

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO DE LA  
MANDARINA  
'AFOURER' (*Citrus reticulata* Blanco) EN CONDICIONES  
PRODUCTIVAS DE URUGUAY**

**por**

**Yamandú POCHINTESTA**

**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. Ana Paula Mautone

Fecha: 2 de septiembre de 2016

Autor: -----  
Yamandú Pochintesta

## **AGRADECIMIENTOS**

A Fabi y a Cora, mi madre, por el apoyo durante este largo camino.

A Cristian, Sebastián y Cecilia por la ayuda en las polinizaciones, a Ximena por la ayuda en el laboratorio.

A Alfredo Gravina y a Giuliana Gambetta por darme la posibilidad de realizar este trabajo, por la paciencia y las correcciones.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Página</b>
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	V
1. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> .....	3
2.1. CULTIVAR ‘Afourer’.....	3
2.2. REPRODUCCIÓN EN CÍTRICOS.....	4
2.2.1. <u>Flor</u> .....	4
2.2.2. <u>Semilla</u> .....	6
2.2.3. <u>Fruto</u> .....	7
2.2.4. <u>Brotación</u> .....	8
2.2.5. <u>Floración</u> .....	9
2.2.6. <u>Polinización</u> .....	10
2.2.7. <u>Cuajado</u> .....	11
2.2.8. <u>Esterilidad y partenocarpia</u> .....	15
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	18
3.1 POLINIZACIÓN DE FLORES INDIVIDUALES.....	19
3.2 COBERTURA DE RAMAS COMPLETAS.....	22
3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	23
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u> .....	25
4.1. POLINIZACIÓN CRUZADA: CUAJADO Y PRESENCIA DE SEMILLAS A TRAVÉS DE LA POLINIZACIÓN DE FLORES INDIVIDUALES.....	25
4.1.1. <u>Germinación de polen <i>in vitro</i></u> .....	29
4.2. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PARTENOCÁRPICA.....	30
5. <u>CONCLUSIONES</u> .....	34
6. <u>RESUMEN</u> .....	35
7. <u>SUMMARY</u> .....	36
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	37

## LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

<b>Cuadro No.</b>	<b>Página</b>
1. Porcentaje de germinación <i>in vitro</i> de diferentes cultivares de citrus en distintas localidades de Uruguay .....	11
2. Cuajado final, frutos con semillas y número de semillas por fruto en condiciones de libre polinización y polinización con tangor ‘Ortanique’ y limón tipo ‘Lisbon’ .....	25
3. Porcentaje de frutos sin semillas y promedio de semillas por fruto en mandarina ‘Afourer’ en condiciones de polinización abierta y aislamiento bajo malla .....	31
<b>Figura No.</b>	
1. Representación esquemática de la flor de los cítricos .....	5
2. Sección transversal de un fruto de la mandarina ‘Afourer’ .....	7
3. Esquema de la distribución de variedades, destacando el cuadro de mandarina ‘Afourer’ utilizado para los experimentos .....	18
4. Estadio de las flores utilizadas en las polinizaciones y frutos post cuajado .....	20
5. Preparación y siembra de granos de polen para evaluar su germinación .....	22
6. Estructura de alambre y voile empleada para cubrir rama completa del experimento .....	23
7. Evolución del cuajado de frutos provenientes de flores en condiciones de libre polinización, polinizadas con polen de limón tipo ‘Lisbon’ y de tangor ‘Ortanique’ .....	26
8. Evolución diámetro ecuatorial (mm) para los tratamientos libre polinización, polinizadas con polen de limón tipo ‘Lisbon’ y de tangor ‘Ortanique’, según días desde plena floración .....	27
9. Relación entre tamaño del fruto (mm) y el número de semillas por fruto .....	28
10. Relación entre tamaño del fruto (mm) y el número de hojas por rama .....	28
11. Evolución del diámetro de frutos de mandarina ‘Afourer’ en	

condiciones de polinización abierta y bajo malla .....	32
12. Efecto de la presencia de semillas sobre el tamaño final de fruto de mandarina ‘Afourer’ .....	33

## 1. INTRODUCCIÓN

En Uruguay la producción de cítricos ocupa una superficie efectiva de 16.174 ha, de las cuales 8.130 son naranjas, 6.113 mandarinas y 1.771 de limones. El cultivo de pomelo ocupa un área marginal de 160 hectáreas que representa el 0,98% de la superficie cítrica. El área cítrica se concentra en dos zonas definidas, la zona norte con el 85% de la superficie plantada y concentrando la producción de naranjas y mandarinas tempranas (Salto, Paysandú y Río Negro); y la zona sur con el restante 15% del área predominando el cultivo de limón y algunas mandarinas de estación y tardías (San José, Canelones y Montevideo, MGAP. DIEA, 2014).

En Uruguay el cultivo de cítricos está fuertemente vinculado a la exportación en contraestación a mercados del hemisferio norte. Desde la década del 2000 la producción cítrica de Uruguay no ha crecido, sin embargo, se dio un importante cambio en la estructura varietal de las mandarinas. Estos cambios varietales en las mandarinas responden a factores comerciales y climáticos. Se plantan variedades más demandadas por los mercados y variedades de cosecha más temprana que escapan a las heladas invernales (Caputi y Montes, 2010).

A principios del año 2000 se comienza a plantar la nueva variedad de mandarina 'Afourer' (o 'Nadorcott'), primera variedad de mandarina patentada que es plantada en Uruguay. El sector pasa de tener una superficie de cultivo de la mandarina 'Afourer' de 62 ha en el 2006 a 300 ha en el 2012 (MGAP. DIEA, 2013). El aumento en el área plantada responde a las nuevas exigencias de los mercados internacionales (alta calidad interna, fácil pelado y bajo o nulo número de semillas). Esta variedad debe su éxito comercial a sus buenas cualidades internas y externas (sabor, color, apariencia, tamaño de fruto y ausencia de semillas), alta productividad (30 a 60 t.ha<sup>-1</sup>), y producción precoz (15 a 20 t.ha<sup>-1</sup> en el tercer año). La ausencia de semillas y su maduración tardía han sido los factores determinantes de su desarrollo en su país de origen (Marruecos) y de su alta plantación en los principales países productores de cítricos (Nadori, 2004)

En las condiciones productivas de Uruguay se ha registrado una productividad de 42 kg.planta<sup>-1</sup> (MGAP. DIEA, 2013). Sin embargo la calidad, dada principalmente por la ausencia de semillas en el fruto, se ve disminuida por una constante presencia de las mismas en los frutos. Según Gravina et al. (2011), a pesar de que la mandarina 'Afourer' ha sido registrada como una variedad sin semillas, en todas las situaciones productivas relevadas de Uruguay, la mayor parte de los frutos presenta semillas, lo que limita su precio y comercialización.

La ausencia de semillas es un rasgo deseado por los consumidores y la producción de cítricos de alta calidad con muy pocas o ninguna semillas es un requisito para el mercado de fruta para consumo en fresco (Vardi et al., 2008). Los frutos cítricos sin semillas pueden ser consecuencia de la esterilidad gamética femenina o masculina, la

autoincompatibilidad del polen, la esterilidad citológica y triploidía (Frost y Soost 1968, Soost y Cameron 1980, Barry 1995, Raza et al. 2003, Mesejo et al. 2006, 2007, Ye et al. 2009, Mesejo et al. 2013). Para obtener fruta sin semillas en cultivares fértiles, se debe impedir la polinización y fecundación de los óvulos y el ovario debe poder retomar el crecimiento para cuajar el fruto (Agustí, 2004).

Con el fin de alcanzar el objetivo de producir frutos sin semillas, conocer la fertilidad del polen y la capacidad de polinización entre las diferentes especies de cítricos y/o cultivares, es esencial para planificar la plantación apropiada en el campo. La polinización cruzada es un factor crítico para los cultivares de cítricos autoincompatibles, esto ha llegado a ser importante en la producción de mandarina, donde muchos cultivares autoincompatibles son capaces de producir un alto número de semillas cuando se produce polinización cruzada.

Este trabajo tiene como objetivo general caracterizar el comportamiento reproductivo de la mandarina 'Afourer' en las condiciones de producción comercial de la zona sur de Uruguay. Se plantea como objetivos específicos determinar la capacidad partenocárpica de la mandarina 'Afourer' y conocer la eficiencia polinizadora del polen de las variedades de limón tipo 'Lisbon' (*Citrus limon*) y tangor 'Ortanique' (*Citrus sinensis* L. Obs. x *C. reticulata* Bl.) presentes comúnmente en plantaciones comerciales del sur del país.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. EL CULTIVAR ‘Afourer’**

Según Nadori (2004) el cultivar ‘Afourer’ es un híbrido de mandarina ‘Murcott’ (*C. reticulata* Bl.) y una especie polinizadora desconocida, proveniente de un programa de selección nucelar donde se mantuvieron bajo estudio todos los embriones generados en el programa y no solo los nucleares (USPTO, 1998). El origen es incierto y no está claro si es un híbrido, una selección nucelar o una mutación espontánea de mandarina ‘Murcott’. Diferentes autores opinan que es un híbrido de tangor ‘Murcott’ x mandarina ‘Clementina’ (Saunt, 2000) o un híbrido de tangor ‘Murcott’ con polen parental desconocido (Nicotra, citado por Nadori, 2004).

La planta original se encuentra en la Estación Experimental de Afourer, del Instituto Nacional de Investigación Agronómica (INRA) en Marruecos. En un principio esta nueva variedad no fue de interés ya que sus frutos presentaban un gran número de semillas, pero en la primavera de 1988 se observó que los frutos fuera de estación (temporonas) no presentaban semillas. Un año después se cubrieron árboles con mallas para evitar el ingreso de abejas y la consecuente polinización cruzada con otras variedades y/o especies de cítricos. El resultado fue que ningún fruto proveniente de los árboles cubiertos presentó semillas demostrando la autoincompatibilidad de la nueva variedad. El anuncio del descubrimiento de esta nueva variedad a nivel internacional fue hecho en 1990, en la Exhibición Mundial de Frutas y Vegetales (MOFEL) en la ciudad de Nisa, Francia (Nadori, 2004).

Se establecieron tres plantaciones experimentales de ‘Afourer’ en diferentes regiones de Marruecos; solo se observaron semillas en aquellos lugares donde el cultivo se encontraba cerca de otras plantaciones de cítricos. En una de las plantaciones, cuya cercanía a otro cultivo de cítricos fue de un km de distancia, la variedad produjo frutos sin semilla de excelente calidad. Es una variedad autoincompatible y por consiguiente carece de semillas en ausencia de polinización cruzada, pero que presenta gran número de ellas cuando es polinizada con variedades compatibles (Nadori, 2004).

La palabra ‘Afourer’ fue registrada como marca para la comercialización de la fruta de mayor calidad, la nueva variedad se registró con el nombre de Nadorcott, una denominación que combina el nombre de su descubridor Nadori y Murcott. Según sus obtentores la variedad se comporta bien sobre numerosos portainjertos, entre los que incluyen: citrange Troyer, naranjo Amargo, citrumelo Sacaton, Volkameriana, lima Rangpur, mandarina Cleopatra entre otros; sin embargo la acidez y el contenido de azúcares son inaceptablemente bajos sobre limón rugoso. También observaron signos de incompatibilidad sobre citrumelo Swingle 4475.

El árbol es vigoroso, con un característico hábito de crecimiento erecto, sin espinas y muy productivo, similar al de mandarina ‘Murcott’. Nadorcott o ‘Afourer’ es

una variedad de maduración relativamente tardía (Marruecos: periodo de cosecha fines de diciembre a mediados de marzo). A este cultivar de mandarina también se lo conoce con el nombre de W. Murcott, y es comercializada bajo el nombre Delite. La fruta es firme, se mantiene bien en los árboles hasta el final de este periodo y tiene un prolongado periodo poscosecha a temperaturas entre 4 y 7 °C. El fruto es de tamaño mediano a pequeño, de color naranja rojizo, brillante, muy atractivo, y de forma aplastada. Se pela con facilidad, presentando un albedo de coloración característicamente rosada. La pulpa es de color naranja intenso con buen contenido de jugo y adecuado equilibrio entre azúcares y ácidos, lo que le confiere gran sabor. ‘Afourer’ es un cultivar que produce fruta sin semillas en condiciones de auto-polinización, presentando un promedio de 0,2 a 0,5 semillas por fruto (USPTO, 1998). Se ha observado que frutos que tienen sectores parcialmente verdes cuando se cosechan y los que son excesivamente cepillados en el packing pueden desarrollar manchas de color marrón (Nadori, 2004).

