UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

OPTIMIZACIÓN DEL RENDIMIENTO DE MANDARINA ‘AFOURER’ [*Citrus reticulata* Blanco] EN AISLAMIENTO DE POLINIZACIÓN CRUZADA

por

Natalia Stephanie GUIMARAES ACUŃA

TESIS presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Ingeniero Agrónomo

MONTEVIDEO
URUGUAY
2016

Tesis aprobada por:

Director: _____

Ing. Agr. MSc. Alfredo Gravina

_____

Ing. Agr. Dra. Giuliana Gambetta

_____

Ing. Agr. Martín Lanfranco

Fecha: 1 de marzo de 2016

Autor: _____

Natalia Stephanie Guimaraes Acuña

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, en especial mis padres y hermanos por su amor y el apoyo en cada desafío.

A mis amigos por acompañarme y ser parte de mi vida; y a Gabi por ir juntos a la par.

A Sole, Vale, Checha, Nati, Lupe, Tati, Mari, Mati, Bocha, Lea, Emi, Hernán, Marcos y Andrés, por disfrutar estos años de aprendizaje y por su amistad.

Al grupo de ecofisiología de cítricos: Florencia, Gerónimo, Ana Paula, Giuliana y Alfredo, por su invaluable colaboración en el trabajo, el apoyo y la motivación.

A mis tutores, Alfredo y Giuliana, por todas las correcciones e importantes aportes, su paciencia y disponibilidad.

A Alejandra Borges por su asesoramiento en estadística.

Al propietario del establecimiento Agriyú, Alegre Sasson; a Martín Lanfranco, Jorge Mendoza y los trabajadores del establecimiento quienes posibilitaron la coordinación y realización de las actividades de campo.

A los funcionarios de la Facultad de Agronomía, especialmente al personal de biblioteca, y a Sully Toledo por las correcciones formales del presente trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

Página

PÁGINA DE APROBACIÓN……..……....II

AGRADECIMIENTOS…….III

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES……. VI

1. INTRODUCCIÓN 1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 5
   2.1. SISTEMAS REPRODUCTIVOS EN CITRUS 5
   2.2. ESTERILIDAD E INCOMPATIBILIDAD 5
      2.2.1. Esterilidad gamética 6
         2.2.1.1. Androesterilidad 6
         2.2.1.2. Ginoesterilidad 7
      2.2.2. Esterilidad citológica 8
      2.2.3. Esterilidad homogenética 9
         2.2.3.1. Incompatibilidad esporofítica 10
         2.2.3.2. Incompatibilidad gametofítica 10
   2.3. POLINIZACIÓN CRUZADA 13
   2.4. PARTENOCARPIA 15
   2.5. CUAJADO DE FRUTOS 16
   2.6. FACTORES QUE DETERMINAN EL CUAJADO 18
      2.6.1. Control hormonal 18
      2.6.2. Disponibilidad de carbohidratos 21
   2.7. TÉCNICAS PARA LA MEJORA DEL CUAJADO 25
      2.7.1. Métodos indirectos 25
         2.7.1.1. Aplicación de ácido giberélico en invierno 25

2.7.2. Métodos directos 26
2.7.2.1. Aplicación de ácido giberélico en floración 26
2.7.2.2. Anillado post floración 28
2.8. CONTROL DE LA PRESENCIA DE SEMILLAS 31
2.8.1. Asilamiento territorial 31
2.8.2. Control químico 32
2.8.3. Repelentes de abejas 33
2.8.4. Mallas anti-abejas 33
2.9. MANDARINA ‘AFOURER’ 33
3. MATERIALES Y MÉTODOS 35
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 40
4.2. CRECIMIENTO DE FRUTOS 45
4.3. COMPONENTES DEL RENDIMIENTO 45
4.4. EFICIENCIA PRODUCTIVA 50
5. CONCLUSIONES 52
6. RESUMEN 53
7. SUMMARY 54
8. BIBLIOGRAFÍA 55
9. ANEXOS 69

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No. Página

1. Número de repeticiones por tratamiento. 38

2. Intensidad de floración (flores/100 nudos) según tratamiento. 41

3. Cuajado final de frutos (%) según tratamiento. 43

4. Número de frutos por planta (No. frutos), rendimiento por planta (Kg), peso promedio de fruto (g) y diámetro ecuatorial de frutos en cosecha (mm) según tratamiento. 46

5. Número de frutos por planta (No. frutos), rendimiento por planta (Kg), peso promedio de fruto (g), frutos por m3 de copa y diámetro ecuatorial de fruto (mm) en cosecha, en condiciones de libre polinización. 47

6. Peso y calidad interna de fruta según tratamiento. 48

7. Eficiencia productiva (frutos.m^{-3} de copa) según tratamiento. 51

Figura No.

1. Plantas de 'Afourer' enmalladas (izquierda), y detalle de estructura (derecha). 36

2. Medición del diámetro ecuatorial de fruta (izquierda); cosecha del experimento (derecha). 37

3. Evolución del cuajado de frutos (%) según tratamiento. 42

4. Tasa de abscisión diaria de frutos según tratamiento. 42

5. Malla anti-abejas sobre las plantas (izquierda), y detalle de la malla donde se observa una abeja y flores sobresaliendo (derecha). 44

6. Evolución del diámetro de fruto (mm) según tratamiento desde inicio de la fase II hasta cosecha. 45

7. Plantas previo a la cosecha con distintos tratamientos: G (izquierda y arriba), G+G (centro y arriba), A (derecha y arriba), G+A (izquierda y abajo), T (centro y abajo) y PA (izquierda y abajo). 48

8. Cortes transversales de frutos cosechados bajo malla anti-abeja (arriba), y en condiciones de polinización abierta (abajo). 49

9. Volumen de copa según tratamiento. 51

1. INTRODUCCIÓN

La producción citrícola nacional ocupa una superficie efectiva de 15.340 hectáreas y un total de 7,2 millones de plantas, con un 86 % de las mismas en producción. Posee 473 empresas registradas, de los cuales 4 concentran el 56,5 % de la superficie efectiva y aportan el 62 % de la producción total. Las principales especies cultivadas comercialmente son naranjas, mandarinas y limones, y con menor importancia pomelos. Las naranjas ocupan la mayor superficie efectiva (51,13 %), seguidas de mandarinas (39,01 %), limones (8,81 %) y los pomelos (1,04 %). La producción en 2014 alcanzó las 287.341 toneladas, de las cuales las naranjas, mandarinas, limones y pomelos representaron el 52,4 %, 36,5 %, 10,8 % y 0,3 %, respectivamente. En nuestro país se distinguen dos grandes zonas de producción de fruta cítrica, conocidas como norte y sur. La primera abarca principalmente los departamentos de Salto, Paysandú y Río Negro, presenta el 88 % de la superficie efectiva, y concentra en naranjas, mandarinas y pomelos, más del 90 % de su producción en toneladas. La zona sur incluye los departamentos de San José, Canelones, Montevideo y en menor medida Maldonado y Colonia. Ésta representa el 12 % de la superficie efectiva, y el 67 % de la producción de limones (MGAP. DIEA, 2015).

En Uruguay la producción de fruta cítrica está orientada a la exportación de fruta para consumo en fresco. Considerando el período 1990-2014, las exportaciones de fruta en fresco representan en promedio el 43 % del volumen total de producción (MGAP. DIEA 2013, MGAP. OPYPA 2014). Las exportaciones de mandarinas en volumen, desde 2005 a 2014 representaron en promedio 40 % del total (MGAP. DIEA, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, Uruguay XXI 2015). A partir de 2012 esta especie se posiciona como primer producto de exportación en valor dentro de los cítricos. En 2014, la exportación de mandarinas alcanzó los 38,8 millones de dólares con 42.749 toneladas; las naranjas totalizaron 32,8 millones de dólares con 59.930 toneladas, mientras que los limones lograron 20 millones de dólares con 17.182 toneladas. Los principales destinos de las exportaciones uruguayas de cítricos en 2014, fueron: Países Bajos (22 %), Rusia (14 %), España (13 %), Reino Unido (12 %) y Estados Unidos (9 %). Se destaca la participación de Estados Unidos,

posicionándose como sexto destino de exportación para la citricultura nacional a partir de la apertura del mercado en 2014, con 7,3 millones de dólares. Este destino en el período enero-agosto de 2015 mostró un importante crecimiento, alcanzando 17 millones de dólares, con una participación de las mandarinas del 87 % (Uruguay XXI, 2015).

La calidad de fruta es un factor determinante en el acceso a mercados y en su valor comercial. Ésta se define como un conjunto de propiedades que satisfacen las exigencias del consumidor, considerando las cualidades externas e internas (Bono et al., 2000). En lo que respecta a las mandarinas, la demanda del mercado internacional muestra una clara tendencia hacia frutos sin semillas, de fácil pelado, sanos y de buen sabor (Chao, 2005b). Actualmente en las variedades de mayor demanda se consideran frutos sin semillas cuando presentan 1 semilla cada 100 frutos (Barry, 2004).

Uruguay logró posicionarse como un proveedor de frutos cítricos de alta calidad en los mercados mundiales más importantes, fundamentalmente Europa (MGAP. OPYPA, 2010). La apertura del mercado estadounidense representa una diversificación en el destino de las exportaciones. Sin embargo, demanda variedades sin semillas (MGAP. OPYPA, 2012). En el marco de la reconversión varietal impulsada por el acceso de los cítricos nacionales a este mercado, se destaca la variedad de mandarina ‘Afourer’, la cual pertenece al “paquete varietal exportador” y satisface las demandas de los mercados internacionales (Carrau, 2005). Se distingue por presentar: frutos sin semillas en condiciones de autopolinización, fácil pelado, excelente aroma y sabor (USPTO, 1998).

La variedad 'Afourer' es conocida como 'Nadorcott®', 'W. Murcott' o 'Delite', según el país. Su origen es marroquí; y fue desarrollada en el Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) cercana a la ciudad de Afourer. Proviene de una planta de semilla de la variedad 'Murcott', cuyo donador de polen es desconocido (Nadori 2004, Agustí et al. 2005). No está claramente determinado si se trata de un híbrido, una selección nucelar o una mutación espontánea (Agustí et al., 2005). Saunt (2000), Nicotra (2001), Nadori (2004) la clasifican como híbrido.

'Afourer' fue divulgada por primera vez en la Exhibición Mundial de Frutas y Vegetales (MOFEL- World Fruits and Vegetables Exhibition), y su primera publicación se realizó en 1992. Es una variedad patentada (USPTO, 1998), los derechos de protección fueron presentados en la Oficina de las

Variedades Vegetales de la Comunidad (CPVO- Community Plant Varieties Office) en 1995; posteriormente se patentó en Estados Unidos y la República de Sudáfrica, en 1997 y 2000 respectivamente (Nadori, 2004).

Las plantas de esta variedad presentan gran desarrollo (Nadori, 2004), con ramas vigorosas y sin espinas, las nuevas brotaciones poseen tendencia a la verticalidad (Agustí et al., 2005). Afourer logra un buen funcionamiento y compatibilidad con muchos portainjertos. Aunque se reportan muertes de plantas injertadas sobre citrange "Carrizo" y problemas sobre el portainjerto citrange "Troyer" (Saunt, 2000).

'Afourer' posee temprana entrada en producción y alta productividad en condiciones de polinización cruzada (Nadori 2004, Agustí et al. 2005). La cosecha es relativamente tardía y extendida (Agustí et al., 2005). La fruta presenta fácil pelado, muy buena calidad interna (color, sabor, alto porcentaje de jugo) y externa (color) (USPTO 1998, Saunt 2000, Nadori 2004). En nuestro país presenta alta calidad de fruto y elevados rendimientos, exhibiendo además presencia constante de semillas en condiciones de libre polinización. Esto limita y disminuye su valor comercial (Gravina et al., 2011).

La variedad ‘Afourer’ a nivel nacional cuenta con 248.201 plantas totales en 382 hectáreas efectivas, con una producción de 5.622 toneladas, y una productividad de 38 Kg por planta en producción y 19 toneladas por hectárea en producción (MGAP. DIEA, 2015). Esta variedad muestra un fuerte crecimiento en la superficie efectiva nacional dentro de las mandarinas, incrementándose desde 0,8 % en 2006 hasta 6,38 % en 2014 (MGAP. DIEA, 2007, 2015).

Esta variedad fue caracterizada como autoincompatible, con capacidad de producir fruta sin semillas cuando es impedida la polinización cruzada (Nadori 2004, Agustí et al. 2005). En nuestras condiciones, también se ha confirmado su autoincompatibilidad, y producción de fruta sin semillas en condiciones de aislamiento (Gravina et al., 2011). Posee autoincompatibilidad de tipo gametofítico (Fasiolo y Rey, 2013), con partenocarpia facultativa autónoma (Gambetta et al., 2013). Estos resultados son coincidentes con los reportados en España (Bono et al., 2000) y California (Chao, 2005b). En condiciones que impidan la polinización cruzada la variedad solo presenta de 0,2 a 0,5 semillas por fruto (USPTO, 1998).

La partenocarpia se define como la producción de frutos sin semillas, sin que ocurra la fecundación (Vardi et al., 2008). La capacidad de acumular niveles suficientes de fitohormonas en el ovario, para que se desarrolle el fruto sin la necesidad de la formación de semillas, se define como habilidad partenocárpica. Ésta varía con las especies e incluso entre variedades de una misma especie (Agustí, 2010).

En montes instalados con variedades donadoras de polen viable cercanas, una de las técnicas utilizadas con el objetivo de disminuir la presencia de semillas es el uso de mallas que cubran totalmente las plantas y las aíslen de agentes polinizadores. En Uruguay esta técnica reduce significativamente el número de frutos con semillas y las semillas por fruto (Gravina et al., 2014b). Sin embargo, aumenta la abscisión de frutitos, afectando negativamente el número de frutos cosechados y el rendimiento (Otero y Rivas 2010, Gambetta et al. 2013, Gravina et al. 2014b). Las variedades partenocárpicas autoincompatibles en condiciones de polinización cruzada presentan mayor cuajado, comparado con condiciones de aislamiento, debido a que el contenido de giberelinas en ovarios fecundados es mayor en comparación con los no fecundados (Mesejo et al., 2013).

En el marco de esta problemática, se planteó como objetivo general de este trabajo: mejorar el cuajado de frutos y el rendimiento en la variedad de mandarina ‘Afourer’ en condiciones de aislamiento de polinización cruzada. Los objetivos específicos propuestos fueron: (1) determinar la eficiencia del ácido giberélico (GA_3) y el anillado de tronco en el cuajado de fruta; (2) determinar la eficiencia de los tratamientos en el número y tamaño de frutos, y el rendimiento.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. SISTEMAS REPRODUCTIVOS EN CITRUS

La reproducción en las plantas puede ser de tipo sexual y/o asexual. En la reproducción sexual participan células reproductoras especializadas denominadas gametos, formadas por el proceso de gametogénesis. La fusión del gameto masculino y el femenino origina el desarrollo de un embrión y finalmente la semilla. El órgano floral contiene las estructuras para la reproducción sexual (Poehlman y Sleper, 2003). Se denomina fertilidad a la capacidad de reproducirse mediante gametos, comúnmente con fecundación (Frost y Soost, 1968). Cuando la fecundación resulta de la unión de gametos producidos por la misma planta o clon se denomina autofecundación. Si la fecundación ocurre entre gametos provenientes de plantas de diferentes clones constituye la fecundación cruzada (Poehlman y Sleper, 2003). En una flor hermafrodita la proximidad entre las anteras y pistilos favorecen la autofecundación (autogamia). Sin embargo, en las plantas han evolucionado diferentes mecanismos para facilitar la fecundación cruzada (alogamia) e impedir la autogamia, que resultaría en endogamia con la consiguiente reducción de variabilidad genética de la especie. Uno de estos mecanismos se denomina autoincompatibilidad (Nasrallah et al. 1994, Kao y McCubbin 1996, Agustí 2010).

2.2. ESTERILIDAD E INCOMPATIBILIDAD

La esterilidad resulta en la incapacidad para reproducirse mediante semillas (Frost y Soost, 1968), debido al desarrollo anormal de los órganos reproductivos (Poehlman y Sleper, 2003). Puede ser inducida por causas ambientales y/o genéticas, éstas últimas son las que tienen verdadera importancia (Agustí, 2010).

En el género *Citrus* han sido encontrados varios tipos de esterilidad. La mayoría de las variedades más importantes en el mundo están dotadas con alguna causa de esterilidad resultando en frutos sin semillas o pobre presencia de éstas, lo cual soporta su alta calidad (Iwamasa, 1966). En *Citrus* la autoincompatibilidad y partenocarpia son rasgos importantes para la producción

de fruta y su calidad, ya que resultan en frutos sin semillas. En particular, la apirenia es actualmente una característica muy importante en la evaluación de frutos comerciales de cítricos para consumo en fresco (Distefano et al., 2012).

La esterilidad de origen genético puede clasificarse en tres tipos: gamética, citológica y homogenética (Agustí, 2010).

2.2.1. Esterilidad gamética

La esterilidad gamética se define como la inhabilidad de producir polen o sacos embrionarios funcionales (Jackson, 1997). Si el desarrollo deficiente es del estambre se denomina esterilidad masculina o androesterilidad. La esterilidad femenina o ginoesterilidad ocurre cuando el desarrollo deficiente es de los ovarios (Agustí, 2010).

2.2.1.1. Androesterilidad

La esterilidad masculina consiste en la inhabilidad de producir polen funcional, es decir con células espermáticas capaces de fecundar la oósfera. El grado de esterilidad masculina es variable entre cultivares del género *Citrus*, incluyendo varias especies [limón 'Eureka' (*Citrus limón* L. Burm), pomelo 'Marsh' (*Citrus paradisi* Macf.)]. Los ejemplos más conocidos los constituyen la naranja 'Washington Navel' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) y la mandarina 'Satsuma' (*Citrus unshiu* Marc.). En la primera, el tejido esporógeno degenera antes de la primera división meiótica, por tanto no se produce polen funcional (Iwamasa 1966, Khan 2007), presentando anteras marchitas de color marrón (Frost y Soost, 1968). Osawa, citado por Frost y Soost (1968) reportó en 'Satsuma' menor número de células madre de polen en sus lóculos, y gran parte de granos de polen que degeneran a lo largo de su desarrollo.

La esterilidad masculina podría deberse al desarrollo imperfecto de estambres pero usualmente es debido al desarrollo defectuoso del polen. La esterilidad previa a la fertilización es caracterizada por la producción de gametos no funcionales (Jackson, 1997).

A través del cruzamiento de mandarina ‘Satsuma’ (cv. ‘Suzuki Wase’) y Trifolia (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) se pudo determinar que uno de los fenómenos que causan esterilidad del polen en los cítricos es la degeneración de la micróspora en etapas tempranas de la meiosis. En lima ‘Tahiti’, la esterilidad del polen no se debe a su condición de triploide natural, y sí a una temprana degradación de la célula madre de polen, como el caso mencionado para ‘W. Navel’ (Iwamasa, 1966).

