

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**ALTERNATIVAS PARA LA INDUCCIÓN DE PARTENOCARPIA EN
MANDARINA “MONTENEGRINA”**

por

Ximena María CHOUZA CASTRO

**TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el Título de
Magister en Ciencias Agrarias
opción Ciencias Vegetales**

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2010**

Tesis aprobada por:

PhD. Gabriela Speroni



PhD. Carlos Mesejo

PhD. Fernando Rivas

Fecha: 11-06-2010

Autor: -----
Ing. Agr. Ximena Chouza

Director: -----
MSc. Alfredo Gravina

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de Bioquímica de Facultad de Agronomía por brindar conocimiento y productos e instrumental para realizar el medio de cultivo in vitro.

Al laboratorio de Genética de Facultad de Agronomía por permitirme utilizar el microscopio de óptico para la observación de cortes de flor con fluorescencia.

A la PhD. Gabriela Speroni y al PhD. Carlos Mesejo por su asesoramiento en la técnica de procesamiento de las flores para observar con fluorescencia.

A la MSc. Alejandra Borges por su asesoramiento continuo en el área estadística.

Al grupo de trabajo de Ecofisiología de Citrus por la colaboración prestada en tareas de campo y laboratorio.

Al Ing. Agr. MSc. Alegre Sasson como dueño y al Sr. Roberto Marrero como encargado de la plantación por poner a nuestra disposición las plantas, la maquinaria y la mano de obra necesaria para las aplicaciones de campo.

Al Ing. Agr. Federico Montes por brindarme información de packing y de campo a cerca de la variedad.

Al INIA y Facultad de Agronomía por el apoyo económico brindado a través de la Beca INIA-UDELAR para cumplir con los estudios de Maestría.

A mis padres por brindarme siempre el apoyo y entusiasmo necesario para afrontar cada reto en mi carrera.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	VI
RESUMEN.....	VIII
SUMMARY.....	IX
<u>1.INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....</u>	<u>1</u>
1.1. REPRODUCCIÓN EN CÍTRICOS.....	2
1.2. POLINIZACIÓN.....	4
1.3. FECUNDACIÓN.....	5
1.4. CUAJADO.....	6
1.5. PARTENOCARPIA.....	11
1.6. OBTENCIÓN DE FRUTOS SIN SEMILLAS.....	13
1.7. INDUCCIÓN DE PARTENOCARPIA.....	14
<u>1.7.1 Inducción de partenocarpia en especies frutales y hortícolas.....</u>	<u>15</u>
1.7.1.1. Fungicidas.....	15
1.7.1.2. Reguladores e inhibidores del desarrollo.....	15
1.7.1.3. Otras sustancias.....	18
<u>1.7.2. Inducción de Partenocarpia en citrus.....</u>	<u>18</u>
1.7.2.1. Sulfato de cobre(CuSO ₄).....	18
1.7.2.2. Ácido giberélico(GA ₃).....	19
1.7.2.3. Ácido naftalenacético (ANA).....	20
1.8. CARACTERÍSTICAS PRODUCTIVAS DE “MONTENEGRINA”.....	21
<u>2.MATERIALES Y MÉTODOS.....</u>	<u>23</u>
2.1.GERMINACIÓN DE POLEN “IN VITRO”.....	23
2.2 INDUCCIÓN DE PARTENOCARPIA EN FLORES INDIVIDUALES.....	25

<u>2.2.1. Estudio del efecto de los tratamientos inductores de partenocarpia sobre la viabilidad de granos de polen y óvulos.....</u>	25
<u>2.2.2. Aplicación de tratamientos inductores de partenocarpia a flores individuales</u>	27
2.3. INDUCCIÓN DE PARTENOCARPIA EN PLANTAS COMPLETAS EN CONDICIONES DE CAMPO.....	28
<u>3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</u>	30
3.1. GERMINACIÓN DE POLEN “IN VITRO”.....	30
3.2.INDUCCIÓN DE PARTENOCARPIA A FLORES INDIVIDUALES	33
<u>3.2.1. Estudio del efecto de los tratamientos inductores de partenocarpia sobre la viabilidad de granos de polen y óvulos.....</u>	33
<u>3.2.2. Aplicación localizada a flores.....</u>	40
3.2.2.1.Cuajado.....	40
3.2.2.2.Tipo de abscisión.....	41
3.2.2.3.Presencia y número de semillas.....	44
3.2.2.4.Crecimiento de fruto.....	47
3.3.INDUCCIÓN DE PARTENOCARPIA CON APLICACIONES A PLANTA COMPLETA EN CONDICIONES DE CAMPO.....	48
<u>3.3.1.Presencia y número de semillas.....</u>	48
<u>3.3.2.Relación entre el número de semillas y diámetro del fruto.....</u>	51
<u>3.3.3.Número de semillas y rendimiento.....</u>	54
4. CONCLUSIONES.....	55
5. BIBLIOGRAFÍA.....	56
6. ANEXOS.....	65
6.1. APLICACIÓN LOCALIZADA A FLORES: TIPO DE ABSCISIÓN Y TAMAÑO DE FRUTO.....	65
6.2. APLICACIÓN A PLANTA COMPLETA EN CONDICIONES DE CAMPO.....	66
6.3 ARTÍCULO CIENTÍFICO. Control de la autopolinización, germinación del polen y crecimiento del tubo polínico en mandarina ‘Montenegrina’	68

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro No.	Página
1. Germinación de polen “in vitro” en porcentaje por tratamiento y en mandarina “Montenegrina”.....	32
2. Número promedio de tubos polínicos germinados en estigma y distancia máxima de estilo recorrida por el tubo polínico más largo (porcentaje) por tratamiento a los 0 , 5 y 10 días post- aplicación en mandarina “Montenegrina”.....	38
3. Número de semillas por fruto, diámetro de fruto (mm), espesor de cáscara (mm), y porcentaje de frutos con semillas por tratamiento en mandarina “Montenegrina” aplicación localizada a flores.....	45
4. Número de semillas verdaderas, abortadas y totales promedio por fruto y diámetro promedio de fruto por tratamiento en mandarina “Montenegrina”. Tratamientos aplicados a planta completa condiciones de campo.....	50
5. Porcentaje de frutos sin semillas y proporción de frutos con 1 a 4 semillas por tratamiento en mandarina “Montenegrina”. Tratamientos aplicados a planta completa en condiciones de campo.....	51
6. Evolución del diámetro de fruto (mm) por tratamiento y condición con y sin poda según días post-aplicación en mandarina “Montenegrina. Tratamientos aplicados a planta completa en condiciones de campo	52

7. Número promedio de frutos por árbol y por tratamiento según condición con poda en mandarina “Montenegrina”. Tratamientos aplicados a planta completa en condiciones de campo.....53

8. Peso medio de fruto según tratamiento y condición de poda en cosecha, mandarina “Montenegrina”. Tratamientos aplicados a planta completa en condiciones de campo.....54

Figura No.

1. Granos de polen en medio de cultivo con distintos tratamientos.....33

2. Tubos polínicos germinados a nivel del estigma y el estilo al día diez post-aplicación en de cortes de flor de mandarina “Montenegrina” observados en microscopio de fluorescencia.....39

3. Evolución del cuajado de fruto por tratamiento según días post antesis en mandarina “Montenegrina”. Tratamientos localizados a flor.....41

4. Evolución del tipo de abscisión de fruto (con y sin pedúnculo) por tratamiento en mandarina “Montenegrina”. Tratamientos localizados a flor.....43

5. Aplicación a flores individuales; estadios de desarrollo de flor, momento de aplicación y semillas promedio por tratamiento.....46

RESUMEN

La mandarina 'Montenegrina' alcanza altos precios debido a sus buenas características organolépticas, facilidad de pelado y un menor número de semillas por fruto que la original, la mandarina común. En los últimos años los consumidores de fruta cítrica fresca han puesto gran énfasis en la ausencia de semillas como un requerimiento de calidad de fruta. La hipótesis de trabajo fue que la aplicación de reguladores de crecimiento y CuSO_4 , inhiben la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico y afectan la viabilidad de los óvulos, reduciendo la presencia de semillas en una variedad autocompatible. Los objetivos de este trabajo fueron: (1) evaluar el efecto de reguladores de crecimiento y sulfato de cobre en la presencia y número de semillas por fruto; (2) y en la biología reproductiva de esta variedad y (3) determinar la efectividad de dichas sustancias en la producción comercial de frutos sin semillas. Se realizaron tres ensayos: 1) Inducción de partenocarpia en flores individuales: a) Aplicación localizada a flores de: GA_3 (100 mgL^{-1}), ANA (200 mgL^{-1}), CuSO_4 (100 mgL^{-1}), $\text{GA}_3 + \text{CuSO}_4$ (100 mgL^{-1} de cada producto) y control. b) Estudio del efecto de los tratamientos sobre la viabilidad de los gametos femeninos y masculinos. 2) Estudio del efecto de los productos sobre la germinación de polen *in vitro*. 3) Inducción de partenocarpia en condiciones de campo: se aplicaron a planta entera CuSO_4 (100 mgL^{-1}) y GA_3 (100 mgL^{-1}) aplicación simple y doble de ambos y control. La aplicación localizada a flor de GA_3 (100 mgL^{-1}) y $\text{GA}_3 + \text{CuSO}_4$ (100 mgL^{-1} c/u) redujo el número de semillas por fruto de 5 a 1 y el porcentaje de frutos con semillas de 100 a 32 y 43 % respectivamente. Todos los tratamientos inhibieron el crecimiento del tubo polínico a los 5 y 10 días post-aplicación y la germinación de polen *in vitro*, con respecto al control. En condiciones de campo la aplicación simple y doble de GA_3 disminuyó el número de semillas promedio por fruto de 9 (control) a 7 (GA_3 aplicación simple y doble) y aumentó el porcentaje de frutos con 1 a 4 semillas de 5% en el control a 21% (GA_3 aplicación simple) y 23% (GA_3 doble aplicación).

Palabras clave: GA_3 , CuSO_4 , semillas, polen, tubo polínico.

SUMMARY

'Montenegrina' mandarin reaches high prices due to its good organoleptic characteristics, easy peeling and lower seed number per fruit than its progenitor, 'Common' mandarin. In the last few years fresh fruit citrus consumers have emphasized on seedlessness as a fruit quality requirement. The hypothesis of this work was that the application of growth regulators and copper sulfate inhibited pollen germination and tube growth and affected ovule viability, resulting in a reduction of the seed number per fruit and in the percentage of seedy fruits of a self-compatible mandarin variety like 'Montenegrina'. The main objectives of this work were: (1) to evaluate the effect of growth regulators and copper sulphate on the presence and number of seeds per fruit; (2) and on the Montenegrina's reproductive biology; and (3) to determine the effectiveness of these products to commercial production of seedless fruit. Three experiments were carried out: 1) Parthenocarpy induction in individual flowers: a) Local flower applications of: GA₃ (100 mgL⁻¹), NAA (200 mgL⁻¹), CuSO₄ (100 mgL⁻¹), GA₃ + CuSO₄ (100 mgL⁻¹ each one) and control. b) Study of the treatments effect on pollen and ovule viability. 2) Study of the products effect on *in vitro* pollen germination. 3) Parthenocarpy induction in field conditions. Application to hole plants of: CuSO₄ (100 mgL⁻¹) and GA₃ (100 mgL⁻¹) simple and double application both and control. GA₃ (100 mgL⁻¹) and GA₃ + CuSO₄ (100 mgL⁻¹ each one) local applications to flowers reduced average seed number per fruit from 5 to 1 and seedless fruit percentage from 100 to 32 and 43 % respectively. An inhibition in pollen tube growth in all treatments, compared to the control was observed at day 5 and 10 after application and also in *in vitro* pollen germination compared to the control. In field conditions GA₃ simple and double applications diminished average seed number per fruit from 9 (control) to 7 (GA₃ simple y double application). These treatments also increased fruit percentage with 1 to 4 seeds from 5% (control) to 21% (GA₃ simple application) and 23% (GA₃ double application).

Key words: GA₃, CuSO₄, seeds, pollen, pollen tube.

1.INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La producción de citrus se sitúa en zonas tropicales y templadas, siendo en estas últimas donde se produce fruta de mayor calidad (Spiegel-Roy and Goldschmidt, 1996). En Uruguay el objetivo de la producción citrícola es la exportación como fruta para consumo en fresco (DIEA, 2008). La composición varietal de nuestra industria citrícola permite una oferta de fruta de mesa durante un período mayor a 7 meses como producción a contra estación destinándose principalmente al mercado de la Unión Europea (Gravina, 1999). La producción promedio de mandarinas en los últimos tres años ha sido de 31 % del total de cítricos producidos en el país, con un 45% promedio de fruta exportada. La producción y exportación de mandarinas se ha ido incrementando en los últimos años por la demanda de los mercados destino. Dentro de las variedades de esta especie, Montenegrina ocupa el sexto puesto en producción y número de plantas (DIEA, 2008).

En los últimos años los consumidores de fruta cítrica fresca han puesto gran énfasis en la ausencia de semillas como un requerimiento de calidad de fruta. La definición de “frutos sin semillas” ha ido cambiando con el tiempo. En los años 80 se definía comercialmente como aquellos frutos que presentaban menos de 5 semillas. Se considera que este concepto es subjetivo y dependiente de las expectativas del consumidor y de la demanda del mercado en un momento determinado (Barry, 2004).

Los cultivares con semillas son aceptados sólo si los cultivares sin semillas no están presentes o si los primeros son marcadamente mejores en características de fruto que los últimos (Raza, *et al.*, 2003). Por tanto el concepto de frutos sin semillas o “seedlessness” contempla la capacidad de un cultivar de producir frutos sin semillas o con un número mucho más reducido de ellas.

1.1. REPRODUCCIÓN EN CÍTRICOS

La producción de frutos requiere de una secuencia de procesos que comienza con la floración. La primera etapa de la floración es la inducción, seguida de la diferenciación (pasaje de yema vegetativa a reproductiva), la maduración de los órganos de la flor, que culmina en la antesis. La inducción floral está regulada por las bajas temperaturas en climas subtropicales y por el estrés hídrico en climas tropicales (Agustí, 2003).

Existen factores endógenos que afectan la floración, siendo el principal la carga de fruta del ciclo anterior especialmente en variedades autofecundas. En dichas variedades ocurre un comportamiento alternante observándose que a años de alta producción de fruta le siguen años de baja producción. La presencia de frutos en la planta provoca una fuerte inhibición de la floración lo cual puede estar determinado por varios factores. Esos factores son el balance de carbohidratos y las alteraciones metabólicas de la nutrición nitrogenada ambas afectadas negativamente por alta carga de fruta. Otro factor es la alteración del balance hormonal por mayor síntesis de giberelinas de frutos lo cual inhibe la floración siguiente. Por último la interacción hormonal y nutricional que implica que el fruto no sólo sea un sumidero de reservas sino a la vez una fuente de producción de giberelinas lo cual conjuntamente provoca la inhibición de la floración (Agustí, 2003).

Del mismo modo que la presencia del fruto inhibe la floración, en años de baja carga la ausencia de frutos provoca alta intensidad de floración asociada con cambios en la distribución de la brotación en la primavera siguiente. En condiciones de alta intensidad de floración predominan brotes uniflorales sin hojas y multibrotes como se ha observado en variedades autofecundas con comportamiento alternante (Gambetta, *et al.*, 2008).

Al proceso de inducción le sigue la diferenciación de la yema floral que conduce al desarrollo de los distintos órganos de flor. Una vez completado el desarrollo de dichos órganos el proceso culmina con la antesis, donde los pétalos abren para que sea posible la polinización y fertilización que dará origen al fruto (Tadeo, *et al.*, 2003).

Previo a la antesis se desarrollan los distintos órganos de la flor y se comienzan a formar los gametos femeninos y masculinos.

La microesporogénesis, que dará origen a los gametos masculinos comienza en etapas tempranas del desarrollo de la antera. Dentro de la antera las células arqueosporicas se diferencian del resto y se dividen periclinalmente para producir células parietales, formando una capa externa y células esporógenas formando una capa interna. La capa más interna de células parietales forman el tapete y el resto forman la pared del saco polínico. Mientras el polen madura las células del tapete se desintegran para alimentar a los granos de polen. Las células madres de las micrósporas se dividen por meiosis y forman la tétrada de micrósporas. Cada micróspora está cubierta por dos capas, intina y exina. Previo a la antesis de la antera, el núcleo del grano de polen se divide en dos, uno vegetativo y otro generativo que dará origen a los gametos masculinos. Mientras el polen madura las células del tapete se desintegran para alimentar a los granos de polen. Existen casos en que el polen no es viable y es de color más claro así como las anteras que son de color pálido y nunca abren. Cuando el polen está maduro colapsan los dos sacos polínicos de cada teca de la antera y su apertura se produce longitudinalmente entre ambas (Frost y Soost, 1968, Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996).