En Uruguay este cultivar es uno de los principales cultivares plantados entre los de reciente introducción. Dentro de las mandarinas, ‘Afourer’ representaba el 0,8 % del área en el 2006, para el año 2010 la superficie se incrementó hasta un 3,2 % (214 ha), alcanzando 300 ha en el año 2012 (MGAP. DIEA, 2011, 2013).

## **2.2. REPRODUCCIÓN EN CÍTRICOS**

### **2.2.1. Flor**

La flor de los cítricos es hermafrodita; tiene ambos órganos sexuales (femenino y masculino) en la misma flor. El cáliz está constituido por cinco sépalos ovales de color verde, dispuestos en círculo alrededor del receptáculo (Figura 1). La corola está formada por cinco pétalos blancos o rosados dispuestos sobre el receptáculo y alternándose entre sí, forman una cavidad globosa que envuelve el androceo y el gineceo (Tadeo et al., 2003). Entre los carpelos y los estambres se encuentra el disco nectarífero sobre el que se apoya el ovario (Agustí, 2003a).

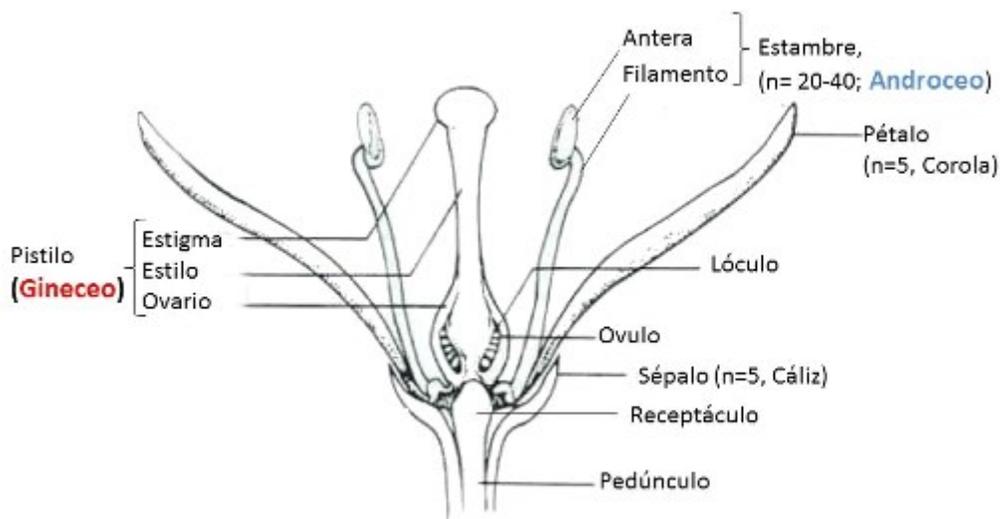


Figura 1. Representación esquemática de la flor de los cítricos (abierta). Fuente: adaptado de Krezdorn (1986).

El androceo está constituido por 20 a 40 estambres, dependiendo de la especie, formado cada uno por un filamento blanco y una antera tetralobular blanca o amarilla en función del estado de maduración del polen. Los estambres se ubican rodeando al gineceo (Agustí, 2003a). Cuando las anteras no contienen polen o éste es defectuoso, el color de las mismas es crema pálida o blanco y usualmente no abren. Cada mitad de la antera se abre por una hendidura longitudinal entre los lóbulos, la epidermis se deshidrata, la pared de la antera se pliega hacia el filamento, exponiendo el polen como un polvo amarillo y pegajoso (Frost y Soost, 1968).

Previo a la etapa de antesis, en las primeras etapas del desarrollo de la antera, comienza la microesporogénesis, que dará origen a los gametos masculinos. Dentro de la antera las células arqueospóricas se diferencian del resto y se dividen periclinalmente para producir las células parietales (capa externa) y las células esporógenas (capa interna). La capa más interna de células parietales forman el tapete y el resto forman la pared del saco polínico. Mientras el polen madura las células del tapete nutren a los granos de polen. Las células madres de las microsporas se dividen por meiosis y forman la tétrada de microsporas. Previo a la antesis de la antera, el núcleo del grano de polen se divide en un núcleo vegetativo y uno generativo que dará origen a los gametos masculinos. Cuando el polen está maduro colapsan los dos sacos polínicos de cada teca de la antera y su apertura se produce longitudinalmente entre ambas (Frost y Soost 1968, Spiegel-Roy y Goldschmidt 1996).

El gineceo, está formado por el ovario constituido por 8 a 14 carpelos, el estilo y el estigma (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996). Los carpelos se fusionan formando cavidades llamadas lóculos. En cada lóculo del ovario hay entre cuatro y cinco óvulos

dispuestos en dos hileras verticales, que podrán dar o no origen a las semillas (Jackson, 1997). El estigma y el estilo son las estructuras de la flor específicamente preparadas para la recepción y germinación del grano de polen, y la conducción del tubo polínico hasta los lóculos del ovario. El estilo se encuentra en la porción distal del ovario, presenta estructura cilíndrica, hueca, y contiene tantos canales estilares como lóculos posee el ovario. El estigma es de tipo húmedo, debido al exudado producido por las regiones glandulares del estigma y del estilo, que lo recubre durante el periodo en que es receptivo. Este exudado está compuesto por azúcares, lípidos y proteínas y el grano de polen lo utiliza para hidratarse y germinar y para mantener el crecimiento longitudinal del tubo polínico. El inicio y duración de la secreción de exudado depende de la especie de cítrico. En la antesis se secreta el mayor volumen de exudado. El periodo receptivo dependerá de la variedad y puede extenderse desde tres días antes de la antesis hasta 8 días después de esta (Tadeo et al., 2003).

Previo a la antesis comienza la megaesporogénesis para formar los gametos femeninos. Dicho proceso se inicia con la diferenciación de la célula arqueosporica del resto del tejido nucelar, la que se divide una sola vez. La célula exterior es la célula del tapete y la interior es la célula madre del saco embrionario de megásporas. Esta última se rodea de tejido cerca del centro del nucelo. En *Citrus*, ocasionalmente se puede formar más de una célula madre del saco embrionario de megásporas en el óvulo. La célula madre del saco embrionario de megásporas crece varias veces su tamaño y se divide por meiosis para formar cuatro células en hilera (megásporas) de las cuales sólo una se desarrolla para formar el saco embrionario. En la célula se forman grandes vacuolas y por división se forman ocho núcleos dos de los cuales denominados núcleos polares, migran al centro y forman la célula media. Tres de los núcleos se quedan en el polo chalazal y forman las células antipodales y los otros tres núcleos forman las células sinérgidas contra la micrópila y la oosfera por debajo de estas dos. En este momento el saco embrionario está pronto para la fecundación (Frost y Soost 1968, Jackson y Futch 1986, Spiegel-Roy y Goldschmidt 1996).

La flor de la variedad 'Afourer' presenta las características típicas de los cítricos con cuatro a cinco pétalos blancos, longitud y ancho del pétalo de 7 y 3,5 mm respectivamente, cuatro a cinco sépalos, longitud del pedicelo de 5- 6 mm y el ancho de la flor cerrada es de 7 a 11 mm (USPTO, 1998).

### **2.2.2. Semilla**

Tras la fecundación, a partir de una serie de cambios en el crecimiento y desarrollo del óvulo se forma la semilla. Está compuesta por la testa exterior que es dura, de color blanco-grisáceo o crema y recubierta por una capa mucilaginosa. Internamente está el tegmen, tegumento delgado de color rojo a marrón, en cuyo extremo se encuentra la chalaza. El tegmen contiene restos del endospermo y de la nucela y envuelve al embrión (Frost y Soost, 1968).

El cigoto se divide transversalmente en forma asimétrica, originando la célula apical, la cual después de sucesivas divisiones dará origen al embrión. La célula basal dará origen al suspensor, encargado de mantener la nutrición de la semilla, hasta el momento en que es sustituido por el endospermo y los cotiledones. La célula apical está próxima a la chalaza y la basal al micrópilo, lo que le confiere una capilaridad fundamental para el desarrollo del embrión (Matilla, 2008).

En los cítricos existen semillas monoembriónicas y poliembriónicas. Las primeras son las que contienen un único embrión de origen sexual, y las poliembriónicas son las que contienen un embrión de origen sexual y uno o varios embriones nucelares. En varios cultivares de cítricos la formación de múltiples embriones es común. El estímulo de la actividad del tubo polínico y de los reguladores del crecimiento es necesario para promover el desarrollo de embriones nucelares (Frost y Soost 1968, Jackson 1997). Tadeo et al. (2003) afirman que los embriones nucelares pueden formarse tanto en óvulos no fertilizados, contengan o no saco embrionario, como en los fertilizados. Los embriones en desarrollo reemplazan gradualmente al endospermo, quien es más tarde digerido por los cotiledones. Los cotiledones son de color blanco, crema o verdes y constituyen la mayor parte de la semilla madura (Jackson, 1997).

### 2.2.3. Fruto

El fruto de los cítricos es una baya modificada denominada hesperidio. Se forma debido al crecimiento del ovario y está constituido por aproximadamente 10 unidades carpelares unidas alrededor del eje floral, formando lóculos donde se encuentran las semillas y las vesículas de jugo (Figura 2).

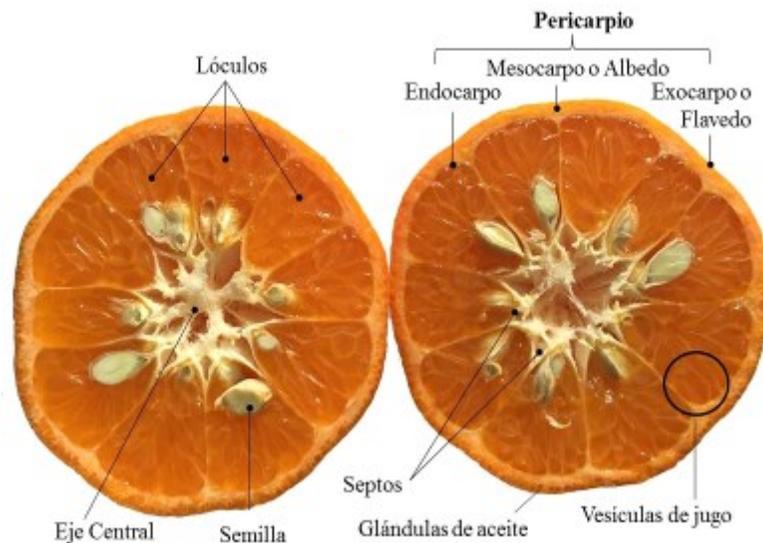


Figura 2. Sección transversal de un fruto de la mandarina ‘Afourer’ (adaptado de Agustí, 2003a).

La parte exterior a los lóculos se conoce como pericarpio y se puede dividir en tres partes. El exocarpo o flavedo, es la región más externa del fruto, está formada por células epidérmicas de color verde cuando el fruto se encuentra en fases inmaduras y naranja o amarillo (según la especie), en la madurez. El endocarpo o pulpa, es la región más interna y constituye parte de la membrana locular. Entre ambas capas se encuentra el mesocarpo o albedo, formado por un tejido parenquimático blanco de aspecto esponjoso; junto al exocarpo, constituyen la corteza del fruto. Los septos son la pared fusionada de carpelos adyacentes, formados por tejido similar al del mesocarpo. Los lóculos contienen las vesículas de jugo, formadas por un cuerpo de células completamente vacuolizadas y un pedúnculo que las mantiene unidas a la epidermis dorsal de los carpelos y limitadas lateralmente por los septos. Dentro de éstos lóculos se encuentran las semillas (Agustí, 2003a).