Las variedades autoincompatibles y aquellas con esterilidad masculina tienen la habilidad de producir frutos sin semillas cuando la polinización cruzada es impedida. Estas líneas autoincompatibles pueden producir fruta con semillas en plantaciones mixtas con frecuente presencia de insectos polinizadores (Khan, 2007).

La androesterilidad es controlada por genes nucleares y citoplasmáticos. El resultado de cruzamientos entre cultivares con esterilidad citoplasmática (‘Kuchinotsu No. 20’) y con citoplasma fértil (‘Otani iyokan’), indican que la esterilidad masculina en *Citrus* resulta de la interacción entre un gen nuclear recesivo y un gen citoplasmático estéril. Este tipo de esterilidad ocurre cuando una variedad presenta citoplasma androestéril y genes nucleares no restauradores de la fertilidad, como es el ejemplo de ‘Satsuma’ (Yamamoto et al., 1997). La esterilidad masculina está expresada como una característica recesiva y controlada por tres genes nucleares restauradores de la fertilidad (r1, r2 y r3). El alelo del gen r1 es un gen epistático de los alelos r2 y r3. La androesterilidad aparece solamente cuando r1 es homocigoto recesivo (r1r1) y uno de los otros dos genes es homocigoto recesivo (r2r2 o r3r3) (Dewi et al., 2015).

2.2.1.2. Ginoesterilidad

La esterilidad femenina se define como la incapacidad de producir sacos embrionarios con oósferas capaces de desarrollar un embrión (Frost y Soost, 1968). Ésta puede resultar del aborto de las partes femeninas de la flor o el desarrollo defectuoso del saco embrionario. Éste a menudo aborta en otros estados de desarrollo. Algunos de los sacos embrionarios exhiben desarrollo retrasado lo que indica que la oósfera no está madura y viable para la fertilización en el tiempo adecuado (Jackson, 1997).

Yahata et al. (2011) estudiaron la formación de gametos femeninos en pummelos [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.], confirmando como causa de su ginoesterilidad la ausencia de la formación de células madre de saco embrionario.

En las variedades 'Satsuma' y 'Washington Navel' se observó que la célula madre de la megáspora o el saco embrionario, muy frecuentemente degenera luego de la formación de la fila de megáspora (Iwamasa, 1966). Aunque Jackson (1997) reporta en 'Washington Navel', el aborto de la célula madre de la megáspora antes de dividirse. Otras variedades de naranja que tienen pocas semillas, poseen algún grado de esterilidad femenina, así como esterilidad masculina. En pomelo 'Marsh' el bajo número de semillas obtenido en polinización cruzada indica un alto grado de esterilidad femenina (Frost y Soost, 1968).

2.2.2. Esterilidad citológica

La esterilidad citológica resulta de alteraciones en la meiosis durante la gametogénesis. Afecta a los cultivares triploides, debido a que durante la meiosis sus gametos reciben distinto número de cromosomas, lo que anula su capacidad de fecundación. Estas anomalías en cítricos dan lugar a zigotos incapaces de desarrollarse, por los que sus semillas no contienen embrión y no pasan de ser rudimentos seminales (Agustí, 2010).

La naranja 'Valencia' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] es un ejemplo de esterilidad citológica en *Citrus*. La esterilidad en esta variedad es causada fundamentalmente por la translocación recíproca, reportándose muy baja fertilidad de polen. La esterilidad parcial en 'Lima mexicana' se debe fundamentalmente a una alteración en la estructura de los cromosomas denominada inversión cromosómica (Iwamasa, 1966). El pomelo 'Marsh' también presenta este tipo de esterilidad, muchas células madre de polen mostraron anormalidades durante la meiosis, debido a una falla en la formación del huso en la segunda división (Raghuvanshi, citado por Iwamasa, 1966).

2.2.3. Esterilidad homogenética

La esterilidad homogenética se define como la incapacidad de un grano de polen viable de fecundar las flores; si pertenecen al mismo cultivar se denomina autoincompatibilidad; si son de otro cultivar se denomina incompatibilidad de cruce (Agustí, 2010).

Frankel y Galun (1977) definen el término incompatibilidad como el proceso por el cual, plantas con gametos funcionales son incapaces de producir semillas. La autoincompatibilidad es la incapacidad de una planta con gametos fértiles de producir un cigoto mediante autopolinización (Frost y Soost 1968, De Nettancourt 1977).

La autoincompatibilidad es un sistema de reconocimiento celular que limita la endogamia y se produce por diversos mecanismos en diferentes especies de plantas. Es un fenómeno genéticamente controlado que previene la formación de semillas en condiciones de autopolinización en plantas que producen gametos funcionales (Nasrallah et al., 1994).

La autoincompatibilidad permite que el pistilo de una flor distinga entre su propio polen (genéticamente relacionado) y el polen no propio (genéticamente no relacionado). El primero es rechazado, mientras el polen no propio es aceptado para la fertilización (Kao y McCubbin, 1996).

La autoincompatibilidad puede ser clasificada en homomórfica y heteromórfica, según la morfología de sus flores (Kao y McCubbin, 1996). En el tipo denominado homomórfica, las flores de una especie tienen el mismo tipo de morfología. Mientras que en el tipo heteromórfica las flores de la especie pueden tener dos o tres tipos de morfología diferentes y la polinización es compatible solamente entre flores de diferentes tipos de morfología (De Nettancourt, 1977). A su vez dentro del tipo homomórfica se clasifican en gametofítica y esporofítica, en función de si el comportamiento del polen en las interacciones de autoincompatibilidad es determinado por el genotipo del polen (gametofítica) o por el genotipo de la planta de la que se deriva el polen (esporofítica) (Kao y McCubbin, 1996).

En el género *Citrus* la autoincompatibilidad parece ser de tipo gametofítica (Frost y Soost, 1968).

Algunos de los cultivares autoincompatibles tienen semillas porque su fertilidad femenina y baja capacidad partenocárpica requieren polinización cruzada para establecer la fruta. En una plantación cerrada algunas líneas autoincompatibles pueden producir fruta sin semillas, las Clementinas son el ejemplo más conocido. Estas frutas pueden ser más pequeñas y tender a reducir el cuajado de fruto en comparación a las con semillas. Cultivos mixtos con variedades con fertilidad masculina frecuentemente producirán frutos con semillas, a menos que posean esterilidad femenina (Khan, 2007).

2.2.3.1. Incompatibilidad esporofítica

En el sistema de incompatibilidad esporofítica, el polen es incapaz de germinar en el estigma, dada la síntesis de enzimas quinasas que impiden su germinación (Nasrallah et al., 1994). Esta incompatibilidad resulta de la interacción entre los esporofitos diploides (el genotipo del pistilo y el de la planta donadora de polen). Este tipo de incompatibilidad está determinada por un locus con múltiples alelos S. El grano de polen presenta los productos de los dos alelos S de la planta que lo generó, si uno de estos coinciden con los alelos S del pistilo, ocurre la incompatibilidad (Matton et al., 1994).

Una de las diferencias de este sistema con el gametofítico, es que el alelo S presenta dominancia, determinada por la planta que produce el polen. Es decir, en una planta de genotipo S1S2, con alelo S1 dominante sobre S2, todo el polen producido funcionará como S1, y será incompatible en el estilo S1 y compatible en el S2 (Poehlman y Sleper, 2003).

2.2.3.2. Incompatibilidad gametofítica

Dentro de la autoincompatibilidad homomórfica, el tipo más común es la gametofítica, encontrándose en más de 60 familias, en comparación con la esporofítica, que fue reportada en 6 familias. Ambos tipos de incompatibilidad evolucionaron independientemente (Kao y McCubbin, 1996).

La autoincompatibilidad gametofítica está determinada por el gen S-RNasa en estilo y por la familia de genes Box-F en polen (Hiratsuka et al. 1995, Janssens et al. 1995, Bošković et al. 1997).

La autoincompatibilidad gametofítica resulta de la interacción entre el fenotipo del esporófito diploide y el microgametofito haploide (Kahn y Demason, 1988).

La autoincompatibilidad gametofítica es un sistema basado genéticamente en el reconocimiento celular en la planta. Esto previene la fertilización por polen propio, un alelo S idéntico a cualquiera de los dos alelos S presentes en el tejido esporofítico femenino (McClure et al., 1990). Este mecanismo está generalmente controlada por un locus simple denominado S que tiene múltiples alelos S, los cuales permiten el reconocimiento y rechazo del polen propio (Franklin-Tong y Franklin, 2003).

La familia Solanaceae ha sido usada como modelo de estudio de las bases moleculares y bioquímicas en el reconocimiento y rechazo del polen propio. En esta familia, un locus genético polimórfico llamado S determina la ocurrencia de fecundación. Si una planta lleva los alelos S1 y S2, y sobre su estigma caen granos de polen de la misma flor (contiene alelos S1 o S2), podrán germinar y crecer a través del estilo, pero su crecimiento se detendrá en el tercio superior del estilo. Esto se debe a que el pistilo es capaz de reconocer los alelos S1 y S2 del polen como propios, por la coincidencia de los alelos S. La punta del tubo polínico usualmente se ensancha y desintegra, impidiendo la entrega de sus células espermáticas en el ovario para la fecundación. Si el estigma de una planta S1S2 es polinizado con polen S2 y S3, el polen S2 es rechazado por el reconocimiento de los alelos S. Pero el polen S3 lleva un alelo S diferente a los dos que contiene el pistilo, será reconocido como polen no propio, germinará y crecerá a través del estilo en dirección al ovario para efectuar la fecundación (Kao y McCubbin, 1996).

Kao y McCubbin (1996) proponían identificar los productos de los alelos S en el polen y pistilo. Los productos en pistilo o proteínas de polen presentan correlación con los alelos S. Para identificar el producto del alelo S1 en el pistilo, se debería buscar una proteína del pistilo que esté presente en todas las plantas que llevan alelo S1, pero esté ausente en todas las plantas que no llevan alelo S1. La proteína del pistilo asociada con un número de alelos S debe ser identificada como proteína S o RNasas S, por su asociación con actividad RNasa.

En un estudio en plantas de petunia (*P. inflata*) de genotipo S1S2 a las cuales se les introdujo un gen S3, analizaron si por sí sola la proteína S es

suficiente para que el pistilo reconozca o rechace su propio polen. Las plantas transgénicas que adquirieron el alelo S3 produjeron cantidades normales de proteína S3, y adquirieron la habilidad de rechazar polen S3. Además, produjeron cantidades normales de proteínas S1 y S2 codificadas de sus propios alelos S1 y S2. Las plantas que fallaron en adquirir la habilidad de rechazar el polen S3, no produjeron ninguna proteína S3. Los autores concluyen que las proteínas S son suficientes para conferir en el pistilo la habilidad de rechazar su propio polen (Murfett et al., 1994). Los resultados en los cuales las plantas pierden o adquieren la habilidad de rechazar un genotipo determinado de polen, proporcionan evidencia directa de que la proteína S controla la habilidad del pistilo de reconocer y rechazar su polen propio (Kao y McCubbin, 1996).

En polinizaciones incompatibles del tangelo 'Orlando', los tubos polínicos mostraron una deposición temprana irregular de calosa en las paredes del tubo polínico, características morfológicas indicativas de una reacción de incompatibilidad. Además de un lento crecimiento con marcada disminución de su tasa, sin superar la zona superior del estilo (Kahn y Demason, 1988).

En las variedades 'Banpeiyu' (*Citrus máxima* Burm. Merr.) y 'Hyuganatsu' (*Citrus tamurana* Hort. ex Tanaka) con autoincompatibilidad gametofítica, los niveles de expresión de cobre / zinc superóxido dismutasa (Cu / Zn SOD), manganeso SOD (Mn SOD), catalasa (CAT), y cisteína proteasa (CYP) aumentaron en los tratamientos con polinizaciones autoincompatibles, en comparación con los niveles registrados en las polinizaciones autocompatibles. En los tratamientos con polinizaciones de autoincompatibilidad, a las 2 horas los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS) aumentan en los tubos polínicos de ambos cultivares. Estos resultados sugieren que un aumento de ROS podría ser uno de los fenómenos clave en la respuesta de autoincompatibilidad en los cítricos (Li et al., 2015b). El contenido de poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) también afecta la germinación y crecimiento del tubo polínico en polinizaciones autoincompatibles, en las variedades 'Banpeiyu' y 'Hyuganatsu'. Se identificaron incrementos en el contenido de espermidina libre y ácido perclórico insolubles, en tubos polínicos en tratamientos incompatibles. La aplicación de espermidina inhibió la elongación del tubo polínico y le provocó alteraciones morfológicas, como el agrandamiento y torsión de su punta, y la fuga de su contenido. Esto sugiere

que la espermidina podría participar en la respuesta de autoincompatibilidad en *Citrus* (Li et al., 2015a).

El desempeño del polen no es únicamente una característica intrínseca del tipo de polen, pero es ampliamente dependiente de la combinación masculina-femenina y la interacción genotipo-temperatura. La temperatura parece tener un efecto en la reacción de autoincompatibilidad afectando el lugar donde se detiene el tubo polínico (Distefano et al., 2012).

Cruzamientos entre cultivares de mandarina muestran una clara detención del tubo polínico en el estilo (Distefano et al., 2009). También se ha informado que la reacción de incompatibilidad en las especies cítricas, se produce en diferentes fases de crecimiento del tubo polínico a través del gineceo (De Nettancourt, 1977).

2.3. POLINIZACIÓN CRUZADA

La polinización consiste en la transferencia de polen de las anteras al estigma. Se distingue entre autopolinización y polinización cruzada según la procedencia del grano de polen. Si éste proviene de estambres de la misma planta o variedad clonal, se denomina autopolinización. La polinización cruzada implica la transferencia de polen de una variedad clonal a otra (Frost y Soost, 1968).

El polen de cítricos es pegajoso y de tipo adherente, característico de plantas entomófilas; en estos casos el viento suele ser de menor importancia en la polinización. La corola visible, perfume fuerte, polen y néctar abundante hacen a las flores atractivas para los insectos. La polinización cruzada natural en *Citrus* se lleva a cabo principalmente por las abejas (Frost y Soost, 1968).

En *Citrus*, al momento de antesis el estigma se encuentra receptivo y la anteras dehiscentes. Una vez que ocurre la polinización, las secreciones estigmáticas generan la hidratación del grano de polen y éste germina. El tubo polínico penetra el estigma y desciende por el estilo, a través de los canales estilares o los espacios intercelulares, hasta los lóculos del ovario (Distefano et al., 2011).

Las condiciones ambientales, en particular la temperatura y humedad relativa pueden afectar los procesos de polinización y fecundación. La humedad relativa afecta negativamente la fecundación en algunas especies cuando es inferior a 50 % o superior a 90 %, perjudicando la dehiscencia de las anteras. La temperatura afecta la polinización de forma indirecta, a través de su efecto en la actividad de las abejas. El transporte de polen de éstas es máximo entre 20 y 22°C, y prácticamente nulo con temperaturas inferiores a 12°C. La temperatura también tiene un efecto directo en la polinización, afectando la germinación del grano de polen y el crecimiento del tubo polínico. Estos son favorecido por temperaturas elevadas (25-30°C) y se reducen notoriamente con bajas temperaturas (menores a 20°C) (Agustí, 2010). Distefano et al. (2012) determinaron en mandarina 'Clementina', pummelo y citrón, el rango óptimo de germinación de polen in vitro entre 15 y 25°C. Estos autores no registraron germinación de polen a temperaturas menores a 10°C, y se redujo a 30°C.

El poder germinativo de limón 'Fino' y naranja 'Sucreña' se afectó por bajas temperaturas durante la formación de sus flores, especialmente entre los estados 55 y 56 de la escala BBCH. Las bajas temperaturas posiblemente generen irregularidades en la meiosis (microsporogénesis) (Pardo et al., 2007).

El período de polinización efectiva es la diferencia entre el tiempo que el óvulo permanece viable y receptivo después de la antesis, y el tiempo que el polen requiere para germinar y fecundar el óvulo. Para que la polinización sea efectiva y ocurra la fecundación, se requiere que el grano de polen sea trasladado al estigma, germine y llegue al óvulo cuando esté aún viable. El período de polinización efectiva está condicionado fundamentalmente por: la receptividad del estigma, el crecimiento del tubo polínico y la longevidad de los óvulos (Sozzi, 2007).

En los cítricos, el período de polinización efectiva es dependiente del genotipo. En mandarina 'Clementina' y naranja 'Valencia' el período de polinización efectiva fue de 8-9 días, mientras que en la mandarina 'Satsuma' alcanzó los 2-3 días. Éste es uno de los factores que determina la presencia de semillas en los frutos cítricos. El tiempo que el estigma se encuentra receptivo es el factor que limita la fecundación y presencia de semillas en mandarina 'Clementina' y naranja 'Valencia'. En mandarina 'Satsuma' esto se explica por la breve longevidad de sus óvulos (Mesejo et al., 2007).

2.4. PARTENOCARPIA

La partenocarpia se define como la producción de fruta sin semillas (Frost y Soost 1968, Spiegel-Roy y Goldschmidt 1996). Los cultivares partenocárpicos autoincompatibles pueden obtener frutos sin semillas aislados de la polinización cruzada, constituyéndose en un rasgo de valor económico, debido a las preferencias de los consumidores (Vardi et al., 2008).

La partenocarpia autónoma consiste en el cuajado de frutos sin estímulo externo, resultando siempre en la producción de fruta sin semillas. La partenocarpia estimulativa requiere algún tipo de estímulo (polinización, germinación del grano de polen, crecimiento del tubo polínico sin que ocurra fecundación) para el cuajado de fruta sin semillas (Vardi et al., 2008). En genotipos autoincompatibles la polinización puede ejercer suficiente estímulo para la producción de frutos sin semillas (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996).

Las semillas en desarrollo constituyen una fuente de reguladores de crecimiento, por lo que son importantes en el crecimiento y desarrollo del fruto. Durante el cuajado partenocárpico se han registrado elevados niveles endógenos de auxinas y giberelinas en el ovario, lo que sugiere que el aumento de la disponibilidad de estos reguladores de crecimiento en los ovarios pueden ser suficiente para inducir el crecimiento de la fruta (Vardi et al., 2008).

La capacidad de acumular niveles suficientes de fitohormonas en el ovario para que se desarrolle el fruto sin la necesidad de la formación de semillas, se define como habilidad partenocárpica. Ésta varía entre especies e incluso entre variedades de una misma especie (Agustí, 2010). Varios autores reportan la relación entre la habilidad partenocárpica y contenido endógeno de giberelinas (Talón et al. 1992, Vardi et al. 2008, Mesejo et al. 2013).

El grado de partenocarpia es fundamental para la producción sostenida. Por esto, aunque la tendencia a la partenocarpia es altamente prevalente en los cítricos, el grado de partenocarpia es fundamental para obtener variedades productivamente exitosas (Frost y Soost, 1968).

La ausencia de semillas es en general un obstáculo en el cuajado de fruto. En variedades autoincompatibles o con polen estéril, y con bajo grado de partenocarpia, la presencia de otra fuente de polen y abejas es esencial para la producción de fruta. Al comparar el cuajado en diferentes variedades en

condiciones de autopolinización y polinización cruzada, se observó que el cuajado es mayor en polinización cruzada (Frost y Soost, 1968).