Al mismo tiempo se forman las megásporas través del proceso de megasporogénesis. Dicho proceso se inicia con la diferenciación de la célula arqueosporica del resto del tejido nucelar, la que se divide una sola vez. La célula exterior es la célula del tapete y la interior es la célula madre del saco embrionario de megásporas. Esta última se rodea de tejido cerca del centro del nucelo. En *Citrus*

ocasionalmente se puede formar más de una célula madre del saco embrionario de megásporas en el óvulo. La célula madre del saco embrionario de megásporas crece varias veces su tamaño y se divide por meiosis para formar cuatro células en hilera (megásporas) de las cuales sólo una se desarrolla para formar el saco embrionario. En la célula se forman grandes vacuolas y por división se forman ocho núcleos dos de los cuales denominados núcleos polares, migran al centro y forman la célula media. Tres de los núcleos se quedan en el polo chalazal y forman las células antipodales y los otros tres núcleos forman las células sinérgidas contra la micrópila y la oosfera por debajo de estas dos. En este momento el saco embrionario está pronto para la fecundación (Frost y Soost, 1968, Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996, Jackson and Futch, 1986).

El desarrollo las micrósporas comienza antes de que la megaspora pase la profase de la primera división. Al momento de apertura de la flor el saco embrionario está inmaduro en la etapa de ocho núcleos o previa. La antesis, que comienza con la apertura de pétalos es una respuesta de crecimiento que está regulada por auxinas. Al momento de apertura de la flor se produce la apertura de las anteras. La secreción estigmática que es síntoma de receptividad estigmática, dura tres días a partir de antesis y hasta la abscisión o el cuajado de la flor (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996).

1.2. POLINIZACIÓN

La polinización consiste en la transferencia de polen desde las anteras al estigma. En *Citrus*, el polen es pegajoso y adherente lo que determina que exista como adaptación a la polinización biótica a través de insectos. Las flores de cítricos son atractivas para los insectos debido a la abundante producción de polen, néctar, aroma típico y a la presencia de corola conspicua. Existen muchos visitantes de la flor de citrus tales como trips y ácaros pero el agente principal de polinización son las abejas (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996).

En el momento de la antesis el estigma es receptivo a los granos de polen que han madurado; la duración del período de receptividad estigmático depende de la especie y de la variedad (Tadeo, *et al.*, 2003). En *Citrus* se observó que el período de polinización efectiva (tiempo durante el cual la flor es capaz de transformarse a fruto sin que la polinización sea limitante según Williams (1965) depende de la variedad ya sea en función de la longevidad del óvulo en mandarina Satsuma, donde el PPE dura de dos a tres días o en función de la receptividad estigmática como en mandarina “Clemenules” y en naranja “Valencia” que puede durar ocho a nueve días (Mesejo *et al.*, 2007). La temperatura es otro factor que afecta el PPE influyendo en la tasa de crecimiento del tubo polínico, la viabilidad del óvulo y del polen, la receptividad estigmática, y la actividad de las abejas (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996).

En variedades de cítricos autocompatibles, la autopolinización puede producirse por contacto directo de las anteras con el estigma, por efecto del viento o por medio de insectos polinizadores (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996, Tadeo *et al.*, 2003). En el primer caso, las anteras se rompen o alcanzan la dehiscencia antes de la antesis, denominándose este proceso como cleistogamia. Las abejas, sin embargo, son los primeros agentes responsables de la polinización cruzada en variedades autoincompatibles (Tadeo *et al.*, 2003).

1.3. FECUNDACIÓN

Una vez que el grano de polen llega al estigma, se hidrata gracias a las secreciones de éste y germina emitiendo una prolongación de la pared celular del tubo polínico. En el ápice del tubo polínico se encuentra el citoplasma vegetativo con tres núcleos: el núcleo vegetativo que domina las funciones tróficas del tubo polínico y dos núcleos generativos gaméticos que se fusionarán, respectivamente, con la oosfera para formar el cigoto y con los dos núcleos polares para formar el endospermo (Frost y Soost, 1968, Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996, Tadeo *et al.*, 2003). El tubo polínico penetra en el estigma y desciende por el estilo hasta alcanzar los lóculos del ovario. Esto puede

hacerlo siguiendo el camino marcado por los canales estilares o a través de los espacios intercelulares de las células corticales. Este último camino es más tortuoso y exige cambios constantes en la dirección de crecimiento del tubo polínico que están marcados por una fuerte deposición de calosa. Ya en los lóculos, los tubos polínicos alcanzan la nucela del óvulo a través del micrópilo y contactan con el saco embrionario, produciéndose la fecundación. La fecundación conduce a la formación de la semilla que en algunas variedades es indispensable para que el fruto cuaje y se desarrolle (Tadeo *et al.*, 2003).

En condiciones favorables la fecundación ocurre dos o tres días posteriores a la polinización pero en algunos casos puede demorar hasta tres o cuatro semanas. Luego de la fecundación comienza la formación del endosperma y posteriormente la del embrión (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996).

Luego de la fecundación, pasa una semana para que el fruto presente síntomas de cuajado debido a la senescencia de pétalos y anteras que además caen y la presencia de un anillo de color marrón entre el estilo y el ovario en flores persistentes. La abscisión del estilo demora alrededor de siete a diez días y es el último evento en la transición de flor a fruto (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996).

Existen variantes al proceso de polinización y fecundación que conducen tanto a formar embriones como a formar frutos y en cítricos suceden con bastante frecuencia. Como ejemplos pueden citarse la formación de embriones nucelares y la producción de frutos sin semillas o partenocarpicos.

1.4. CUAJADO

El cuajado en los frutos se define en sentido estricto como el reinicio del crecimiento del ovario, posterior a la antesis y en sentido amplio como el período de crecimiento durante el cual el fruto puede sufrir abscisión (Talón, 1997). Este proceso puede ser consecuencia de la polinización y fecundación o sólo de la polinización que

actúa como estímulo para que se reinicie el crecimiento del ovario generándose frutos partenocárpicos (Gravina, 1999).

El cuajado está determinado por el proceso de abscisión, el cual está regulado por distintos factores: uno es el factor genético que determina el número inicial de frutos que van a formarse, otro es el hormonal que determina el crecimiento y desarrollo de los frutos y por último la disponibilidad de nutrientes. El ambiente puede llegar a supeditar los factores anteriores y por tanto limitar el cuajado (Talón, 1997).

En cuanto a los factores genéticos que determinan o limitan el cuajado en citrus existen dos que son los más importantes; uno es la autoincompatibilidad y otro el período de polinización efectiva.

En la autoincompatibilidad, existen dos tipos de mecanismos a nivel gamético genético: esporofítico y gametofítico. El primero se caracteriza por la inhibición de la germinación de polen y el segundo está controlado genéticamente y hace que el crecimiento del tubo polínico se vea interrumpido. Esto puede estar causado por la presencia de inhibidores o falta de promotores a nivel del estilo (Jackson and Futch 1986). La incompatibilidad esporofítica está regulada por el genoma parental del esporofito mientras que la gametofítica está regulada por el genoma del gametofito por sí mismo. La incompatibilidad gametofítica está genéticamente controlada por el genoma haploide de cada grano de polen y el genoma diploide del tejido del pistilo. Pueden existir tres variantes: controlada por un locus multialélico S, dos loci multialélicos S y Z o por tres o más loci multialélicos. En el sistema de incompatibilidad esporofítica la reacción del polen es determinada por el genoma del tejido somático del esporofito en el cual el polen se desarrolló (tapete) y se expresa sobre la capa externa del grano de polen o exina la cual entra en contacto con el pistilo. En dicho caso se suele dividir la incompatibilidad esporofítica en heteromórfica y homomórfica. En la incompatibilidad heteromórfica las bases genéticas del mecanismo están asociadas a distintas morfologías florales dentro de la especie, determinadas por alturas diferenciales

de androceo y gineceo y se denomina heterostilia. En el caso de la homomórfica, la reacción del polen es determinada por el genotipo del tejido esporofítico en el cual fue formado y es controlado por dos alelos de locus S. Todo el polen tiene la misma reacción de incompatibilidad y los alelos puede reaccionar independiente o dominantemente y difieren en el pistilo y en el polen; siendo idénticos los alelos activos, se produce incompatibilidad (Frankel y Galum, 1977).

El período de polinización efectiva (PPE) se define como el tiempo durante el cual la flor es capaz de transformarse a fruto sin que la polinización sea limitante (Williams, 1965). En *Citrus* el PPE es de 3 días pre antesis hasta 8 días pos-tantesis dependiendo de la especie o variedad (Tadeo *et al.*, 2003). El PPE es un factor condicionante del cuajado y depende de la receptividad estigmática, de la cinética del polen y del desarrollo del óvulo, así como de factores ambientales que pueden estar afectando a los anteriores (Sanzol y Herrero, 2001). Es así como la temperatura demostró afectar la receptividad estigmática, al aumentar la primera se redujo la segunda y viceversa.

Los parámetros de cinética de polen más afectados fueron la germinación y penetración de polen y en menor medida la adhesión en cerezo (Hedhly *et al.*, 2003). La temperatura también afectó la receptividad estigmática, al aumentar la primera se redujo el período de receptividad y viceversa (Hedhly *et al.*, 2003).

La receptividad floral o tiempo durante el cual la flor se encuentra funcionalmente activa es genéticamente dependiente ya sea de la longevidad del óvulo o de la receptividad estigmática. A mayor longevidad, la viabilidad y capacidad del óvulo de guiar a los tubos polínicos disminuye.

La receptividad estigmática es el principal factor de la duración del PPE en variedades con gametos viables, ya que cuando comienza la senescencia del estigma (previo a antesis) en el caso de variedades estériles como satsuma se produce una deposición de lignina que evita la penetración del tubo polínico a través del mismo,

evitando la llegada al óvulo. La edad del pistilo afecta también la germinación y crecimiento del tubo polínico y varía según la especie y la variedad (Mesejo *et al.*, 2007).

Los factores ambientales determinantes del cuajado son la temperatura y la humedad. Se consideran temperaturas favorables para la fecundación entre 15 y 20 ° C, en tanto que temperaturas inferiores a 13° C dificultan el desarrollo del tubo polínico. Durante el período posterior a la fecundación y hasta el fin de la caída fisiológica, el aumento térmico provoca incrementos en la abscisión, siendo los cambios bruscos de temperatura aún más importantes en la promoción de la misma. La humedad relativa y del suelo afecta el cuajado, es así como humedades relativas bajas acompañadas de bajas temperaturas promueven la caída de frutitos en desarrollo. En condiciones de alta transpiración que no puede ser repuesta con facilidad por el estado hídrico de la planta se produce un aumento en la abscisión de frutitos que conlleva a una pérdida de cosecha (Agustí, 2003).

Entre los factores hormonales que afectan el cuajado, las giberelinas y las citoquininas son generalmente consideradas como reguladores positivos del crecimiento de fruto, mientras que las auxinas presentan efectos contradictorios, estimulando el crecimiento en las primeras etapas de desarrollo del fruto y luego pasan a ser agentes de abscisión, estimulando la síntesis de etileno (Iglesias *et al.*, 2007).

Las otras dos hormonas que actúan regulando este proceso son el ácido abscísico (ABA) promoviendo directamente la abscisión a través de la síntesis de enzimas hidrolíticas e indirectamente a través de la inducción de la síntesis de etileno a través de su precursor el ACC (Talón, 1997).

Las giberelinas están involucradas en el cuajado y desarrollo de frutos existiendo suficientes evidencias; en variedades con semilla no existen problemas de cuajado debido a que son éstas uno de los principales lugares de síntesis de giberelinas, hormonas responsables del desarrollo del ovario.

En variedades sin semilla con alta capacidad partenocarpica, son las paredes del ovario las que sustituyen la función de las semillas en el desarrollo del fruto ya sea por ser lugar de síntesis o de recepción de factores reguladores del desarrollo (Agustí, 2003). En variedades con semillas y variedades sin semillas con alta capacidad de partenocarpia los altos niveles de giberelinas hacen posible que no existan problemas de cuajado. En variedades autoincompatibles en condiciones de monocultivo (en ausencia de polinización cruzada) se logra producir fruta sin semilla, muchas veces con baja productividad (Jackson and Futch, 1986). Esto último se debe a que son variedades con bajos niveles de giberelinas lo cual limita el cuajado y por tanto la producción (Talón *et al.*, 1990).

La disponibilidad de carbohidratos es otro de los factores importantes que influyen sobre el cuajado y determinan la periodicidad e intensidad de la abscisión (Moss, 1972). Una evidencia de ello es el efecto que logra la práctica del anillado aplicada en *Citrus*, justo después de anthesis a un cultivar de bajo cuajado y aplicado en plena abscisión de frutitos en un cultivar de alto cuajado. En ambas situaciones el anillado logra aumentar el cuajado de ambos cultivares, independiente de su capacidad para cuajar; mediante el aumento de la disponibilidad de carbohidratos (Rivas *et al.*, 2006).

En el caso de los citrus existen otros factores asociados a la disponibilidad de carbohidratos que afectan el cuajado. Uno de esos factores es la presencia de hojas en el brote, que tiene como efecto un mayor desarrollo vascular de los tejidos brindando mayor flujo xilémico de agua y nutrientes (Erner *et al.*, 2000). Brotes con hojas aportan un 85% de los frutos a cosecha y el restante 15% proviene de brotes sin hojas. Una posible explicación es que los brotes con hojas son los que aparecen más tarde en la estación por lo que se desarrollan en presencia de mayor temperatura ambiente logrando así una mayor tasa de crecimiento y además un mayor tamaño del ovario (Lovatt y Streeter, 1984). Durante la primera fase de crecimiento del fruto, cuando se

determina el número de frutos que permanecerá en la planta la presencia de hojas limita la abscisión e incrementa el cuajado final. (Da Cunha Barros y Gravina, 2006).

1.5. PARTENOCARPIA

La producción de frutos sin semillas se denomina partenocarpia (Frost y Soost, 1968) y puede adoptar diferentes formas dependiendo del momento en el cual el desarrollo de la semilla es interrumpido (Varoquax *et al.*, 2000).

La partenocarpia puede clasificarse en obligada y estimulativa, entendiéndose la primera como el cuajado sin ningún estímulo externo. La tendencia partenocárpica y la esterilidad del óvulo pueden variar independientemente. La capacidad partenocárpica de las variedades está relacionada con los diferentes tipos de esterilidad gamética que se pueden producir. En variedades con partenocarpia obligada, ésta se relaciona a la esterilidad gamética absoluta, tanto masculina (incapacidad para producir polen funcional), como femenina (incapacidad para producir sacos embrionarios). De la primera existen muchos ejemplos tales como el naranjo “Washington Navel” y el mandarino “Satsuma”. La esterilidad gamética femenina absoluta no es muy común en los *Citrus* aunque existen variedades en donde la mayoría de óvulos que producen están desprovistos de saco embrionario, como el mandarino “Satsuma”, los naranjos dulces “Washington Navel” y “Valencia”, los pomelos “Ruby” y “Duncan” y los limones “Lisbon” y “Eureka”.

En todos ellos excepto en “Lisbon”, el grado de formación de embriones no sexuales en los óvulos, denominado embriogénesis adventicia o nucelar, es elevado (Tadeo *et al.*, 2003).

Se define partenocarpia estimulativa como aquella que necesita de algún tipo de estímulo para la producción de frutos. En este caso los estímulos pueden ser la polinización, la germinación del polen, o el crecimiento del tubo polínico sin la presencia de la fecundación. Muchas veces la fertilidad del óvulo y la presencia de polen

compatible enmascara la partenocarpia estimulativa (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996). Es el caso de las denominadas variedades partenocárpicas facultativas en condiciones de monocultivo, pueden formar frutos sin semillas, es el caso de mandarina “Ellendale” (Vithanage, 1991) y de la mandarina “Clementina de Nules” (Soler Aznar, 1999), mientras que dichas variedades autoincompatibles en condiciones de polinización cruzada con presencia de polen compatible producen semillas (Spiegel-Roy and Goldschmidt, 1996).

La partenocarpia estimulativa está relacionada a la esterilidad gamética relativa, la cual representa tanto la autoincompatibilidad gamética o incapacidad de producir embriones por autopolinización, aunque los gametos sean perfectamente viables, como la incompatibilidad cruzada o incapacidad para formar gametos por polinización cruzada. En cualquiera de los casos, el grano de polen germina al entrar en contacto con el exudado del estigma y comienza el crecimiento del tubo polínico, sin embargo este no progresa más allá de las papilas estigmáticas y morfológicamente, presenta deposiciones irregulares de calosa (Tadeo *et al.*, 2003).

En algunos casos existe la stenospermocarpia que es la fecundación seguida de un aborto post-zigótico que resulta también en la producción de frutos sin semillas. (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996)

Resultados recientes de cruzamientos utilizando mandarino “Satsuma” como progenitor femenino y polen de otras variedades de Citrus como progenitor masculino hacen plantear la hipótesis de que la partenocarpia en esta variedad estuviera codificada por al menos dos genes complementarios dominantes siendo heterocigota para ambos genes (Vardi *et al.*, 2008).