La mandarina 'Afourer' alcanza la madurez entre los meses de julio y agosto. El peso promedio de los frutos es de 83-93 g, la forma no es perfectamente redonda con el diámetro medio de 60-68mm, altura promedio de 46-49 mm (parámetros dependientes de las condiciones de cultivo). La superficie de la corteza es suave; color naranja intenso, corteza delgada (promedio de 2,8 mm) y la adherencia es media siendo fácil de pelar. Presenta de 8 a 13 segmentos que se separan fácilmente. La pulpa es de color naranja intenso, vesículas globosas a ovoide de tamaño medio a grande. Es una fruta muy jugosa, jugo de color anaranjado, aroma fuerte y atractivo y un excelente sabor. En condiciones de auto-polinización (aislada), los frutos no tienen semillas (promedio de 0,2 a 0,5 semillas/fruto, USPTO, 1998).

#### **2.2.4. Brotación**

En las condiciones climáticas de Uruguay, los cítricos presentan tres etapas de crecimiento o brotaciones al año bien definidas: primavera, verano y otoño, siendo la más importante la de primavera ya que en ella se define la producción (Gravina, 1999). Las características e intensidad de las brotaciones están determinadas por factores endógenos y exógenos. Entre los exógenos se encuentran las condiciones ambientales (cantidad de luz, agua, y temperatura) y el manejo del cultivo (cantidad y época de cosecha). Los factores exógenos operan a través de su influencia sobre el balance hormonal y sobre la movilización de reservas en el árbol. Las condiciones ambientales son responsables de la época de brotación y en gran medida de la intensidad y distribución de la floración (Agustí, 2003a).

No existen requerimientos de frío para que las yemas broten y podrían hacerlo en cualquier época del año siempre que la temperatura del suelo supere los 12°C, con independencia de la temperatura del aire. Pero las condiciones de día largo reducen el periodo entre las brotaciones, cuya frecuencia e intensidad están reguladas endógenamente. La temperatura del suelo influye sobre el número de nuevos brotes y la temperatura ambiental diurna sobre su longitud (Agustí, 2003a).

La brotación de primavera es la que desarrolla las flores en la mayoría de las especies, (excepción del limonero). Esta brotación de primavera se origina mayoritariamente sobre ramas desarrolladas el año anterior y ocasionalmente existe desarrollo de yemas adventicias de mayor edad. La madera del otoño anterior es la que brota más precozmente, da más cantidad de brotes y produce los brotes más largos. Cada nudo, cuando brota, puede desarrollar más de un brote en la que son visibles varias yemas (Agustí, 2003a). Los cítricos florecen más intensamente en brotes de 6 meses de edad, siendo fundamental promover una buena brotación de otoño para no limitar la floración en la primavera siguiente. La intensidad de brotación, se encuentra correlacionada con el crecimiento radicular, la humedad y temperatura de suelo que favorezcan el crecimiento radicular, incrementan la intensidad de brotación (Rivas et al., 2009).

### **2.2.5. Floración**

La producción de frutos cítricos requiere de una secuencia de procesos que comienza con la floración. Las condiciones ambientales no solo determinan la época de brotación sino que también son determinantes de la intensidad y distribución de la floración. Gravina et al. (2012) clasifican según su morfología (número de hojas y flores) a los brotes de cítricos en cinco tipos: brotes que sólo tienen hojas - brotes vegetativos, brotes con flores y hojas - mixtos uniflorales, mixtos multiflorales, inflorescencias sin hojas - ramos de flor; y brotes uniflorales sin hojas - flores solitarias.

La distribución de las flores en los tipos de brotes es idéntica para todas las especies y variedades diferenciándose cuantitativamente. En naranja dulce, pomelo y limonero predominan los brotes mixtos mientras que en las mandarinas Clementina e híbridos las flores simples. El número de flores y hojas de los brotes depende del número de primordios presentes en la yema y la abscisión o falta de desarrollo de algunos órganos, fundamentalmente hojas. Como consecuencia de esto, con el tiempo se puede producir la transformación de unos tipos de brotes en otros (Agustí, 2003a).

La floración se puede dividir en varias etapas, inducción floral, diferenciación (pasaje de yema vegetativa a reproductiva), la maduración de los órganos de la flor y la antesis. Todas las etapas del proceso de floración son controladas tanto por factores endógenos (hormonas promotoras/inhedoras) como exógenos (temperatura, humedad relativa, luz, intercambio gaseoso), con diferentes características dependiendo de la especie (Martínez-Fuentes et al., 2004).

En los cítricos, el proceso de inducción floral es el mecanismo de activación o desrepresión de cada yema, ya que todas las yemas son biológicamente reproductivas y requieren de ciertos estímulos bioquímicos para superar sucesivas inhibiciones y expresar su capacidad reproductiva. En la inducción las células madre en los meristemos apicales de los brotes responsables de la organización y desarrollo de estructuras

vegetativas pasan a la producción y desarrollo de los órganos reproductivos, lo que se produce normalmente durante el periodo invernal (Gravina 1999, Gravina et al. 2012).

Entre los factores exógenos que regulan la inducción floral, la baja temperatura y el estrés hídrico que ocurren entre tres y cinco meses antes de la floración, han sido descritos como los promotores de la inducción (Agustí 2003a, Gravina et al. 2012). Temperaturas por debajo de 15°C son promotoras de la inducción floral, encontrándose una correlación positiva entre la duración del periodo de frío y el número de flores formadas (Gravina, 1999). La carga de fruta inhibe la floración reprimiendo la expresión de los genes de inducción (*CiFT* y *SOC1*). La aplicación de GA<sub>3</sub> o el inhibidor de la síntesis de giberelinas (paclobutrazol) en el periodo de inducción floral, disminuye o aumenta significativamente la expresión del gen, y el número de flores diferenciadas por brote (Muñoz-Fambuena et al., 2012). En condiciones de alta intensidad de floración predominan brotes uniflorales sin hojas y multibrotes como se ha observado en variedades autofecundas con comportamiento alternante (Gambetta et al., 2008). En años de baja carga de frutos, en los árboles se produce el efecto inverso con un aumento de la floración, asociada con cambios en la distribución de la brotación en la primavera siguiente.

En la etapa de diferenciación de la yema floral se producen una serie de cambios morfológicos en la anatomía del meristemo vegetativo, que consiste en el ensanchamiento y alisamiento de su porción apical, que conduce al desarrollo de los distintos órganos de flor. La formación de los órganos florales se da en forma acrópeta, primero se forman los verticilos externos, sépalos y pétalos y luego los estambres y los carpelos (Lord y Eckard, 1985).

La última etapa de la floración es la antesis, donde los pétalos se abren para que sea posible la polinización y fertilización, momento que marca el inicio de la fructificación. La antesis, que comienza con la apertura de pétalos es una respuesta de crecimiento que está regulada por auxinas. Al momento de apertura de la flor se produce la apertura de las anteras (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996).

#### **2.2.6. Polinización**

La polinización es la transferencia de granos de polen de la antera al estigma. Esta transferencia puede darse por contacto directo entre las anteras y el estigma, por viento (anemófila) o por insectos polinizadores (entomófila). El polen de los cítricos es pesado y viscoso, y las flores son muy atractivas para los insectos (corola conspicua, fuerte perfume, polen y néctar abundante) por lo que la polinización es principalmente entomófila, siendo la abeja (*Apis mellifera*, L) el principal polinizador (Gravina, 2014).

Cuando el polen se transfiere al estigma de la misma flor, o al estigma de flores de la misma planta o flores de diferentes plantas pero del mismo genotipo (o clon de la variedad) se denomina autopolinización (Frost y Soost, 1968). La existencia de flores

hermafroditas en que los gametos femeninos y masculinos maduran en forma conjunta, promueve la autogamia (Azcón-Bieto y Talón, 2008). La autopolinización puede producirse por medio de insectos polinizadores o por contacto directo de las anteras con el estigma donde las anteras se rompen o alcanzan la dehiscencia antes de la antesis, proceso de polinización denominado cleistogamia (Tadeo et al., 2003).

Cuando el polen es transportado al estigma de una flor de otra variedad o especie, se denomina polinización cruzada (Frost y Soost, 1968). En el caso de variedades autoincompatibles o con polen estéril y a su vez con baja capacidad partenocárpica, la presencia de otras fuentes de polen y abejas es esencial para la producción de frutas (Tadeo et al., 2003). La polinización cruzada entre variedades puede influenciar fuertemente el número de semillas en los frutos cítricos (Frost y Soost, 1968). Según Vithanage (1991), es posible encontrar un polinizador que aumente el cuajado y el tamaño de los frutos, sin que ocurra un aumento en el número de semillas, incluso en diferentes condiciones de crecimiento y años. El principal inconveniente que presenta la polinización cruzada en la producción cítrica es el aumento del número de semillas por fruto, lo cual disminuye la calidad y su aceptación en los mercados para consumo de fruta fresca. En términos productivos la semilla no es una mala calidad ya que favorece el aumento del tamaño de los frutos (Krezdorn 1967, Vithanage 1991).

La polinización puede ser afectada por factores hormonales y nutricionales, así como ambientales como la humedad relativa y la temperatura. La temperatura puede afectar la actividad de las abejas, la germinación del polen, el crecimiento del tubo polínico y la longevidad del óvulo (Gravina, 2014). La germinación del grano de polen y crecimiento del tubo polínico es altamente dependiente de la temperatura, favorecidos a 25-30 °C e inhibidos a temperaturas menores a 20 °C. Dentro del género *Citrus* las diferentes especies y variedades, presentan capacidad germinativa altamente variable *in vitro* (Cuadro 1). A su vez la viabilidad del polen está muy relacionada con la temperatura que predomina durante los estadios 55 y 56 (escala BBCH) registrada durante el periodo de floración (Agustí et al., 1995). La humedad relativa baja afecta la fecundación en algunas especies al disminuir la retención del polen en el estigma; mientras que valores mayores a 90% puede dificultar la dehiscencia de las anteras o reducir la fijación del polen en el estigma.

Cuadro 1. Porcentaje de germinación *in vitro* de diferentes cultivares de citrus en distintas localidades de Uruguay.

Cultivar	Departamento	% Germinación <i>in vitro</i>
Limón Lisbon	Montevideo	43
Limón Ana Claudia	Paysandú	2
Mandarina Afourer	Paysandú	25
Mandarina Afourer	Montevideo	39
Mandarina – Montenegrina	San José	40

Mandarina – Tango	Salto	0
Naranja Valencia	Paysandú	2
Tangor Ortanique	Montevideo	54

Fuente: Gravina (2014)

En el momento de la antesis el estigma es receptivo al polen maduro. Una vez en el estigma, se hidrata con secreciones estigmáticas y germina emitiendo el tubo polínico, que penetra en el estigma, desciende por el estilo hasta llegar a los lóculos del ovario y penetra vía micrópilo en el saco embrionario del óvulo. En el saco embrionario se produce la fecundación, un anterozoide (n) se fusiona con la oósfera (n) formando el cigoto (2n). El otro anterozoide se fusiona con los núcleos polares (2n) formando el endosperma (3n). El endosperma es importante para el desarrollo del embrión, este acumula almidón durante el crecimiento (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996).

La fecundación de la oosfera ocurre dos o tres días después de la polinización bajo condiciones favorables. Williams, citado por Gravina (2014) definió como periodo de polinización efectivo (PPE) a la diferencia entre la longevidad de los óvulos y el tiempo entre la polinización y la fecundación. Por lo tanto es el periodo en el cual la flor es capaz de cuajar un fruto en condiciones no limitantes de polinización. La receptividad del estigma, cinética del tubo polínico y el desarrollo de los óvulos son factores que determinan el éxito de la fertilización en los pocos días siguientes a la antesis (Mesejo et al., 2007). La receptividad de la flor de cítricos es dependiente de la especie y puede estar limitada por la longevidad del óvulo, como pasa en mandarina Satsuma cv. 'Owari', o por la receptividad estigmática, como en la mandarina Clementina cv. 'Clemenules' y en naranja dulce 'Valencia'. Estas características de cada especie - crecimiento del tubo polínico, periodo de la receptividad de la flor, vida del óvulo - deben tenerse en cuenta para mejorar el manejo agronómico de los montes y evitar la producción de semillas en los frutos (Mesejo et al., 2007).

### **2.2.7. Cuajado**

El porcentaje de frutos cuajados puede definirse en sentido amplio como el periodo de crecimiento durante el cual el fruto puede sufrir abscisión. Su definición en sentido estricto, es la reiniciación rápida del crecimiento de los tejidos del ovario de la flor que se había detenido durante la antesis, proceso que dará el fruto (Talón, 1997). El reinicio del crecimiento puede ser consecuencia de la polinización y fecundación o sólo de la polinización que actúa como estímulo sobre el ovario generándose frutos partenocárpico (Gravina, 1999).