2.5. CUAJADO DE FRUTOS

El cuajado se define como el proceso de transición del ovario de la flor a fruto en desarrollo. Abarca el período de crecimiento del fruto durante el cual éste puede sufrir abscisión (Talón, 1997b). Dicha transición requiere el reinicio del crecimiento del ovario, que se detiene durante la antesis. Si este crecimiento no se reinicia o una vez reiniciado cesa, el ovario se desprende (Agustí, 2003a).

El cuajado está determinado por el proceso de abscisión. La determinación del cuajado ocurre durante la primera fase de crecimiento, inicia en floración y culmina en la transición entre la fase I y II del crecimiento del fruto, denominada fin de la caída fisiológica. Los frutitos que superan este período son frutos cuajados (Talón, 1997b).

La abscisión de estructuras reproductivas se produce en dos flujos, que pueden solaparse en el tiempo. El primero, induce una masiva abscisión de flores y ovarios, durante los primeros 30 días post antesis aproximadamente. El segundo reduce el número de frutitos creciendo hasta fin de caída fisiológica (Goren 1993, Ruiz et al. 2001). La abscisión se produce en zonas predeterminadas denominadas zonas o capas de abscisión. La caída de flores y ovarios al comienzo del período de cuajado ocurre a través de la zona de abscisión A (ZA A) ubicada en el pedicelo del fruto. Ésta se vuelve progresivamente inoperante, mientras la zona de abscisión C (ZA C), localizada entre el cáliz y el ovario, está activada durante el final de la caída de junio del hemisferio norte (Goren, 1993). Durante la primera fase de caída se observó que la concentración de etileno en cáliz (tejido que contiene la ZA C) era tan alta como en ovario y pedicelo. Sin embargo, la abscisión no ocurrió por esta zona de abscisión porque era insensible en esta etapa. Similares resultados se registraron en la ZA A luego de caída fisiológica, donde mayor concentración de etileno no logró reactivar esta capa de abscisión durante su período natural de inactivación (90-10 días post antesis) (Iglesias et al., 2006).

La abscisión es un mecanismo de autorregulación, donde se ajusta el número de frutos a la capacidad de suministrar metabolitos que posee el árbol

(Guardiola et al., 1984). El cuajado depende entre otros factores, de la competencia entre las flores en desarrollo. En la mayoría de las variedades, el cuajado es deficitario sólo cuando la planta presenta una elevada floración (Agustí, 2003a). En esta situación, el árbol no es capaz de satisfacer la demanda de todos los frutitos y gran parte de ellos caen, disminuyendo la cosecha. La relación inversa entre la intensidad de floración y el cuajado es entonces una evidencia del efecto de la competencia sobre éste último (Aznar et al., 1995).

La reducción de la floración incrementa el cuajado y el número de frutos cosechados. Este efecto es general en todas las especies, variedades y condiciones climáticas (Agustí, 2003a). Esto se debe a que el tamaño de las flores en antesis disminuye en la medida que aumenta la intensidad de floración (Guardiola et al., 1984).

La abscisión de frutitos está inversamente relacionada a su tasa de crecimiento, aquellos que caen, presentaron previamente una disminución de su tasa de crecimiento (Zucconi et al. 1978, Aznar et al. 1995). Da Cunha y Gravina (2006) reportan la disminución del crecimiento de los frutitos entre 28 y 55 días post antesis, coincidiendo con el período de mayor abscisión.

Los frutos de mayor tamaño poseen mayores posibilidades de cuajar y continuar su crecimiento (Agustí et al., 1982), estableciendo una relación inversa entre el tamaño del ovario o del frutito en desarrollo y su abscisión (Zucconi et al. 1978, Da Cunha y Gravina 2006).

El tipo de brote es una característica varietal (Talón, 1997b), pero su distribución se modifica con la intensidad de floración. En la medida que la intensidad de floración aumenta, también lo hace la proporción de brotes sin hojas (inflorescencia y solitario) (Agustí et al., 2003b). Estos poseen menor posibilidad de cuajado, principalmente por la ausencia de hojas jóvenes, que tienen mayor eficiencia fotosintética que las hojas adultas (Iglesias et al., 2002). Da Cunha y Gravina (2006) observaron mayor cuajado en brotes con hojas (mixtos y terminales); a su vez en los brotes mixtos el cuajado aumentaba cuanto mayor era el número de hojas. El orden de aparición es diferente según el tipo de brote. Los brotes reproductivos sin hojas son los primeros en botar, y posteriormente aparecen los brotes reproductivos con hojas. El cuajado de estos últimos es favorecido por temperaturas más altas avanzada la primavera y menor competencia inicial (Lovatt et al. 1984, Ruiz et al. 2001). La tasa de

crecimiento del fruto luego de la caída de pétalos, es mayor en brotes con hojas que en los sin hojas, aumentando su capacidad de cuajado (Lovatt et al., 1984).

El cuajado está regulado por una serie de factores endógenos y exógenos. Entre los primeros se encuentran los factores genéticos, hormonales y nutricionales (Agustí, 2003a).

2.6. FACTORES QUE DETERMINAN EL CUAJADO

2.6.1. Control hormonal

La abscisión de ovarios y frutitos posee un fuerte componente hormonal, destacándose las giberelinas como el principal factor responsable de la transición de ovario a fruto (Talón et al. 1992, Ben-Cheikh et al. 1997).

El proceso de cuajado es el resultado de un conjunto de estímulos promotores e inhibidores. Estos comprenden señales hormonales complejas que incluye a las giberelinas como promotoras, y el ácido abscísico como principal sustancia inhibidora (Bermejo et al., 2015).

El ácido abscísico actúa como inhibidor del desarrollo y activador de la abscisión (Agustí, 2003a). La concentración de esta hormona en los ovarios se incrementa durante la caída de pétalos y en la transición de la fase de división celular a la de elongación celular (Talón et al., 1990). Sagee y Erner (1991) reportan la disminución de la concentración de esta hormona durante el desarrollo del fruto, encontrando 1 mes después de antesis 1/15 del nivel registrado 2 días después de antesis. Sin embargo, el contenido de ácido abscísico aumenta a los 2 y 63 días después de antesis. El incremento de los niveles de ácido abscísico en frutitos en desarrollo está relacionado a su abscisión en *Citrus* (Talón et al. 1990, Gómez-Cadenas et al. 2000, Pozo 2001). Esta hormona puede actuar como un sensor de la intensidad de la escasez de nutrientes, modulando los niveles de etileno (activador de la abscisión) y su precursor, el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (Gómez-Cadenas et al., 2000).

El contenido de ACC y la producción de etileno de los frutitos son paralelos a la tasa de abscisión. El etileno se postula como factor hormonal

promotor de la abscisión de frutitos, aunque su sola presencia no es suficiente para disparar el proceso de abscisión (Iglesias et al., 2006).

Otros autores sugieren que también el ácido jasmónico podría participar del proceso de cuajado y abscisión inicial. Debido a su mayor concentración en ovarios y frutitos en desarrollo en las variedades con fuerte abscisión temprana (Pozo 2001, Bermejo et al. 2015).

Los factores genéticos y ambientales que afectan el crecimiento reproductivo en *Citrus* son mediados por la síntesis y acumulación de hormonas en flores y frutitos. La acumulación de giberelinas en ovarios es la señal de reactivación de su crecimiento permitiendo el cuajado de fruto (Talón, 1997b).

Las giberelinas incrementan su concentración en los ovarios en desarrollo durante la antesis constituyendo parte del estímulo que activa la división celular; favoreciendo el cuajado y limitando la abscisión temprana de los ovarios en desarrollo, que naturalmente ocurre inmediatamente después de antesis (Sagee y Erner 1991, Ben-Cheikh 1997, Talón 1997b, Mahouachi et al. 2009). El efecto positivo de las giberelinas en crecimiento inicial del fruto se explica por el incremento de la fuerza fosa de los ovarios durante las primeras semanas después de antesis (Powell y Krezdorn, 1977), a través del estímulo a la división celular y con ésta el consumo de carbohidratos (Rivas et al., 2007), mayor movilización de asimilados y nutrientes a los frutitos (García-Papí y García-Martínez, 1984) y el aumento de la actividad de la enzima Rubisco (Yuan y Xu, 2001).

El nivel de giberelinas en los ovarios está determinado genéticamente, y varía según el potencial de cuajado de cada variedad (Talón, 1997b). La relación entre el contenido endógeno de giberelinas en los tejidos del ovario y su capacidad partenocárpica, se determinó en varias investigaciones comparando la concentración de giberelinas en los ovarios de variedades con elevada y baja capacidad partenocárpica. El contenido endógeno de esta hormona en ovarios es un factor limitante en el desarrollo partenocárpico de frutos (Talón et al. 1992, Talón 1997b, Vardi et al. 2008, Mesejo et al. 2013, Bermejo et al. 2015). Las variedades partenocárpicas autoincompatibles en polinización cruzada presentan mayor cuajado, que en condiciones de aislamiento. Debido a que el contenido de giberelinas en los ovarios fecundados, es mayor en comparación con aquellos no fecundados (Mesejo et al., 2013). Las variedades sin semillas, que poseen contenidos

significativamente inferiores de giberelinas en sus ovarios, presentan mayor dificultad para cuajar (Talón et al. 2001, Agustí et al. 2003b). Las variedades con semillas generalmente presentan niveles relativamente altos de giberelinas, cuajado apropiado y respuesta nula a la aplicación de GA_3. La concentración de giberelinas en los tejidos del ovario explica la distinta sensibilidad de las variedades a las aplicaciones de GA_3 (Talón et al., 2001).

En los cultivares dependientes de polinización, la acumulación de giberelinas es inducida por el estímulo de polinización (Ben-Cheikh et al., 1997), e incrementa el cuajado final de frutos (Borges et al., 2009). Los niveles de giberelinas activas GA_1 y GA_4 en ovarios, están estrechamente relacionados a la capacidad de producción de semillas. La variedad 'Murcott' sin polinizar presenta niveles menores de GA_1 y GA_{19} en sus ovarios en comparación con los niveles registrados con polinización natural. Esto parece ser una consecuencia de la fuerte reducción de actividad de las enzimas GA_{20}ox2 y GA_3ox1 en ausencia de polinización (Bermejo et al., 2015).En las variedades partenocárpicas, como 'Marsh Seedless' la señal hormonal ocurre con la inducción ambiental (Talón, 1997b). En las variedades con semillas, éstas constituyen el principal sitio de síntesis de giberelinas. Las paredes del ovario realizan esta función en las variedades de alto índice partenocárpico (Agustí et al., 2003b).

La aplicación de un inhibidor de la síntesis de giberelinas (paclobutrazol) en frutos en crecimiento disminuyó su tasa de crecimiento e incrementó la abscisión en 'Satsuma' y 'Clementina'. Este efecto se revirtió con aplicación de giberelinas, confirmando la participación de esta hormona en el proceso de cuajado (Talón et al. 1992, Zacarías et al. 1995). La variedad 'Clementina' en ausencia de polinización, muestra un incremento del doble en el contenido de ácido abscísico libre, inmediatamente después de caída de pétalos, mientras que en 'Satsuma' la acumulación de esta hormona fue baja. En esta variedad, la aplicación de paclobutrazol incrementó 3 veces el contenido del ácido abscísico, y no afectó el patrón de acumulación de este regulador en Clementinas. En 'Satsuma' el efecto del GA_3 en el contenido de ácido abscísico fue nulo. Al tratar los frutos con un inhibidor de la síntesis de carotenoides, y por tanto del ácido abscísico, se retrasó la abscisión. Se observó una relación entre la alta concentración de ácido abscísico, una reducción de la tasa de crecimiento y la aceleración de la abscisión (Zacarías et al., 1995).

Pozo (2001) analizó la relación entre promotores (giberelinas) e inhibidores (ácido abscísico) en las flores de 'Valencia' (variedad dependiente de polinización), 'Marsh Seedless' (variedad partenocárpica) y 'Ortanique' (autoincompatible). El autor reportó una alta relación en la concentración de estos reguladores en 'Valencia', mientras que en las otras dos variedades la relación fue baja. Además estudió estas relaciones en frutitos fuertemente adheridos y frutitos sin crecimiento, encontrando en los primeros una alta relación giberelinas/ácido abscísico y baja en los últimos.

La importancia de las hojas en el cuajado de frutos también se relaciona con el contenido de giberelinas en los ovarios. Sagee y Erner (1991) reportan diferencias en la concentración de giberelinas en los ovarios procedentes de brotes con y sin hojas, registrando mayor cuajado en los primeros. En los frutos procedentes de ambos tipos de brotes, la máxima concentración de giberelinas ocurrió 7 días después de floración. Los brotes sin hojas presentaron mayor concentración de esta hormona y menor concentración de ácido abscísico. La relación giberelinas/ácido abscísico en ovarios, fue siempre mayor en aquellos provenientes de brotes con hoja, mostrando un pico máximo un mes después de floración.

El nivel de giberelinas acumuladas en los ovarios también parece estar relacionada con la acumulación de carbohidratos en estos, que se sugiere que es dependiente de la concentración GA_1 en estos órganos (Bermejo et al., 2015).

2.6.2. Disponibilidad de carbohidratos

En las especies subtropicales y tropicales perennifolias, como los cítricos, la presencia permanente de hojas disminuye la dependencia de las nuevas brotaciones de las reservas de carbohidratos (Sozzi, 2007).

Los procesos de brotación, floración y cuajado de frutos involucran una activa división celular, y son altamente demandantes de energía (Goldschmidt, 1999). Ésta, no puede ser íntegramente abastecida por el área foliar, utilizando también las reservas hidrocarbonadas (Goldschmidt y Koch, 1996).

Al inicio de un nuevo período vegetativo (primavera), el aparato fotosintético si bien activo, es viejo (brotes de otoño) y funcionalmente menos

eficiente. Los carbohidratos suplementados en la primera etapa del desarrollo de frutitos y hojas jóvenes son originados principalmente de la fotosíntesis de las hojas adultas. La fotosíntesis neta de éstas decrece drásticamente 20 días después de plena brotación, y es superada por la de las hojas jóvenes. En ese momento, éstas superan el 40 % de su área total y son exportadoras netas de fotoasimilados, remplazando gradualmente a las hojas adultas para suplementar el desarrollo de los frutitos (Ruan, 1993).

Durante el período de cuajado, miles de estructuras reproductivas compiten fuertemente por carbohidratos con otros órganos en desarrollo (Gravina, 2014a). La fotosíntesis es crucial en la determinación del cuajado (Iglesias et al., 2002). En *Citrus* la abscisión durante la caída fisiológica es altamente dependiente de los carbohidratos (Buwalda y Smith 1990, Bustan et al. 1996, Iglesias et al. 2002). El hecho que las flores procedentes de botes con hoja presenten mayor cuajado y tasa de crecimiento, constituye una fuerte evidencia de la participación de los fotoasimilados en este proceso (Agustí, 2003a).

Los niveles de carbohidratos en las hojas disminuyen durante el período de floración y cuajado (primavera-verano) acentuándose en condiciones de alta floración. Esto indica que los carbohidratos de reserva son utilizados para sostener las primeras etapas del desarrollo reproductivo (Shimizu, citado por Goldschmidt, 1999). En las hojas adultas el contenido de minerales (nitrógeno, potasio y fósforo) disminuye desde el inicio de la brotación hasta plena floración y alcanza su valor mínimo en antesis, coincidiendo con el pico de abscisión. Esto indica una fuerte translocación de estos nutrientes hacia órganos en desarrollo. En estas hojas, los carbohidratos se acumulan hasta floración, perdiéndose después de antesis a una tasa constante hasta fin de agosto (hemisferio norte). Esta tasa de pérdida no está relacionada a la presencia cercana de frutos en crecimiento, debido a que la eliminación de todos los frutos no tuvo efecto en la tasa de transporte a las hojas. En las hojas jóvenes se acumularon carbohidratos y minerales después de antesis. Al final de caída fisiológica se observó una interrupción de la acumulación de nitrógeno y una pérdida de fósforo, potasio y carbohidratos, coincidiendo con máxima tasa de crecimiento de los frutos. Esto sugiere su participación como fosa, previo al fin de la caída fisiológica, y a partir de este momento de alta demanda, su rol como fuente de nutrientes y carbohidratos (Sanz et al., 1987).

En la primera fase de crecimiento del fruto los carbohidratos son utilizados fundamentalmente como fuente de energía, para abastecer procesos altamente demandantes, como la división celular. En la segunda fase de crecimiento, los carbohidratos son acumulados (Agustí, 2003a). Los carbohidratos son distribuidos entre los frutitos de acuerdo a la relación fuente-fosa, y la abscisión del fruto es impedida cuando alcanza cierto umbral de crecimiento (Talón, 1997b).

Los principales periodos de abscisión de ovarios y/o frutitos coinciden con la mínima cantidad de reservas en hoja, sugiriendo que una limitante en la suplementación de metabolitos podría causar la caída (Sanz et al., 1987).

Los tratamientos que disminuyen la disponibilidad de carbohidratos (defoliación, sombreado), promueven el proceso de abscisión (Mehouachi et al., 1995), mientras que los tratamientos que aumentan la disponibilidad de carbono (suplementación de sacarosa, anillado, raleo de frutos) resultan en una menor tasa de abscisión (Iglesias et al., 2003).

En mandarina ‘Satsuma Clausellina’ y ‘Satsuma Okitsu’, la remoción de las hojas en antesis provocó la abscisión de frutitos en desarrollo. Ésta se relacionó positivamente con la intensidad de defoliación. El tratamiento con 100 % de defoliación presentó 100 % de abscisión, el control (sin eliminación de hojas) obtuvo el mayor porcentaje de cuajado, mientras que el tratamiento con 50% de defoliación presentó valores intermedios. La remoción de las hojas afectó el contenido de sacarosa al reinicio de crecimiento del ovario, aunque el contenido de fructosa y glucosa presentaron escazas diferencias. La sacarosa se correlacionó positivamente con el crecimiento de frutos, y negativamente con su abscisión. Los tratamientos también alteraron el contenido de materia seca de los ovarios. A los 42 días post antesis este contenido en árboles con 0, 50 y 100 % de defoliación, fue de 13,1, 8,9, 4,8 $mg.g^{-1}$, respectivamente (Mehouachi et al., 1995). Gómez-Cadenas et al. (2000) obtuvieron resultados similares al aplicar en plantas una defoliación total. Cuando se removió solo las hojas adultas observaron un déficit temprano de sacarosa, acompañada de una abscisión temprana. Los frutos cuajados comienzan a recuperar los niveles normales de sacarosa y la tendencia de abscisión es detenida. Estos resultados sugieren que la carga de fruta es ajustada por la disponibilidad de carbohidratos. La relación fuente-fosa en frutos, actúa como elemento

regulatorio entre el estatus de carbohidratos y la severidad de abscisión de frutos.