1.6. OBTENCIÓN DE FRUTOS SIN SEMILLAS

La producción de frutos sin semillas ha sido de gran interés tanto para el mejoramiento genético como para el manejo fisiológico-reproductivo. Los métodos de mejoramiento genético utilizados con este objetivo se pueden resumir en:

i) la mutágenesis inducida por radiación o agentes químicos, que permite aumentar la frecuencia de mutaciones espontáneas en plantas con propagación vegetativa y la obtención de triploides (Raza *et al.*, 2003, Vardi *et al.*, 2008). Un ejemplo más reciente fue la utilización de radiación para producir frutos partenocárpicos en pummelo “Tosa-Buntan” naturalmente auto-estéril y sin capacidad partenocarpica, mediante la polinización cruzada con polen irradiado de otra variedad cítrica (Hyuga-natsu) que produjo el aborto de semillas (Ogata *et al.*, 2008).

ii) métodos que utilizan la recombinación sexual: cruzamiento de diploides con tetraploides ($2n \times 4n$), cruzamiento de tetraploides con diploides ($4n \times 2n$) y triploides espontáneos. Recientemente ha surgido otra forma de obtener triploides como lo es el cultivo de endosperma. El endosperma es un tejido único, pues resulta de la fusión de tres núcleos haploides, dos núcleos polares y un núcleo del polen y por tanto es triploide. Con el desarrollo de técnicas de cultivo de tejidos “in vitro” fue posible obtener embriogénesis a partir de cultivo de tejido de endosperma y así producir a partir de este último plantas triploides, sin semillas (Raza *et al.*, 2003).

iii) métodos biotecnológicos que son independientes de la recombinación sexual. Las técnicas convencionales de mejoramiento han tenido muchas dificultades en la producción de triploides, dado por complicaciones reproductivas de la planta.

Para levantar dichas restricciones, últimamente han surgido nuevas técnicas de mejoramiento:

-Hibridación somática vía fusión de protoplastos y desarrollo de cyhíbridos: forma más importante de producción de triploides (Raza *et al.*, 2003).

Grosser *et al.* (2000), reportaron la obtención de híbridos sin semillas mediante fusión somática combinando suspensiones de protoplastos embriogénicos de mandarina Satsuma (cultivar andro estéril) con protoplastos de otras variedades con semillas (mandarina “Murcott”, híbrido “Orie Lee”, mandarina “Sunburst”, etc). Esto fue posible gracias a que la andro esterilidad citoplasmática es controlada por el genoma mitocondrial y este control fue transmitido por los protoplastos embriogénicos de la mandarina “Satsuma” (Raza *et al.*, 2003, Vardi *et al.*, 2008).

-Generación de plantas transgénicas: mediante el desarrollo de protocolos eficientes para la transformación de diversos genotipos y la introducción en citrus de genes de potencial interés agronómico (Navarro *et al.*, 2004).

Un ejemplo de lo anterior es la producción de transgénicos de lima: plantas conteniendo genes para la reducción de producción de semillas, a través de inoculación con *Agrobacterium* conteniendo los genes de interés en su plásmido T. Los posibles transformantes fueron identificados y se propagaron las líneas seleccionadas (Koltunow *et al.*, 1995). Li *et al.* (2002) reportaron aborto de embriones produciendo stenoespermiocarpia y resultando en la producción de frutos sin semillas en mandarina “Ponkan” transformada con genes suicidas barnasa.

1.7. INDUCCIÓN DE PARTENOCARPIA

Otra vía de producción de frutos sin semillas es mediante la aplicación de sustancias químicas, ya sea reguladores, inhibidores del desarrollo u otras. La inducción de partenocarpia, ha sido reportada como una práctica de potencial valor comercial en diferentes cultivos, ya que permite eliminar o disminuir la presencia de semillas sin disminuir la productividad y calidad de frutos.

1.7.1 Inducción de partenocarpia en especies frutales y hortícolas

1.7.1.1. Fungicidas

Los fungicidas han sido reportados como inhibidores de la germinación de polen y del crecimiento del tubo polínico en diversas especies como melón (*Cucumis melo* L.) y “Cranberry” (*Vaccinium macrocarpon* Ait.). En esta última especie la aplicación de fungicidas como captan, triforine e hidróxido de cobre en floración inhibieron la germinación de polen sin afectar el cuajado de las bayas ni el rendimiento (Bristow y Shawa, 1981). Elezaby y Hasseeb (1995) reportan los mismos resultados con la aplicación de fungicidas en distintas variedades de manzano.

1.7.1.2. Reguladores e inhibidores del desarrollo

Las semillas son órganos con alta capacidad de síntesis hormonal, especialmente de giberelinas que incrementan la capacidad fosa de los frutos jóvenes. La polinización, sería la responsable del cuajado inicial de frutos, a través del estímulo de la síntesis de giberelinas; de acuerdo a Ben-Cheikh *et al.* (1997) flores emasculadas abscisionan en un 99% mientras que las intactas, sólo lo hacen en un 50%; la aplicación exógena de ácido giberélico (GA₃) en pre-antesis de naranja “Pineapple”, logra sustituir el estímulo del polen en flores emasculadas.

En vid, el GA₃ aplicado en pre y post-antesis (Fellman *et al.*, 1991; Lu *et al.*, 1997; Shiozaki *et al.*, 1998) ha resultado el producto más eficiente en inducir partenocarpia aunque con variaciones de acuerdo a la concentración, momento de aplicación, estado de desarrollo de las flores y condiciones climáticas.

En manzano “Cox’s Orange Pippin” la aplicación de una mezcla de GA₃, BAP y ácido naftoxiacético 2 semanas post caída de pétalos indujo partenocarpia sin disminución del tamaño de frutos (Kotob y Schwabe, 1971).

En “Cloudberry” (*Rubus chamaemorus* L.), una especie del grupo de los frutos del bosque o pequeños frutos, la aplicación en floración de GA₁, GA₃, GA₄ y dimetil-GA₄ que son giberelinas 3β hidroxiladas, indujeron desarrollo partenocárpico efectivo. Si bien el tamaño de baya fue menor, no hubo cambios en la maduración y en el color de las mismas (Juntilla *et al.*, 2002). Esto coincide con lo evidenciado anteriormente en la variedad de arándano “Highbush” donde la aplicación de giberelinas en floración estimuló el cuajado y desarrollo de frutos partenocárpicos (Mainland y Eck, 1968).

El modo de acción de las giberelinas como inductoras de partenocarpia no ha sido dilucidado. En vid se ha propuesto que las aplicaciones pre-antesis actuarían matando los óvulos y las post-antesis estimulando el crecimiento posterior de los frutitos sin semilla (Motomura e Ito, 1972). Fellman *et al.* (1991), proponen un ‘desarrollo incongruente’ entre el pistilo y el saco embrionario, por un desarrollo acelerado del primero y sin cambios en el segundo lo que resulta en la falla en la formación de semillas. Kimura *et al.* (1996) trabajando en la variedad de vid “Muscat Bailey”, plantean que el efecto de la aplicación de giberelinas entre 9 y 14 días pre-antesis inhibe el crecimiento del tubo polínico en el pistilo, no penetrando más allá del estilo. También encuentran una disminución del número de óvulos con potencial de ser fertilizados. El 80% de los óvulos presentan sacos embrionarios sin fusión de los núcleos polares o se encuentran en un estado de desarrollo muy inicial.

Las auxinas han demostrado ser promotoras de partenocarpia en varias especies. El ácido indolacético se encontró en estrecha relación con el nivel de partenocarpia en pepino (*Cucumis sativus*), mientras que la aplicación exógena de ANA y GA₃ aumentaron los niveles endógenos del ácido indolacético favoreciendo el cuajado de frutos partenocárpicos (Kim *et al.*, 1992). En la variedad de arándano “Highbush”, Mainland y Eck (1968) reportaron aumento del cuajado de frutos partenocárpicos pero con reducción del tamaño de bayas con respecto al testigo con la aplicación de 2,4,5-T(ácido trichlorofenoxyacetico). A pesar de que no se conoce el modo de acción de las auxinas se ha observado que a nivel “in vitro” existió un efecto inhibitor del crecimiento

del tubo polínico con aplicaciones de 200 mgL^{-1} de ácido indolacético en cebolla (Kwan *et al.*, 1969).

El ácido jasmónico es otro producto que ha demostrado ser inductor de partenocarpia en algunas especies como la frutilla, inhibiendo la germinación del polen. Una dosis de 0.5 mM redujo la germinación de los granos de polen desde 42.5 a 5.8% con respecto al testigo (Yildiz y Yilmaz, 2002). En vid la combinación de ácido jasmónico y giberelina produjo el mayor porcentaje de bayas sin semillas aplicado seis días antes de plena floración.

El porcentaje de frutos sin semilla aumentó significativamente al incrementar la concentración de ácido jasmónico sin afectar la calidad de baya y sin producir toxicidad a altas concentraciones. Al igual que en frutilla el ácido jasmónico actúa como inhibidor tanto de la germinación del polen como del crecimiento del tubo polínico.

Cuanto mayor es la fertilidad del polen más difícil es inducir partenocarpia por aplicación de giberelinas, por lo que aplicaciones de esta hormona con inhibidores de la germinación del polen y del crecimiento del tubo polínico como el ácido jasmónico pueden aumentar la proporción de frutos sin semillas en cultivares que no responden a la aplicación de giberelinas. La combinación de estas dos sustancias actúa disminuyendo la germinación del tubo polínico y esta disminución es cuadrática en función del aumento de la concentración del ácido jasmónico (Shiozaki *et al.*, 1998).

Recientemente la aplicación de Paclobutrazol, un inhibidor de la síntesis de giberelina, ha resultado efectivo como inhibidor del desarrollo de óvulos fecundados, observándose mediante fluorescencia la deposición de calosa que demuestra dicho efecto. Además presentó efecto reductor del tamaño de semilla de un 13% en cosecha (Mesejo *et al.*, 2008).

1.7.1.3. Otras sustancias

Se ha demostrado la capacidad de varios productos de controlar la fertilización o inducir partenocarpia. Uno de ellos es la enzima ARNasa B1 purificada de *Aspergillus Níger B-1* eficiente en controlar la fertilización en especies frutales. Esta enzima aplicada en almendro, nectarino y mandarina “Murcott” presentó dos efectos, inhibiendo la germinación del polen y generando tubos polínicos cortos y desorientados que fracasaron en la penetración del estilo. Al mismo tiempo se observó necrosis de tejido embrionario (Roiz *et al.*, 2000).

1.7.2. Inducción de Partenocarpia en Citrus

1.7.2.1. Sulfato de cobre (CuSO₄)

Recientemente, Mesejo *et al.* (2006) obtuvieron resultados positivos con el uso de sulfato de cobre para inducir partenocarpia en diferentes cultivares de citrus. A nivel “in vitro”, aplicaciones de 25mg L⁻¹ de CuSO₄ inhibieron la germinación del polen, y aplicado 8 horas después de la germinación, el desarrollo del tubo polínico se detuvo. Aplicaciones a botón floral (25mgL⁻¹) previo a polinización en mandarina “Clemenules”, no solo frenaron el desarrollo del tubo polínico sino que redujeron en 96% el número promedio de semillas por fruto. Las aplicaciones a planta entera en plena floración (60% flor abierta) con 25mg L⁻¹ en tangor “Afourer” bajo condiciones de polinización cruzada, disminuyeron significativamente el número promedio de semillas por fruto (en un 55% en el primer año y un 81% en el segundo año) y aumentaron en forma significativa el porcentaje de frutos sin semillas sin reducir el rendimiento. Existe muy poca información de qué efecto producen los compuestos de cobre sobre el polen para que se inhiba el crecimiento y desarrollo del tubo polínico, aunque se ha reportado que el cobre como metal pesado, produjo un abultamiento del extremo anterior del tubo polínico debido a la organización anormal de las fibrillas de la pared celular, lo cual resultó en la detención de su crecimiento (Sawidis y Reiss 1995).

1.7.2.2. Ácido giberélico (GA₃)

En citrus, existe evidencia del efecto de las giberelinas como inhibidoras del desarrollo de semillas en fruto. Tominaga (1997) aplicando 200 mg L⁻¹ de GA₃ en antesis en mandarina “Ponkan” con el objetivo de incrementar el cuajado, reportó como un resultado secundario, una disminución significativa del número de semillas en frutos de tamaño medio o pequeño, pero no en frutos grandes.

Feinstein et al (1975) con aplicaciones de 20 mgL⁻¹ de GA₃ reporta una reducción en el número de semillas desarrolladas y no desarrolladas en mandarina “Dancy” y en mandarina “Temple”, disminuyendo el número de frutos cosechados y el peso de los mismos.

En “Murcott” variedad de mandarina autocompatible con una dosis de 100 mgL⁻¹ de GA₃ aplicada a planta entera en plena floración, se logró una reducción de 30% de las semillas totales sin afectar el tamaño ni el contenido de sólidos solubles de los frutos (Domínguez y Rodríguez, 2007).

Resultados recientes demuestran que con la aplicación de 200 mgL⁻¹ de GA₃ se logra reducir significativamente el número de semillas por fruto en una variedad autoincompatible como el pummelo “Chandler”. La aplicación doble fue más efectiva que la simple, la primera en plena floración y el segunda dos semanas posteriores (Erner et al., 2008).

Existe por lo tanto una amplia variación en la respuesta de diferentes variedades al GA₃, tanto en la disminución del número de semillas formadas, como en el cuajado y desarrollo de los frutos.

Mesejo et al. (2008) con la aplicación de 10mgL⁻¹ de GA₃ próximo a la antesis en mandarina “Clemenules” (*Citrus clementina* Hort ex Tan.) confirma el efecto desincronizante de esta sustancia sobre la fertilización, en condiciones de polinización cruzada.

La aplicación de GA₃ promueve el aborto de óvulos así como la reducción del crecimiento del tubo polínico. Todos los momentos de aplicación cercanos a anthesis produjeron frutos sin semillas, siendo los más efectivos aquellos en los cuales la aplicación fue más temprana.

1.7.2.3. Ácido naftalenacético (ANA)

En citrus el uso de auxinas de síntesis ha tenido efecto en la reducción del número de semillas. Aplicaciones de 150 mgL⁻¹ de ANA a planta entera tanto en inicio de floración como en frutitos recién cuajados, provocaron una disminución significativa del número de semillas que alcanzó al 28% en mandarina “Dancy” y 18% en mandarina “Temple” así como un aumento del número de semillas abortadas (Feinstein *et al.*, 1975).

En “Ortanique” y “Temple” aplicando la misma dosis de ANA se obtuvo reducción significativa (27%) en el número de semillas, pero se verificó una reducción del tamaño de fruto, la cual fue más severa en aplicaciones tempranas a frutitos recién cuajados (Lewin y Monselise, 1976).

Recientemente Domínguez y Rodrigues (2007) reportan resultados coincidentes con los de Feinstein *et al.* (1975) con la aplicación de ANA a 100, 150 y 200mgL⁻¹. Las aplicaciones realizadas a planta entera en la mandarina autocompatible “Murcott”, lograron reducir un 30% del total de semillas viables en relación al testigo. No existió reducción en el tamaño o peso de los frutos ni tampoco hubo efecto en el número de semillas no viables o sobre el contenido de sólidos solubles.

En pummelo “Chandler” (autoincompatible) los resultados coinciden con los anteriores. Aplicaciones de 150 mgL⁻¹ de ANA a planta entera lograron reducir significativamente el número de semillas por fruto, siendo la aplicación doble la más efectiva (Erner *et al.*, 2008).

El modo de acción de las auxinas no está completamente dilucidado pero existe evidencia de aborto de embriones por aplicación de ANA a dosis de 300 y 450 mgL⁻¹ en mandarina “Temple” y “Ortanique” (Lewin y Monselise, 1976).

1.8 CARACTERÍSTICAS PRODUCTIVAS DE “MONTENEGRINA”

“Montenegrina” es una de las variedades de mandarina más requeridas por los mercados destino de exportación, alcanzando altos precios debido a que presenta muy buenas características organolépticas (buen sabor, facilidad de pelado, menor número de semillas que la mandarina común). Su cultivo ha sido reportado en Argentina, Brasil y Uruguay (Anderson, 1996; Gambetta *et al.*, 2008) aunque con difusión limitada. Debe su origen a una mutación natural de la mandarina Común obtenida en Montenegro, Río Grande do Sul, (Anderson, 1996; De Souza y Zugno, 2001). Las flores son completas y autocompatibles, de tamaño pequeño a mediano, desarrollándose preferentemente en brotes uniflorales con o sin hojas. Cuando los botones florales alcanzan un diámetro promedio de 3-3.5mm, presentan células madres de polen en todas las fases de desarrollo, inclusive granos de polen ya formados. Presenta microesporogénesis regular, lo que indica elevados índices de fertilidad masculina; el porcentaje de polen viable supera el 95% (Rodríguez y Cunha Dornelles, 1999).

Se caracteriza por presentar alta calidad de fruta, recolección tardía y un número menor de semillas por fruto que la original, entre 6-8 (Anderson, 1996), 14 (Rodríguez *et al.*, 1999), 12 (Koehler-Santos *et al.*, 2003), 1-34 (Mesejo, com. pers.¹) y 2-15 (Gravina, com. pers.²), con promedio de 7 para nuestro país (Gambetta *et al.*, 2008) y un alto grado de poliembrionía, con una media de 5.7 embriones (Rodríguez *et al.*, 1999).

¹ Comunicación personal con PhD. Carlos Mesejo, 2007.

² Comunicación personal con MSc. Alfredo Gravina, 2006.