El cuajado está determinado por el proceso de abscisión. La dinámica de caída de estructuras reproductivas ocurre en diferentes etapas observándose un primer periodo de abscisión entre pre-antesis y caída de pétalos, una segunda caída luego del inicio de cuajado de frutos y una tercera caída al final de la fase de división celular, denominada caída fisiológica.

El cuajado de los frutos cítricos es regulado por diferentes factores endógenos (hormonales y nutricionales) como exógenos (factores climáticos y de manejo), los cuales pueden incidir en forma positiva o negativa sobre el desarrollo del fruto (Agustí et al., 2003b).

Entre los factores endógenos reguladores del cuajado de los frutos cítricos, el balance hormonal entre giberelinas, ácido abscísico, auxinas y citoquininas es relevante. Las giberelinas actúan aumentando la capacidad de fosa de los frutos recién cuajados, mejorando así su nutrición mineral y de carbohidratos. El ácido abscísico actúa principalmente en condiciones de estrés hídrico, estimulando la abscisión de los frutos a través de la síntesis de enzimas hidrolíticas e indirectamente a través de la inducción de la síntesis de etileno (Talón, 1997). Las auxinas, en las primeras etapas del fruto, promueven la abscisión estimulando la síntesis de etileno y luego estimulan el crecimiento del fruto (Iglesias et al., 2007).

A su vez, el cuajado está relacionado con la competencia por carbohidratos, ya que los cítricos producen en general un número de flores muy alto, la mayor parte de las cuales no llegan a fructificar. En condiciones de altas concentraciones de giberelinas en los frutos dado por una alta capacidad de fosa, si esta demanda de carbohidratos no es satisfecha, los frutos caen dado que se desencadena un proceso de autorregulación de la carga por parte de la planta (Goldschmidt y Monselise 1977, Talón 1997, Gravina 1999, Iglesias et al. 2007).

La presencia de giberelinas depende de factores genéticos, en variedades o especies que presentan semillas, el estímulo de iniciar el desarrollo del fruto necesita de la polinización y fertilización. Si la flor no es polinizada, el desarrollo del gineceo se detiene, toda la flor senesce y cae (Iglesias et al., 2007), dado que las semillas son responsables de sintetizar giberelinas. En variedades que no producen semillas las paredes del ovario (que posteriormente darán lugar a la corteza del fruto) que se encuentran en activa división celular, son la principal fuente de giberelinas (Monselise, 1977).

Existen diferencias en el cuajado de los frutos, según el tipo de brote donde se formen, existiendo una correlación positiva entre el peso del ovario y el peso de las flores completas, siendo mayor en inflorescencias con hojas que en inflorescencias sin hojas, independiente del número de flores por árbol (Guardiola et al., 1984). Los frutos que se desarrollan en brotes con hojas presentan una mayor capacidad de cuajado, mayor tasa de crecimiento inicial y logran un mayor tamaño final y con mayor poder de fosa, que los solitarios o ubicados en inflorescencias sin hojas (Moss et al. 1972, Hofman 1990). La presencia de hojas en el brote se muestra como un factor importante en el cuajado, debido a su capacidad para sintetizar y exportar metabolitos al fruto en desarrollo. Otro factor asociado al mayor cuajado de estas flores es la presencia de un área vascular mayor que las inflorescencias sin hojas. Esto estaría asociado a una mayor capacidad de transporte de agua en las inflorescencias con hojas (Agustí y Almela, citados por da Cunha Barros y Gravina, 2006).

En las condiciones productivas de Uruguay se caracterizó el cuajado y el tamaño final del fruto según el tipo de brote en que se desarrolla y se determinó como afecta la relación hojas/flores del brote, al cuajado y crecimiento del fruto para el tangor 'Ortanique'. Los brotes con hojas presentaron un porcentaje de cuajado significativamente mayor al de los brotes sin hojas. Considerando cada tipo de brote, los terminales alcanzaron el 39,2%, seguido por los mixtos (16,8%), solitarios (9,9%) e inflorescencias (7,2%). En conjunto, los frutos ubicados en brotes con hojas, uni o multiflorales alcanzaron un tamaño final mayor que los ubicados en brotes sin hojas, presentando un diámetro de pedúnculo significativamente superior. Durante la primera fase, cuando se determina el número de frutos que permanecerá en la planta, la presencia de hojas limita la abscisión e incrementa el cuajado final. En la segunda fase, el crecimiento y tamaño final de los frutos en los brotes mixtos y terminales, supera al de los que se desarrollan sin fuente cercana, lo que se traduce en calibres de mayor valor comercial. También demuestra la capacidad fosa ligada al número de frutos en desarrollo de los brotes multiflorales (da Cunha Barros y Gravina, 2006)

Los principales factores reguladores exógenos que condicionan y modifican la capacidad natural de cuajado de las variedades de Citrus, son las altas temperaturas en el periodo de antesis y post-antesis (Talón et al., 1999), o el stress hídrico (Bower, citado por da Cunha Barros y Gravina, 2006), que actúan como promotores de la abscisión. La humedad relativa baja, acompañada de altas temperaturas promueve la caída de frutos en desarrollo, efecto que se acentúa si la planta no logra rehidratarse en el corto plazo (Agustí, 2003a).

El crecimiento y desarrollo de los frutos cítricos presenta tres fases bien definidas y está representado por una curva sigmoidea típica. La fase I de crecimiento (desde la antesis hasta el final de la caída fisiológica) se caracteriza por un rápido crecimiento debido al aumento en el número de células, provocado por la división celular, básicamente en la corteza del fruto. En este momento queda definido el tamaño potencial del mismo. La fase II, es de crecimiento rápido y es de expansión de los tejidos del fruto debido a la elongación celular (abarca desde el fin de caída fisiológica hasta poco antes del inicio de cambio de color). Se desarrollan los lóculos, las vesículas de jugo alcanzan su máxima longitud y volumen y el contenido de jugo de sus células aumenta. En la fase III el crecimiento se detiene para dar lugar a la maduración de los frutos; el cambio de color de la corteza como consecuencia de la degradación enzimática de las clorofilas del flavedo y la síntesis de carotenoides. A su vez aumentan los sólidos solubles, principalmente azúcares y disminuyen los compuestos nitrogenados y los ácidos libres (Agustí et al., 2003b).

El crecimiento y tamaño del fruto es el resultado de las propiedades genéticas y de su capacidad para acumular metabolitos y puede ser limitado por una baja fuerza de fosa o por la baja disponibilidad de carbohidratos. La fuerza de fosa está definida por factores exógenos (temperatura, nutrición mineral y disponibilidad de agua), y factores endógenos (tipo de brote en que crece y la competencia con otros frutos y brotes en

desarrollo, Gravina, 1999). El tamaño final que alcanza un fruto tiene una relación inversa con el número de frutos (Goldschmidt y Monselise, 1977) y con el número de flores (Guardiola, 1997). La floración afecta el tamaño de frutos, debido al tamaño del ovario alcanzado (alto número de flores genera flores con ovarios chicos) y la competencia por metabolitos en etapas tempranas de desarrollo. A su vez diferentes estudios han demostrado la correlación significativa que existe entre el tamaño del fruto y el número de semillas (Frost y Soost 1968, Chao 2005b).

### **2.2.8. Esterilidad y partenocarpia**

Durante el período de floración, con la presencia de abejas, los ovarios son polinizados con polen fértil y fecundados, lo que conduce a la formación de semillas en especies autocompatibles. Este es en general un requisito previo para el cuajado y crecimiento normal del fruto en muchas especies. Sin embargo, algunas variedades son capaces de producir frutos normales sin la formación de semillas (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996). La falta de semillas en los frutos puede ser causada por muchos factores endógenos como la esterilidad femenina o masculina (Frost y Soost, 1968), la esterilidad homogenética, autoincompatibilidad (Ye et al. 2009, Gambetta et al. 2013, Mesejo et al. 2013), la triploidía (Soost y Cameron, 1980). También se puede lograr esterilidad mediante la aplicación de reguladores de crecimiento o la aplicación de metales pesados (Mesejo et al. 2006, 2008, Gambetta et al. 2013).

La esterilidad gamética, incapacidad reproductiva mediante gametos debido a la producción de óvulos o polen estéril, puede ser relativa o absoluta. Dentro de los casos de esterilidad relativa se encuentran los debidos a autoincompatibilidad gamética donde no se forman embriones por autopolinización a pesar de que los gametos son viables y los de incompatibilidad cruzada donde ciertos cruzamientos son incapaces de producir embriones (Gravina, 2014).

En flores con esterilidad homogenética, el polen y óvulos son fértiles, pero mecanismos de incompatibilidad sexual (polen-pistilo) hacen que no ocurra la fertilización. Cuando esta incompatibilidad ocurre entre flores de la misma planta o entre plantas con el mismo genotipo se conoce como autoincompatibilidad. Si ocurre entre plantas de diferente genotipo se conoce como incompatibilidad cruzada. La esterilidad homogenética puede ser esporofítica o gametofítica. En la autoincompatibilidad esporofítica, el grano de polen no germina en el estigma mientras que si lo hace en el gametofítico. El crecimiento del tubo polínico está controlado genéticamente por una serie de alelos. El núcleo haploide del polen posee un alelo de incompatibilidad mientras que el estilo diploide posee dos alelos, si el alelo que llega en el polen es idéntico a uno de los del estilo se retrasa o no ocurre la fecundación. El estilo sintetiza enzimas que penetran en el tubo polínico, descomponen el ARN y detienen su crecimiento (McClure et al., 1990). En condiciones de producción de Uruguay, se determinó la autoincompatibilidad del tanger 'Ortanique' y la mandarina 'Afourer'. En 'Afourer' el

grano de polen germina en el estigma, crece hasta un 50% de la longitud total pero no llega hasta el óvulo (Gambetta et al., 2013).

El desarrollo del ovario, por lo tanto la producción de frutos sin semillas sin que ocurra fecundación, se denomina partenocarpia (Vardi et al., 2000). La partenocarpia es muy común en muchas especies y variedades del género *Citrus*. Hay dos tipos de partenocarpia: autónoma y estimulativa. Cuando no se requiere de un estímulo externo para que se desarrolle el ovario luego de la antesis y producir así la fruta, se denomina partenocarpia estimulativa. Este tipo en general lo presentan especies que tienen esterilidad homocigótica. Por otro lado el desarrollo del ovario sin ningún estímulo externo es conocido como partenocarpia autónoma. Factores ambientales pueden inducir el desarrollo del fruto afectando directa o indirectamente la polinización, receptividad del estigma, desarrollo del tubo polínico o del óvulo. Sin embargo la causa principal es la esterilidad genética (gamética, citológica o homocigótica).

La estenospermocarpia, es cuando se desarrollan frutos y las semillas están parcialmente formadas. El aborto de los embriones luego de la fecundación del óvulo se debe a que se produce una meiosis anormal en plantas triploides o debido a defectos en el desarrollo del endospermo (Vardi et al., 2008). En frutos estenospermocárpicos, la polinización y la fertilización ocurre, pero tanto la cubierta de la semilla como el endospermo cesan su desarrollo normal en las primeras etapas, y se observa una variación cuantitativa y cualitativa en el grado de desarrollo de la semilla

A su vez las variedades se las puede clasificar en partenocarpia obligada (variedades que producen siempre frutos sin semillas) y partenocarpia facultativa (producen frutos sin semillas solamente en ausencia de polinización cruzada). La partenocarpia obligada se observa en especies que presentan esterilidad femenina, los frutos de estas variedades no contienen semillas independientemente de que se evite o no la polinización. Habitualmente, la esterilidad femenina va acompañada de esterilidad masculina por lo que además de no formar semillas ni por autopolinización ni por polinización cruzada tampoco pueden polinizar a otras variedades. La partenocarpia facultativa se observa en especies que son autoincompatibles o tienen esterilidad masculina. Esto implica que la ausencia de semillas depende de que se evite la polinización cruzada con otras variedades que aporten polen fértil y sean compatibles (Montalt et al., 2009).