El rol de los carbohidratos también fue probado por Iglesias et al. (2003) en ensayos con suplementación de sacarosa y defoliación. En el primer caso, los autores reportaron la disminución de la tasa de abscisión y el retraso en la ocurrencia de la máxima tasa de abscisión en comparación con el control, a los 90-95 y 80 días post antesis respectivamente. El tratamiento de defoliación incrementó la abscisión de frutos. La adición de sacarosa en árboles defoliados incrementó los niveles de ésta en los frutos en crecimiento, y disminuyó la tasa de abscisión, sin conseguir compensar totalmente los efectos de la remoción de hojas. Esto podría explicarse porque la defoliación afectaría otros factores metabólicos o fisiológicos, tales como factores hormonales.

En estudios realizados por Ruan (1993) el anillado de rama, la defoliación y el oscurecimiento de hojas viejas, no modifican significativamente el contenido endógeno de giberelinas, ácido abscísico y zeatina (citoquinina). El autor explica que el resultado de estos tratamientos en el cuajado de frutos en desarrollo se debe principalmente a su efecto en la suplementación de fotoasimilados, y no a su efecto en el contenido hormonal.

Si bien el nivel de sacarosa en los frutitos es el principal factor en el mecanismo que desencadena la abscisión (Mehouachi et al., 1995), el ácido abscísico y ACC actúan como señales reguladoras en el mecanismo de abscisión de frutos, inducida por la escasez de carbohidratos (Gómez-Cadenas et al., 2000).

La caída de frutitos a través de la ZA A se reduce con la suplementación de sacarosa. Ésta fue combinada con un promotor de la síntesis de etileno (ACC), observándose incrementos en la tasa de abscisión. Por lo tanto la mayor disponibilidad de carbohidratos no contrarresta el efecto del ACC. Del mismo modo, al combinar la suplementación de sacarosa con un inhibidor de la síntesis de etileno (AVG) no se incrementó el porcentaje de cuajado en comparación al reportado para la suplementación, por tanto no se observaron efectos sinérgicos entre estos. Las condiciones que inducen altos niveles de azúcar (anillado de rama), incrementan el contenido de carbohidratos, disminuyen la producción de etileno y la tasa de abscisión. En tratamientos con anillado de pedicelo, se observó la disminución de la

disponibilidad de fotoasimilados e incremento del contenido del etileno y la abscisión (Iglesias et al., 2006).

Varios autores (Talón et al. 1997a, Iglesias et al. 2003, Iglesias et al. 2006, Mahouachi et al. 2009) proponen que los carbohidratos también participan en los procesos de abscisión ocurridos durante las etapas más tempranas del crecimiento de los ovarios. La mayor disponibilidad de sacarosa para los frutos en las etapas tempranas de desarrollo aumenta su probabilidad de cuajado. El cuajado y crecimiento del fruto son procesos altamente demandantes de energía. En el proceso de abscisión los carbohidratos además de desempeñar funciones nutricionales, podrían participar como señales fisiológicas (Iglesias et al., 2003).

2.7. TÉCNICAS PARA LA MEJORA DEL CUAJADO

2.7.1. Métodos indirectos

2.7.1.1. Aplicación de ácido giberélico en invierno

Los manejos agronómicos cuyo objetivo sea la disminución de la intensidad de floración, favorecerán el cuajado. Debido a la reducción de los brotes reproductivos sin hojas, el incremento de la relación hoja/flor, y el aumento de los brotes con hojas que poseen mayor probabilidad de cuajado (Lovatt et al., 1984).

Para disminuir la floración cuando su intensidad esperada es tan elevada, que pueda comprometer el cuajado y reducir la cosecha, se realiza la aplicación de GA_3 durante el reposo vegetativo. La aplicación de GA_3 inhibe la inducción floral (Goldschmidt y Monselise 1970, Gravina et al. 1997). La concentración de GA_1 y GA_3 en hoja se correlaciona negativamente con el retorno floral (Koshita et al., 1999).

El proceso de iniciación y diferenciación en yemas de naranja 'Washington Navel' puede ser interrumpido por el GA_3, hasta la fase de formación de primordios de sépalos (Lord y Eckar, citados por Gravina, 2014a).

La aplicación de GA_3 debe realizarse durante la ecodormición, y la época de aplicación es un factor crítico en su eficiencia. En los cítricos existen

dos momentos de sensibilidad: ecodormición y en momento de yema hinchada. Este último período es muy breve, y si el tratamiento se realiza una vez iniciado el desarrollo floral el proceso es irreversible y no es posible inhibir la floración. El momento de ecodormición posee un mayor período de tiempo para realizar la aplicación. En las condiciones de España abarca desde mediados de noviembre a principios de diciembre (Agustí, 2003a).

El tratamiento con GA_3 invernal disminuye la brotación y modifica la distribución de los brotes; aumentando el número de brotes con hoja y reduciendo el de brotes sin hoja. Estos efectos del GA_3 (reducción de la floración y redistribución de brotes) explican el incremento del cuajado (Agustí, 2003a).

La eficiencia de esta medida depende de la sensibilidad de las yemas durante el período inductivo. La eficiencia en la reducción de la floración por la aplicación GA_3, se relaciona negativamente con la intensidad de floración esperada (Gravina, 2014a). En mandarina 'Nova' el tratamiento de 40 $mg.l^{-1}$ de GA_3 en junio (hemisferio sur) no fue eficiente cuando la intensidad de floración superó las 200 flores/100 nudos. Sin embargo, redujo la floración cuando los árboles presentaron menos de 150 flores/100 nudos (Gravina, 2007).

En 'Navelate' se reduce la floración un 30 % con la aplicación de 25 $mg.l^{-1}$ de GA_3 durante reposo vegetativo (Guardiola et al., 1977). La utilización de 50 $mg.l^{-1}$ logró disminuir la floración en varios cultivares de 'Clementina' (Martínez-Fuentes et al., 2004). En condiciones nacionales se reporta la disminución de la floración en 'Ellendale' con 20 y 75 $mg.l^{-1}$ (Gravina et al., 1994). En 'Ortanique' también se reporta la disminución de la intensidad de floración con la aplicación de GA_3 en período inductivo (Espino et al., 2005).

2.7.2. Métodos directos

2.7.2.1. Aplicación de ácido giberélico en floración

La aplicación de GA_3 en floración en variedades con bajo índice partenocárpico es una técnica eficaz para aumentar su cuajado (El-Otmani et al., 2000).

En las condiciones de España, el grupo de las Clementinas, ('Clementina de Nules', 'Clementina Fina' y 'Clementina Oronules') presentan una importante respuesta al GA_3, tanto en aplicaciones localizadas como en pulverizaciones a plantas completas. Aunque 'Clementina Marisol' y 'Clementina Hernandina', presentan alto cuajado en la mayoría de las condiciones, y no responden a estas aplicaciones con un aumento del número de frutos cuajados (Talón et al., 2001). En la mandarina 'Afourer' existen resultados contradictorios con igual concentración de GA_3 (40 $mg.l^{-1}$), Gravina et al. (2014c) no reportaron mejora del cuajado, mientras Otero y Rivas (2015) si registraron efecto positivo.

En las condiciones nacionales, la aplicación de GA_3 en plena floración no mostró respuesta en 'Ellendale', aplicado en antesis a 10, 20 y 100 $mg.l^{-1}$, y al final de caída de pétalos a 20 $mg.l^{-1}$ (Gravina, 2007). Similares resultados se han encontrado en la misma variedad con la aplicación de 15 $mg.l^{-1}$ en plena flor (Gravina et al., 1994); en 'Ortanique' tampoco logró mejorar el cuajado aplicado a 50 $mg.l^{-1}$ (Gravina, 2007). En mandarina 'Nova' la aplicación en plena flor a 50 $mg.l^{-1}$, retrasó la caída de frutitos pero no logró incrementar el cuajado final (Gambetta et al., 2008). La nula respuesta de estos híbridos a la aplicación de GA_3, en las condiciones nacionales, coincide con lo reportado a nivel internacional (Talón et al., 2001). Las variedades del grupo 'Satsuma', tampoco responden al GA_3. Las naranjas en general presentan nulo o escaso efecto en aplicaciones localizadas, y efecto nulo en pulverizaciones a plantas enteras (Agustí et al. 1982, Talón et al. 2001).

En la condiciones de California, no se registraron aumentos del rendimiento con la aplicación de GA_3 en mandarina 'Clementina' utilizando diferentes concentraciones y momentos. Estos autores confirman una interacción entre la concentración de GA_3 y los momentos de aplicación, estableciéndose éstos como un efecto crítico en el rendimiento de esta mandarina en esas condiciones (Chao y Lovatt, 2006).

La falta de respuesta al GA_3 en el cuajado final de fruta, sugiere la existencia de otros factores que limitan el proceso (Gravina, 2007).

La aplicación de GA_3 incrementa el número de frutitos que reinician su desarrollo, pero si éste es muy elevado debido a una alta floración, la abscisión no se evita, solo se retrasa. Si la floración es moderada, la competencia es

menor y el número de frutitos que cuajan tras la aplicación de GA_3, aumenta el cuajado final (Agustí et al., 2003b).

La intensidad de floración afecta negativamente el efecto de la aplicación de GA_3. Cuando la floración es reducida, el incremento del cuajado en los árboles tratados con GA_3 es evidente; si la floración es muy intensa la aplicación de GA_3 es ineficiente. En condiciones de elevada intensidad de floración es fundamental su reducción para lograr una respuesta positiva al GA_3 exógeno en la mejora del cuajado (Agustí et al., 1982).

La eficacia del GA_3 es dependiente de la carga de fruta, y ésta debe considerarse al momento de decidir su uso para aumentar el cuajado (Chao et al., 2011).

Existen otros factores que inciden en el efecto del GA_3 en la mejora del cuajado, como los factores físicos que alteran la penetración del producto (pH del agua, temperatura, humedad relativa, estructura de la superficie vegetal), y factores fisiológicos. La penetración de GA_3 a través de la cutícula disminuye notoriamente en condiciones de pH neutro-alcalino. Por esto se recomienda acidificar la solución de la aplicación a pH entre 5-6 (Talón et al., 2001).

2.7.2.2. Anillado post floración

La práctica de anillado consiste en marcar un anillo completo de la corteza del tronco o rama, de 1 mm de ancho sin afectar el cambium (Agustí et al., 2003b).

El efecto positivo del anillado sobre el cuajado de fruto, se debe fundamentalmente al incremento de carbohidratos disponibles (Mataa et al. 1998, Goldschmidt 1999, Iglesias et al. 2006, Rivas et al. 2006, Mahouachi et al. 2009), al interrumpir el transporte floemático (Agustí, 2003a). Esta técnica puede mejorar el rendimiento en cultivares de diferentes habilidades partenocárpicas (Rivas et al., 2006).

Esta práctica incrementa el contenido de azúcar soluble en frutitos, retrasa su abscisión durante el proceso de caída fisiológica, y aumenta el cuajado final, reportando una correlación positiva entre el contenido de sacarosa y el cuajado. El contenido de sacarosa en los frutitos se incrementan

pocos días después del anillado, mejorando su disponibilidad en procesos metabólicos relacionados a la división celular y crecimiento temprano del fruto (Mataa et al. 1998, Rivas et al. 2006).

El anillado provoca una fuerte disminución de las concentraciones de azúcar soluble y almidón en las raíces, en años de alta y baja carga de fruta. En años de alta carga, no ocurre acumulación de carbohidratos en la parte aérea (por encima del anillado), debido a la alta demanda de carbohidratos por parte de los frutitos en desarrollo, quienes consumen todos los carbohidratos disponibles e impiden su acumulación en hojas y corteza del tronco. El anillado involucra cambios en la expresión de genes relacionados a la acumulación de carbohidratos (STPH-L, STPH-H, Agps, AATP, PGM-C y CitSuS1). El nivel de expresión de estos genes fue elevado en hojas y corteza de brotes que acumulan alta concentración de almidón, y baja en raíces con disminución de la concentración de este. Los cambios en el contenido de carbohidratos constituye una señal para la regulación de los genes implicados en la síntesis de almidón (Li et al., 2003).

Estudios realizados por Mahouachi et al. (2009) en mandarina 'Satsuma', demostraron que el anillado en antesis reduce transitoriamente la tasa de abscisión temprana, retrasando inicialmente el proceso de caída de frutitos. Estos autores plantean además que el efecto del anillado sobre el cuajado puede también deberse al incremento de la concentración de giberelinas, al interrumpir transitoriamente el transporte del floema desde las hojas a las raíces. En este estudio la reducción de la tasa de abscisión, fue acompañada por elevadas concentraciones de carbohidratos (hexosas y almidón) y giberelinas (GA_1, GA_{19} y GA_{20}) en frutitos y ovarios en desarrollo. Aunque Rivas et al. (2010) descartan que en condiciones deficitarias de giberelinas, el efecto del anillado estimule el cuajado mediante la vía de las giberelinas, su efecto en estas condiciones se explica por el estímulo que generan sobre la actividad fotosintética. Ésta es disminuida por los inhibidores de la síntesis de giberelinas, provocando una reducción significativa del contenido de carbohidratos de los frutitos. El anillado logra revertir el efecto de los inhibidores de las giberelinas sobre el cuajado de frutos debido a su efecto estimulador de la nutrición orgánica y no como estimulador de la síntesis de esta hormona (Rivas et al., 2007). Además altera las relaciones hormonales afectando positivamente la relación giberelinas/ácido abscísico durante la fase inicial de su desarrollo (Rivas et al., 2010).

El anillado retrasa la abscisión de frutitos ubicados en brotes con y sin hojas, visible a partir de los 15 días post tratamiento. Sin embargo, el efecto desaparece a los 60 días en los brotes sin hojas, mientras los brotes con hojas mantienen mayores niveles de cuajado hasta fin de caída fisiológica (Rivas et al., 2010). El anillado provoca un efecto diferencial según el tipo de brote. En las hojas de los brotes reproductivos se incrementa la actividad fotosintética, medida como rendimiento cuántico del fotosistema II (ΦFSII). Además, aumentan los niveles de carbohidratos y mantienen una mayor tasa de crecimiento. En brotes vegetativos la actividad fotosintética disminuye, posiblemente por la falta de una fosa en estos brotes. El anillado incrementa la concentración de glucosa y almidón, y debido a la baja demanda los carbohidratos son acumulados. Únicamente las hojas jóvenes son capaces de modular su actividad fotosintética en respuesta a la demanda de carbohidratos durante la caída fisiológica de frutos (Rivas et al., 2007).

El grado de respuesta al anillado podría estar afectado por la especie, el cultivar y la carga de fruta (Mataa et al., 1998). En condiciones de muy alta intensidad de floración el anillado es ineficaz, debido a que la disponibilidad de carbohidratos para los órganos en desarrollo se encuentra muy reducida (Gravina et al., 1996). En condiciones de elevada floración la producción es prácticamente nula y el anillado es incapaz de promover el cuajado, esto sugiere que la elevada competencia entre órganos en desarrollo es la causa de su escaso cuajado. En estas condiciones, la disponibilidad de carbohidratos para los frutitos está fuertemente comprometida, y mejorarla es prácticamente imposible, por esto el anillado no resulta eficaz (Agustí et al., 1997).

La utilización de esta práctica en plantas en buen estado y con floración adecuada, presenta una respuesta general en las variedades ‘Navelate’, Clementinas, ‘Fortune’ y ‘Ellendale’ (Agustí et al., 2003b). Otros autores también señalan respuesta favorable del anillado en ‘Ellendale’ (Gravina et al., 1998), ‘Nova’ (Barry y Bower, 1997), ‘Ortanique’ (Espino et al., 2005), ‘Fortune’ y ‘Clausellina’ (Rivas et al., 2006).

El principal efecto del anillado es detener temporalmente o disminuir la abscisión. Esta práctica presenta su mayor eficiencia cuando se realiza en plena caída fisiológica (25 días post caída de pétalos), debido a que parte importante de los frutitos ya han caído, y los que permanecen retenidos superan la primera fase de desarrollo del fruto. Cuando el anillado se efectúa antes, la

abscisión también se retrasa pero los frutitos no logran superar la etapa de caída fisiológica, dada la duración del período que han de permanecer en el árbol hasta finalizar la etapa de abscisión. Si el anillado se realiza posteriormente presenta reducida eficiencia porque casi la totalidad de los frutos ya han sufrido la abscisión (Agustí et al., 1997). Diferentes estudios han evaluado distintas fechas de anillado para aumentar el cuajado de fruta, confirmando su mayor eficiencia cuando se realiza en antesis (Mataa et al., 1998); 25 días después de antesis (Agustí et al., 2003b); 30 días post caída de pétalos (Gravina et al., 1998); o entre 35 y 40 días post antesis (Rivas et al., 2006).

2.8. CONTROL DE LA PRESENCIA DE SEMILLAS

En cultivares autoincompatibles, capaces de producir gametos viables y de alto valor comercial, la presencia de semillas generadas por la polinización cruzada con otras fuentes de polen compatibles, disminuye considerablemente su valor comercial y limita su comercialización (Gravina, 2014a).

En la actualidad, existen varias alternativas para la eliminación o reducción de la presencia de semillas en cultivares partenocárpicos autoincompatibles de alto valor comercial.

2.8.1. Asilamiento territorial

Una alternativa para la producción de fruta sin semillas en variedades autoincompatibles con partenocarpia facultativa, es el aislamiento territorial de fuentes de polen viable. Esta medida debe ser considerada al momento de diseñar una nueva plantación. Otra opción para la producción de fruta sin semillas en una variedad autoincompatible, es rodearla con variedades androestériles, y así disminuir la probabilidad de su polinización con una variedad compatible (Gravina, 2014a).

Las abejas, principales polinizadores de los cítricos son capaces de transportar el polen de ‘Afourer’ y ‘Clementina de Nules’ entre 960 y 500 m, respectivamente. Esto muestra la dificultad que implica en condiciones

comerciales el aislamiento territorial de las variedades autoincompatibles con gametos femeninos fértiles (Chao et al., 2005a).

2.8.2. Control químico

En plantaciones establecidas donde no se implementó el aislamiento territorial, una de las alternativas disponibles para la disminución de la presencia de semillas es el uso de productos químicos (Gravina, 2014a).

La aplicación de GA_3 en antesis perjudica la fecundación, a través del incremento de aborto de óvulos y la reducción del crecimiento del tubo polínico, y su orientación defectuosa, inducida por el aborto de los óvulos (Mesejo et al., 2008). La aplicación de sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4.5H_2O$) en plena flor, incrementa el porcentaje de frutos sin semillas y disminuye el número de semillas por fruto, sin llegar a eliminarlas. La germinación del polen de la mandarina 'Fortune' se inhibió completamente en los medios de cultivo que se añadió $CuSO_4$ (Mesejo et al., 2006). En la variedad 'Afourer', la germinación del polen *in vitro* se redujo en los medios que contenían GA_3 y $CuSO_4$, y se detuvo completamente en aquellos que combinaban estos productos (Gambetta et al., 2013). En las condiciones nacionales, la aplicación de GA_3 y $CuSO_4$ en antesis redujeron significativamente el porcentaje de frutos con semillas (Otero y Rivas, 2010), aunque los mejores resultados se obtuvieron con la combinación de ambos productos. En los estudios realizados por Gambetta et al. (2013) solamente las aplicaciones con GA_3 y su combinación con $CuSO_4$ lograron disminuir la presencia de semillas. Sin embargo, las aplicaciones de estos productos químicos no presentaron resultados relevantes a nivel comercial, porque si bien reducen la presencia de semillas, no las eliminan completamente (Mesejo et al. 2006, Mesejo et al. 2008, Otero y Rivas 2010, Gambetta et al. 2013).