En las condiciones de producción de Uruguay se clasifica como una variedad de comportamiento alternante. En años “on” con elevados niveles de floración predominan brotes de flor solitaria y terminal y casi nula presencia de brotes mixtos. A pesar de los altos niveles de floración y la presencia de brotes solitarios se mantienen altos porcentajes de cuajado. En años “off” la floración es prácticamente nula, alcanzando una intensidad de floración de 2 flores cada 100 nudos (Gambetta *et al.*, 2008).

En variedades autofecundas como “Montenegrina”, la alta capacidad de cuajado aun en condiciones de alta floración y competencia, se asocia a la presencia de las semillas en crecimiento, lo que puede limitar su valor comercial. Lograr reducir el porcentaje de frutos con semillas y el número promedio de semillas por fruto se presenta como una alternativa para incrementar su valor. Con tal fin a partir del año 2004 se ha estudiado la capacidad partenocárpica natural de “Montenegrina” para las condiciones de Uruguay. Se concluyó que esta variedad presenta baja o nula capacidad partenocárpica, presentando 5.2% y 0% de cuajado final en flores emasculadas comparado con 26 y 28% en flores control (Chouza *et al.*, 2008).

Ensayos preliminares para inducir partenocarpia en “Montenegrina” utilizando ácido giberélico (GA_3) 10 a 20 mgL^{-1} o sulfato de cobre ($CuSO_4$) a 25 mgL^{-1} , no han logrado obtener reducción significativa en el número de semillas por fruto, tanto en aplicaciones localizadas a flor como a planta entera (Chouza *et al.*, 2008).

Para cumplir con dichos objetivos se plantea como hipótesis de trabajo que la aplicación de concentraciones adecuadas de NAA, $CuSO_4$, GA_3 y sus combinaciones, en los estados sensibles de desarrollo de las flores pueden reducir el número de semillas promedio por fruto y el porcentaje de frutos con semillas en una variedad de mandarina autocompatible como “Montenegrina”, mediante la inhibición de la germinación de polen y el crecimiento del tubo polínico y/o la promoción de la pérdida de viabilidad de los óvulos.

A partir de la información precedente y conociendo la baja capacidad partenocarpica natural que presenta dicha variedad se plantean como objetivos de este trabajo: (1) evaluar la eficacia de reguladores de crecimiento y sulfato de cobre en el control de la presencia y número de semillas por fruto; (2) determinar cómo actúan dichos productos sobre la biología reproductiva de la variedad en estudio y (3) determinar la viabilidad del uso de dichas sustancias como práctica de uso comercial.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de campo se llevó a cabo en el establecimiento frutícola Agriyú, localizado en la zona de Kiyú, departamento de San José (35° LS), Uruguay. Se realizaron tres experimentos, los dos primeros en la primavera del 2006 en un mismo cuadro de mandarina Montenegrina” (*Citrus deliciosa* Tenore) y el último en la primavera del 2008 en otro cuadro de la misma quinta. Los experimentos fueron:

2.1 GERMINACIÓN DE POLEN “IN VITRO”

En plena floración se recolectaron 30-40 flores al inicio de la antesis (estado 61 de la escala BBCH) de árboles testigo del cuadro utilizado en el experimento 1. Las flores se colocaron en una caja de petri abierta la que se depositó en una cámara con sílica gel durante 24-36 horas para que abrieran las anteras. Luego se mantuvieron las anteras abiertas en heladera durante 2 horas para que se hidrataran los granos de polen.

La germinación de los granos de polen se realizó en portaobjetos, colocando una base de 750µl de medio sólido. De las anteras se extrajeron los granos de polen frotando las mismas con pincel fino para recoger la mayor cantidad de granos de polen, los cuales se depositaron sobre el medio sólido de cada portaobjeto. Posteriormente se cubrieron los granos de polen con 30 µl de medio líquido.

Se utilizó el medio de cultivo Brewbaker y Kwack (1963) (10% sucrosa, 100 ppm H₃BO₃, 300 ppm Ca (NO₃)₂.4H₂O, 200 ppm MgSO₄ y 100 ppm KNO₃ con PH 5.4

± 0.1) y se dividió en dos partes, una se utilizó como medio líquido y la otra como medio sólido con el agregado de Phytigel (polvo incoloro espesante) con el fin de que el medio fuera lo más transparente posible para facilitar la observación de los granos de polen en el microscopio. A su vez ambos medios de cultivo se dividieron en 9 soluciones cada uno. A cada una de esas soluciones se le agregaron los productos en las concentraciones determinadas para cada uno de los tratamientos. Se utilizó un diseño completo al azar con 9 tratamientos y 3 repeticiones.

Los tratamientos realizados fueron:

- (1) GA₃ (ácido giberélico, 100 mgL⁻¹)
- (2) GA₃ (ácido giberélico, 200 mg.L⁻¹)
- (3) ANA (ácido naftalen-acético, 200 mg.L⁻¹)
- (4) ANA (ácido naftalen-acético, 300 mg.L⁻¹)
- (5) CuSO₄ (sulfato de cobre, 50 mgL⁻¹)
- (6) CuSO₄ (sulfato de cobre, 100 mgL⁻¹)
- (7) CuSO₄ (sulfato de cobre, 100 mgL⁻¹) + GA₃ (ácido giberélico, 100 mgL⁻¹)
- (8) CuSO₄ (sulfato de cobre, 100 mgL⁻¹) + ANA (ácido naftalen-acético, 200 mg.L⁻¹)
- (9) Control

Se colocaron los preparados en cámara oscura a 25°C y 70-80% de humedad hasta que el tratamiento Testigo germinó (aproximadamente a las 72 horas). Una vez que germinaron los granos de polen, se fijaron con solución de FAA (5% formaldehído, 5% ácido acético, 90% etanol al 70%, 5:5:90). La germinación de polen, se evaluó contabilizando un promedio de 300-400 granos por repetición con ayuda de un microscopio óptico (OLYMPUS ECE-Bi). Del total contabilizado, se determinó el número de granos de polen germinados para calcular el porcentaje de germinación. Se tomó como criterio que un grano de polen germinó, cuando el largo del tubo polínico superaba el diámetro del mismo (Stanley y Linskens, 1974).

2.2. INDUCCIÓN DE PARTENOCARPIA EN FLORES INDIVIDUALES

Se seleccionó un cuadro de mandarina “Montenegrina” (*Citrus deliciosa* Tenore), proveniente de un cambio de copa de tres años de edad con Salustiana (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) como intermediario, injertado sobre Trifolia (*Poncirus trifoliata* L.Raf.) con riego localizado y en un marco de plantación de 5.5 x 3 metros. Se marcaron 12 árboles tomando como criterio para la selección, que presentaran alta floración, distribuida de forma homogénea, sin deficiencias nutricionales evidentes y en buen estado sanitario. El experimento se dividió en dos partes:

2.2.1. Estudio del efecto de los tratamientos inductores de partenocarpia sobre la viabilidad de los granos de polen y los óvulos

En flores preantesis, estado 59 de la escala BBCH (Agustí *et al.*, 1995) se aplicaron los tratamientos de 2.2.2 y se marcaron 75 brotes adicionales en los dos árboles restantes de los seleccionados en dicho cuadro. A grupos de 15 flores (unidad experimental la flor) de dichos brotes marcados, se les aplicaron los mismos cinco tratamientos de 2.2.2.). Se recolectaron y se fijaron 5 flores por tratamiento en tres momentos: 0, 5 y 10 días postaplicación para observar en microscopio óptico con fluorescencia el efecto de los productos sobre el crecimiento de los tubos polínicos y la viabilidad de los óvulos. Se utilizó un diseño completo al azar con 5 tratamientos y 5 repeticiones.

Las flores recolectadas se fijaron en solución de FAA (5% formaldehído, 5% ácido acético, 90% etanol al 70%, 5:5:90) y se guardaron a 4 °C de temperatura hasta que fueron analizadas. Previo al análisis las flores se procesaron de la siguiente forma: se les eliminaron los pétalos, se lavaron con agua destilada y se mantuvieron en sulfito sódico, al 5%, durante una noche. Al día siguiente, utilizando una nueva solución de la misma concentración de sulfito sódico, los tejidos se ablandaron durante 30 a 40 segundos en microondas (JAMES-20NDG) a 100 watts.

Para observar la germinación de los granos de polen y el desarrollo del tubo polínico, se separó el pistilo (estigma y estilo) del ovario y se seccionó longitudinalmente bajo lupa binocular (OLYMPUS SZ40) con ayuda de bisturí y pinzas. Se colocaron los pistilos seccionados en solución de azul de anilina al 0.1% en K_2HPO_4 0.1 N (Kearns y Inouye, 1993) donde se mantuvieron por 20 a 30 minutos para teñir los tejidos. Las secciones de pistilos se colocaron en portaobjetos con una gotita de glicerina líquida para evitar que se deshidrataran los preparados, se cubrieron con cubreobjetos, evitando la formación de burbujas de aire y se realizó un *squash*. El azul de anilina tiñe la calosa que se deposita en las paredes del tubo polínico durante su crecimiento, en forma de tapones y a intervalos irregulares. La calosa teñida e iluminada con luz ultravioleta emite fluorescencia, lo que permite observar tanto la germinación de los granos de polen como el desarrollo del tubo polínico. La evaluación de la germinación de los granos de polen se realizó contando al azar 200-300 granos de polen por flor en tres campos visuales, mientras que el desarrollo del tubo polínico en el estilo se determinó como el porcentaje de estilo recorrido por el tubo polínico más largo. Para observar la viabilidad de los óvulos, los ovarios ablandados se seccionaron ecuatorialmente bajo una lupa binocular (OLYMPUS SZ40) con la ayuda de bisturí y pinzas. Se colocaron en solución de azul de anilina al 0.1% en K_2HPO_4 0.1 N durante 20-30 minutos para teñirse. Los óvulos se rescataron y depositaron sobre un portaobjetos con una gota de glicerina líquida y se cubrieron con un cubre objeto, evitando la formación de burbujas de aire, y se realizó un *squash*. Se sellaron los preparados con esmalte para facilitar su manipulación. Los óvulos que inician su proceso de degeneración sintetizan calosa en el extremo chalazal de la nucela, lo que permite su observación en microscopio óptico con fluorescencia. Se utilizó microscopio Olympus Vanox AH3 y filtro U BH2-DMU para el rango de línea de emisión Hg 334-365 nm. El porcentaje de óvulos viables se determinó contando al azar entre 15 y 20 óvulos por flor, se consideraron viables aquellos que no presentaban depósitos de calosa en la zona de la chalaza, no emitiendo fluorescencia en esa zona.

2.2.2 Aplicación de tratamientos inductores de partenocarpia a flores individuales

En 10 de los 12 árboles seleccionados, se marcaron 500 brotes de flor terminal a los que se les contabilizó el número de hojas por brote y su localización en el árbol. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con 10 bloques, 5 tratamientos y 10 flores por tratamiento (unidades de submuestreo).

Los tratamientos aplicados fueron:

- 1) ANA (200mgL^{-1})
- 2) GA_3 (100 mgL^{-1})
- 3) $\text{GA}_3 + \text{CuSO}_4$ (100 mgL^{-1} c/u)
- 4) CuSO_4 (100 mgL^{-1})
- 5) Control

La solución de GA_3 , se acidificó a pH 4.0-4.5 y en todos los casos, a las soluciones se les agregó un agente humectante no iónico al 0.05%. Las aplicaciones se realizaron con pulverizadora manual en forma localizada a flores en estado 59 de la escala BBCH (Agustí *et al.*, 1995). En el caso del tratamiento combinado de GA_3 y CuSO_4 , ambos productos se aplicaron por separado sobre las mismas flores en el mismo momento.

Cada 7 días se contabilizó el número de flores o frutitos remanentes por tratamiento, y se evaluó el diámetro de los frutos a partir de los 30 días post-aplicación. A los 65 días post-aplicación se cosechó el experimento como consecuencia de la caída masiva de frutitos en algunos de los tratamientos como el de ANA, CuSO_4 y el control. Se cuantificó la presencia de semillas, contabilizando el número total por fruto y se midió además el diámetro de fruto y el grosor de la cáscara.

2.3. INDUCCIÓN DE PARTENOCARPIA EN PLANTAS COMPLETAS EN CONDICIONES DE CAMPO

Se seleccionó un cuadro de mandarina “Montenegrina” (*Citrus deliciosa* Tenore), de 8 años injertado sobre Trifolia (*Poncirus trifoliata* (L).Raf.) en plena producción, con riego localizado y con un marco de plantación de 5.5 x 3.5 metros.

Durante la brotación se seleccionaron 30 árboles que presentaran alta floración, distribuída de forma homogénea, sin deficiencias nutricionales evidentes y en buen estado sanitario. Se manejaron dos condiciones: la mitad de los árboles fueron podados previo a floración (para evitar daño de planta por excesiva carga de fruta) y la otra mitad sin podar. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con un árbol como unidad experimental y 3 repeticiones por tratamiento en cada condición. Se utilizaron las filas del cuadro elegido como bloques en base a que presentan un manejo similar. Los tratamientos aplicados fueron:

- (1) GA₃ 100 mg.L⁻¹ única aplicación 30-40 % de flor abierta
- (2) GA₃ 100 mg.L⁻¹ doble aplicación 30-40 % y 70-80% de flor abierta
- (3) CuSO₄ 100 mgL⁻¹ única aplicación 30-40 % de flor abierta
- (4) CuSO₄ 100 mgL⁻¹ doble aplicación 30-40 % y 70-80% de flor abierta
- (5) Control

Las aplicaciones se realizaron con pulverizadora de puntero a una presión de 10 - 12 bar, cubriendo todo el follaje hasta punto de goteo. La solución de ácido giberélico (GA₃) se ajustó a un pH de 4.0-4.5, a la cual se agregó un humectante no iónico al 0.05%. En el caso del sulfato de cobre (CuSO₄) se le agregó el mismo agente humectante a igual dosis. El gasto promedio por planta de ambas soluciones de productos aplicados fue de 7,3 l y 6,7 l. Luego del final de caída fisiológica se realizó raleo de frutos en forma manual utilizando el criterio comercial de la quinta con el fin de evitar una excesiva carga que dañase la planta. Se contabilizaron los frutos raleados por

árbol y se tuvieron en cuenta en el número final de frutos cosechados por árbol. Los frutos raleados se tomaron como muestra para contabilizar el número de semillas por fruto y se midió el calibre de cada fruto. A partir de 30 días post-caída de pétalos, en períodos de 20 días se midió el diámetro ecuatorial de 30 frutos al azar por planta hasta el momento de cosecha. En cosecha se midió rendimiento contabilizando el número de frutos y los kilos de fruta por árbol. A una muestra de 50 frutos al azar por árbol, se le midió el diámetro ecuatorial y se contabilizó el número de semillas totales y abortadas por fruto.

El análisis estadístico de las variables se detalla por experimento:

Experimento 2.1.: La variable discreta “proporción de granos de polen germinados” se analizó según razón de verosimilitud, a través del Modelo Lineal Generalizado (McCullagh y Nelder, 1989), asumiendo distribución binomial y función de enlace logit. En la comparación de medias se hicieron contrastes utilizando χ^2 .

Experimento 2.2.1: Las variables continuas “número medio de tubos polínicos”, “distancia máxima recorrida por los tubos polínicos”, se analizaron a través de un Modelo Lineal Mixto, asumiendo distribución normal y la diferencia de medias se analizó mediante el test de Tukey.

Experimento 2.2.2: Las variables continuas “número medio de semillas totales por fruto”, “número medio de semillas verdaderas por fruto”, “número medio de semillas abortadas por fruto”, “calibre medio por fruto” se analizaron a través de un Modelo Lineal General, considerando el bloque como factor aleatorio, asumiendo distribución normal y la diferencia de medias se analizó mediante el test de Tukey. La variable discreta “proporción de frutos cuajados”, se analizó según razón de verosimilitud, a través del Modelo Lineal Generalizado (McCullagh y Nelder, 1989), asumiendo distribución binomial y función de enlace logit. En la comparación de medias se hicieron contrastes utilizando χ^2 .