La partenocarpia en citrus tiene una base genética y se asocia a los niveles de las hormonas que promueven el crecimiento del fruto (Vardi et al., 2008). Después de la fertilización se desencadena un proceso de señales que incluyen la formación de las semillas. Éstas tiene una función reproductiva y a su vez actúa como fuente y reserva de hormonas necesarias para el desarrollo del fruto (Raghavan, 2003). Las hormonas implicadas en el proceso son las giberelinas, las citoquininas y las auxinas (Nitsch 1970, Fos et al. 2000, 2001).

La partenocarpia combinada con diferentes tipos de esterilidad, es la forma más eficiente de producir frutos cítricos sin semillas (Khan, 2007). Uno de los aspectos centrales a controlar en la producción de frutos sin semillas, es la polinización cruzada en aquellos cultivares autoincompatibles que generan gametos viables. La mandarina 'Afourer' produce muchas semillas si hay una fuente de polen compatible cercana. En condiciones de campo se ha demostrado la alta capacidad de formación de semillas que tiene la mandarina 'Afourer' a través de polinizaciones artificiales con polen de Clementinas e híbridos como 'Fortune', 'Nova' y 'Ortanique' (Bono et al., 2000). En variedades partenocárpicas de cítricos, la polinización por otros cultivares es fundamentalmente entomófila, realizada principalmente por las abejas. La distancia a la que puede encontrarse polen de variedades donadoras transportado por abejas es de hasta 500 y 960m para polen de 'Clementina Nules' y 'Afourer' respectivamente en las condiciones del estudio (Chao, 2005b). Esto plantea a nivel productivo la dificultad de aislar a los cultivares partenocárpicas facultativos de la polinización cruzada como es el caso de la mandarina 'Afourer'.

La mandarina 'Afourer' bajo condiciones de aislamiento produce casi todos los frutos sin semillas, ya que es muy sensible a la polinización cruzada (Saunt 2000, Agustí et al. 2005, Chao 2005b). Por lo tanto conocer la fertilidad del polen y la capacidad de ser polinizada por polen de otras especies es esencial para asegurar la disposición en el campo respecto a otras variedades/especies. La polinización cruzada es un factor crítico que debería ser tenido en cuenta en la planificación de nuevas plantaciones de esta mandarina para producción de frutos para consumo en fresco de alta calidad en Uruguay. Por lo tanto, la comprensión de cómo reducir la presencia de semillas es de gran importancia para la producción citrícola, de esta forma se debe conocer el mecanismo de reproducción de los nuevos materiales introducidos en el país así como conocer su comportamiento a campo.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de campo se llevó a cabo en el establecimiento de producción cítrica perteneciente a la empresa Browni S.A. El establecimiento está localizado en la zona de Rincón del Pino en el departamento de San José (35° LS), Uruguay.

Se seleccionó un cuadro de mandarina ‘Afourer’ (*Citrus reticulata* Blanco) plantado en el 2003, injertada sobre el portainjerto ‘Trifolia’ (*Poncirus trifoliata* L.Raf.) con riego localizado y un marco de plantación de 5,11 x 3 metros. Dentro del cuadro se seleccionó un sector de plantas homogéneas, ubicado en la esquina noroeste de aproximadamente un cuarto de hectárea, que tuvo un manejo distinto al resto de la plantación de esta variedad. Este manejo diferencial fue la ausencia de aplicación de productos fitosanitarios con cobre y de raleadores químicos durante el periodo comprendido entre floración y cuajado. Rodeando al sector seleccionado, hay plantaciones de limoneros y de mandarinos ‘Ortanique’ que son fuente de polen para la mandarina ‘Afourer’ (Figura 3). De allí se extrajo el polen para realizar las polinizaciones artificiales de las flores.

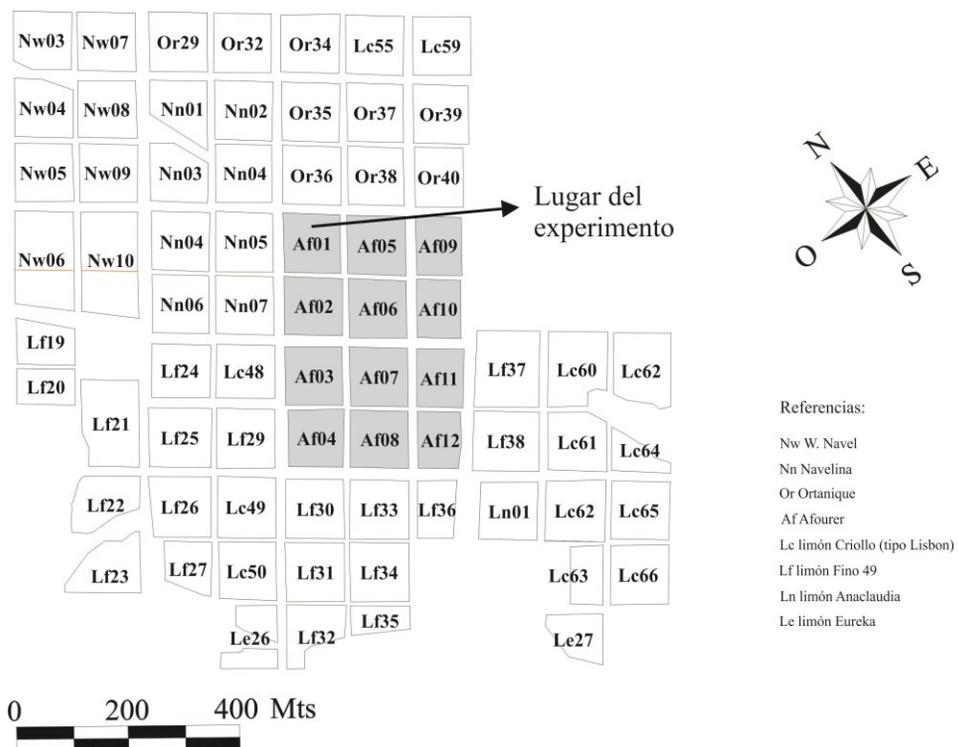


Figura 3. Esquema de la distribución de variedades, destacando el cuadro de mandarina ‘Afourer’ utilizado para los experimentos.

En el marco de este trabajo experimental se plantearon dos experimentos:

- Estudio de polinización cruzada, cuajado y presencia de semillas a través de la polinización de flores individuales a campo
- Estudio de la capacidad partenocarpica a través de la cobertura de ramas completas

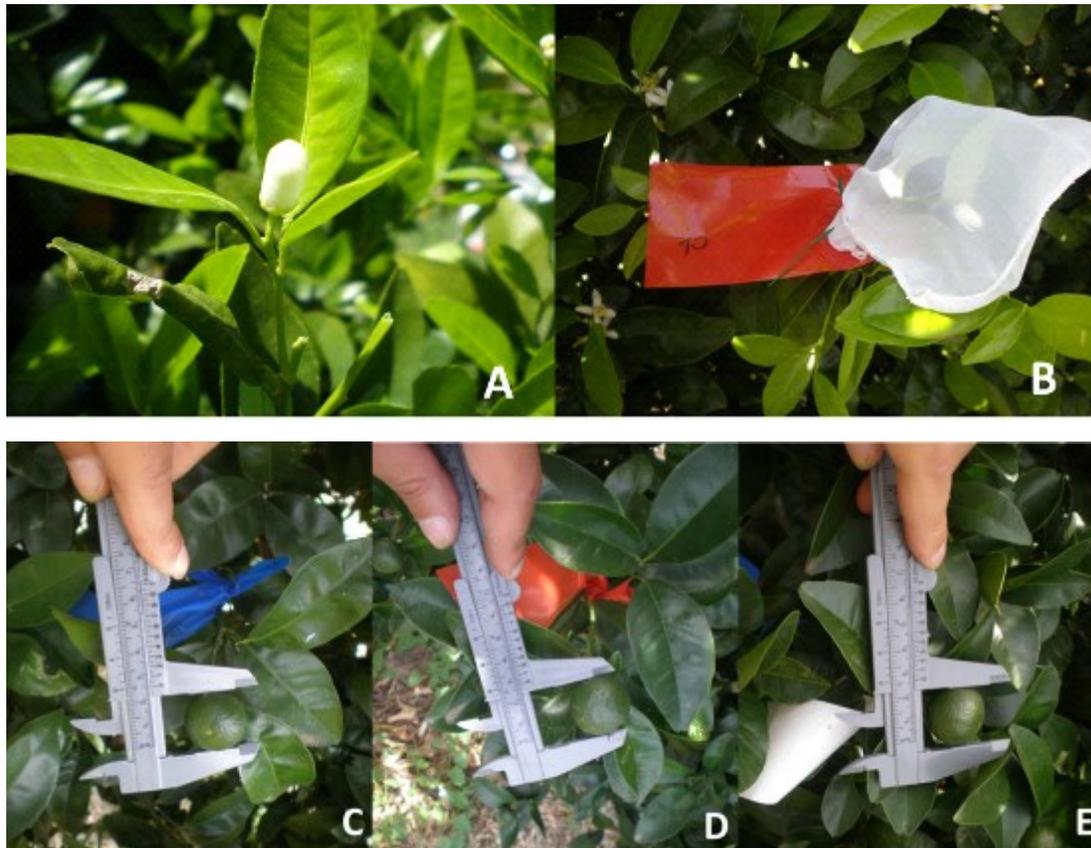
### 3.1 POLINIZACIÓN DE FLORES INDIVIDUALES

Dentro del sector del monte escogido, se seleccionaron al azar 9 árboles, teniendo como criterio el estado sanitario (sin síntomas de enfermedades y daño por insectos plagas), sin síntomas de deficiencias nutricionales, volumen de copa y altura homogéneos. En cada árbol se seleccionaron 45 brotes mixtos de flor terminal con más de dos hojas, las flores seleccionadas estaban cerradas pero próximas a la antesis, en el estado 59 de la escala BBCH (la mayoría de las flores con los pétalos cerrados forman una bola hueca y alargada) (Figura 4, Agustí et al., 1995).

Los 45 brotes seleccionados por árbol se dividieron en tres grupos de 15 brotes cada uno, para aplicar los siguientes tratamientos:

- Tratamiento A. Las flores fueron emasculadas y polinizadas con polen extraído de limón tipo 'Lisbon' (*Citrus limon*). Cada brote fue cubierto inmediatamente después de realizada la polinización con una bolsa de tela voile con el objetivo de impedir el acceso de insectos al brote. Cada brote polinizado con limón fue identificado con una cinta azul.
- Tratamiento B. Las flores fueron emasculadas y polinizadas con polen extraído de tangor 'Ortanique' (*Citrus sinensis* L. Obs. x *C. reticulata* Bl.). Cada brote fue cubierto inmediatamente después de realizada la polinización con una bolsa de tela voile. Cada brote polinizado con 'Ortanique' fue identificado con una cinta roja.
- Tratamiento Testigo. Las flores no fueron emasculadas ni polinizadas en forma artificial y no se cubrieron de forma que su polinización fuera libre. Este tipo de brote fue identificado con una cinta blanca.

En cada árbol se numeró cada brote, se contaron las hojas de cada uno y se registró en una planilla el número de hojas, la identificación del tratamiento y la ubicación del brote en el cuadrante del árbol (Figura 4).



A. Flores con los pétalos cerrados, forman una bola hueca y alargada, estado 59 de la escala BBCH. B. Brote cubierto con bolsa de tela voile. Frutos producto de flores polinizadas según tratamientos: C. Fruto proveniente de polinización con polen limón tipo ‘Lisbon’. D. Fruto proveniente de polinización con polen de tanger ‘Ortanique’. E. Frutos provenientes de polinización libre.

Figura 4. Estadío de las flores utilizadas en las polinizaciones y frutos post cuajado.

Los tres tratamientos (A, B y Testigo) se repitieron en los nueve árboles seleccionados y distribuidos al azar de forma que quedaron inicialmente 135 brotes terminales polinizados con polen de limón, 135 brotes terminales polinizados con polen de tanger ‘Ortanique’ y 135 brotes terminales de polinización libre.