Uno de los principales factores que debe considerase para incrementar la eficiencia de las aplicaciones son la concentración del producto, estado fenológico, y cubrir la mayor cantidad de flores en el estado fenológico sensible, por tanto aumentar el número de aplicaciones (Gravina, 2014a).

2.8.3. Repelentes de abejas

Los repelentes de abejas pueden disminuir la polinización cruzada entre variedades de cítricos compatibles. El uso de disulfuro de bis (dimetilo tiocarbamilo), fue reportando como un eficiente repelente de abejas al disminuir sus visitas, incluso en plena flor (Pons et al., 1996). Sin embargo, aplicaciones de caolinita, como repelente de abejas, no logró disminuir la presencia de semillas (Rey et al., 2014).

2.8.4. Mallas anti-abejas

El uso de malla anti-abejas es la herramienta más eficiente en disminuir el porcentaje de frutos con semillas y el número de semillas por fruto, en relación a las aplicaciones de repelentes y GA_3 en el período de floración (Rey et al., 2014).

Gravina et al. (2014b) estudiaron la eficiencia de tres tipos de mallas anti-abejas de diferentes densidades (45, 50 y 100 $g.m^{-2}$). La malla de 45 $g.m^{-2}$ se reportó como parcialmente efectiva (70 % de frutos sin semillas), debido a que permitía la entrada de abejas a su interior. Las otras mallas impidieron el ingreso de los polinizadores, y alcanzaron 98 % de fruta sin semillas. Los autores concluyen que la malla de 50 $g.m^{-2}$ es altamente efectiva en evitar la polinización cruzada, reduciendo al mínimo el porcentaje de frutos con semillas y las semillas cada 100 frutos.

2.9. MANDARINA ‘AFOURER’

‘Afourer’ fue caracterizada como autoincompatible, con la capacidad de producir fruta sin semillas cuando es impedida la polinización cruzada (Nadori 2004, Agustí et al. 2005). En nuestras condiciones, también se ha confirmado su autoincompatibilidad, y producción de fruta sin semillas con condiciones que impidan la polinización cruzada (Gravina et al., 2011). Su autoincompatibilidad es de tipo gametofítica (Fasiolo y Rey, 2013) con partenocarpia facultativa autónoma (Gambetta et al., 2013). Estos resultados son coincidentes con los reportados en España (Bono et al., 2000) y California (Chao, 2005b). En

condiciones que impidan la polinización cruzada la variedad presenta en promedio solo de 0,2 a 0,5 semillas por fruto (USPTO, 1998).

Resultados nacionales e internacionales muestran importantes variaciones en el porcentaje de frutos con semillas y el número de semillas por fruto en 'Afourer' según el polinizador. Gravina et al. (2011) reportan, en las condiciones de Paysandú la obtención de 88 y 21 % de frutos con semillas en polinizaciones con 'Valencia' (clon CV 64) y 'Clementina de Nules', respectivamente. En las condiciones de San José, estos autores reportaron 32 % de frutos con semillas y 0,41 semillas por fruto, y 18 % de frutos con semillas y 0,41 semillas por fruto, utilizando como donadores de polen 'Ortanique' y limón tipo 'Lisbon', respectivamente. Fasiolo y Rey (2013) obtuvieron 100 % de frutos con semillas en la polinización con limón tipo 'Lisbon', y 54 % de frutos con semillas en polinizaciones con 'Ortanique', en las condiciones de Montevideo.

Bono et al. (2000) reportan para las condiciones de España una elevada capacidad polinizadora de las variedades Clementinas, 'Fortune', 'Ortanique' y 'Nova' en 'Afourer'.

Existen diferentes niveles de compatibilidad entre las variedades cítricas, algunas combinaciones pueden producir muy elevado número de semillas (Chao et al., 2005a). En las condiciones de California, la polinización de 'Afourer' con polen de 'Clementina de Nules', resultó en 11 y 5 semillas por fruto en 2002 y 2003, respectivamente. Utilizando como polinizador 'Clementina Fina Soder', se obtuvieron 12 y 11 semillas por fruto en 2002 y 2003, respectivamente (Chao, 2005b).

Agustí et al. (2005) reportan un alto índice de cuajado partenocárpico en esta variedad, sin respuesta a la aplicación de GA_3. A nivel nacional se ha reportado la disminución del cuajado de fruta en condiciones aisladas de polinización cruzada (malla anti-abejas) en plantas (Otero y Rivas, 2010).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el establecimiento Agriyú, ubicado en la localidad de Kiyú (34° LS), departamento de San José. Se seleccionó un cuadro de mandarina 'Afourer' (*Citrus reticulata* Blanco) injertada sobre Poncirus trifoliata (L.) Raf., implantado en 2009 en un marco de plantación de 5 m x 3,5 m, con una densidad de 666 plantas por hectárea. El trabajo experimental se realizó desde setiembre de 2014 hasta julio de 2015.

Se marcaron sesenta plantas homogéneas en altura y volumen de copa, en condiciones de riego localizado, buen estado sanitario y sin deficiencias nutricionales evidentes.

Se aplicaron cinco tratamientos bajo malla anti-abejas:

- Testigo bajo malla (T).
- Una aplicación de ácido giberélico (GA_3) en plena floración (estadio 65 de la escala BBCH) (Agustí et al., 1997) (G).
- Anillado de tronco: 30 días post plena floración (A).
- Una aplicación de GA_3 en plena floración y anillado de tronco 30 días post plena floración (G+A).
- Dos aplicaciones de GA_3: la primera en plena floración y la segunda 30 días post plena floración (G+G).

De las plantas seleccionadas, 10 se mantuvieron en condiciones de polinización abierta (PA), sin incluirlas en el diseño estadístico. En estas plantas se evaluaron las mismas variables que en los tratamientos, con la finalidad de conocer el comportamiento de esta variedad en condiciones de libre polinización en el mismo cuadro y año.

Se utilizaron mallas anti-abejas de 50 $g.m^{-2}$ de densidad, colocadas sobre estructuras de madera con el objetivo de disminuir el contacto entre la copa de los árboles y la malla. Dichas estructuras constaron de postes de madera colocados en la fila cada dos árboles, unidos en la parte superior mediante alambre que sostenía las mallas (Figura 1). Las mismas se sujetaron

al suelo con ganchos metálicos. Las mallas se colocaron el 13 de setiembre, previo a la apertura de flores y se retiraron luego de caída de pétalos, el 31 de octubre. Las flores que aparecieron luego de sacar las mallas se retiraron manualmente.

Figura 1. Plantas de 'Afourer' enmalladas (izquierda), y detalle de estructura (derecha).

El agua utilizada en la aplicación de GA_3 (Giberelan 36) se acidificó hasta un pH 5,0 mediante la incorporación de ácido fosfórico, además se añadió un coadyudante no iónico (Exit ®). El GA_3 se aplicó con una pulverizadora de puntero, a una concentración de 40 $mg.l^{-1}$, mojándose toda la canopia hasta punto de goteo, con un gasto promedio de caldo de 5 l por planta. Las aplicaciones se realizaron en plena floración (1 de octubre) y 30 días post plena floración (31 de octubre).

El anillado de 1 mm de profundidad, se realizó con una cuchilla circular, cortando la corteza del tronco sin dañar el cambium, 30 días post plena floración (31 de octubre).

El 12 de setiembre se seleccionaron dos ramas representativas por árbol, cada una hacia las entre-filas, contabilizándose el número de nudos y de flores, para evaluar el número de flores cada 100 nudos (F/100n). Esta relación se utilizó como indicador de intensidad de floración. El inicio de la evaluación del cuajado de frutos se realizó a partir del retiro de las mallas anti-abejas, con frecuencia quincenal hasta el 21 de enero.

La evolución del diámetro ecuatorial del fruto se evaluó en 30 frutos por árbol utilizando calibre digital (Mitutoyo), con una frecuencia quincenal desde el 23 de diciembre al 18 de junio (Figura 2).

Figura 2. Medición del diámetro ecuatorial de fruta (izquierda); cosecha del experimento (derecha).

El día 24 de abril se estimó el volumen de copa asimilando el árbol a un cilindro; registrando la altura de copa, diámetro de copa en dirección a la entre-fila y en dirección a la fila, con una regla de teodolito.

En la cosecha se contabilizaron el número de frutos y su peso (Kg) por planta (Figura 2). Se colectó una muestra de 50 frutos por árbol para analizar la presencia de semillas, diámetro ecuatorial y calidad interna. La cosecha se realizó el 17 de julio.

Los análisis de calidad interna de fruta se realizaron con 5 frutas al azar por árbol (repetición). Dichos análisis consistieran en: porcentaje de jugo, sólidos solubles totales (SS), acidez total (AT) y ratio. Los frutos se pesaron en una balanza de precisión. El jugo de la muestra se extrajo utilizando un exprimidor eléctrico (Philips HR2737), hasta que la totalidad de la pulpa fue removida y colectada en un vaso de bohemia. El jugo obtenido en este proceso se filtró, y pesó en balanza de precisión. El porcentaje de jugo se determinó dividiendo el peso del jugo por el peso total de la muestra, y se multiplicó por

100. Los sólidos solubles totales fueron determinados mediante refractómetro de mano (B&C 30103) el cual expresa el resultado en °Brix, utilizando una gota de jugo. La acidez se obtuvo mediante la titulación con hidróxido de sodio (NaOH) al 0.1 N. Se colocaron 10 ml de jugo con 2 gotas de fenolftaleína (1% en etanol 95%), y se midió el gasto de soda que neutraliza la acidez del volumen de jugo utilizado. La AT se calculó utilizando la formula No. 1. El valor de ratio corresponde al cociente de los sólidos solubles totales sobre la acidez total.

Formula No. 1: AT = ml NaOH agregados * 0,1 (normalidad de NaOH) * 0,064 (g/meq ácido cítrico) * 100/10 (ml jugo)

Se utilizó un diseño estadístico completamente al azar, con ocho repeticiones y un árbol como unidad experimental. Debido a un error en la aplicación de GA_3 a los 30 días post plena floración se perdieron cuatro repeticiones, resultando en un diseño desbalanceado (Cuadro 1).

Cuadro 1. Número de repeticiones por tratamiento.

Tratamiento	Número de repeticiones
G	8
G+G	8
T	7
A	7
G+A	6

Los análisis estadísticos se realizaron con software Infostat versión 2015 interfaz en R versión 3.1.2. (Di Rienzo et al., 2015).

Las variables de distribución normal: volumen de copa, diámetro ecuatorial de fruto, número de frutos por árbol, rendimiento por árbol, peso promedio de fruto, frutos por m^3 de copa y los parámetros de calidad interna (% jugo, sólidos solubles totales, acidez y ratio) se analizaron por análisis de la varianza (ANAVA). La separación de medias se hizo por prueba de Tukey-Kramer, con nivel de significancia de 0,05.

La intensidad de floración (flores cada 100 nudos) si bien presentó distribución normal se analizó mediante modelos lineales generales y mixtos,

considerando el árbol como un efecto aleatorio. Se utilizó la prueba DGC para la separación de medias, con un nivel de significancia de 0,05.

El porcentaje de frutos cuajados en cada fecha se analizó estadísticamente con un modelo lineal generalizado y mixto, asumiendo distribución binomial y función logit. Se empleó la prueba DGC (con nivel de significancia de 0,05) para la separación de medias.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RELACIÓN FLORACIÓN - CUAJADO

La intensidad de floración fue elevada en todos los tratamientos, superando las 150 flores cada 100 nudos (Cuadro 2). Los árboles que recibieron los tratamientos G+G y A, habían presentaron menor intensidad de floración, estadísticamente diferente de los demás. Los árboles en condiciones de polinización abierta tuvieron en promedio 194 flores cada 100 nudos.

Situaciones de elevada intensidad de floración pueden llegar a comprometer el cuajado y en cultivares no alternantes, disminuir la cosecha. Este efecto es general para todas las especies, variedades y condiciones climáticas (Agustí et al., 2003b). En tangor 'Ellendale' en España y Uruguay, el porcentaje de cuajado disminuye en la medida que la floración aumenta (Gravina et al., 1996).

Las diferencias estadísticas detectadas en la intensidad de floración, no afectaron el cuajado final. Los tratamientos con mayor intensidad de floración presentaron niveles de cuajado elevado como también bajo. El A exhibió los mayores niveles de cuajado junto con G+A, mientas que G+G no logró diferenciase del testigo. Esto puede explicarse porque todos los tratamientos registraron niveles de floración ubicados en valores que comprometen el cuajado (Agustí et al. 1982, Guardiola et al. 1984, Gravina et al. 1997). Cuando la floración alcanza valores ente 50 y 90 flores cada 100 nudos, el cuajado disminuye en forma pronunciada; superados estos valores el cuajado se estabiliza en valores muy bajos, y el efecto de la floración en el cuajado es relativamente menor en comparación al primer rango (Gravina, 2014a).

La eficiencia de la aplicación de GA_3 disminuye cuando aumenta la intensidad de floración. En condiciones de elevada floración la aplicación de GA_3 y la práctica de anillado, reducen marcadamente su eficiencia en mejorar el cuajado (Agustí et al. 1982, Gravina et al. 1996). Aunque en las condiciones experimentales la floración fue elevada los tratamientos de GA_3 y la práctica de anillado, solos o combinados, incrementaron el cuajado de fruta.

Cuadro 2. Intensidad de floración (flores/100 nudos) según tratamiento.

Tratamiento	Flores/100 nudos	
G	198,1	a
G+G	153,2	b
A	157,9	b
G+A	188,6	a
T	183,4	a

Medias seguidas de letras diferentes indican diferencias significativas (P ≤ 0,05).

La aplicación de GA_3 en plena floración incrementó el cuajado inicial hasta los 42 DPPF, a partir de entonces este efecto se pierde. Los tratamientos que recibieron esta aplicación (G, G+G y G+A) se diferenciaron del resto de los tratamientos (Figura 3, Cuadro I, Anexos). En esta fecha, los porcentajes de cuajado en los tratamientos de anillado y testigo, no se diferenciaron estadísticamente, 24,13 y 16,83 % respectivamente. Estos resultados son coherentes, ya que el anillado se realizó a los 30 DPPF.

La primera fase de abscisión de ovarios y frutitos se relaciona con las giberelinas (Talón et al., 1997a). El bajo contenido endógeno de giberelinas en los ovarios de variedades partenocárpicas limita su cuajado. La respuesta de la aplicación de GA_3 con incremento en el cuajado inicial, sugiere un déficit en la síntesis de giberelinas en sus ovarios no fecundados (Talón et al., 1990).

El anillado se diferenció del testigo, alcanzando mayor porcentaje de cuajado a partir de los 56 DPPF. Luego de la primera etapa de abscisión y hasta fin de caída fisiología, los carbohidratos juegan un rol fundamental en el cuajado (Mahouachi et al., 2009). Esto concuerda con los resultados obtenidos en los tratamientos con anillado de tronco (A y G+A).

El efecto del anillado en la disminución la abscisión se extendió hasta fin de caída fisiológica (112 DPPF), provocando el aumento del cuajado final en los árboles que se practicó anillado (G+A y A). Probablemente debido al efecto del anillado sobre el aumento en el contenido de carbohidratos (Ruiz et al., 2001).

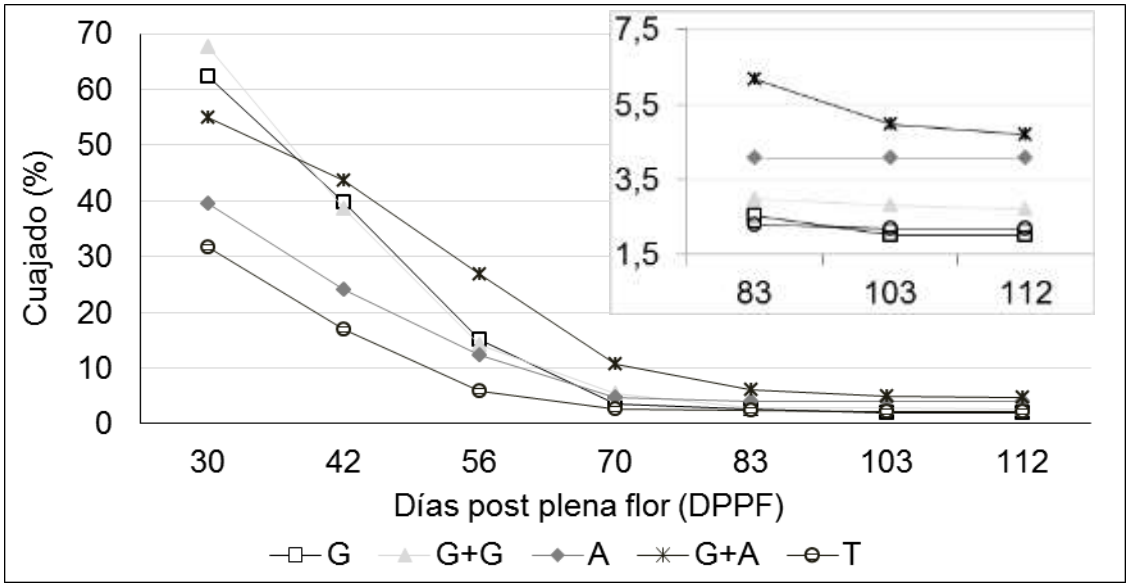


Figura 3. Evolución del cuajado de frutos (%) según tratamiento.

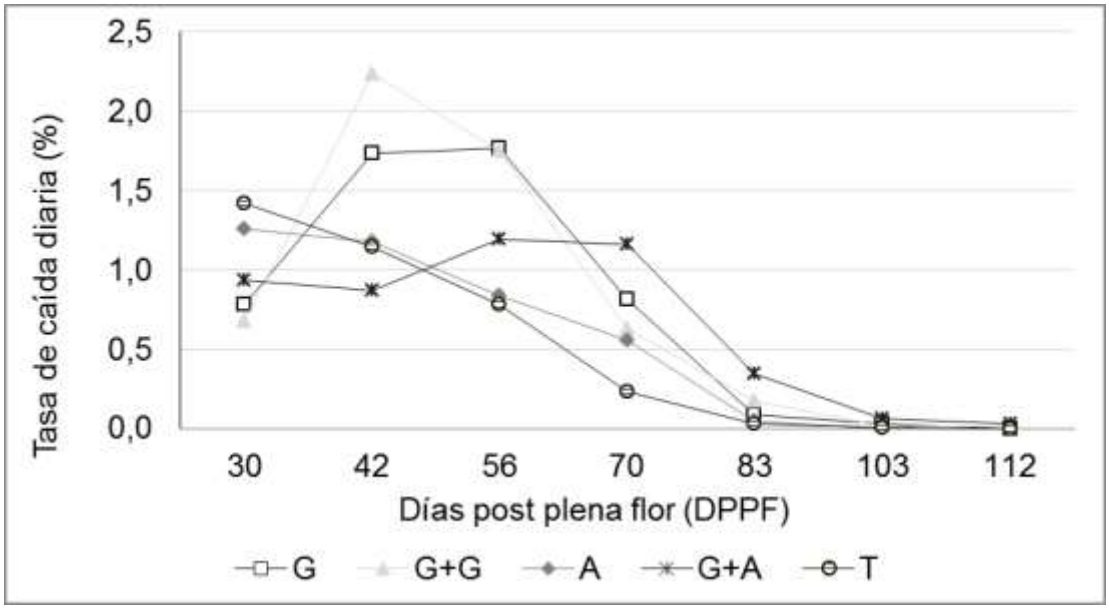


Figura 4. Tasa de abscisión diaria de frutos según tratamiento.