Experimento 2.3.: Análisis de varianza para las dos situaciones poda y no poda determinando el efecto poda y su interacción con las demás variables. Las variables continuas “número medio de semillas totales por fruto”, “número medio de semillas verdaderas por fruto”, “número medio de semillas abortadas por fruto”, “calibre medio por fruto”, “número medio de frutos por árbol”, “kilos por árbol” y “peso medio de fruto” se analizaron a través de un Modelo Lineal Mixto, asumiendo distribución normal y la diferencia de medias se analizó mediante el test de Tukey. La variable discreta “proporción de frutos cuajados”, “proporción de frutos sin semillas”, “proporción de frutos con 1-4 semillas” se analizó según razón de verosimilitud, a través del Modelo Lineal Generalizado (McCullagh y Nelder, 1989), asumiendo distribución binomial y función de enlace logit. En la comparación de medias se hicieron contrastes utilizando Chi^2 . Se utilizó un modelo Lineal Mixto y se realizó un ANAVA para los efectos poda, tratamiento e interacción poda con tratamiento, donde los bloques se consideraron factores aleatorios. Análisis estadístico de todas las variables medidas en campo y en laboratorio utilizando el programa SAS/STAT (1997).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. GERMINACIÓN DE POLEN “*IN VITRO*”

El porcentaje de germinación de polen “*in vitro*” de “Montenegrina” fue del 40% (cuadro 1). Este valor de germinación se considera adecuado para los cítricos de acuerdo a reportes de distintas especies y variedades que se analizaron durante dos años consecutivos, determinándose valores de entre 0.6 a 86.3% (Pardo *et al.*, 2007). Estos autores observaron diferencias entre especies y entre variedades de la misma especie, además de existir variaciones en la germinación del polen entre los dos años analizados. En mandarina “Común”, variedad que dio origen a “Montenegrina”; reportaron un 67.9 a 73.5% de germinación de polen *in vitro*, utilizando la misma técnica de germinación y el mismo medio de cultivo que en el presente trabajo. El valor obtenido de germinación “*in vitro*” para “Montenegrina”, se considera elevado tomando como referencia el

reporte de Rodríguez y Cunha Dornelles (1999) en el cual los granos de polen de mandarina “Montenegrina” presentaban un 96.13% de viabilidad utilizando la técnica de teñido de grano de polen con carmín acético y entre 19.36 y 33.68% de germinación en medio de cultivo con sacarosa, ácido bórico y nitrato de calcio.

Todas las concentraciones y combinaciones de productos aplicados al medio de cultivo, inhibieron la germinación de polen *in vitro* en relación al control (cuadro 1, Figura 1B, 1C, 1D). En el caso del CuSO_4 , aplicado a 50 y 100 mgL^{-1} , sólo o combinado con GA_3 y ANA los resultados obtenidos en “Montenegrina”, confirman lo reportado por Mesejo *et al.* (2006) en mandarina “Fortune”, y se alinean con el efecto inhibitor de diferentes compuestos de cobre en la germinación del polen de diversas especies vegetales (Bristow y Shawa, 1981, Abott, 1991; Elezaby y Hasseeb, 1995)

El cobre mineral ha demostrado ser polinicida en cerezo y damasco y a mayor concentración del mismo, menor el porcentaje de germinación de polen y el crecimiento de tubo polínico (Gür y Topdemir, 2008).

El GA_3 sólo o combinado con CuSO_4 alcanzó similares resultados (cuadro 1). Se ha demostrado que las giberelinas actúan a nivel de los óvulos, ya sea mediante el aborto de los mismos, el desarrollo anormal del saco embrionario, o por el desarrollo desincronizado entre el estilo y el saco embrionario (Motomura e Ito, 1972, Fellman, *et al.*, 1991). Nuestros resultados demuestran que el GA_3 también afecta a los granos de polen inhibiendo su germinación en “Montenegrina”. Este resultado coincide con lo encontrado por Kimura *et al.* (1996) en la variedad de vid “Muscat Bailey”, donde la aplicación de GA_3 solo o combinado con estreptomycin presentó los menores porcentajes de germinación de polen, mientras que la aplicación de estreptomycin sola no modificó el comportamiento de los testigos. Las giberelinas han demostrado ser polinidas en otras especies como *Allium cepa*, evitando el desarrollo de granos de polen y de anteras, produciendo plantas estériles (Van Der Meer y Van Bennekom, 1973, 1976).

El ANA redujo significativamente la germinación de polen “*in vitro*” y existe evidencia en otras especies que confirman dicho resultado. Zhang y O’ Neill, (1993) han propuesto que las auxinas, conjuntamente con el etileno actúan coordinando el desarrollo de gametos femeninos y masculinos para favorecer la fertilización. Se ha reportado que concentraciones mayores a 50 mgL⁻¹ de auxina (AIA) inhibieron la germinación de polen en *Allium cepa* y provocaron detención de desarrollo del tubo polínico, el cual apareció como una mínima protuberancia (Kwan *et al.*, 1969). Similares resultados han sido encontrados en manzano con la aplicación de AIA, verificándose germinación anormal de polen y efecto negativo en la elongación del tubo polínico (Elezaby y Hasseeb, 1995).

Cuadro 1. Germinación de polen “*in vitro*” en porcentaje por tratamiento y en mandarina “Montenegrina”. Tratamientos aplicados al medio de cultivo: ANA 200 y 300 mgL⁻¹, CuSO₄ 50 y 100 mgL⁻¹, GA₃ 100 y 200 mgL⁻¹, combinación de CuSO₄ con GA₃ 100 mgL⁻¹ cada uno y combinación de CuSO₄ 100 mgL⁻¹ con ANA 200 mgL⁻¹ y control.

Tratamiento (mgL ⁻¹)	% de germinación	Error estándar
ANA 200	1,32 c	0,005325
ANA 300	1,58 bc	0,005309
ANA 200 + CuSO ₄ 100	1,77 bc	0,004665
CuSO ₄ 50	1,92 bc	0,005853
CuSO ₄ 100	0,49 c	0,003168
GA ₃ 100	3,98 b	0,010508
GA ₃ 200	1,35 bc	0,005090
GA ₃ 100 + CuSO ₄ 100	1,32 bc	0,004439
Control	40,32 a ^z	0,017732

^z separación de medias Test Chi²

ns: no significativo, diferencia significantiva ($P \leq 0.01$), N= 27

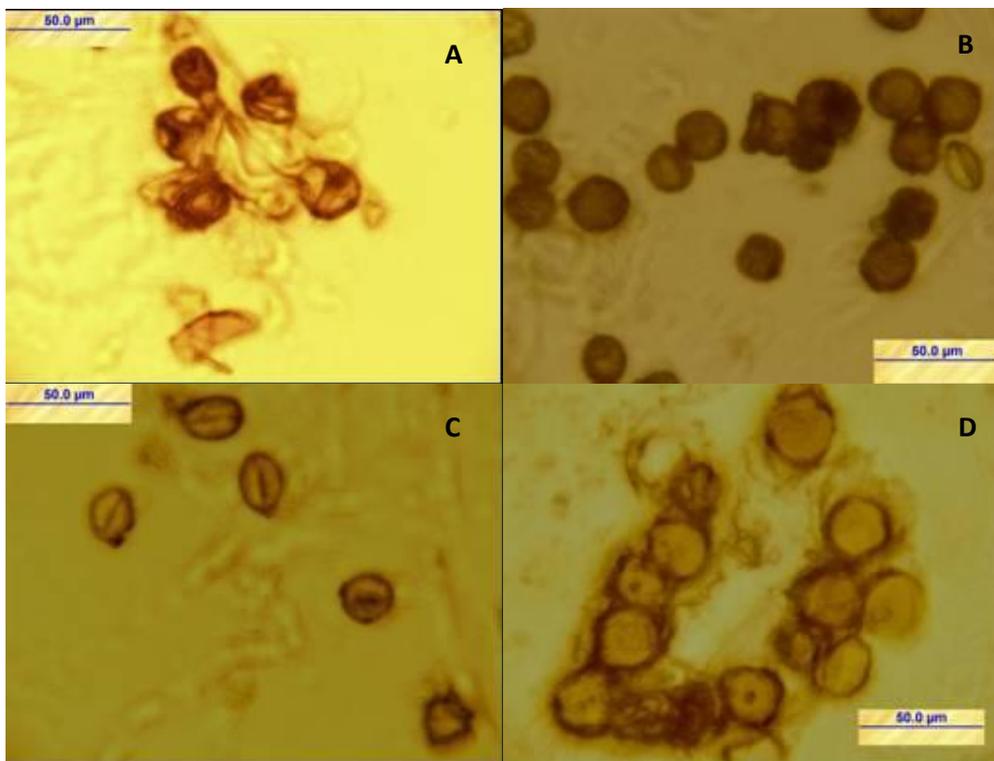


Figura 1. Granos de polen en medio de cultivo con distintos tratamientos. A) Granos de polen germinados en el control, B) granos de polen tratados con 100mgL^{-1} de CuSO_4 sin germinar con alguna protuberancia emergiendo que se detuvo, C) granos de polen sin germinar tratados con 100mgL^{-1} de GA_3 y CuSO_4 , D) granos de polen sin germinar tratados con 200mgL^{-1} de ANA.

3.2. INDUCCIÓN DE PARTENOCARPIA A FLORES INDIVIDUALES

3.2.1. Estudio del efecto de los tratamientos inductores de partenocarpia sobre la viabilidad de los granos de polen y los óvulos

El estudio de viabilidad de polen y óvulos se llevó adelante a través del análisis de: viabilidad de los granos de polen, mediante la determinación del número de tubos polínicos desarrollados a nivel del estigma y midiendo la longitud máxima recorrida por

el tubo polínico más largo en el estilo. La viabilidad de los óvulos se analizó mediante la observación de depósitos de calosa en la zona de la chalaza como síntoma de obstrucción del flujo vascular y de pérdida de viabilidad de los mismos. La viabilidad de los óvulos no se pudo determinar pues existieron problemas de ajuste de la técnica de teñido y aclarado de los mismos, que imposibilitaron la observación de los depósitos de calosa en la chalaza. De todas maneras con los resultados de número de tubos polínicos a nivel del estigma y la longitud máxima recorrida por el tubo polínico más largo, se pudo determinar el efecto de los distintos productos sobre la viabilidad del polen en distintos momentos del desarrollo de la flor.

Al día cero, en que se aplicaron los tratamientos con las flores pre-antesis en estado de desarrollo 59 de la escala BBCH (Agustí *et al.*, 1995) (figura 5B y 5C), se observó muy poco polen a nivel del estigma. En el control germinaron en promedio sólo 18 granos de polen y ninguno de ellos creció más allá del estigma (cuadro 2). Esto último indica que en estado de flor cerrada, no existió posibilidad de cleistogamia debido por un lado a la falta de maduración de las anteras que estaban aún húmedas (datos no presentados), y por otro a la falta de madurez del grano de polen y el pistilo. Como resultado se observó un bajo número de tubos a nivel del estigma que no fueron capaces de desarrollarse (cuadro 2).

A los cinco días post-aplicación (cuadro 2, figura 5B) sólo el CuSO_4 y el ANA redujeron significativamente la germinación de polen mientras que todos los tratamientos inhibieron el crecimiento del tubo polínico en relación al control (cuadro 2). Si bien el CuSO_4 y el GA_3 no provocaron una reducción significativa en el número de granos germinados, su número se redujo a la mitad comparado con las flores control.

A los diez días post-aplicación (cuadro 2, figura 5B) en todos los tratamientos se verificó una disminución del número de tubos polínicos a nivel del estigma, con respecto al control. En cuanto al crecimiento del tubo polínico, el ANA no provocó inhibición del mismo con respecto al testigo. Por el contrario, el GA_3 fue el que presentó el mayor

efecto inhibitor, deteniendo el crecimiento del tubo polínico en la zona del estigma, mientras que en esa fecha en el control los tubos polínicos llegaron a recorrer más del 75% del estilo (cuadro 2). Es importante señalar que estos resultados son nuevos para una especie autocompatible como “Montenegrina”, ya que los únicos reportes existentes sobre la inhibición del crecimiento del tubo polínico con GA₃ en cítricos, son de Mesejo *et al.* (2008) para “Clemenules” variedad autoincompatible.

El CuSO₄, a los cinco y a los diez días postaplicación redujo significativamente el crecimiento del tubo polínico. Esto coincide con lo observado en mandarina “Fortune” donde la aplicación in vitro de 25 mgL⁻¹ de CuSO₄, 8 horas posteriores a la germinación de polen, detuvo por completo el crecimiento de tubo polínico, mientras que el testigo continuó creciendo y se incrementó un 50% en longitud (Mesejo *et al.*, 2006). En ese mismo trabajo la aplicación de CuSO₄ a flores en el momento de la polinización, también inhibió el crecimiento de tubo polínico lo cual coincide con los resultados obtenidos para mandarina “Montenegrina”. El cobre como mineral o bajo distintas formas químicas ha demostrado ser inhibitor del crecimiento del tubo polínico en varias especies de plantas (Abbott, 1991, Sawidis y Reiss, 1995, Gür y Topdemir, 2008). El efecto del cobre mineral sobre el tubo polínico ha sido reportado, al igual que para otros metales pesados, afectando la estructura de la pared celular del tubo polínico (Speranza *et al.*, 2007). En *Lilium longiflorum* se observó que el cobre mineral provocó una desorganización de la estructura de la pared celular a nivel del extremo del tubo, provocando así que no continuara su crecimiento (Sawidis y Reiss, 1995).

El GA₃ aplicado previo a la antesis tuvo un efecto similar, provocando la inhibición del crecimiento del tubo polínico a los cinco y diez días post-aplicación. En ese período se interrumpió el crecimiento a nivel del estigma, provocando que no existiera interacción entre polen y estilo (figura 2D). Este resultado coincide con lo reportado por Mesejo *et al.* (2008), donde la aplicación de 10 mgL⁻¹ de GA₃ redujo el crecimiento del tubo polínico y sólo el 20% del estilo fue recorrido en flores de “Clemenules” tratadas, contra un 60% en el control.

El efecto dependió del momento de aplicación, ya que en las flores tratadas en antesis, los tubos polínicos no llegaron a los óvulos, y se produjo un arresto completo del crecimiento que impidió completamente la fertilización, a tal punto que la reducción en el número de semillas fue del 100% (Mesejo *et al.*, 2008). Por otro lado en las flores tratadas un día posterior a antesis, los mismos autores reportan que los tubos llegaron a fecundar el 15% de los óvulos doce días después y esto resultó en un 55% de reducción en el número de semillas. En el presente trabajo las aplicaciones fueron realizadas previas a la antesis y la inhibición del crecimiento del tubo polínico fue significativa en ambas fechas y se intensificó su efecto con el tiempo y la maduración del polen.

Según Mesejo *et al.* (2008) el GA₃, además de tener un efecto directo inhibiendo la elongación del tubo polínico, también promueve la elongación del estilo haciendo que se dificulte aún más la llegada al óvulo. Esto podría ser una explicación al menor recorrido logrado por los tubos polínicos a los diez días, comparado con la distancia recorrida a los cinco días. Kimura *et al.* (1996), reportan resultados similares en la variedad de vid “Muscat Bailey” con aplicaciones previas a plena floración, donde se pudieron observar muy pocos tubos polínicos y todos ellos sin sobrepasar la región estigmática. En una línea coincidente, en el cultivar de vid “Delaware”, aplicaciones prefloración de GA₃, inhibieron significativamente el crecimiento de los tubos polínicos, impidiendo la penetración al micrópilo aún luego de 3 y 5 días posteriores a la polinización. Se observó además que las aplicaciones prefloración produjeron deformación del extremo del tubo polínico afectando su elongación y direccionamiento hacia el óvulo (Okamoto y Miura, 2005).

El ANA redujo significativamente el número de tubos polínicos en el estilo con respecto al control a los cinco y diez días pos-aplicación. El crecimiento de los mismos, también disminuyó a los cinco días post-aplicación y a la mitad a los diez días post-aplicación con respecto al testigo. Si bien las auxinas han demostrado ser reguladoras del crecimiento de tubo polínico y del desarrollo de óvulo (Zhang y O’Neill 1993), y concentraciones menores a 0,5 mgL⁻¹ han promovido el crecimiento del tubo polínico en

cebolla, las superiores a 50 y 100 mgL⁻¹ han provocado su inhibición (Kwan *et al.*, 1969). Con 200 mgL⁻¹ ni siquiera ocurrió la emergencia del tubo polínico, observándose apenas una pequeña protuberancia en el grano del polen (Kwan *et al.*, 1969). Estos mismos autores han reportado que dosis superiores a 5 mgL⁻¹ de AIA produjeron acumulación de dicho metabolito, lo cual provocó aumento del potencial osmótico que terminó con la ruptura del tubo polínico. En manzano, Elezaby y Hasseeb (1995), también reportan reducción del crecimiento de tubo polínico en plantas tratadas en plena floración con 10 y 100 mgL⁻¹ de AIA con respecto a plantas sin tratar. Esa reducción del crecimiento del tubo polínico fue acompañada de una germinación anormal del grano de polen.

Cuadro 2. Número promedio de tubos polínicos germinados en estigma y distancia máxima de estilo recorrida por el tubo polínico más largo (%) por tratamiento a los 0, 5 y 10 días post- aplicación en mandarina “Montenegrina”. Tratamientos localizados a flor: ANA 200 mgL⁻¹, CuSO₄ 100 mgL⁻¹, GA₃ 100 mgL⁻¹, combinación de CuSO₄ y GA₃ 100 mgL⁻¹ cada uno y control.