Para la polinización, se colectaron anteras de flores de limoneros y de tanger ‘Ortanique’ en plena floración, al inicio de la antesis (Estado 61 de la escala BBCH). Las anteras fueron puestas, por separado, sobre cajas de Petri abiertas y colocadas en cajas de plástico herméticas que contenían silica gel durante 24 hrs, a 20°C y en condiciones de oscuridad, con el objetivo de que las anteras se abrieran. Luego se mantuvieron las anteras abiertas en heladera durante dos horas para que se hidrataran los granos de polen. Todas las anteras, de cada especie donante, se colocaron en tubos de ensayo debidamente identificados para utilizar en la polinización artificial a campo. A

cada flor emasculada (sin pétalos y sin anteras) se le realizó la polinización artificial, con la ayuda de un pincel fino se tomó polen del tubo de ensayo y se frotó sobre el estigma.

Cuando el estigma dejó de ser receptivo, aproximadamente a los 9 días, se retiraron las cubiertas de los brotes. Cada 15 días y hasta fin del mes de diciembre se evaluó el cuajado de cada flor y se midió el diámetro ecuatorial de cada fruto con calibre digital hasta la maduración del fruto. Se cosecharon todos los frutos y se midieron las variables: diámetro del fruto, presencia de semillas y número de semillas por fruto.

Paralelo a las polinizaciones, se cosecharon 40 flores, en estado 61 de la escala de BBCH, de cada especie donante, para realizar una prueba de germinación del polen *in vitro*. Los estambres se colocaron en cajas de petri abiertas y dentro de un recipiente hermético con sílica gel durante 24-36 horas para que abrieran las anteras. Cuando las anteras se abrieron se mantuvieron en heladera durante 2 horas para que se hidrataran los granos de polen. El polen se extrajo en condiciones de asepsia en cámara de flujo laminar, frotando un pincel fino por las anteras sobre un portaobjetos. En cada portaobjeto se colocó una base de 750  $\mu$ l de un medio sólido. Posteriormente se cubrieron los granos de polen con 30  $\mu$ l de un medio líquido. El medio de cultivo utilizado fue Brewbaker y Kwack (1963) (10% sacarosa, 100 ppm H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 300 ppm Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 200 ppm MgSO<sub>4</sub> y 100 ppm KNO<sub>3</sub> con PH 5.4  $\pm$  0.1) y se dividió en dos partes, una se utilizó como medio líquido y la otra como medio sólido con el agregado de polvo incoloro espesante (Phytigel) con el fin de que el medio fuera lo más transparente posible para facilitar la observación de los granos de polen en el microscopio (Figura 5).

Se colocaron los preparados en cámara oscura a 25°C y 70-80% de humedad durante 48 hrs. Una vez que germinaron los granos de polen, se fijaron con solución de FAA (5% formaldehído, 5% acético, 90% etanol al 70%). Hasta el momento de conteo, los portaobjetos se conservaron en heladera a 4 °C. La germinación de polen, se evaluó contabilizando un promedio de 300-400 granos por repetición con ayuda de un microscopio óptico (OLYMPUS ECE-Bi). Del total contabilizado, se determinó el número de granos de polen germinados para calcular el porcentaje de germinación. Se tomó como criterio que un grano de polen germinó, cuando el largo del tubo polínico superaba el diámetro del mismo (Stanley y Linskens, 1974).

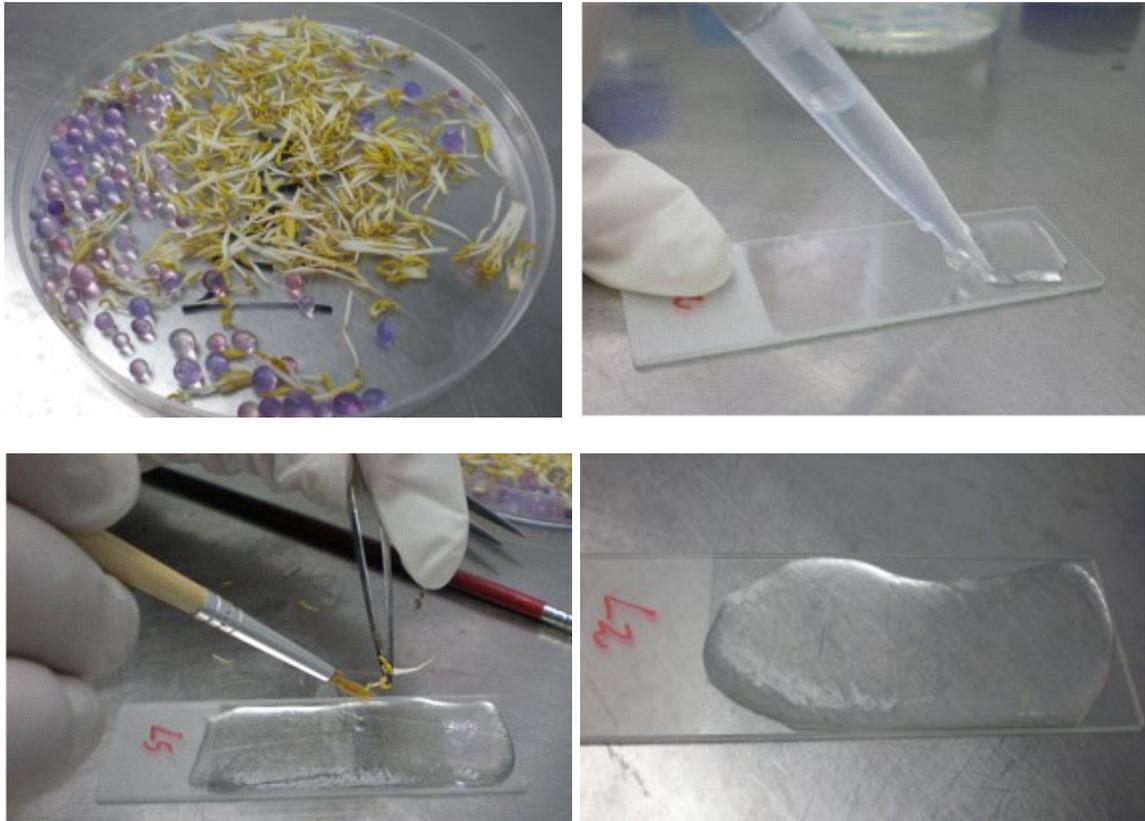


Figura 5. A. Estambres en cajas de petri con sílica gel. B. Preparación de portaobjeto con 750  $\mu$ l de medio sólido C. Extracción de polen de las anteras abiertas con un pincel fino sobre un portaobjetos. D. Portaobjeto con polen en medio sólido para prueba de germinación.

Se utilizó un diseño completo al azar con 3 tratamientos (variedades polinizadoras A, B y Testigo) y 5 repeticiones (portaobjetos).

### 3.2 COBERTURA DE RAMAS COMPLETAS

En el sector del cuadro seleccionado se eligieron 10 plantas al azar tomando como criterios de selección vigor de la planta, estado sanitario y volumen de copa. En cada planta se tomaron dos ramas secundarias que tuvieran similar intensidad de floración. Una de las ramas seleccionadas tenía orientación hacia el oeste y la otra hacia el este. Se cubrió una rama completa de cada uno de los árboles con una estructura de alambre y tela de voile para evitar la polinización cruzada. La estructura de alambre que sostenía la tela evitaba que, ante una lluvia o viento fuerte, la tela aplastara las flores (Figura 6).



Figura 6. Estructura de alambre y voile empleada para cubrir rama completa del experimento.

De esta forma quedaron 10 ramas cubiertas en 10 plantas distintas, cinco ramas orientadas hacia el este y cinco ramas orientadas hacia el oeste. Las otras ramas, orientadas hacia el lado opuesto en cada planta, se dejaron sin cubrir como testigos.

Las ramas del tratamiento se cubrieron el 9 de octubre en el estado 59 de la escala BBCH (Agustí et al., 1995), y se descubrieron el 10 de noviembre con los frutos ya cuajados. Periódicamente se recorrió el ensayo para sacar las flores que salieran posteriores al momento en que fueron cubiertas las ramas, esta actividad se realizó tanto en las ramas que fueron cubiertas como en las ramas testigo. A partir del fin de caída fisiológica (primer quincena de diciembre) se midió el diámetro ecuatorial de un máximo de 35 frutos en cada rama seleccionada.

En el momento de maduración comercial, se cosecharon todos los frutos de cada rama y se evaluaron las variables: número de frutas, número de semillas por fruto y la proporción de frutos sin semilla.

### 3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables continuas diámetro de fruta y rendimiento, se asume que presentan una distribución normal. Las variables discretas número de frutos, número

promedio de semillas fueron transformadas por la raíz del valor, mientras que la proporción de frutos con y sin semillas, el porcentaje de cuajado y el porcentaje de granos de polen germinados fueron transformados por el método ArcoSeno (Raíz(p)), para cumplir con el supuesto de Normalidad de los errores. El efecto de los tratamientos (ramas cubiertas, testigo, polinizaciones) fue estudiado ajustando modelos lineales generales (ANAVA).

Las medias de los efectos significativos fueron comparadas usando la prueba Tukey, con una significancia de 0,05. Se realizaron correlaciones entre el número de semillas y el diámetro ecuatorial del fruto. Los datos fueron analizados utilizando el software estadístico: InfoStat-Statistical Software versión 2011 (Di Rienzo et al., 2011).

Para los experimentos se utilizaron diferentes modelos estadísticos, según el diseño utilizado.

Para el experimento de autopolinización y polinización el modelo propuesto es:

$$Y_{ij} = \mu + V_i + D_j + \epsilon_{ij},$$

Donde,

Las variables continuas se analizaron por el Modelo Lineal Generalizado y las proporciones por razón de verosimilitud.

Siendo,

- $Y_{ij}$ : variable de respuesta (diámetro ecuatorial, proporción de frutos sin semillas, número de semillas por fruto, cuajado)
- $\mu$ : media general
- $V_i$ : efecto del  $i$ -ésimo tratamiento ( $i$ : Testigo; flores emasculadas, polinizadas con polen de Limón tipo 'Lisbon' (*Citrus limón*) y embolsadas; flores emasculadas, polinizadas con polen tangor 'Ortanique' y embolsadas.
- $D_j$ : efecto del  $i$ -ésimo bloque ( $j$ : 1, 2,3...10)
- $\epsilon_{ij}$ : error experimental

Para el experimento en el que se evaluó el efecto de la cobertura de las ramas sobre la presencia y número de semillas y diámetro ecuatorial, se propuso el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + M_i + \epsilon_{ij},$$

Donde,

Las variables continuas se analizaron por el Modelo Lineal Generalizado y las proporciones por razón de verosimilitud.

Siendo,

- $Y_{ij}$ : variable de respuesta (diámetro ecuatorial, proporción de frutos sin semillas, número de semillas por fruto)
- $\mu$ : media general
- $M_i$ : efecto del  $i$ -ésimo tratamiento ( $i$ : Bajo cubierta, polinización libre)
- $\epsilon_{ij}$ : error experimental

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. POLINIZACIÓN CRUZADA: CUAJADO Y PRESENCIA DE SEMILLAS A TRAVÉS DE LA POLINIZACIÓN DE FLORES INDIVIDUALES

El porcentaje de cuajado final obtenido en los tratamientos fue alto. Las flores polinizadas manualmente con polen de ‘Ortanique’ alcanzaron el mayor cuajado, seguido de aquellas en polinización libre y por último las polinizadas con limón tipo ‘Lisbon’, aunque las diferencias no fueron significativas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Cuajado final, frutos con semillas y número de semillas por fruto en condiciones de libre polinización y polinización con tangor ‘Ortanique’ y limón tipo ‘Lisbon’.

Tratamiento	Cuajado Final (%)	Frutos con semillas (%)	No. de semillas por fruto (de frutos con semilla)		No. de semillas/fruto (del total de frutos cuajados)
			Promedio	Rango	
Polinización - limón tipo ‘Lisbon’	67,0 ns*	28 b	1,64	0 - 5	0,41 ns
Polinización - tangor ‘Ortanique’	78,0	32 a	1,40	0 - 2	0,41
Libre polinización	70,0	27 ab	1,60	0 - 7	0,34

\*ns sin diferencias, letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey,  $p \leq 0,05$ )

En los experimentos realizados por Chao (2005b) en las condiciones de California, ‘Afourer’ presentó un comportamiento diferente ya que el tratamiento de polinización libre solamente cuajó el 12,2 %. El elevado porcentaje de cuajado en todos los tratamientos, puede atribuirse a que las flores utilizadas fueron todas de brotes uniflorales, de flor terminal con varias hojas; estos presentan mayor porcentaje de cuajado (da Cunha Barros y Gravina, 2006).