La aplicación de GA_3 30 DPPF no logró sostener el porcentaje de cuajado logrado con la primera aplicación, ni mejoró el cuajado final. La evolución del cuajado en este tratamiento no se diferenció estadísticamente del

tratamiento G. La aplicación de GA_3 en antesis y 30 días después obtuvo el mismo efecto sobre el cuajado que GA_3 solo en antesis. Ampliar el período de estímulo del GA_3 superados los 30 DPPF, con una segunda aplicación no redujo la abscisión hacía final de caída fisiológica (Figura 4).

Los tratamientos que solo involucraron la aplicación de GA_3 (G y G+G), a partir de los 56 DPPF presentaron una marcada disminución del cuajado.

El anillado solo o combinado con GA_3, redujo la abscisión de frutitos, alcanzando mayor porcentaje de cuajado. El efecto del anillado se mantuvo hasta fin de caída fisiológica, e incrementó el cuajado final con respecto al testigo. Esto resultados sugieren que la disponibilidad de carbohidratos en estas condiciones, una vez superado el reinicio del crecimiento del ovario, sería un factor limitante del cuajado final, de acuerdo a Mahouachi et al. (2009). La mayor disponibilidad de carbohidratos destinados a los frutitos en desarrollo, disminuye su abscisión e incrementa el número de frutos cosechados. Esta respuesta es mucho mayor en cultivares con bajo índice partenocárpico (Rivas et al., 2006).

Cuadro 3. Cuajado final de frutos (%) según tratamiento.

Tratamiento	Cuajado final (%)	
G	2,04	b
G+G	2,71	b
A	4,10	a
G+A	4,70	a
T	2,20	b

Medias seguidas de letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

El tratamiento G+A promovió el mayor porcentaje de cuajado final, sin diferenciarse estadísticamente del anillado (Cuadro 3). Los tratamientos G, G+G y T presentaron menor cuajado final, sin diferencias estadísticas entre sí. La aplicación de GA_3 por sí sola no logró aumentar el cuajado. La aplicación de GA_3 en floración ha sido reportada como promotora del cuajado en variedades autoincompatible, como Clementinas (Talón et al., 2001) y ‘Navelate’ (Agustí et al., 1982). El contenido endógeno de giberelinas se ha asociado con la

capacidad de respuesta a las aplicaciones de GA_3. La variedad 'Clementina Oroval' presenta bajo contenido endógeno de esta hormona, y la aplicación de GA_3 incrementa el cuajado de fruta (Talón et al.1992, Talón et al. 2001). Sin embargo, esta medida agronómica no ha sido eficiente en mejorar en cuajado en 'Ellendale' (Gravina et al. 1994, Talón et al. 2001), 'Ortanique' (Talón et al. 2001, Espino et al. 2005), ni en mandarina 'Nova' (Talón et al. 2001, Gambetta et al. 2008). Otero y Rivas (2015) reportan en las condiciones nacionales un incremento del número de frutos cosechados en 'Afourer' con aplicación de GA_3 en plena flor.

Las plantas en condiciones de libre polinización obtuvieron 3,88 % de cuajado (Cuadro II, Anexos). Este valor fue similar al alcanzado en los tratamientos G+A y A bajo malla, 4,70 y 4,10 % respectivamente. Sin embargo, fue superior al registrado en las plantas testigo bajo malla (2,2 %). Las variedades que producen semillas en general poseen niveles altos de giberelinas, cuajan adecuadamente y no responden a la aplicación de GA_3 con el aumento del cuajado. Si la fecundación es impedida, por ejemplo porque se evita la polinización cruzada, se reduce la síntesis de giberelinas y el cuajado. Éste último se incrementa con el aporte de GA_3 (Talón et al., 2001).

Figura 5. Malla anti-abejas sobre las plantas (izquierda), y detalle de la malla donde se observa una abeja y flores sobresaliendo (derecha).

4.2. CRECIMIENTO DE FRUTOS

El diámetro ecuatorial del fruto presentó una evolución del tipo sigmoidal (Figura 6), característica los frutos cítricos (Bain, 1958). Durante el período evaluado no se registraron diferencias significativas en el diámetro ecuatorial del fruto, entre los tratamientos (Cuadros III, IV, V, Anexos).

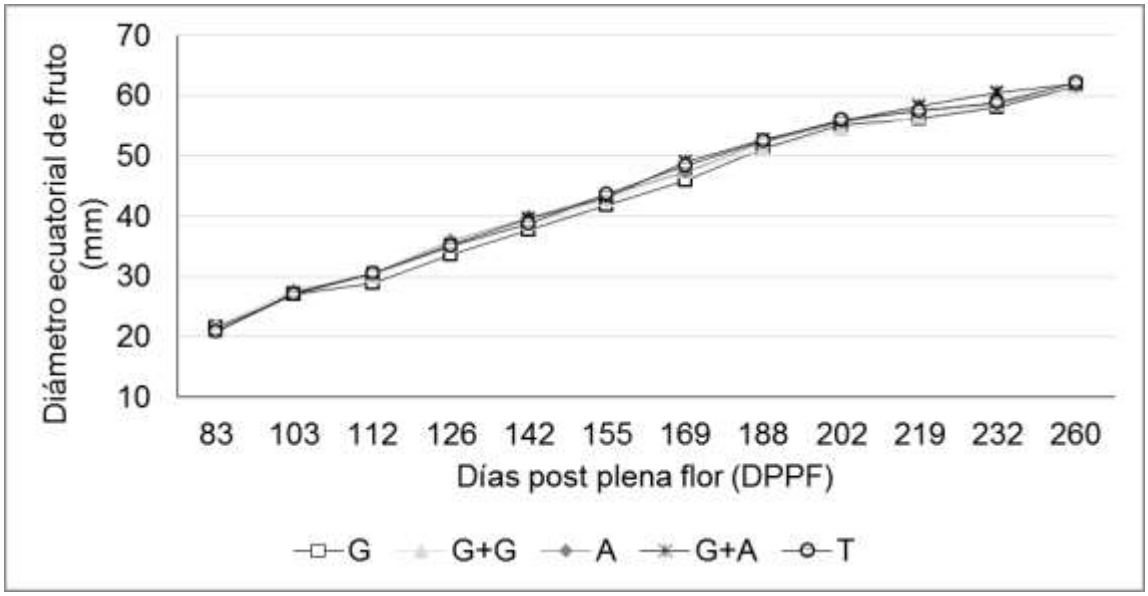


Figura 6. Evolución del diámetro de fruto (mm) según tratamiento desde inicio de la fase II hasta cosecha.

4.3. COMPONENTES DEL RENDIMIENTO

Los tratamientos afectaron significativamente el rendimiento (Kg) y el número de frutos cosechados por planta (Figura 7), ambos están fuertemente correlacionados (Gravina, 2014a). Los resultados obtenidos en el cuajado final de fruta concuerdan con el número de frutos cosechados por tratamiento (Cuadro 4). La aplicación de GA_3 en floración más anillado de tronco, y el anillado, lograron mayor porcentaje de cuajado, incrementaron el número de frutos cosechados por planta y el rendimiento, aunque solamente el tratamiento combinado se diferenció estadísticamente del testigo. Entre los tratamientos T, G y G+G no se detectaron diferencias estadísticas. La falta de respuesta de la

aplicación de GA_3, podría deberse a la imposibilidad de la planta de nutrir un número elevado de frutos cuyo cuajado inicial fue promovido por dicho regulador. Luego de permanecer en el árbol durante un tiempo compitiendo entre sí, la restricción por carbohidratos impide su desarrollo, y sufren la abscisión. El anillado es capaz de compensar parcialmente dicha competencia, incrementando el cuajado final (Agustí et al., 1997).

Cuadro 4. Número de frutos por planta (No. frutos), rendimiento por planta (Kg), peso promedio de fruto (g) y diámetro ecuatorial de frutos en cosecha (mm) según tratamiento.

Tratamiento	No. frutos		Rendimiento (Kg)		Peso promedio fruto (g)		Diámetro ecuatorial (mm)	
G	375	c	37,03	c	98,51	a	62,10	a
G+G	379	c	37,55	c	99,81	a	63,09	a
A	571	ab	57,76	ab	102,49	a	61,58	a
G+A	677	a	67,07	a	97,91	a	62,33	a
T	408	bc	41,09	bc	102,04	a	62,14	a

Medias seguidas de letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Las plantas en libre polinización no presentaron limitantes en el cuajado de fruta, obteniendo mayor número de frutos cosechados y rendimiento por planta en comparación al testigo (Cuadro 5). 'Afourer' presenta alta productividad en condiciones de libre polinización (Nadori, 2004). En condiciones de aislamiento físico, mediante mallas anti-abeja, se reporta la reducción del cuajado y el número de frutos cosechados en el norte (Otero y Rivas, 2010) y sur del país (Gravina et al., 2014b).

Cuadro 5. Número de frutos por planta (No. frutos), rendimiento por planta (Kg), peso promedio de fruto (g), frutos por m^3 de copa y diámetro ecuatorial de fruto (mm) en cosecha, en condiciones de libre polinización.

No. frutos	Rendimiento (Kg)	Peso promedio fruto (g)	Frutos.m^{-3} de copa	Diámetro ecuatorial de fruto (mm)
680	76,7	113	81	63,90

La aplicación de GA_3 en floración combinada con el anillado 30 días después, mostró el mayor incremento en rendimiento en comparación al testigo, si bien no se diferenció estadísticamente del anillado que produjo 10 Kg menos por planta. Proyectando los rendimientos alcanzados por estos tratamientos a la densidad de plantación del cuadro en que se realizó el experimento, el tratamiento G+A permitiría alcanza 45 $t.ha^{-1}$, mientras que el anillado lograría 38 $t.ha^{-1}$.

No se detectaron diferencias estadísticas entre tratamiento en el diámetro ecuatorial (mm) y peso medio (g) (Cuadro 4). La competencia entre órganos en desarrollo es un factor de gran importancia en el tamaño final del fruto, presentando una relación inversa entre el número de frutos cosechados y su tamaño (Agustí, 2003a). Nuestros resultados indican que el aumento del número de frutos cosechados en los tratamientos G+A y A, no redujo su tamaño. Debido a que dicho aumento no comprometió el tamaño de fruta, es posible que no se haya alcanzado el máximo potencial productivo de esta variedad.

Los tratamientos y niveles productivos alcanzados con ellos, no modificaron la calidad interna de fruta y peso de fruta (g) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Peso y calidad interna de fruta según tratamiento.

Tratamiento	Peso (g)		SS (ºBrix)		Jugo (%)		Acidez (%)		Ratio	
G	96,51	a	13,80	a	50,87	a	1,32	a	10,46	a
G+G	104,49	a	13,20	a	49,05	a	1,40	a	9,54	a
A	106,05	a	12,07	a	48,58	a	1,20	a	10,08	a
G+A	108,36	a	12,87	a	49,58	a	1,24	a	10,50	a
T	112,61	a	13,17	a	49,68	a	1,38	a	9,52	a

Medias seguidas de letras diferentes en columnas indican diferencias significativas (p ≤ 0,05).

Figura 7. Plantas previo a la cosecha con distintos tratamientos: G (izquierda y arriba), G+G (centro y arriba), A (derecha y arriba), G+A (izquierda y abajo), T (centro y abajo) y PA (izquierda y abajo).

Los árboles bajo malla obtuvieron 95 % de frutos sin semillas, mientras que en condiciones de polinización abierta todos los frutos presentaron semillas (Figura 8). En estas condiciones se obtuvieron en promedio 10,8 semillas por fruto, mientras que bajo malla éste disminuyó a 0,3 (Cuadros VI, VII, Anexos). Estos resultados confirman la elevada eficiencia de la malla anti-abejas en la producción de fruta sin semillas reportada por estudios nacionales (Otero y Rivas 2010, Gravina et al. 2011, Gambetta et al. 2013, Gravina et al. 2014b, Rey et al. 2014, Otero y Rivas 2015).

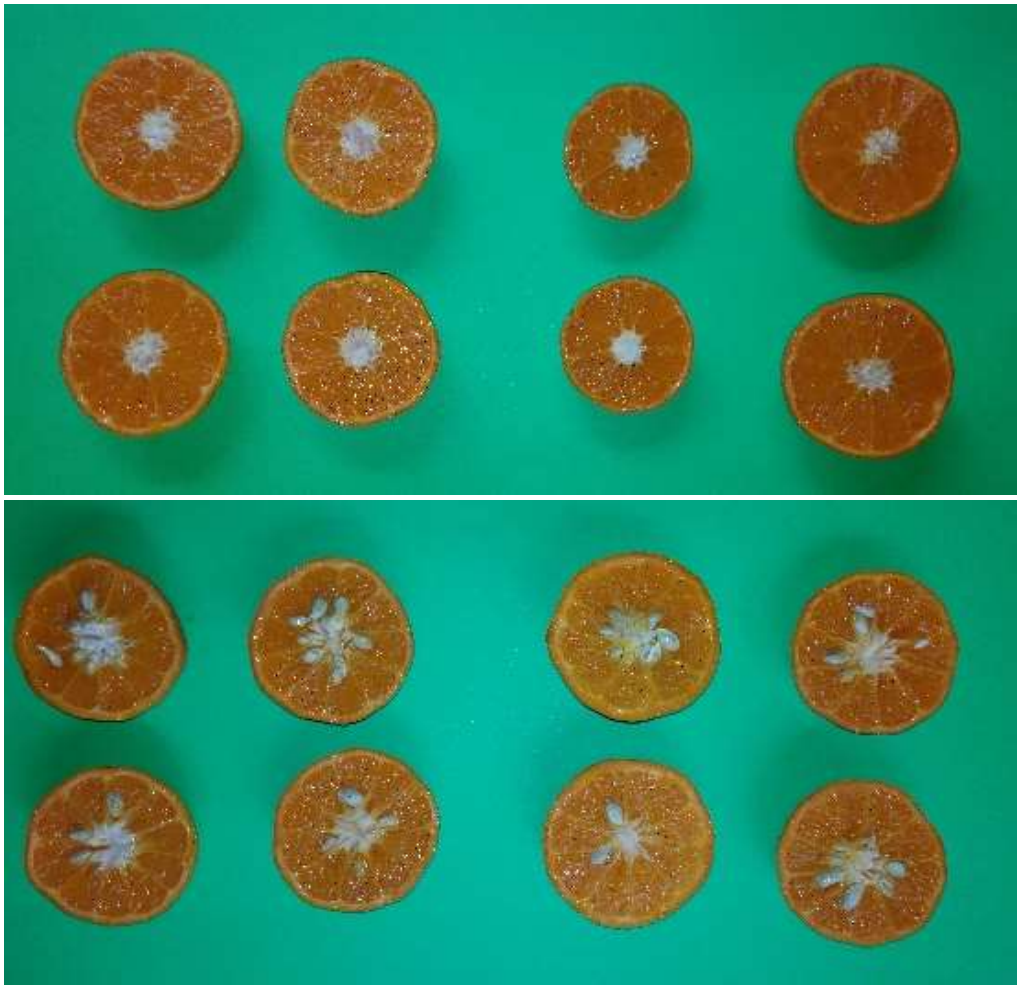


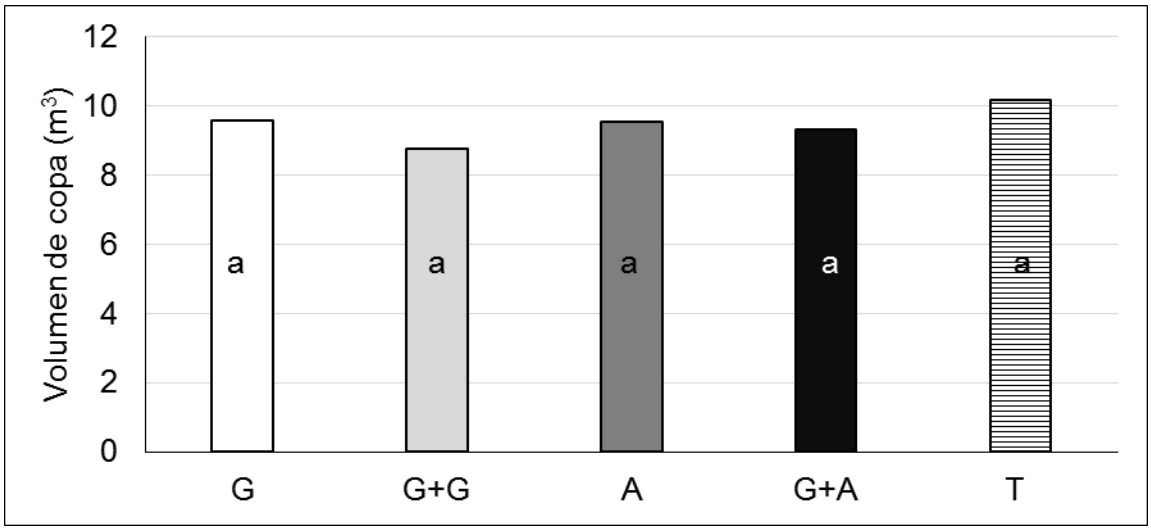
Figura 8. Cortes transversales de frutos cosechados bajo malla anti-abejas (arriba), y en condiciones de polinización abierta (abajo).

La presencia de semillas con el uso de mallas anti abejas fue reportada entre 1 y 5 % (Gravina et al. 2011, Gambetta et al. 2013, Gravina et al. 2014b, Rey et al. 2014). Esta medida de manejo presenta mayor eficiencia en la disminución en el contenido de semillas que el control químico, el cual reposta entre 14 y 31 % de frutos sin semillas (Mesejo et al. 2008, Otero y Rivas 2010, Gambetta et al. 2013, Rey et al. 2014).

La presencia de 5 % de frutas con semillas en plantas bajo malla podría explicarse en aquellos que presentaron 1 semilla por fruto debido a la superación de la autoincompatibilidad, reportada en esta variedad por Gravina et al. (2011). Otra hipótesis, es que la presencia de orificios en las mallas y zonas de contacto entre éstas y los árboles (Figura 5), posibilitan el acceso de las abejas a las flores, y su acción como polinizadores, generando la formación de semillas.