Días post-aplicación	Tratamiento	Nº de tubos polínicos	Error Estándar	Distancia recorrida (% de estilo)	Error Estándar
0	Control	18	-----	Estigma	-----
	ANA	0		Estigma	
	CuSO ₄	9		Estigma	
	CuSO ₄ + GA ₃	0		Estigma	
	GA ₃	0		Estigma	
5	Control	120 a ^z	16,2242	82,6 a	8,6072
	ANA	27,4 b		19,6 b	
	CuSO ₄	63,4 ab		27 b	
	CuSO ₄ + GA ₃	28,2 b		14 b	
	GA ₃	61 ab		32 b	
10	Control	566 a	63,9728	77,6 a	12,5030
	ANA	30,6 b		30,6 ab	
	CuSO ₄	68,8 b		23 b	
	CuSO ₄ + GA ₃	22,6 b		23 b	
	GA ₃	20,8 b		5 b estigma	

^z separación de medias Test de Tukey, ns: no significativo, diferencia significantiva ($P \leq 0.01$), N=75

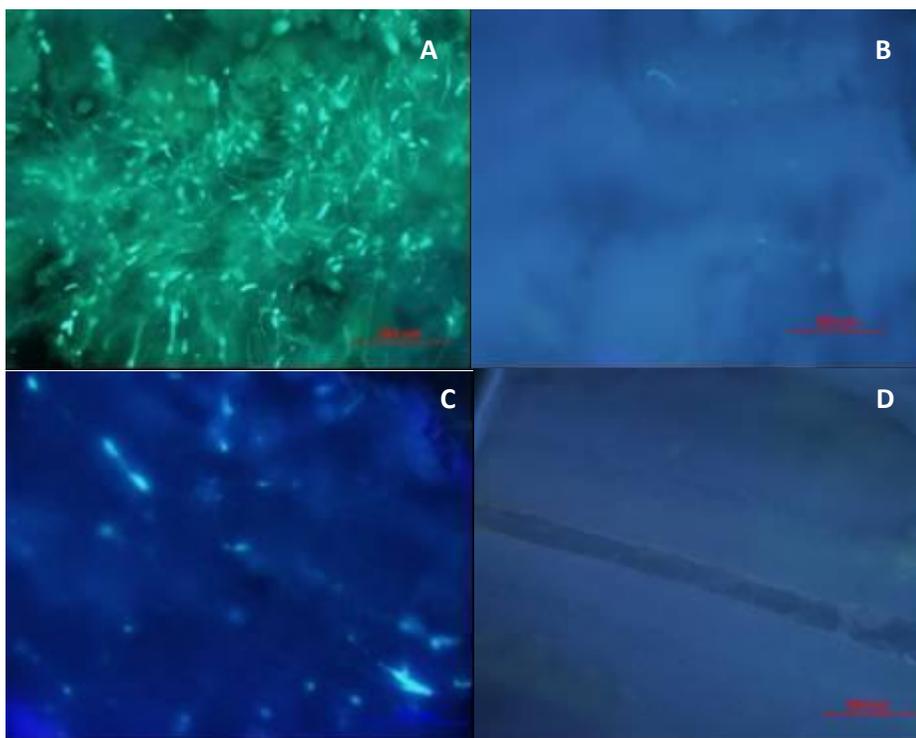


Figura 2. Tubos polínicos germinados a nivel del estigma y el estilo al día diez post-aplicación en de cortes de flor de mandarina “Montenegrina” observados en microscopio de fluorescencia. A) tubos polínicos en el estigma de flores control, B) tubos polínicos en el estigma de flores tratadas con GA_3 a $100mgL^{-1}$, C) tubos polínicos en estilo de flores control, D) Corte de estilo en flores tratadas con GA_3 a $100mgL^{-1}$.

3.2.2. Aplicación localizada a flores.

3.2.2.1. Cuajado

La aplicación de GA₃ sólo o combinado con CuSO₄ incrementó significativamente el cuajado en relación al control y al resto de los tratamientos (figura 3). Este incremento fue constante durante todo el período de abscisión y se mantuvo en el cuajado final. Estos resultados coinciden con varios reportes que demostraron que las giberelinas son responsables del incremento del cuajado, tanto por las aplicaciones exógenas, como por el aumento en los niveles endógenos luego de la polinización (Ortolá *et al.*, 1997; Talón *et al.*, 1997).

Las aplicaciones de CuSO₄ presentaron similar cuajado que el control durante todo el período analizado (figura 3), por lo que el aumento cuantificado en el tratamiento combinado, es atribuible al GA₃.

El ANA adelantó la abscisión de frutos jóvenes a partir de los 15 días post-aplicación hasta que el experimento finalizó, aunque el cuajado final fue similar al testigo (figura 3). El efecto raleador de las auxinas de síntesis, entre ellas el ANA, ha sido demostrado en diferentes cultivares de citrus cuando son aplicadas en floración o durante la caída fisiológica (Ortolá *et al.*, 1997). Existió además una abscisión severa de los tratamientos control y CuSO₄ que dejó muy pocos frutos al momento que el experimento finalizó (65 días post-aplicación). Esto inhabilitó que se hiciera un análisis estadístico completo para alguna de las variables evaluadas como el tamaño final de fruto y porcentaje de frutos sin semillas. En el caso de tamaño de fruto se realizó el análisis estadístico del diámetro de fruto con los datos de las dos semanas previas a la finalización del experimento, pues era la última fecha de medición, en la cual quedaba un número suficiente de frutos en los tratamientos testigo, CuSO₄ y ANA.

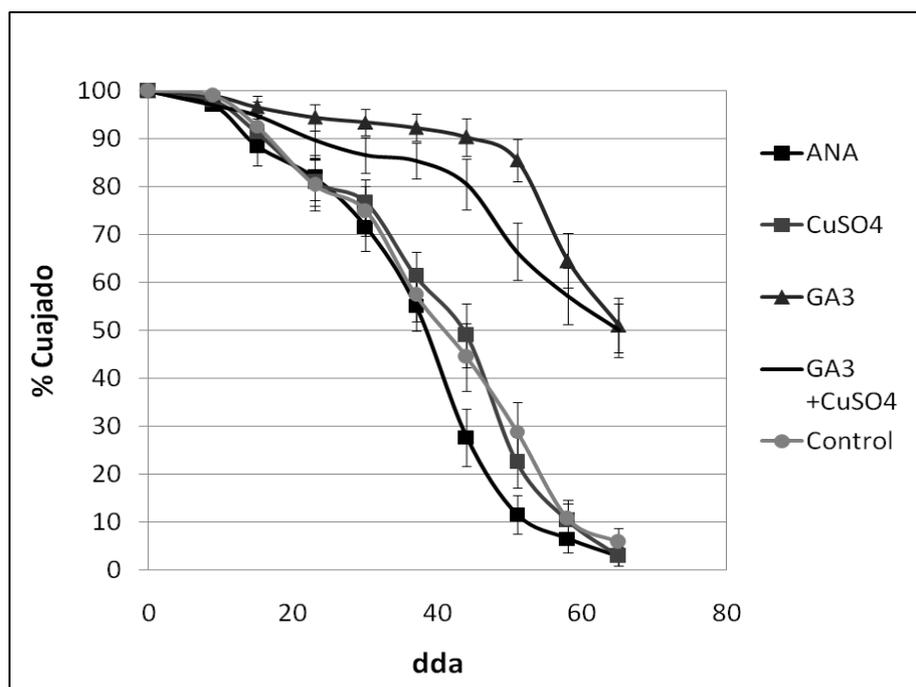


Figura 3. Evolución del cuajado de fruto por tratamiento según días después de antesis (dda) en mandarina “Montenegrina”. Tratamientos localizados a flor: ANA 200 mgL⁻¹, CuSO₄ 100 mgL⁻¹, GA₃ 100 mgL⁻¹, combinación de CuSO₄ y GA₃ 100 mgL⁻¹ cada uno y control.

3.2.2.2. Tipo de abscisión

Los distintos productos aplicados para inducir partenocarpia, produjeron diferencias en el tipo de abscisión. Los frutos cítricos presentan dos zonas distintas de abscisión durante su desarrollo. Durante las primeras semanas de desarrollo los frutos en su mayoría, presentan la zona de abscisión en la base del pedúnculo, cayendo con el mismo incluido. Más adelante y hasta el final de la caída fisiológica la zona de abscisión cambia pasando a ser en la base del caliz del fruto, de tal modo que los frutos caen sin pedúnculo. Estas dos etapas de abscisión están separadas por una etapa de transición de dos o tres semanas, donde los frutos pueden presentar los dos tipos de abscisión (Goren, 1993).

Durante el período posterior a la aplicación de los tratamientos, entre un 60 a 90 % de las flores tratadas con ANA presentaron caída de frutos sin pedúnculo desde el inicio del cuajado hasta la fecha en que finalizó el experimento (figura 4A, anexo 6.1B). Este resultado coincide con lo reportado por Ortolá *et al.* (1997), donde aplicaciones de 200 mgL^{-1} retrasaron la abscisión en la base del pedúnculo y promovieron la abscisión a nivel del cáliz en inflorescencias incubadas y remojadas en ANA. Por el contrario, se observó que el CuSO_4 provocó caída de frutos en su gran mayoría con pedúnculo, durante todo el período de abscisión (figura 4B, anexo 6.1D). El resto de los tratamientos presentaron una proporción similar de ambos tipos de caída durante el período de abscisión, prevaleciendo en las etapas tempranas de desarrollo del fruto, la caída con pedúnculo y en las etapas tardías la caída sin pedúnculo, coincidiendo con lo propuesto por Goren (1993) (figura 4C, 4D y 4E).

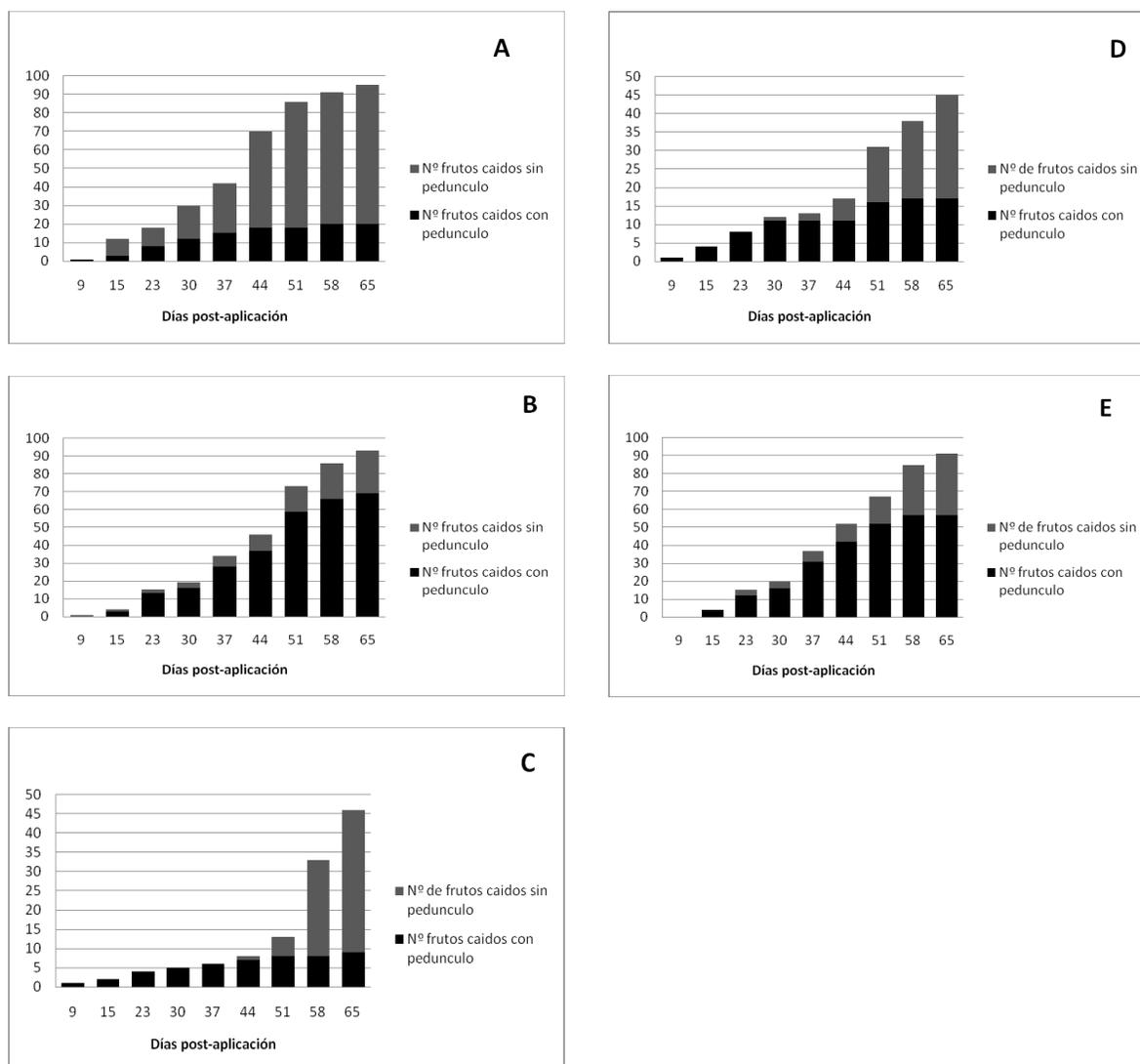


Figura 4. Evolución del tipo de abscisión de fruto (con y sin pedúnculo) por tratamiento en mandarina “Montenegrina”. Tratamientos localizados a flor: A) ANA 200 mgL⁻¹, B) CuSO₄ 100 mgL⁻¹, C) GA₃ 100 mgL⁻¹, D) combinación de CuSO₄ y GA₃ 100 mgL⁻¹ cada uno, E) control.

3.2.2.3. Presencia y número de semillas

La aplicación de GA₃ sólo o con CuSO₄ disminuyó significativamente el número promedio de semillas por fruto comparado con el control y el tratamiento con ANA (cuadro 3). Estos resultados coinciden con Feinstein *et al.* (1975), quienes reportan una reducción significativa del número de semillas de 8.7 a 3.6 y 4.9 con 100 y 200 mg.L⁻¹ de GA₃ respectivamente, aplicados a superficies estigmáticas de mandarina “Dancy”, variedad autocompatible. Recientemente, Mesejo *et al.* (2008) con aplicaciones localizadas a flores, de 10 mg.L⁻¹ de GA₃, logran una reducción de 26 a 100% del número de semillas por fruto, dependiendo del momento de los tratamientos en mandarinas autoincompatibles. Erner *et al.* (2008) determinaron que aplicaciones de 200 y 400 mg.L⁻¹ de GA₃ fueron las más efectivas en reducir el número de semillas en pummelo “Chandler”.

Experimentos realizados en nuestro país desde el año 2004 al 2007, con aplicaciones de 20 mg.L⁻¹ de GA₃ preantesis (figura 5C), tanto a flores individuales como a árbol completo no fueron eficaces en inducir partenocarpia en “Montenegrina” (Chouza *et al.*, 2008). En este trabajo, el aumento de la concentración de GA₃ a 100 mg.L⁻¹ ha logrado reducir el número de semillas por fruto (cuadro 3, figura 5D), lo que puede explicarse porque se trata de una variedad autocompatible que presenta baja capacidad partenocarpica natural (Chouza *et al.*, 2008), por lo que necesita concentraciones mayores de GA₃ para producir frutos sin semillas o con menor número de ellas.

La aplicación de CuSO₄ no redujo el número promedio de semillas por fruto (cuadro 3, figura 5D). Este resultado difiere del obtenido por Mesejo *et al.* (2006) quienes reportaron que aplicaciones de 25 mg L⁻¹ de CuSO₄ aplicado a flores 2 horas previas a polinización redujeron el número de semillas por fruto en “Clemenules” de 24.6 a 1.1 y aplicado 24 horas postpolinización se redujo a 17.7.

La aplicación de ANA no modificó significativamente el número de semillas en relación a los frutos control (cuadro 3). No existen reportes sobre el efecto de aplicaciones localizadas a flor en cítricos con ANA, en relación a la presencia de semillas, por lo que estos resultados son la primera aproximación al conocimiento de su efecto en una variedad autocompatible.

El GA₃ y el CuSO₄ solos o combinados redujeron el porcentaje de frutos con semillas de 100% en los frutos control a 43, 75 y 32% respectivamente, mientras que el ANA no modificó el porcentaje de frutos con semillas en la muestra analizada. Debe considerarse que el porcentaje de frutos con semillas no se pudo analizar estadísticamente, por presentar muy pocos frutos en tres de los cinco tratamientos al momento en que finalizó el experimento.

Cuadro 3. Número de semillas por fruto, diámetro de fruto (mm), espesor de cáscara (mm), y porcentaje de frutos con semillas por tratamiento en mandarina “Montenegrina”. Tratamientos localizados a flor: ANA 200 mgL⁻¹, CuSO₄ 100 mgL⁻¹, GA₃ 100 mgL⁻¹, combinación de CuSO₄ y GA₃ 100 mgL⁻¹ cada uno y control.

Tratamiento	Nº de semillas	Diámetro de fruto	Espesor de cáscara	% de frutos con semillas
ANA	3.7 a ^z	7.3 c	0.7 b	100.0 ^w
CuSO ₄	2.2 ab	8.5 b	1.3 ab	75.0
GA ₃	0.9 b	10.2 a	2.1 ab	43.1
CuSO ₄ + GA ₃	0.6 b	11.0 a	2.4 a	32.0
Control	5.2 a	9.0 b	1.3 b	100.0

^z separación de medias Test de Tukey ns: no significativo, diferencia significativa ($P \leq 0.05$). Análisis estadístico de datos a los 44 días post aplicación.