En el tipo de brote seleccionado, la flor terminal escapa a la competencia inicial entre flores, momento en que se produce una gran abscisión de estructuras reproductivas y se desarrollan en condiciones ambientales más favorables para el cuajado (Lovatt et al. 1984, da Cunha Barros y Gravina 2006). La presencia de determinados tipos de brotes es una característica varietal (Talón, 1997), los cuales presentan un orden diferente de aparición o de desarrollo durante la brotación. Los brotes con hojas en general presentan mayor cuajado debido a la cercanía a la fuente de fotoasimilados (Lovatt et al., 1984). La menor abscisión de este tipo de brotes también puede deberse a que estos presentan un área vascular significativamente mayor que los brotes sin hojas, lo que se asocia a una mayor capacidad de transporte de agua y nutrientes. En un estudio realizado en tangor ‘Ortanique’ (*Citrus sinensis* L. Osb. x *C. reticulata* Bl.) los brotes con hojas presentaron un porcentaje de cuajado significativamente mayor al de los brotes sin hojas,

donde los terminales alcanzaron el 39,2%, seguidos por los mixtos (16,8%), solitarios (9,9%) e inflorescencias (7,2%, da Cunha Barros y Gravina, 2006).

Los frutos provenientes de flores polinizadas con limón tipo ‘Lisbon’ y tangor ‘Ortanique’, también presentaron un alto porcentaje de frutos sin semillas y un número bajo de semillas, lo que podría indicar una baja capacidad de fecundación de las flores de ‘Afourer’ (Cuadro 2). El porcentaje de frutos sin semillas y número de semillas por fruto provenientes de flores de polinización abierta fue similar al de flores polinizadas artificialmente, en donde la cantidad de polen aplicada es muy superior y concentrada en el momento de mayor receptividad del estigma (Cuadro 2). Existe importante variabilidad en los resultados disponibles sobre polinización artificial en ‘Afourer’, tanto en el porcentaje de cuajado, como en la presencia de semillas.

En la evolución del cuajado se observa que hasta los 50 días post-antesis todos los tratamientos presentaban la misma cantidad de frutos, a partir de esa fecha se produce una caída importante, y los tratamientos comienzan a diferenciarse (Figura 7).

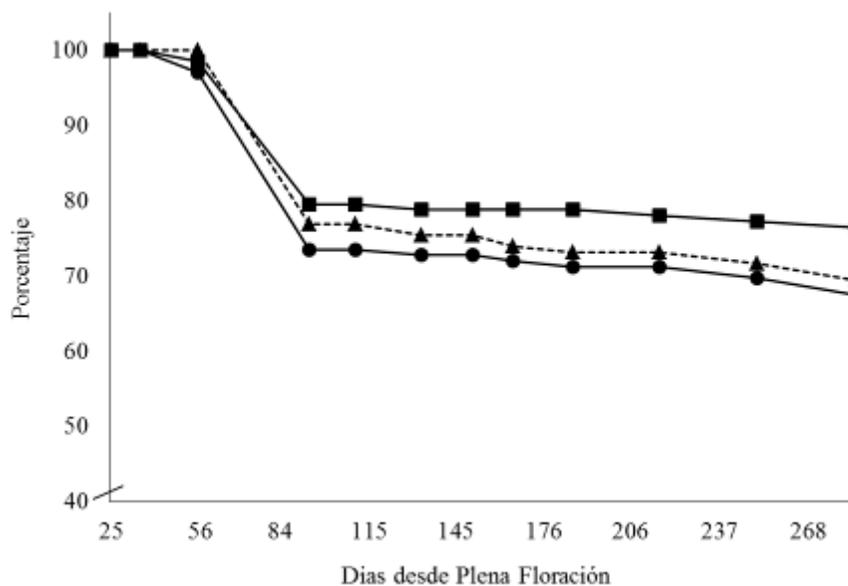


Figura 7. Evolución del cuajado de frutos provenientes de flores en condiciones de libre polinización (▲), polinizadas con polen de limón tipo ‘Lisbon’ (●) y de tangor ‘Ortanique’ (■).

La evolución del diámetro ecuatorial (mm) de los frutos según el tratamiento se presenta en la Figura 8. La evolución del diámetro y las diferencias entre los tratamientos se mantuvieron durante todo el periodo de crecimiento de los frutos, observándose diferencias significativas al momento de la cosecha entre los tratamientos libre polinización y polinizadas con polen de limón tipo ‘Lisbon’ en relación a los de tangor ‘Ortanique’.

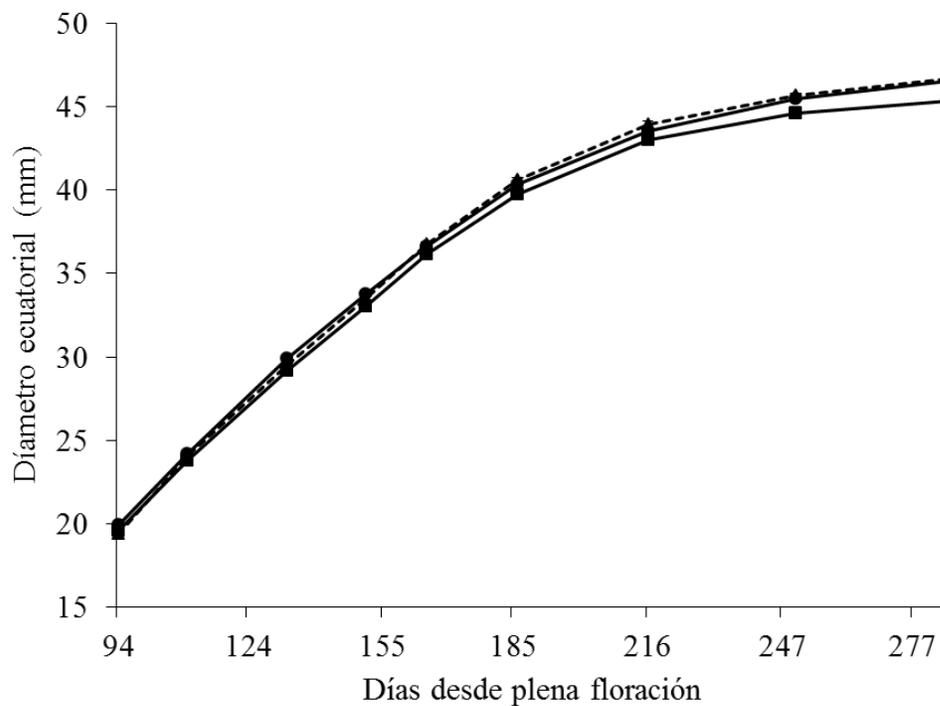


Figura 8. Evolución diámetro ecuatorial (mm) para los tratamientos libre polinización (---▲---), polinizadas con polen de limón tipo 'Lisbon' (—●—) y de tangerine 'Ortanique' (—■—), según días desde plena floración.

La polinización cruzada puede incrementar significativamente la cosecha, el número de semillas por fruto y el tamaño del fruto. En este estudio se observó una correlación positiva ( $r=0,58$ ) entre el número de semillas por fruta y el diámetro ecuatorial del fruto (Figura 9). En este experimento la correlación observada fue menor a la obtenida en el experimento de ramas cubiertas ( $r=0,78$ ), logrando un valor similar al obtenido por Chao (2005b) que determinó una correlación de 0,59 y Pardo et al. (2010) de 0,44.

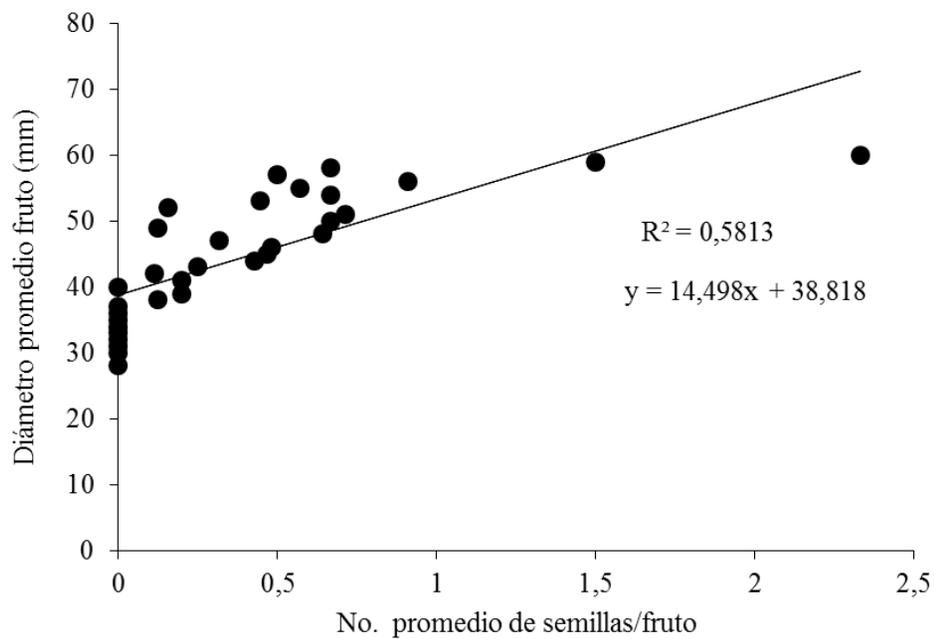


Figura 9. Relación entre tamaño del fruto (mm) y el número de semillas por fruto.

Analizando la totalidad de los datos de la relación entre el diámetro promedio de fruto (mm) y el número promedio de hojas de los brotes, independientemente del tratamiento aplicado, se observó una correlación positiva ( $r=0,58$ ) entre ambas variables (Figura 10). Donde los diámetros de frutos mayores eran los que crecían en brotes con cuatro o más hojas.

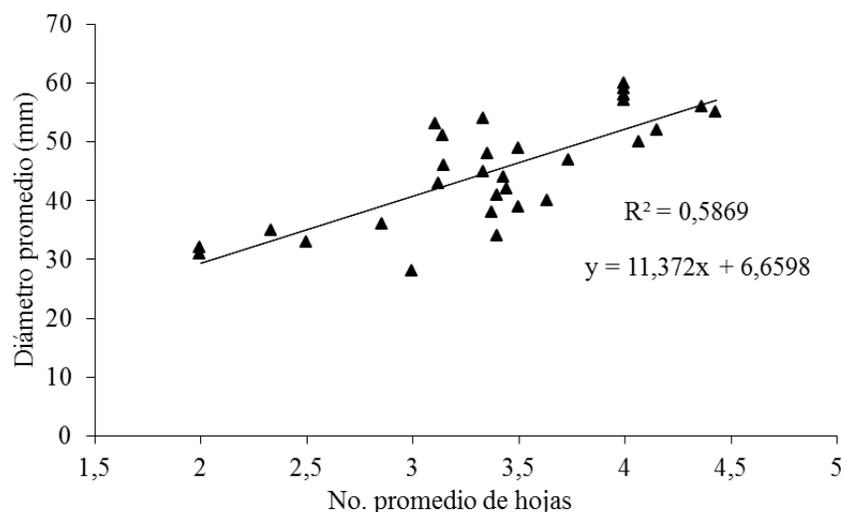


Figura 10. Relación entre tamaño del fruto (mm) y el número de hojas por rama.

La presencia de hojas en el brote se muestra como un factor importante en el cuajado, debido a su capacidad para sintetizar y exportar metabolitos al fruto en desarrollo (Agustí y Almela, citados por da Cunha Barros y Gravina, 2006). La presencia de hojas en el brote determina un mayor porcentaje de cuajado y de frutos que logran un mayor tamaño final (Moss et al., 1972), originándose estructuras con mayor poder de fosa (Hofman, 1990), debido en parte a un mayor contenido de giberelinas y citoquininas (Agustí y Almela, citados por da Cunha Barros y Gravina, 2006). En el experimento realizado por da Cunha Barros y Gravina (2006) los brotes de flor terminal con 5 o más hojas cuajaron significativamente más que los de 1-4 hojas.