4.4. EFICIENCIA PRODUCTIVA

El volumen de copa entre tratamientos alcanzó valores entre 8,8 y 10,2 m^3, sin diferenciarse estadísticamente (Figura 9). La combinación de GA_3 en plena floración más anillado 30 días después, logró la mayor eficiencia productiva (frutos.m^{-3} de copa) (Cuadro 7). El resto de los tratamientos presentaron menos de 70 frutos.m^{-3} de copa, sin diferencias estadísticas. El anillado obtuvo 14 frutos.m^{-3} de copa menos que G+A, sin detectarse diferencias estadísticas entre ambos. La eficiencia productiva de copa en cada tratamiento no se debe a sus volúmenes de copa, y puede explicarse por el porcentaje de cuajado logrado en cada tratamiento.



Letras diferentes indican diferencias significativas (P ≤ 0,05).

Figura 9. Volumen de copa según tratamiento.

Cuadro 7. Eficiencia productiva (frutos.m^{-3} de copa) según tratamiento.

Tratamiento	Frutos.m^{-3} copa	
G	40	b
G+G	44	b
A	61	ab
G+A	75	a
T	42	b

Medias seguidas de letras diferentes indican diferencias significativas (P ≤ 0,05).

5. CONCLUSIONES

- Se confirmó la eficiencia de la malla anti-abejas en la producción de fruta sin semillas.

- El tratamiento combinado de GA_3 en floración y anillado 30 días después (G+A), incrementó el rendimiento por planta en relación al testigo, con 67 kilos por planta, lo que proyectado a superficie significa 45 $t.ha^{-1}$, mientras que el testigo presentó 27 $t.ha^{-1}$. Las plantas en condiciones de polinización abierta alcanzaron un rendimiento de 51 $t.ha^{-1}$. El tratamiento de anillado de tronco 30 DPPF (A) alcanzó valores intermedios entre el testigo y G+A, tanto en número de frutos como en rendimiento por planta, sin diferenciarse estadísticamente con ambos tratamientos. Proyectando su rendimiento a superficie significa 38 $t.ha^{-1}$.

- Los tratamientos que solo incluían la aplicación de GA_3 (G y G+G) no lograron incrementar el cuajado final, rendimiento ni el número de frutos por árbol, sin diferencias estadísticas con el testigo.

- La aplicación de GA_3 en plena floración combinado con anillado de tronco 30 días después, permite incrementar la productividad de 'Afourer' en condiciones de polinización abierta, alcanzando niveles similares a los obtenidos en libre polinización.

- El incremento del número de frutos cosechados en los tratamientos G+A y A, no redujo su tamaño (diámetro ecuatorial y peso).

6. RESUMEN

La mandarina ‘Afourer’ es una variedad patentada de alto valor comercial, registrada como variedad sin semillas. Actualmente ha cobrado considerable importancia en la producción nacional por sus excelentes cualidades organolépticas, posicionándose como “variedad exportable” con creciente demanda internacional y elevado valor comercial. En las condiciones productivas nacionales la mayor parte de los frutos presentan semillas; condición que reduce notoriamente su valor comercial además de restringir su comercialización. Las mallas anti-abejas se utilizan con la finalidad de impedir la polinización cruzada, y posibilitar la producción de fruta sin semillas. Sin embargo, esta técnica disminuye el cuajado, y por lo tanto el rendimiento. El objetivo de este trabajo fue mejorar los componentes del rendimiento que se ven afectados por las condiciones de aislamiento de polinización mediante malla anti-abejas. El experimento se realizó en un establecimiento comercial del departamento de San José, en plantas en producción. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con 6-8 repeticiones y una planta como unidad experimental. Se aplicaron cinco tratamientos: una aplicación de ácido giberélico (GA_3) (40 $mg.l^{-1}$) en plena floración; anillado de tronco (30 días post plena floración); la combinación de los tratamientos anteriores; dos aplicaciones de ácido giberélico (GA_3) (40 $mg.l^{-1}$), una en plena floración y otra 30 días después; y testigo bajo malla. Además, se seleccionaron plantas en condiciones de polinización abierta. La instalación de las mallas anti-abejas de 50 $g.m^{-2}$, se realizó desde inicios de brotación hasta el final de caída de pétalos. La aplicación de GA_3 combinado con anillado de tronco incrementó significativamente el cuajado de frutos y el rendimiento, sin afectar el tamaño de fruta. Los tratamientos que solo incluían la aplicación de GA_3 no aumentaron el cuajado final con respecto al testigo. En estos, el rendimiento se redujo marcadamente con respeto a lo obtenido en polinización abierta. Las plantas bajo malla presentaron 95 % de frutos sin semillas, mientras que en libre polinización todos los frutos presentaron semillas.

Palabras clave: Mandarina; ‘Afourer’; Cuajado; Semillas; Ácido giberélico; Anillado.

7. SUMMARY

‘Afourer’ mandarin is a high value commercial patent cultivar, registered as seedless cultivar. Currently it has grown in importance at the national production, mainly due to fruit quality. It is considered as a ‘market high demanded exportable cultivar’. In our conditions, a great fruit proportion has seeds. This importantly reduces its commercial value and restricts their marketing. The anti-bees nets are used to avoid cross-pollination and produce seedless fruit. However, the anti-bees nets decrease fruit-set and yield. The purpose of this research was to improve yield components that are affected by isolation of cross-pollination with anti-bees nets. The experiment was made in a commercial orchard located in San José. A randomize single plot design, with 6-8 replications and a tree as experimental unit was used. Five treatments were applied: application of gibberellic acid (GA_3) (40 $mg.l^{-1}$) at full bloom; trunk girdling (30 days after full bloom); their combination; two applications of gibberellic acid (GA_3) (40 $mg.l^{-1}$) at full bloom, and 30 days after; and a control without net (cross pollination). The anti-bees nets (50 $g.m^{-2}$) were fixed from the beginning of flowering to the end of petal fall. GA_3 application combined with trunk girdling increased fruit set and yield, without affecting fruit size. GA_3 applications did not improve fruit set. The Control plants had considerably low yield compared to trees leave in cross pollination. Net-covered trees had 95 % of seedless fruit, while trees in cross pollination had no seedless fruit.

Keywords: Mandarin; ‘Afourer’; Fruit set; Seeds; Gibberellic acid; Girdling.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Agustí, M.; García-Marí, F.; Guardiola, J. 1982. The influence of flowering intensity on the shedding of reproductive structures in sweet orange. Horticultural Science. 17: 343-352.

2. _____.; Zaragoza, S.; Bleiholder, H.; Buhr, L.; Hack, H.; Klose, R.; Staub, R. 1997. Adaptación de l'echelle BBCH a la description des stades phenologiques des agrumes du genere *Citrus*. Fruits. 52: 287-295.

3. _____. 2003a. Citricultura. 2ª. ed. rev. ampl. Madrid, Mundi-Prensa. 422 p.

4._____.; Martínez-Fuentes, A.; Mesejo, C.; Juan, M.; Almela, V. 2003b. Cuajado y desarrollo de frutos cítricos. Valencia, Generalitat Valenciana, Conselleria D'Agricultura, Peixca I Alimentació. 80 p. (Sèrie Divulgació Tècnica no. 55)

5._____.; _____.; Reig, C.; Mesejo, C. 2005. Comportamiento agronómico del tangor 'Afourer'. Levante Agrícola. 375: 124-128.

6._____. 2010. Fruticultura. Madrid, Mundi-Prensa. 507 p.

7.Aznar, M.; Almela, V.; Juan, M.; El-Otmani, M.; Agustí, M. 1995. Effect of the synthetic auxin phenothiol on fruit development of 'Fortune' mandarin. Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 70 (4): 617-622.

8.Bain, J. M. 1958. Morphological, anatomical and physiological chages in the developing fruit of the 'Valencia' orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). Australian Journal of Botany. 6: 1-24.

9.Barry, G. H.; Bower, J. P. 1997. Manipulation of fruit ser and stylar-end fruit split in 'Nova' mandarin hybrid. Scientia Horticulturae. 70: 243-250.

10. _____. 2004. The quest for seedless citrus fruit. In: International Citrus Congress (10th., 2004, Agadir, Morocco). Proceedings. Agadir, Marocco, International Society of Citriculture. v.1, pp. 346.

11. Ben-Cheikh, W.; Perez-Botella, J.; Tadeo, F. R.; Talón, M.; Primo-Millo, E. 1997. Pollination increases gibberellin levels in developing ovaries of seeded varieties of citrus. Plant Physiology. 114: 557-564.

12. Bermejo, A.; Primo-Millo, E.; Agustí, M.; Mesejo, C.; Reig, C.; Iglesias, D. J. 2015. Hormonal profile in ovaries of mandarin varieties with differing reproductive behaviour. Journal of Plant Growth Regulation. 34 (3): 584-594.

13. Bono, R.; Soler, J.; Buj, A. 2000. Parámetros de calidad de los cítricos; el problema de las semillas. Revista Comunidad Valenciana Agraria. 16: 7-15.

14. Borges, A.; Da Cunha, M.; Pardo, E.; García, M.; Franco, J.; Gravina, A. 2009. Cuajado de frutos en tangor 'Ortanique' en respuesta a la polinización y a distintas situaciones de estrés ambiental. Agrociencia (Montevideo). 13 (1): 7-18.

15. Bošković, R.; Russell, K.; Tobutt, K. 1997. Inheritance of stylar ribonucleases in cherry progenies, and reassignment of incompatibility alleles to two incompatibility groups. Euphytica. 95 (2): 221-228.

16. Bustan, A.; Goldschmidt, E. E.; Erner, Y. 1996. Carbohydrate supply and demand during fruit development in relation to productivity of grapefruit and 'Murcott' mandarin. Acta Horticulturae. no. 416: 81-88.

17. Buwalda, J. G.; Smith, G. S. 1990. Effects of partial defoliation at various stages of the growing season on fruti yields, roots growth and return bloom of kiwifruit vines. Scientia Horticulturae. 42: 29-44.

18. Carrau, F. 2005. Anances de evaluación de cultivares cítricos; variedades de maduración tardía. (en línea). Montevideo, INIA. pp. 1-7 (Actividades de Difusión no. 422). Consultado 28 jun. 2015. Disponible en http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/sa/ad/2005/ad_422.pdf

19. Chao, C-C. T.; Fango, J.; Devanand, P. S. 2005a. Long distance pollen flow in mandarin orchards determined by AFLP markers-implications for seedless mandarin production. Journal of the American Society for Horticultural Science. 130 (3): 374-380.

20. _____. 2005b. Pollination study of mandarins and the effect on seediness and fruit size; implications for seedlees mandarin production. HortScience. 40 (2): 362-365.

21. _____.; Lovatt, C. J. 2006. Effects of concentration and application time of GA3 and urea on yield, fruit size distribution and crop value of clementine mandarin in California. Acta Horticulturae. no. 727: 227-238.

22. _____.; Khuong, T.; Zheng, Y.; Lovatt, C. J. 2011. Response of evergreen perennial tree crops to gibberellic acid is crop load-dependent. I; GA3 increases the yield of commercially valuable 'Nules' Clementine mandarin fruit only in the off-crop year of an alternate bearing orchard. Scientia Horticulturae .130: 743–752.

23. Da Cunha, M.; Gravina, A. 2006, Influencia del tipo de brote en el cuajado y crecimiento del fruto del tangor Ortanique. Agrociencia (Montevideo). 5 (1): 37-46.

24. De Nettancourt, D. 1977. Incompatibility in angiosperms. Berlin, Springer. 203 p.

25. Dewi, P.; Wakana, A.; Tanimoto, Y.; Fujiwara, Y.; Sakai, K.; Kajiwara, K. 2015. Genotyping for male sterility (ms) and ms gene mapping with rapd markers in citrus, especially with precocious flowering seedlings from a cross of 'hy16' × grapefruit. Acta Horticulturae. no. 1065: 475-486.

26. Di Rienzo, J. A.; Casanoves, F.; Balzarini, M. G.; González, L.; Tablada, M.; Robledo, C. W. 2015. InfoStat versión 2015. (en línea). Córdoba, Universidad Nacional de Córdoba. FCA. s.p. Consultado 23 jul. 2015. Disponible en http://www.infostat.com.ar

27. Distefano, G.; Caruso, M.; La Malfa, S.; Gentile, A.; Tribulato, E. 2009. Histological and molecular analysis of pollen-pistil interaction in clementine. Plant Cell Report. 28: 1439-1451.

28. _____.; Gentile, A.; Herrero, M. 2011. Pollen-pistil interactions and early fruiting in parthenocarpic citrus. Annals of Botany. 108: 499-509.

29. _____.; Hedhly, A.; Las Casas, G.; La Malfa, S.; Herrero, M.; Gentile, A. 2012. Male-female interaction and temperatura variation affect pollen performance in Citrus. Scientia Horticulturae. 140: 1-7.

30. El-Otmani, M.; Coggins, C. W. Jr.; Agustí, M.; Lovatt, C. L. 2000. Plant growth regulators in citriculture; world current uses. Critical Reviews in Plant Sciences. 19: 395-447.

31. Espino, M.; Borges, A.; Da Cunha, M.; Gambetta, G.; Gravina, A. 2005. Manejo de la floración y cuajado de frutos en tangor 'Ortanique'. In: Simposio Investigación y Desarrollo Tecnológico en Citrus (2°., 2005, Salto). Trabajos presentados. Montevideo, Facultad de Agronomía. pp. 1-4.

32. Fasiolo, A. C.; Rey, F. A. 2013. Contribución al conocimiento de la biología reproductiva de la mandarina 'Afourer' (*Citrus reticulata* Blanco). Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 64 p.

33. Frankel, R.; Galum, E. 1977. Pollination mechanisms, reproduction and plant breeding. Berlin, Springer. 281 p.

34. Franklin-Tong, N. V.; Franklin, F. C. 2003. Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. Trends Plant Science. 8 (12): 598-605.

35. Frost, H. B.; Soost, R. S. 1968. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: Reuther, W.; Batchelor, L. D.; Webber, H. J. eds. The citrus industry. Berkeley, University of California. v. 2, cap. 4. pp. 290-319.

36. Gambetta, G.; Borges, A.; Espino, M.; Da Cunha, M.; Rivas, F.; Arbiza, H.; Gravina, A. 2008. Mejora de la productividad de la mandarina 'Nova': aspectos fisiológicos y medidas de manejo. Agrociencia (Montevideo). 2 (2): 1-9.

37. _____.; Gravina, A.; Fasiolo, C.; Fornero, C.; Galiger, S.; Inzaurralde, C.; Rey, F. 2013. Self-incompatibility, parthenocarpy

and reduction of seed presence in ‘Afourer’ mandarin. Scientia Horticulturae. 164: 183-188.

38. García-Papí, M.; García-Martínez, J. 1984. Endogenous plant growth substances content in young fruits of seeded and seedless Clementine mandarin as related to fruit set and development. Scientia Horticulturae. 22 (3): 265-274.

39. Goldschmidt, E. E.; Monselise, S. P. 1970. Hormonal control of flowering in citrus and some other woody perennials. In: Carr, D. J. ed. Plant growth substances 1970. Berlin, Springer. cap.16, pp. 758-766.

40. _____.; Koch, K. E. 1996. Citrus. In: Zaminski, E.; Schaffer, A. A. eds. Photoassimilate distribution in plants and crops; source-sink relations. New York, Marcel Dekker. pp. 797-823.

41. _____. 1999. Carbohydrate supply as a critical factor for citrus fruit development and productivity. HortScience. 34 (6): 1020-1024.

42. Gómez-Cadenas, A.; Mehouachi, J.; Tadeo, F.; Primo-Millo, E.; Talón, M. 2000. Hormonal regulation of fruitlet abscission induced by carbohydrate shortage in citrus. Planta. 210 (4): 636-643.

43. Goren, R. 1993. Anatomical, physiological, and hormonal aspects of abscission in citrus. Horticulture Reviews. 15: 145-177.

44. Gravina, A.; Arbiza, H.; Balbi, V. 1994. Efecto de aplicaciones de ácido giberélico y anillado sobre la producción de tangor ‘Ellendale’ (*C.sinensis* L. Osb. x *C.reticulata* Bl.) en Uruguay. Fruticultura Profesional. no. 61: 17-22.

45. _____.; _____.; Juan, M.; Almela, V.; Agustí, M. 1996. Flowering-fruiting interrelationships in ‘Ellendale’ tangor under the growing conditions of Spain and Uruguay. In: International Citrus Congress (8th., 1996, Sun City, South Africa). Proceedings. Sun City, South Africa, International Society of Citriculture. v.2, pp. 1081-1085.

46. _____.; _____.; Arias, M.; Ronca, F. 1997. Estudio de la floración en el tangor ‘Ellendale’ (*Citrus sinensis* L. Osb. X *C.*

reticulata Bl.) y su relación con el cuajado de frutos y productividad. Agrociencia (Montevideo). 1 (1): 55-59.

47. _____.; Juan, M.; Arbiza, H.; Almela, V.; Coelli, V.; Agustí, M. 1998. Respuesta productiva del tangor 'Ellendale' (*Citrus sinensis* L. Osb. X *C. reticulata* Bl.) a diferentes fechas del anillado. Agrociencia (Montevideo). 2 (1): 112-116.

48. _____. 2007. Aplicación del ácido giberélico en citrus: revisión de resultados experimentales en Uruguay. Agrociencia (Montevideo). 2007. 11 (1): 57-66.

49. _____.; Fornero, C.; Galiger, S.; Inzaurralde, C.; Fasiolo, C.; Gambetta, G. 2011. Partenocarpia, polinización cruzada y presencia de semillas en mandarina 'Afourer'. Agrociencia (Montevideo). 15 (2): 40-47.

50. _____. 2014a. Fisiología de citrus. Montevideo, Universidad de la República. 145 p.

51. _____.; Gambetta, G.; Rey, F.; Fasiolo, C.; Pereira das Neves, V. 2014b. Producción de mandarina 'Afourer' bajo malla anti-abejas. I. efecto de diferentes mallas en la presencia de semillas y el rendimiento. In: Congreso Latinoamericano de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Citrus (1°., 2014, Salto, Uruguay). Trabajos presentados. Montevideo, Facultad de Agronomía. s.p.

52. _____.; _____.; _____.; _____.; Guimaraes, N. 2014c. Producción de mandarina 'Afourer' bajo malla anti-abejas. II. técnica de mejora del cuajado y rendimiento en el sur de Uruguay. In: Congreso Latinoamericano de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Citrus (1°., 2014, Salto, Uruguay). Trabajos presentados. Montevideo, Facultad de Agronomía. s.p.

53. Guardiola, J. L.; Agustí, M.; García-Marí, F. 1977. Gibberellic acid and flower bud development in sweet orange. In: International Citrus Congress (2nd., 1977, Orlando, Florida). Proceedings. s.n.t. pp. 696-699.

54. _____.; García-Marí, F.; Agustí, M. 1984. Competition and fruit set in the Washington Navel orange. Physiologia Plantarum. 62 (3): 297-302.