^w Sin análisis estadístico debido a muestra insuficiente para analizar proporción en los tratamientos ANA, CuSO₄ y Testigo. Nº frutos al momento de cosecha: 6 control, 3 ANA, 4 CuSO₄, 51 GA₃, 50 CuSO₄ +GA₃



Figura 5. Aplicación a flores individuales; estadios de desarrollo de flor, momento de aplicación y semillas promedio por tratamiento A) árboles seleccionados donde se marcaron los brotes con las flores a las que se le aplicaron los tratamientos, B) Estado floral en que se recolectaron las flores tratadas para observar viabilidad de polen con fluorescencia, C) Estado de floral (59 escala BBCH) al cual se aplicaron los tratamientos, D) Frutos cosechados a los 65 días pos-aplicación con el número promedio de semillas para cada tratamiento.

3.2.2.4. Crecimiento de fruto

El tratamiento con GA₃ incrementó el tamaño de fruto, aplicado sólo o combinado con CuSO₄ (cuadro 3). El aumento en tamaño de fruto producido por el GA₃ puede atribuirse, de acuerdo a Ben-Cheikh *et al.* (1997), a un aumento de la división celular y al incremento radial de las células mesocárpicas. En el tratamiento combinado de GA₃ y CuSO₄ existió un aumento significativo en el grosor de cáscara comparado con los tratamientos de ANA, CuSO₄ y control (cuadro 3), lo que evidencia la existencia de un aumento adicional de la división celular en la corteza. El ANA provocó raleo de frutos, lo cual junto con la caída masiva de los tratamientos de CuSO₄ y control inhabilitó analizar estadísticamente la evolución del diámetro de fruto desde el cuajado hasta el fin de caída fisiológica. A pesar de esto último, se observaron diámetros menores de fruto durante todo el transcurso del experimento en los frutos tratados con ANA y al momento de finalización del experimento se observó significativamente menor tamaño en el tratamiento con ANA comparado con los frutos control y los del resto de los tratamientos (cuadro 3). Este resultado es coincidente con los de Lewin y Monselise (1976), donde la aplicación de 150 mgL⁻¹ de ANA a frutitos jóvenes disminuyó la tasa de crecimiento de los mismos en tangor “Ortanique”.

3.3. INDUCCIÓN DE PARTENOCARPIA CON APLICACIONES A PLANTA COMPLETA EN CONDICIONES DE CAMPO

3.3.1. Presencia y número de semillas

La aplicación simple y doble de GA₃ logró disminuir significativamente el número de semillas verdaderas y totales en relación al control, con una reducción promedio de dos semillas por fruto (cuadro 4). Este resultado coincide con lo reportado por Feinstein *et al.* (1975), donde una aplicación a principio y mitad de floración de 20 mgL⁻¹ GA₃ a árboles completos redujo el número de semillas desarrolladas por fruto en forma significativa de 12.5 a 9.7 y 10.3 promedio por fruto respectivamente en mandarina “Dancy”, variedad autocompatible.

Erner *et al.* (2008) reportaron resultados coincidentes con los anteriores, con dos aplicaciones de GA₃ de 200 y 400 mgL⁻¹ separadas por un período de dos semanas en pummelo “Chandler” autoincompatible. La causa de no lograr una reducción más importante en el número de semillas, no parece ser la concentración aplicada, ya que ésta fue efectiva en las aplicaciones localizadas a flor y además demostró ser el mejor tratamiento inhibitor de la germinación y el crecimiento del tubo polínico. La causa más probable está relacionada con los momentos de aplicación; en el presente trabajo se hicieron una o dos aplicaciones con un intervalo de quince días entre sí, la primera con 30-40% de flor abierta y la segunda con 70-80% de flor abierta. Con estas dos aplicaciones no se pudo cubrir un porcentaje importante de flores en los estados de mayor sensibilidad y por lo tanto muchas de ellas no fueron afectadas por los tratamientos (Anexo 6.2B). El momento de aplicación, relacionado al estado de desarrollo de las flores es uno de los factores que más importantes en la respuesta a la aplicación de GA₃ tal como lo demostró Mesejo *et al.* (2008) en “Clemenules”. Las aplicaciones más tempranas, 7 días pre-antesis presentaron reducción del número de semillas del 52% y 2 días pre-antesis la reducción fue del 26%.

Pero la aplicación en antesis demostró ser la más efectiva, ya que produjo arresto completo del crecimiento del tubo polínico, previniendo la fertilización y logrando una reducción del 100% en el número de semillas (Mesejo *et al.*, 2008).

El número de semillas abortadas no presentó diferencias significativas entre tratamientos ni con el control (cuadro 4). Este resultado coincide con los de Feinstein *et al.* (1975) donde aplicaciones con distintas dosis de GA₃ tampoco produjeron diferencias significativas en el número de semillas abortadas entre sí, ni con el control.

Las aplicaciones simples y dobles de CuSO₄ no provocaron reducción significativa del número de semillas verdaderas y totales por fruto comparado con el control (cuadro 4). Este resultado no confirma el reporte de Mesejo *et al.* (2006), quienes verifican en dos años de trabajo una disminución significativa del número de semillas con aplicaciones de 25 mgL⁻¹ de CuSO₄ (aún menores a las aplicadas en el presente trabajo) en mandarina “Afourer” en condiciones de polinización abierta, reduciendo el número de semillas por fruto en un 55% y 81% respectivamente. Erner *et al.* (2008) tampoco logran repetir esos resultados en pummelo “Chandler” con aplicaciones de 25 y 100 mgL⁻¹ de CuSO₄. La causa podría ser que tanto pummelo “Chandler” como mandarina “Montenegrina”, son variedades con baja capacidad partenocarpica y alta fertilidad de polen (Rodríguez y Cunha Dornelles, 1999, Yamamoto *et al.*, 2006), lo cual hace que no respondan a la aplicación de CuSO₄ de la misma forma que otras variedades que presentan alta capacidad partenocarpica.

Ninguno de los tratamientos inductores de partenocarpia aumentó significativamente el porcentaje de frutos sin semillas con respecto al control, siendo prácticamente nulo en todos los casos (cuadro 5). No se pudieron confirmar en Montenegrina los resultados obtenidos por Domingués y Rodríguez (2007) en una variedad autocompatible como “Murcott” quienes alcanzaron una reducción del 30% en el porcentaje de frutos sin semillas con aplicaciones de 100 y 200 mgL⁻¹ de GA₃, ni los de Erner *et al.* (2008) con 200 y 400 mgL⁻¹ en pummelo “Chandler”. Sin embargo, se

destaca el aumento significativo de los frutos con 1-4 semillas en relación al control, con una y dos aplicaciones de GA₃ (cuadro 5).

Adicionalmente, no existió efecto de ninguno de los tratamientos en el porcentaje de frutos con semillas abortadas y su número promedio, lo cual podría sugerir la ausencia de efecto de los productos sobre el desarrollo embrionario o sobre el desarrollo del óvulo en “Montenegrina”, lo cual no se pudo confirmar por carecer de resultados del análisis de viabilidad de óvulos.

Cuadro 4. Número de semillas verdaderas, abortadas y totales promedio por fruto y diámetro promedio de fruto por tratamiento en mandarina “Montenegrina”. Tratamientos aplicados a planta completa: aplicación simple de CuSO₄ (CU1) y doble (CU2), aplicación simple de GA₃ (GA1) y doble (GA2) y control.

Tratamiento	Diámetro de fruto(mm)	Número de semillas verdaderas	Número de semillas abortadas	Número de semillas totales
CU1	53,63 ab ^z	8,16 ab	2 ns	10,35 ab
CU2	52,92 abc	7,89 ab	2	10,14 ab
GA1	50,36 bc	7,35 b	2	9,80 b
GA2	49,17 c	7,09 b	3	9,70 b
Control	54,67 a	9,34 a	3	11,96 a

^z separación de medias Test de Tukey

ns: no significativo, diferencia significativa ($P \leq 0.05$)

N=1450

Cuadro 5. Porcentaje de frutos sin semillas y proporción de frutos con 1 a 4 semillas por tratamiento en mandarina “Montenegrina”. Tratamientos aplicados a planta completa: aplicación simple de CuSO_4 (CU1) y doble (CU2), aplicación simple de GA_3 (GA1) y doble (GA2) y control.

Tratamiento	%frutos sin semillas	% frutos con semillas de 1 a 4	% frutos con semillas abortadas
CU1	0 ns	9 bc ^z	84 ns
CU2	1	12 abc	85,5
GA1	3	21 ab	86
GA2	2	23 a	86,5
Control	1	5 c	86

^z separación de medias Test de Tukey

ns: no significativo, diferencia significativa ($P \leq 0.05$)

N=1450

3.3.2. Relación entre el número de semillas y diámetro del fruto

El tratamiento de doble aplicación de GA_3 fue el que presentó menor peso medio de fruto en cosecha y menor diámetro durante todo el período de crecimiento de fruto (desde 76 hasta los 259 días postaplicación) en relación al control (cuadros, 6 y 8). Por el contrario los tratamientos con CuSO_4 no modificaron significativamente el tamaño de fruto con respecto control en el período considerado. La correlación entre el diámetro de fruto y el número de semillas fue baja, con un coeficiente R de 28 a 53% muy variable según tratamiento (datos no presentados), por lo que la disminución en el tamaño de los frutos tratados con GA_3 no puede explicarse por la disminución del número de semillas.

La existencia de una alta correlación negativa ($r = -0.82$) entre el peso medio de fruto y el número de frutos en cosecha, indica que el principal factor determinante del menor tamaño de frutos en los tratamientos con GA_3 , es el número de frutos cosechados que alcanzó un promedio por planta de 2895 en el doble tratamiento de GA_3 frente a

1980 en el testigo en plantas no podadas (cuadro 7). La competencia entre frutos provocada por un aumento del cuajado producido por el GA₃, ha sido reportado por varios autores como la principal causa de la disminución en el tamaño en varios cultivares de citrus (Agustí *et al.*, 1982, Talón *et al.*, 1992, Tominaga, 1997). Consistentemente, aplicaciones de 50, 100 y 200 mgL⁻¹ de GA₃ con el fin de inducir partenocarpia, incrementaron significativamente el porcentaje de cuajado a 45, 58, y 62% respectivamente y ese aumento llevó asociado una reducción de 80 y 84% del peso de fruto con respecto al control (Feinstein *et al.*, 1975).

Cuadro 6. Evolución del diámetro de fruto (mm) por tratamiento y condición con y sin poda según días post-aplicación en mandarina “Montenegrina”. Tratamientos aplicados a planta completa: aplicación simple de CuSO₄ (CU1) y doble (CU2), aplicación simple de GA₃ (GA1) y doble (GA2) y control.

Diámetro de fruto (mm)	Condición	Tratamiento	Días post- aplicación							
			76	110	131	152	173	206	238	259
Sin poda	CU1		22,04 a ^z	30,73 a	34,27 a	36,95 ab	39,13 ab	43,11 ab	45,05 ab	45,72 ab
	CU2		21,4 ab	29,42 ab	33,72 ab	37,77 ab	39,55 ab	43,45 ab	45,39 ab	46,64 ab
	GA1		19,78 b	28,00 b	31,86 b	35,22 b	37,50 b	41,54 ab	43,46 ab	43,79 b
	GA2		19,90 b	27,80 b	31,63 b	34,72 b	36,77 b	40,08 b	42,15 b	44,15 ab
	Control		22,75 a	31,04 a	35,57 a	38,63 a	41,85 a	45,63 a	47,00 a	48,55 a
Con poda	CU1		25,18 a	34,24 a	39,66 a	44,05 a	45,12 a	52,28 a	54,67 a	54,28 a
	CU2		23,27 bc	32,37 ab	37, 73 a	40,36 ab	43,94 ab	49,98 ab	52,12 ab	53,66 a
	GA1		22,34 c	30,61 b	35,29 b	38,26 bc	41,73 ab	47,11 bc	49,79 bc	50,78 ab
	GA2		21,56 c	29,85 b	34,36 b	36,54 c	40,17 b	44,86 c	47,63 c	47,81 b
	Control		24,89 ab	33,61 a	38,66 a	41,59 a	45,13 a	50,61 ab	53,03 ab	53,01 a

^z separación de medias Test de Tukey

ns: no significativo, diferencia significativa ($P \leq 0.01$)

N=90

Cuadro 7. Número promedio de frutos por árbol y por tratamiento según condición con poda en mandarina “Montenegrina”. Tratamientos aplicados a planta completa: aplicación simple de CuSO_4 (CU1) y doble (CU2), aplicación simple de GA_3 (GA1) y doble (GA2) y control.

Condición		Rendimiento en número de frutos		Error estándar
Sin Poda		2085	a ^z	154,52
Con Poda		869	b	131,3
Tratamiento				
Sin Poda	GA2	2895	a	247,5
	CU1	2029	ab	
	Control	1980	ab	
	CU2	1798	ab	
	GA1	1727	b	
Con Poda	GA2	1211	b	167,6
	GA1	1069	bc	
	Control	1039	bc	
	CU2	588	cd	
	CU1	439	d	

^z separación de medias Test de Tukey

ns: no significativo, diferencia significantiva ($P \leq 0.05$)

N=30. No están incluidos los frutos raleados por impedir el análisis estadístico.

Cuadro 8. Peso medio de fruto según tratamiento y condición de poda en cosecha, mandarina “Montenegrina”. Tratamientos aplicados a planta completa: aplicación simple de CuSO_4 (CU1) y doble (CU2), aplicación simple de GA_3 (GA1) y doble (GA2) y control.

Condición	Peso medio de fruto(grs.)	Error estándar
Sin Poda	60,09 a ^z	6,183
Con Poda	93,18 b	7,232
Tratamiento		
Control	86,27 a	6,998
CU2	82,39 ab	
CU1	78,11 ab	
GA1	76,09 ab	
GA2	60,32 b	

^z separación de medias Test de Tukey, ns: no significativo, diferencia significativa ($P \leq 0.05$), $N=30$

3.3.3. Número de semillas y rendimiento

Ninguno de los tratamientos con GA_3 disminuyó el rendimiento físico en número de frutos promedio producidos por planta con respecto al control (cuadro 7). La doble aplicación de GA_3 afectó el rendimiento comercial al provocar disminución de tamaño de los frutos por debajo de 50 mm, lo cual no se considera como fruta exportable (Federico Montes, com. pers.³). Si en siguientes ensayos se corrobora el efecto reductor del número de semillas de estos tratamientos sería conveniente tener en cuenta medidas de manejo complementarias para mejorar el tamaño de fruto provocado por el efecto promotor del cuajado que presenta el GA_3 en “Montenegrina”. El raleo es una de esas

³ Comunicación personal con Ing. Agr. Federico Montes, 2010.

medidas que se utiliza actualmente en esta variedad por los problemas de tamaño de fruto que presenta debido su alta capacidad de natural de cuajado (Gambetta *et al.*, 2008).

4. CONCLUSIONES

En las condiciones del estudio, la mandarina Montenegrina presentó un mínimo índice de partenocarpia natural, con un 99% de frutos con semillas.

En condiciones “In vitro”, el polen presenta un alto porcentaje de germinación, el cual puede ser casi totalmente inhibido con GA₃, ANA y CuSO₄ en diferentes concentraciones y combinaciones.

Estas mismas sustancias aplicadas a flores individuales, limitaron en forma significativa el crecimiento del tubo polínico a los 5 y 10 días posteriores a la polinización. El GA₃ resultó el más eficiente, no permitiendo el avance del tubo polínico más allá del estigma a los 10 días posteriores a la polinización.

La aplicación de GA₃ (100mgL⁻¹) a flores individuales, indujo el desarrollo de frutos partenocárpicos y un mayor porcentaje de cuajado que las flores control hasta los 65 días post-aplicación. Ni el CuSO₄ ni el ANA lograron inducir partenocarpia, presentando adicionalmente el ANA un adelanto en la abscisión.

Las aplicaciones de GA₃ a plantas completas, no modificaron el porcentaje de frutos sin semillas en relación al control, pero lograron una disminución significativa en el número promedio de semillas por fruto y un incremento en el porcentaje de frutos con 4 o menos semillas. El CuSO₄ no fue eficaz en ninguno de los parámetros evaluados con respecto al control.

Desde el punto de vista de su uso como práctica agronómica, se considera relevante aumentar el número de aplicaciones, como forma de cubrir un mayor número de flores en el estado de mayor sensibilidad al producto.

5.BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, J.D. 1991. Fungicidal Inhibition of Pollen Germination and Germ-tube Elongation in Muskmelon. *HortScience* 26(5): 529-530.
- Agustí, M.; García-Marí, F.; Guardiola, J. L. 1982. Gibberellic acid and fruit set in sweet orange. *Sci. Hortic.* 17: 257-264.
- Agustí, M.; Zaragoza, S.; Bleiholder, H.; Buhr, L.; Hack, H.; Klose, R.; Staub, R. 1995. Escala BBCH para la descripción de los estadios fenológicos del desarrollo de los agrios (Gén. Citrus). *Rev. Lev. Agrícola* 332: 189-199.
- Agustí, M. 2003. *Citricultura*. 2 ed. Mundiprensa. 422p.
- Anderson, C. 1996. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA. Manual para productores de naranja y mandarina de la Región del Río Uruguay. Manual Serie "A" N° 2. p 67.
- Barry, G. H. 2004. The Quest for Seedless Citrus Fruit. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 2004. Vol. I : 346.
- Ben-Cheikh, W.; Perez-Botella, J.; Tadeo, R.; Talon, M.; Primo-Millo, E. 1997. Pollination increases gibberellin levels in developing ovaries of seeded varieties of Citrus. *Plant Physiol.* 114: 557- 564.
- Brewbaker, J.L.; Kwack, B. H. 1963. The essential role of calcium ion in the pollen tube growth. *Amer. J. Bot.* 50: 859-865.
- Bristow, P.R.; Shawa, A. Y. 1981. The Influence of Fungicides on Pollen Germination and Yield of Cranberry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106(3): 290-292.

- Chouza, X.; Mesejo, C.; Gravina, A. 2008. Parthenocarpic Ability of Self-compatible 'Montenegrina' Mandarin and Alternatives to Induce It. Abstract, XI Int. Citrus Congress, Wuhan, China: 82.
- Da Cunha Barros, M.; Gravina, A. 2006. Influencia del tipo de brote en el cuajado y crecimiento de tangor "Ortanique". *Agrociencia* 10(1): 37-46.
- De Souza, R.; Zugno, J. 2001. Tangerina conquista paladar europeo. In: *Materias da edição 4.743- Ano 93 – Caxias do Sul, 1º da agosto 2001*. www.via-rs.com.br/esteditora/correio/4743.htm#pouco.
- DIEA. 2008. Encuesta Citrícola "Primavera 2007". MGAP, Serie de Encuestas, N° 259.24p.
- Domingués, M. C.; Rodrigués, J. D. 2007. Redução de sementes do tangor 'Murcott' com a aplicação de biorreguladores durante o florescimento. *Cienc. Agrotec., Lavras*, v. 31 n. 3 p. 758-764, maio/jun.
- Elezaby, A. A.; Haseeb, G. M. 1995. Fungicidal inhibition and growth regulator promotion of pollen germination and germ-tube elongation in Apple. *Acta Horticulturae* 409: 179-183.
- Erner, Y.; Artzi, B.; Tagari, E.; Shiea, F.; Hamou, M. 2000. Carbohydrate and vascular bundle effects on Citrus fruit set. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 1: 693-698.
- Erner, Y.; Tagari, E.; Shmueli, S. 2008. Reduction of Seed Number in Pummelo Chandler. Abstract XI Int. Citrus Congress, Wuhan, China: 82.
- Feinstein, B.; Monselise, S. P.; Goren, R. 1975. Studies on the Reduction of Seed Number in Mandarins. *HortScience* 10(4): 385-386.

- Fellman, C.; Hoover, E.; Ascher P. D.; Luby J. 1991. Gibberellic acid - induced seedlessness in field- grown vines of 'Swenson Red' grapes. *HortScience*, 26 (7): 873-875.
- Frankel, R.; Galum, E. 1977. *Pollination Mechanisms, Reproduction and Plant Breeding*. Springer-Verlag, Berlín, Heidelberg, New York. 281p.
- Frost, H.B.; Soost, R.K. 1968. *Seed reproduction: development of gametes and embryos. The citrus industry. Vol. II*, Berkeley: University of California, Press.
- Gambetta, G.; Espino, M.; Pardo, E.; Alberti, V.; Arbiza, H.; Gravina, A. 2008. 'Montenegrina' Mandarin: Characterization of the Agronomic Behaviour and Fruit Size Improvement. *Abstract Int. Citrus Congress, Wuhan, China*: 84.
- Goren, R. 1993. Anatomical, Physiological and Hormonal Aspects of Abscission in Citrus. *Hort. Rev.* 15: 145-182.
- Gravina, A. 1999. *Ciclo Fenológico-reproductivo en citrus. Bases Fisiológicas y Manejo*. Universidad de la República, Facultad de Agronomía, 55p.
- Grosser, J.W.; Ollitrait, P.; Olivares-Fuster, O. 2000. Somatic hybridization in Citrus: An effective tool to facilitate variety improvement. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 36: 434-449.
- Gür N.; Topdemir, A. 2008. Effects of Some Heavy Metals on in vitro Pollen Germination and Tube Growth of Apricot (*Armenica vulgaris* Lam.) and Cherry (*Cerasus avium* L.). *World Applied Sciences Journal* 4(2): 195-198.
- Hedhly, A.; Hormaza, J. I; Herrero, M. 2003. The effect of temperature on stigmatic receptivity in sweet cherry (*Prunus avium* L.) *Plant, Cell and Environment* 26: 1673-1680.

- Iglesias, D. J.; Cercós, M.; Colmenero-Flores, J.M.; Naranjo, M. A.; Ríos G.; Carrera, E., Ruiz-Rivero, O.; Lliso, I.; Morillon, R., Tadeo, F. R.; Talón, M. 2007. Physiology of citrus fruiting. *Braz. J. Plant Physiol.* 19(4):333-362.
- Jackson, L. K.; Futch S. H. 1986. Pollination and Fruit set: Pollination requirement. Citrus Flowering and Fruiting Short Course. University of Florida (USA) Institute of Food and Agricultural Sciences. 163p.
- Juntilla, O.; Martinussen, I.; Ernstsen, A.; Nilsen, G.; Bhuvaneswari, T. V. 2002. Parthenocarpic fruit development in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) is induced by 3 β -hydroxylated gibberellins. *J. Hort. Sci. & Biotechnology*, 77(1) 9-12.
- Kearns, C. A.; Inouye, D. W. 1993. Techniques for Pollination Biologists. University Press of Colorado. 583 p.
- Kim, I.S.; Okubo, H.; Fujieda, K. 1992. Endogenous levels of IAA in relation to parthenocarpy in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Scientia Horticulturae* 52:1-8.
- Kimura, P.; Okamoto, G.; Hirano, K. 1996. Effect of gibberellic acid and streptomycin on pollen germination and ovule and seed development in Muscat Bailey A. *Am. J. Enol. Vitic.* 47 (2): 152-156.
- Koehler-Santos, P.; Cunha Dornelles, A. L. and Brandao de Freitas, L. 2003. Characterization of mandarin citrus germplasm from southern Brazil by morphological and molecular analyses. *Pesq. agropec. bras.*, Brasilia, v.38 n.7, p. 797-806, jul. 2003.
- Koltunow, A.M.; Brennan, P.; Protopsaltis, S.; Nito, N. 1995. Regeneration of West Indian lime (*Citrus aurantifolia*) containing genes for decreased seed set. *Acta Horticulturae* (www.ishs.org).

- Kotob, M.; Schwabe, W. 1971. Induction of parthenocarpy fruit in Cox's Orange Pippin apples. *J. Hort. Sci.* 46: 89- 93.
- Kwan, S. C.; Hamson, A. R.; Campbell, W. F. 1969. The Effects of Different Chemicals on Pollen Germination and Tube Growth in *Allium Cepa* L. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 94: 561-562.
- Lewin, I. J.; Monselise, S. P. 1976. Further studies on the reduction of seeds in Mandarins by NAA sprays. *Sci. Hortic.*, 4: 229-284.
- Li, D. D.; Shi, W.; Deng, X. X. 2002. Agrobacterium-mediated transformation of embryogenic calluses of Ponkan mandarin and the regeneration of plants containing the chimeric ribonuclease gene. *Plant Cell Rpt.* 21: 153-156.
- Lovatt, C. J.; Streeter, S. M. 1984. Phenology of Flowering in *Citrus sinensis* (L) Osbeck, cv. Washington Navel Orange. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 1: 186-190.
- Lu, J.; Lamikandra, O.; Leong, S. 1997. Induction of seedlessness in 'Triumph' Muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.) by applying gibberellic acid. *HortScience*, 32 (1):89 – 90.
- Mainland, C.M.; Eck, P. 1968. Growth Regulator Survey for Activity in Inducing Parthenocarpy in the Highbush Blueberry. *HortScience*, 3(3): 170-172.
- McCullagh, P.; Nelder, J. 1989. *Generalized Linear Models*. London: Chapman and Hall. 511p.
- Mesejo, C.; Martínez-Fuentes, A.; Reig, C.; Rivas, F.; Agustí, M. 2006. The inhibitory effect of CuSO₄ on Citrus pollen germination and pollen tube

growth and its application for the production of seedless fruit. *Plant Science*, 170: 37-43.

a Mesejo, C.; Martínez-Fuentes, A.; Reig, C.; Agustí, M. 2007. The effective pollination period in ‘Clemenules’ mandarin, ‘Owari’ Satsuma mandarin and ‘Valencia’ sweet orange. *Plant Science* 173: 223–230.

b Mesejo, C.; Martínez-Fuentes, A.; Reig, C.; Agustí, M. 2008. Gibberellic acid impairs fertilization in Clementine mandarin under cross-pollination conditions. *Plant Science*, 175(3): 267-271.

Mesejo, C.; Reig, C.; Martínez-Fuentes, A.; Agustí, M. 2008. Paclobutrazol Induces In Vitro Embryo Abortion and Reduces Seed Weight in Clementine Mandarin Fruit. Abstract, XI Int. Citrus Congress, Wuhan, China: 171.

Moss, G. I. 1972. Promoting fruit-set and yield in sweet orange using plant growth substances. *Australian Journal of Experimental Agriculture animal Husbandry* 114: 96-102.

Motomura, Y.; Ito, H. 1972. Exogenous Gibberellin as Responsible for the seedless Berry Development of Grapes. II. Role and Effects of the Prebloom Gibberellin Application as Concerned with the Flowering, Seedlessness and Seedless Berry Development of Delaware and Campbell Early Grapes. *Tohoku Journal of Agricultural Research* 23(1): 15-32.

Navarro, L.; Olivares-Fuster, O.; Juárez, J.; Aleza, P.; Pina, J. A.; Ballester-Olmos, J. F.; Cervera, M.; Fagoaga, C.; Duran-Vila, N.; Pena, L. 2004. Applications of biotechnology to Citrus improvement in Spain. *Acta Hort.* 632: 221-234.

Ogata, T.; Takeichi, T.; Matsunaga, K.; Hasegawa K.; Yamane, S.; Sugiyama, K. 2008. Seed abortion of ‘Tosa-Buntan’ pummelo pollinated with soft-X-irradiated pollens. *Scientia Horticulturae* 116: 180–185.

- Okamoto, G.; Miura, K. 2005. Effect of pre-bloom GA application on pollen tube growth in cv. Delaware grape pistils. *Vitis* 44(4): 157-159.
- Ortolá, A. G.; Monerri, C.; Guardiola, J. L.; 1997. Fruitlet age and inflorescence characteristics affect the thinning and the increase in fruitlet growth rate induce by auxin applications in citrus. *Acta Hort.* 463:501-508.
- Pardo, J.; Bermejo, A.; Cano, A.; Zaragoza, S. 2007. La Germinación del polen y la formación de las semillas en los cítricos. *Levante Agrícola*, 1 Trimestre: 16-20.
- Raza, H.; Khan, M.M.; Khan A.A. 2003. Seedlessness in Citrus. *Int. J. Agri. Biol.*, Vol. 5, No. 3.
- Rivas, F.; Erner, E.; Alós, E.; Juan, M.; Almela, V.; Agustí, M. 2006 Girdling increases carbohydrate availability and fruit set in citrus cultivars irrespective of parthenocarpic ability. *J. Hort. Sci. & Biotechnology*, 81(2): 289-295.
- Rodríguez, L.; Cunha Dornelles, A. 1999. Origem e caracterização horticultural da tangerineira 'Montenegrina'. *Laranja*, Vol.20 (1): 167-185
- Rodríguez, L.; Cunha Dornelles, A. L.; Schifino-Wittmann, M. T. 1999. Poliembrionia e número de sementes por fruto de quatro cultivares de tangerineira. *Ciencia Rural*, Santa María. 29(3):469-474.
- Roiz, L.; Ozeri, U.; Goren, R.; Shoseyov, O. 2000. Characterization of *Aspergillus niger* B-1 RNase and its inhibitory effect on pollen germination and pollen tube growth in selected tree fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 125(1):9-14.
- Sanzol, J.; Herrero, M. 2001. The effective pollination period in fruit trees. *Scientia horticulturae* 90(1-2): 1-17.

- SAS/STAT® 1997. Software: Changes and enhancements through release 6.12, Cary, NC:SAS Institute Inc., 1167p.
- Sawidis, T.; Reiss, H. D. 1995. Effects of heavy metals on pollen tube growth and ultrastructure. *Protoplasma* 185: 113-122.
- Shiozaki, S.; Pan, M.; Ogata, T.; Horiuchi, S.; Kawase, K. 1998. Jasmonic acid effects on gibberellic acid-induced seedlessness in 'Neo Muscat' table grapes. *J. Hort. Sci. & Biotechnology* 73 (6): 768 – 773.
- Soler Aznar, J. 1999. Reconocimiento de variedades de cítricos en campo. Generalitat Valenciana. España. pp. 145-151.
- Speranza, A.; Ferri, P.; Battistelli, M.; Falcieri, E.; Crinelli, R.; Scoccianti, V. 2007. Both trivalent and hexavalent chromium strongly alter in vitro germination and ultrastructure of kiwifruit pollen. *Chemosphere* 66: 1165–1174.
- Spiegel-Roy, P.; Goldschmidt, E.E. 1996. *Biology of Citrus*. 1^a E d. U.K. Cambridge Univ. Press. 230p.
- Stanley, R.G.; Linskens, H.F. 1974 *Pollen: biology, chemistry, management*. New York: Springer X, 307p.
- Tadeo, F.R.; Moya, J.L.; Iglesias, D.J.; Talón, M.; Primo-Millo, E. (2003) *Histología y citología de cítricos*. Serie de Divulgación Técnica. Generalitat Valenciana Conselleria d'Agricultura Peixca. pp 99.
- Talón, M.; Zacarías, L.; Primo-Millo, E. 1990. Hormonal changes associated with fruit set and development in mandarins differing in their parthenocarpic ability. *Physiol. Plant.* 79: 400-406.
- Talón, M. 1997. Regulación del cuajado del fruto en cítricos: evidencias y conceptos. *Levante Agrícola*, 1er trimestre, 338: 27-37.

- Tominaga, S. 1997. GA sprays delay and reduce physiological fruit drop in Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). *Acta Hort.* 463, 301- 310.
- Van der Meer, Q. P.; Van Bennekom, J. L. 1973. Gibberellic acid as a gametocide for the common onion (*Allium cepa* L.) *Euphytica* 22: 239-243.
- Van der Meer, Q. P.; Van Bennekom, J. L. 1976. Gibberellic acid as a gametocide for the common onion (*Allium cepa* L.) II. The effect of GA 4/7. *Euphytica* 25: 293-296.
- Vardi, A.; Levin, I.; Carmi, N. 2008 Induction of Seedlessness in Citrus: From Classical Techniques to Emerging Biotechnological Approaches. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 133(1):117-126.
- Varoquaux, F.; Blanvillain, R.; Delseny, M.; Gallois, P. 2000. Less is better: new approaches for seedless fruit production. *Trends in Biotechnology* 18(6):233-242.
- Vithanage, V. 1991. Effect of different pollen parent on seediness and quality of 'Ellendale' tangor. *Scientia Horticulturae*, 48: 253 – 260.
- Williams. R. R. 1965. The effect of summer nitrogen applications on the quality of Apple blossom. *J. Hort. Sci.* 40:31-41.
- Yamamoto, M.; Kubo, T.; Tominaga, S. 2006. Self- and cross-incompatibility of various Citrus accessions. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 75(5): 372-378.
- Yildiz, K.; Yilmaz H., 2002. Effect of jasmonic acid, ACC and ethephon on pollen germination in strawberry. *Plant Growth Regulation*, 38: 145–148.
- Zhang, X. S.; O'Neill, S. D. 1993. Ovary and gametophyte development are coordinately regulated by auxin and ethylene following pollination. *The Plant Cell* 5: 403-418.

6. ANEXOS

6.1 APLICACIÓN LOCALIZADA A FLORES: TIPO DE ABSCISIÓN Y TAMAÑO DE FRUTO

Tipo de abscisión y tamaño de fruto en algunos de los tratamientos. A) tamaño de fruto tratado con ANA (200mgL^{-1}), B) abscisión sin pedúnculo en el tratamiento con ANA(200mgL^{-1}), C) tamaño de un fruto control. D) abscisión con pedúnculo en fruto tratado con CuSO_4 (100mgL^{-1}), E) tamaño de fruto tratado con GA_3 (100mgL^{-1}), F) abscisión con pedúnculo de un fruto control al final del experimento.



6.2 APLICACIÓN A PLANTA COMPLETA EN CONDICIONES DE CAMPO

Estado de desarrollo floral al momento de aplicación y números de semillas promedio por tratamiento. A) Planta marcada en brotación, B) estado floral de aplicación de los tratamientos. Número de semillas según tratamiento: C) fruto con doble aplicación de CuSO_4 , D) fruto con una aplicación de CuSO_4 (100mgL^{-1}), E) fruto con una aplicación de GA_3 (100mgL^{-1}), F) fruto con doble aplicación de GA_3 (100mgL^{-1}), G) fruto control.