55. Hiratsuka, S.; Okada, Y.; Kawai, Y.; Tamura, F.; Tanabe K. 1995. Stylar basic proteins corresponding to 5 self-incompatibility alleles of japanese pears. Journal of the Japanese Society for Horticultural. 64: 471-478.

56. Iglesias, D. J.; Lliso, I.; Tadeo, F. R.; Talón, M. 2002. Regulation of photosynthesis through source:sink imbalance in citrus is mediated by carbohydrate content in leaves. Physiologia Plantarum. 116 (4): 563-572.

57. _____.; Tadeo, F. R.; Primo-Millo, E.; Talón, M. 2003. Fruit set dependence on carbohydrate availability in citrus trees. Tree Physiology. 23: 199-204.

58. _____.;_____.;_____.;_____. 2006. Carbohydrate and ethylene levels related to fruitlet drop through abscission zone A in citrus. Trees. 20 (3): 348-355.

59. Iwamasa, M. 1966. Studies on the sterility in genus citrus with special reference to the seedlessness. Bulletin of the Horticultural Research Station B. no. 6: 1-81.

60. Jackson, L. K. 1997. Seed development in citrus. (en línea). Fort Pierce, FL, University of Florida. Indian River Research and Education Center. pp. 33-42. Consultado oct. 2015. Disponible en http://irrec.ifas.ufl.edu/flcitrus/pdfs/short_course_and_workshop/citrus_flowering_97//Jackson-Seed_Development.pdf

61. Janssens, G. A.; Goderis, I. J.; Broekaert, W. F.; Broothaerts, W. 1995. A molecular method for S-allele identification in apple based on allele-specific PCR. Theoretical and Applied Genetics. 91 (4): 691-698.

62. Kahn, T. L.; Demason, D. A. 1988. Citrus pollen tube development in cross-compatible gynoecia, self-incompatible gynoecia, and in vitro. Canadian Journal of Botany. 66: 2527-2532.

63. Kao, T.; McCubbin, A. G. 1996. How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 93 (22): 12059-12065.

64. Khan, I. 2007. Citrus genetics, breeding and biotechnology. Wallingford, CABI. 370 p.

65. Koshita, Y.; Takahara, T.; Ogata, T.; Goto, A. 1999. Involvement of endogenous plant hormones (IAA, ABA, GAs) in leaves and flower bud formation of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). Scientia Horticulturae. 79: 185-194.

66. Li, C.; Weiss, D.; Goldschmidt, E. E. 2003 Girdling affects carbohydrate-related gene expression in leaves, bark and roots of alternate-bearing citrus trees. Annals of Botany. 92 (1): 137-143.

67. Li, Y.; Uchida, A.; Abe, A.; Yamamoto, A.; Hirano, T.; Kunitake, H. 2015a. Effects of polyamines on self-incompatibility-like responses in pollen tubes of citrus cultivars, Banpeiyu and Hyuganatsu. Journal of the American Society for Horticultural Science. 140 (2): 183–190.

68. _____.; Abe, A.; Fuse, T.; Hirano, T.; Hoshino, Y.; Kunitake, H. 2015b. In vitro self-incompatible-like response applied for protein identification and gene expression analysis in citrus cultivars, Banpeiyu and Hyuganatsu. Journal of the American Society for Horticultural Science. 140 (4): 339–345.

69. Lovatt, C. J.; Streeter, S. M.; Minter, T. C.; O'Conneln, N. V.; Flaherty, D. L.; Freeman, M. W.; Goodell, P. B. 1984. Phenology of flowering in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, cv. 'Washington' Navel orange. In: International Citrus Congress (5th., 1984, Sao Paulo, Brazil). Proceedings. s.n.t. pp. 186-190.

70. McClure, B. A.; Gray, J. E.; Anderson, M. A.; Clarke, A. E. 1990. Self-incompatibility in *Nicotiana alata* involves degradation of pollen rRNA. Nature. 347: 757-760.

71. Mahouachi, J.; Iglesias, D.; Agustí, M.; Talón, M. 2009. Delay of fruitlet abscission by branch girdling in citrus coincides with previous increases in carbohydrate and gibberellin concentrations. Plant Growth Regulator. 58 (1): 15-23.

72. Martínez-Fuentes, A.; Mesejo, C.; Juan, M.; Almela, V.; Agustí, M. 2004. Restrictions on the exogenous control of flowering in citrus. Acta Horticulturae. no. 632: 91-98.

73. Mataa, M.; Tominaga, S.; Kozaki, I. 1998. The effect of time of girdling on carbohydrate contents and fruiting in Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). Scientia Horticulturae. 73: 203–211.

74. Matton, D.; Nass, N.; Clarke, A.; Newbing, E. 1994. Self-incompatibility: how plants avoid illegitimate offspring. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American. 91 (6): 1992-1997.

75. Mehouachi, J.; Sernaa, D.; Zaragozaa, S.; Agustí, M.; Talón, M.; Primo-Millo, E. 1995. Defoliation increases fruit abscission and reduces carbohydrate levels in developing fruits and woody tissues of *Citrus unshiu*. Plant Science. 107 (2): 189-197.

76. Mesejo, C.; Martínez-Fuentes, A.; Reig, C.; Rivas, F. 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.

77. _____.; _____.; _____.; Agustí, M. 2007. The effective pollination period in ‘Clemenules’ mandarin, ‘Owari’ Satsuma mandarin and ‘Valencia’ sweet orange. Plant Science. 173: 223-230.

78. _____.; _____.; _____.;._____. 2008. Gibberellic acid impairs fertilization in Clementine mandarin under cross-pollination conditions. Plant Science. 175: 267–271.

79. _____.; Yuste, R.; Martínez-Fuentes, A.; Reig, C.; Iglesias, D. J.; Primo-Millo, E.; Agustí, M. 2013. Self-pollination and parthenocarpic ability in developing ovaries of self-incompatible Clementine mandarins (*Citrus reticulata*). Physiologia Plantarum. 148: 87-96.

80. MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias, UY). 2007. Encuesta citrícola "primavera 2006". Montevideo. 38 p.

81. _____._____. 2008. Encuesta citrícola "primavera 2007". Montevideo. 31 p.

82. _____._____. 2009. Encuesta citrícola "primavera 2008". Montevideo. 26 p.

83. _____._____. 2010. Encuesta citrícola "primavera 2009". Montevideo. 30 p.

84. _____._____. 2011. Encuesta citrícola "primavera 2010". Montevideo. 28 p.

85. _____._____. 2013. Encuesta citrícola "primavera 2012". Montevideo. 28 p.

86. _____._____. 2015. Encuesta citrícola "primavera 2014". Montevideo. 27 p.

87. _____. OPYPA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Oficina de Programación y Política Agropecuaria, UY). 2010. Anuario 2010. Montevideo. 444 p.

88. _____._____. 2012. Anuario 2012. Montevideo. 404 p.

89. _____._____. 2014. Anuario 2014. Montevideo. 650 p.

90. Murfett, J.; Atherton, T. L.; Mou, B.; Gasser, C. S.; McClure, B. A. 1994. S-RNase expressed in transgenic Nicotiana causes S-allele-specific pollen rejection. Nature. 367 (6463): 563-566.

91. Nadori, E. B. 2004. Nadorcott Mandarin: a promising new variety. In: International Citrus Congress (10th., 2004, Agadir, Morocco). Proceedings. Agadir, Morocco, International Society of Citriculture. v.1, pp. 356-359.

92. Nasrallah, J. B.; Stein, J. C.; Kandasamy, M. K.; Nasrallah, M. E. 1994. Signaling the arrest of pollen tube development in self-incompatible plants. Science. 266 (5190): 1505-1508.

93. Nicotra, A. 2001. Híbridos de mandarina de reciente interés para el consumo como fruta fresca; problemas y formas de control. In: FAO Simposio sobre los Cítricos (2001, Beijing.). Trabajos presentados. Beijing, FAO. pp. 13-24.

94. Otero, A.; Rivas, F. 2010. Producción de semillas y métodos de control en el tangor ‘Afourer’ en el litoral norte de Uruguay. In: Simposio Investigación y Desarrollo Tecnológico en Citrus (3°., 2010, Salto). Trabajos presentados. Montevideo, Facultad de Agronomía. pp. 96 - 99.

95. _____.; _____. 2015. Estrategias para la producción de frutos sin semillas en mandarina ‘Afourer’. (en línea). Montevideo, INIA. pp. 26-30 (Actividades de Difusión no. 752). Consultado 12 oct. 2015. Disponible en http://www.inia.uy/Publicaciones/Paginas/SAD-752.aspx

96. Pardo, J.; Bermejo, A.; Cano, A.; Zaragoza, S. 2007. La germinación del polen y la formación de las semillas en los cítricos. Levante Agrícola. 384 (1): 16-20.

97. Poehlman, J. M.; Sleper, D. A. 2003. Mejoramiento genético de las cosechas. 2ª. ed. México, Limusa. 511 p.

98. Pons, J.; Pastor, J.; Polls, M.; Reverter, A. 1996 Polinización cruzada en cítricos; III polinización entomófila. Efecto de repelentes. Levante Agrícola. 337: 291-295.

99. Powell, A.; Krezdorn, A. 1977. Influence of fruit-setting treatment on translocation of ^{14}C-metabolites in citrus during flowering and fruiting. Journal of the American Society for Horticultural Science. 102 (6): 709-714.

100. Pozo, L. 2001. Endogenous hormonal status in citrus flowers and fruitlets: relationship with postbloom fruit drop. Scientia Horticulturae. 91: 251-260.

101. Rey, F.; Gravina, A.; Gambetta, G.; Fasiolo, C.; Guimaraes, N. 2014. Alternativas para disminuir la presencia de semillas en mandarina 'Afourer'. In: Congreso Latinoamericano de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Citrus (1°., 2014, Salto, Uruguay). Trabajos presentados. Montevideo, Facultad de Agronomía. s.p.

102. Rivas, F.; Arbiza, H.; Gravina, A, 2004. Caracterización del comportamiento reproductivo de la mandarina ‘Nova’ en el sur del Uruguay. Agrociencia (Montevideo). 8 (2): 79-88.

103. _____.; Erner, Y.; Alós, E.; Juan, M.; Almela, V.; Agustí, M. 2006. Girdling increases carbohydrate availability and fruit-set in citrus cultivars irrespective of parthenocarpic ability. Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 81 (2): 289-295.

104. _____.; Gravina, A.; Agustí, M. 2007. Girdling effects on fruit set and quantum yield efficiency of PSII in two citrus cultivars. Tree Physiology. 27: 527-535.

105. _____.; Martínez-Fuentes, A.; Mesejo, C.; Reig, C.; Agustí, M. 2010. Efecto hormonal y nutricional del anillado en frutos de diferentes tipos de brotes de cítricos. Agrociencia (Montevideo). 14 (1): 8-14.

106. Ruan, Y. L. 1993. Fruit set, young fruit and leaf growth of *Citrus unshiu* in relation to assimilate supply. Scientia Horticulturae. 53: 99-107.

107. Ruiz, R.; García-Luis, C.; Monerri, C.; Guardiola, J. L. 2001. Carbohydrate availability in relation to fruitlet abscission in citrus. Annals of Botany. 87: 805-812.

108. Sagee, O.; Erner, Y. 1991. Gibberellins and abscisic acid contents during flowering and fruit set of 'Shamouti' orange. Scientia Horticulturae. 48: 29-39.

109. Sanz, A.; Monerri, C.; González-Ferrer, J.; Guardiola, J. L. 1987. Changes in carbohydrates and mineral elements in citrus leaves during flowering and fruit set. Physiologia Plantarum. 69: 93-98.

110. Saunt, J. 2000. Citrus varieties of the world, an illustrated guide. 2nd. ed. Norwich, Sinclair. 156 p.

111. Sozzi, G. O. 2007. Árboles frutales, ecofisiología, cultivo y aprovechamiento. Buenos Aires, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Agronomía. 848 p.

112. Spiegel-Roy, P.; Goldschmidt, E. 1996. Biology of citrus. Cambridge, Cambridge University Press. 230 p.

113. Talón, M.; Zacarías, L.; Primo-Millo, E. 1990. Hormonal changes associated with fruit set and development in mandarins differing in their parthenocarpic ability. Plant Physiology. 79: 400-406.

114. _____.; _____.; _____. 1992. Gibberellins and parthenocarpic ability in developing ovaries of seedless mandarins. Plant Physiology. 99: 1575-1581.

115. _____.; Tadeo, F. R.; Ben-Cheikh, W.; Gómez-Cadenas, A.; Mehouachi, J.; Pérez-Botella, J.; Primo-Millo, E. 1997a. Hormonal

regulation of fruit set and abscission in citrus; classical concepts and new evidence. Acta Horticulturae. no. 463: 209-217.

116. _____. 1997b. Regulación del cuajado del fruto en cítricos; evidencia y conceptos. Levante Agrícola. 338: 27-37.

117. _____.; Tadeo, F. R.; Juan, M.; Soler, J.; Agustí, M.; Primo-Millo, E. 2001. Mejora del cuajado del fruto de los cítricos mediante aplicaciones de ácido giberélico. Fruticultura Profesional. no. 116: 31-45.

118. Uruguay XXI (Instituto de Promoción de Inversiones y Exportaciones del Uruguay, UY). 2015. Producción y comercio exterior citrícola del Uruguay (en línea). Montevideo. pp. 15. Consultado 25 oct. 2015. Disponible en http://www.uruguayxxi.gub.uy/informacion/wp-content/uploads/sites/9/2015/09/Sector-C%C3%ADtricos-Setiembre-2015-Uruguay-XXI.pdf

119. USPTO (United States Patent and Trademark Office, US). 1998. Mandarin tangerine called Nadorcott. (en línea). Washington, D. C. s.p. Consultado may. 2015. Disponible en http://www.google.com/patents/USPP10480

120. Vardi, A.; Levin, I.; Carmi, N. 2008. Induction of seedlessness in citrus; from classical techniques to emerging biotechnological approaches. Journal of the American Society of Horticultural Science. 133 (1): 31-34.

121. Yahata, M.; Kunitake, H.; Yasuda, K.; Hirai, T.; Yabuya, T.; Yamashita, K.; Komatsu, H. 2011. Abnormality of gamete formation in a pummelo (*Citrus máxima* (Burm.) Merr.) haploid. Journal of the Japanese Society for Horticultural. 80 (1): 14-18.

122. Yamamoto, M.; Matsumoto, R.; Okudai, N.; Yamada, Y. 1997. Aborted anthers of citrus result from gene-cytoplasmic male sterility. Scientia Horticulturae. 70: 9-14.

123. Yuan, L.; Xu, D. 2001. Stimulation effect of gibberellic acid short term treatment on leaf photosynthesis to increase in rubisco content in bean and soybean. Photosynthesis Research. 68: 39-47.

124. Zacarías, L.; Talón, M.; Ben-Cheikh, W.; Lafuente, M.; Primo-Millo, E. 1995. Abscisic acid increases in non growing and paclobutrazol

treated fruit of seedless mandarins. Physiologia Plantarum. 95 (4): 613-619.

125. Zucconi, F.; Monselise, R.; Goren, R. 1978. Growth abscission relationships in developing orange fruit. Scientia Horticulturae. 9 (2): 137-149.

9. ANEXOS

Cuadro I. Evolución del cuajado (%) según tratamiento (Trat.).

Trat.	Días post plena floración						
	30	42	56	70	83	103	112
G	62,35 a	39,74 a	14,99 b	3,65 b	2,55 b	2,04 b	2,04 b
G+G	67,72 a	38,64 a	14,07 b	5,30 b	2,98 b	2,80 b	2,71 b
A	39,45 b	24,13 b	12,39 b	4,66 b	4,10 a	4,10 a	4,10 a
G+A	54,93 a	43,57 a	26,85 a	10,61 a	6,17 a	4,97 a	4,70 a
T	31,72 b	16,83 b	5,89 c	2,66 b	2,31 b	2,20 b	2,20 b

Medias seguidas de letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Cuadro II. Evolución del cuajado (%) en condiciones de polinización abierta.

Días post plena floración					
42	56	70	83	103	112
38,29	11,56	4,35	3,91	3,91	3,88

Cuadro III. Evolución del diámetro ecuatorial del fruto (mm) según tratamiento (Trat.) desde 83 hasta 155 días post plena floración.

Trat.	Días post plena floración					
	83	103	112	126	142	155
G	21,52 a	26,98 a	28,96 a	33,61 a	37,63 a	41,74 a
G+G	21,59 a	27,94 a	29,98 a	35,09 a	38,66 a	42,60 a
A	20,91 a	27,42 a	30,57 a	35,88 a	39,73 a	43,47 a
G+A	20,87 a	27,30 a	30,53 a	35,28 a	39,54 a	42,97 a
T	20,81 a	27,08 a	30,47 a	35,05 a	38,65 a	43,68 a

Medias seguidas de letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Cuadro IV. Evolución del diámetro ecuatorial del fruto (mm) según tratamiento (Trat.) desde 169 hasta 260 días post plena floración.

Trat.	Días post plena floración					
	169	188	202	219	232	260
G	45,97 a	51,30 a	55,22 a	56,11 a	57,98 a	61,53 a
G+G	47,45 a	51,01 a	54,29 a	56,41 a	58,50 a	61,49 a
A	47,39 a	52,35 a	55,69 a	57,63 a	58,65 a	61,55 a
G+A	49,05 a	52,75 a	55,74 a	58,17 a	60,60 a	61,99 a
T	48,35 a	52,46 a	56,01 a	57,46 a	58,95 a	62,21 a

Medias seguidas de letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Cuadro V. Evolución del diámetro ecuatorial del fruto (mm) en condiciones de polinización abierta.

Días post plena floración											
83	103	112	126	142	155	169	188	202	219	232	260
23,9	31,5	34,8	40,2	44,3	48,7	50,8	55,4	57,8	59,3	62,7	64,1

Cuadro VI. Porcentaje de frutos con semilla (% frt. con sem.), número de semillas por fruto (No. sem/ frt.), número de semillas por fruto con semilla (No. sem/ frt. con sem.) y número de semillas cada 100 frutos (No. sem. c/ 100 frt.), según tratamiento y en condiciones de polinización abierta.

Tratamiento	% frt. con sem.	No. sem/ frt.	No. sem/ frt. con sem.	No. sem c/ 100 frt.
G	6,9	0,21	3,09	21
G+G	5,6	0,41	7,22	41
A	4,3	0,20	4,67	20
G+A	7,5	0,42	5,56	42
T	2,1	0,19	9,00	19
PA	100,0	10,78	10,78	1078

Cuadro VII. Distribución del porcentaje de frutos con semilla en los rangos de: 1-3 (1-3 sem.), 4-6 (4-6 sem.) y más de 6 (> 6 sem.) semillas por fruto, según tratamiento y en condiciones de polinización abierta.

Tratamiento	**% Frutos con semilla**		
	1-3 sem.	4-6 sem.	> 6 sem.
G	4,38	1,88	0,63
G+G	1,25	1,25	3,13
A	2,14	1,43	0,71
G+A	2,50	1,67	3,33
T	0,71	0,00	1,43
PA	2,00	10,00	88,00