#### **4.1.1. Germinación de polen *in vitro***

El porcentaje de germinación de polen obtenido *in vitro* fue de 8 % para el polen del limón tipo ‘Lisbon’ y 25% para el tangor ‘Ortanique’. Para el caso del limón el resultado es similar al obtenido por Barry (1995) que en cuatro años obtuvo para limón tipo ‘Lisbon’ porcentajes entre 0 y 15,0 ( $\pm 4,16$ ). Frost y Soost (1968) afirmaron que un alto grado de esterilidad del polen se produce en todos los cultivares de limón, posiblemente debido a anomalías meióticas. Por lo tanto, los limoneros pueden ser considerados como polinizadores relativamente ineficientes.

La germinación del polen del tangor ‘Ortanique’ fue inferior a los porcentajes alcanzados por Pardo et al. (2007), que utilizando la misma técnica y medio de cultivo,

obtuvieron un porcentaje de germinación de polen aproximado de 67 % (en promedio en los dos años). Estos autores encontraron diferencias entre especies y variedades, así como entre los dos años consecutivos del estudio, determinándose valores entre 0,6 y 86,3%.

La germinación de polen obtenida en este experimento tanto en limón tipo 'Lisbon' (8%) como en tangor 'Ortanique'(25%) es muy inferior a lo obtenido por Fasiolo y Rey (2013), quienes con la misma técnica obtuvieron una germinación de los granos de polen del 43% y 54% para limón tipo 'Lisbon' y tangor 'Ortanique' respectivamente.

Asimismo, en este experimento se obtuvo un número promedio de 1,64 semillas por fruto para flores polinizadas con polen de limón tipo 'Lisbon' y de 1,4 semillas por fruto para flores polinizadas con polen de 'Ortanique'. Valores también muy inferiores a los obtenidos por Fasiolo y Rey (2013), un promedio de 6 semillas por fruto para flores polinizadas con polen de limón y un promedio de 4,4 semillas por fruto para flores polinizadas con polen de 'Ortanique'.

Mientras en esta investigación se obtuvo un 72 % de frutos sin semillas en las flores polinizadas con polen de limón y un 68% de frutos sin semilla para flores polinizadas con polen de 'Ortanique'; Fasiolo y Rey (2013) obtuvieron 0% y 2% de frutos sin semilla respectivamente.

Barry (1995) encontró una alta correlación directa y positiva ( $r^2= 0,9192$ ) entre la germinación del polen *in vitro* de algunas variedades y el número de semillas en los frutos de la variedad "Clementina de Nules" cuando eran polinizados por estas variedades.

Aunque los porcentajes de germinación obtenidos en este trabajo no fueron tan altos como los reportados por otros autores, el bajo porcentaje de frutos con semillas y número de semillas por fruto, no puede atribuirse solamente a este factor.

## **4.2. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PARTENOCÁRPICA**

El número de frutos cuajados por rama, en condiciones de polinización abierta, fue significativamente superior al de las ramas cubiertas con malla. Esta diferencia puede explicarse por las condiciones de competencia por nutrientes entre frutos sin semilla y frutos con semilla en la misma planta. Las fitohormonas que son producidas por las semillas en desarrollo dan lugar a la movilización de fotosintatos desde las hojas, lo que retrasa o impide la abscisión de los frutos (Krezdorn, 1986).

El cuajado no es una limitante en cultivares de naranjas, pomelos y mandarinas si las condiciones de cultivo son las óptimas (Krezdorn, 1986). Sin embargo, cultivares sexualmente incompatibles, y con capacidad partenocárpica débil requiere polinización cruzada con polen compatible (Krezdorn 1986, Davies y Albrigo, citados por Barry 1995). Cultivares estériles, como por ejemplo naranjas 'Navel' y mandarinas 'Satsuma',

con fuerte capacidad partenocárpica vegetativa no requieren polinización para lograr un buen cuajado, mientras que cultivares autoincompatibles con menor habilidad partenocarpia, como por ejemplo, la mandarina 'Clementina' y el híbrido 'Nova', logran bajo condiciones óptimas un buen cuajado de frutos sin semillas, pero requieren de cierta mejora en condiciones subóptimas (Jackson, citado por Barry, 1995). De esta forma diferentes cultivares de cítricos autoincompatibles han mostrado una amplia variabilidad en sus capacidades partenocárpicas. En condiciones de ausencia de polinización cruzada, Talón et al. (1990) observaron un alto cuajado en Satsuma; mientras que los híbridos Nova, Ortanique y Clementinas presentaron baja capacidad partenocarpica (Rivas et al. 2004, Borges et al. 2009). El cuajado está principalmente influenciado por el estatus hormonal de los frutos durante su desarrollo. Así, la baja capacidad de producir frutos partenocárpicos en variedades de baja capacidad partenocarpica, parece estar asociada a los bajos niveles de giberelinas activas, baja capacidad de catabolizar el ABA y a una alta capacidad de conjugar auxinas (IAA) durante este periodo (Talón et al., 1990).

La mandarina 'Afourer' ha sido reportada como una mandarina de alta productividad en condiciones de polinización abierta y con presencia de semillas (Agustí et al., 2005). La presencia de semillas en frutos de la mandarina 'Afourer' en las condiciones experimentales, debe explicarse casi exclusivamente por la polinización cruzada con variedades plantadas próximas a los árboles del experimento que ofician de donantes de polen. Según el reporte de Chao et al. (2005a) dada la distancia que es transportado el polen de diferentes variedades de cítricos por las abejas (960 metros), para las condiciones de California se necesitaría 640m para que una variedad actuara como filtro con otras compatibles. Otros autores determinaron que para prevenir la polinización cruzada realizada por las abejas se debe considerar grandes áreas buffers para prevenir el movimiento de las abejas entre materiales compatibles. Según lo reportado por diferentes autores, variedades como 'Ortanique', 'Valencia', 'Clemendor', 'Ellendale', limón 'Ana Claudia', mandarino 'Nova', pomelo 'Star Ruby' serían potenciales donantes de polen para la mandarina 'Afourer' (Agustí et al. 2005, Fornero et al. 2012). De estos potenciales donantes es necesario cuantificar la capacidad polinizadora y la viabilidad del polen en condiciones de campo e *in vitro*. Los establecimientos deben ser bien planificados y prestar especial atención a las posibles fuentes de polen y las distancias entre ellas para asegurarse una producción de mandarina 'Afourer' sin semilla (Chao et al., 2005a)

En las condiciones experimentales el 100% de los frutos cuajados en las ramas a las que se les impidió la polinización cruzada, no presentaron semillas (Cuadro 3). Estos resultados confirman los reportes de diferentes autores donde en condiciones de aislamiento total, esta variedad cuaja y no presenta semillas (Bono et al. 2000, Chao 2005b, Agustí et al. 2005). La ausencia de semillas en las ramas aisladas podría deberse a que las abejas, principal agente polinizador, no pudieron realizar la polinización de las flores protegidas (Frost y Soost, 1968), confirmando que la variedad es autoincompatible.

Cuadro 3. Porcentaje de frutos sin semillas y promedio de semillas por fruto en mandarina ‘Afourer’ en condiciones de polinización abierta y aislamiento bajo malla.

Tratamiento	Porcentaje de frutos sin semillas	No. medio de semillas por fruto
Polinización Abierta	29 b*	2,3
Aislamiento ramas con malla	100 a	0

\* Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas (Tukey,  $p \leq 0,05$ )

En las ramas testigo, donde no se impidió la polinización (polinización abierta), el 29% de los frutos cuajados no presentaron semillas (partenocárpicos). Esto podría indicar que en la variedad ‘Afourer’ los frutos partenocárpicos cuajan y pueden competir por nutrientes con los frutos que se desarrollan con semillas, lo que puede estar relacionado con los niveles endógenos de giberelinas sintetizados en las paredes de los ovarios de los frutos partenocárpicos (Talón et al., 1992). Talón et al. (1990) demostraron que el naranjo dulce cv. Salustiana (sin semillas) y el cv. Blanca (con semillas), mantenían el mismo patrón evolutivo de giberelinas internas en sus ovarios. En las variedades sin semillas, son las paredes del ovario las que sintetizan las giberelinas necesarias para el cuajado. Pero no todas las variedades de cítricos sin semillas poseen la misma capacidad de cuajado partenocárpico. Talón et al. (1992), al comparar variedades sin semillas con diferente partenocarpia natural, demostraron que las que poseían contenidos significativamente inferiores de giberelinas en sus ovarios eran las que fructificaban con mayor dificultad. En frutos sin semillas, el factor genético responsable de la partenocarpia estimula altos contenidos de hormonas en los ovarios en el momento de la antesis e inmediatamente después de esta (Nitsch, 1971). En los trabajos de Talón et al. (1990, 1992), Ben Cheikh et al. (1997) los autores demostraron que son las GAs las responsables del cuajado, tanto en variedades partenocárpicas como en variedades con semillas.

La evolución del diámetro de frutos de mandarina ‘Afourer’ en condiciones de polinización abierta y bajo malla se presenta en la Figura 11. El crecimiento del diámetro ecuatorial del fruto presenta una evolución lineal típica de la fase II con una tasa de crecimiento que decrece al final coincidiendo con el inicio de la maduración del fruto. Los frutos de las ramas bajo malla presentan diámetros significativamente menores en comparación con los testigos.

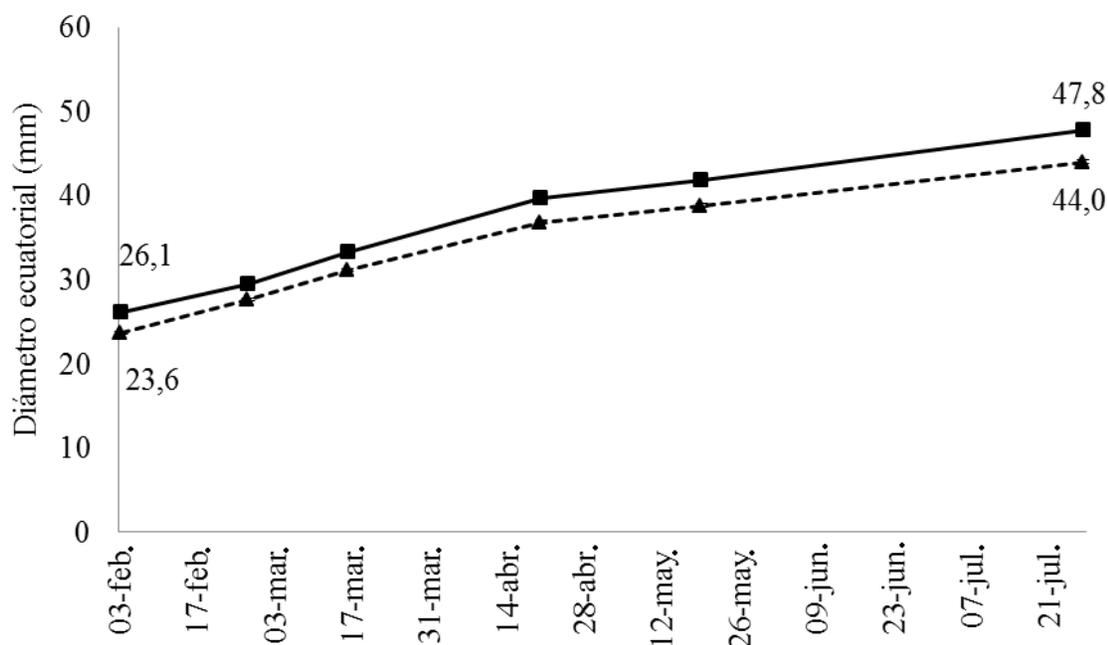


Figura 11. Evolución del diámetro de frutos de mandarina ‘Afourer’ en condiciones de polinización abierta (—■—) y bajo malla (---▲---)

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Otero y Rivas (2010), quienes al aislar plantas encontraron tamaños de fruto significativamente menores.

En condiciones de polinización libre, los frutos que presentaron diámetro pequeño tuvieron bajo número de semillas, mientras que aquellos con valores de diámetro ecuatorial mayores, presentaron un alto número de semillas. Se determinó una correlación positiva entre el diámetro ecuatorial (mm) y el número de semillas ( $r=0,78$ ) en frutos cuajados en condiciones de polinización libre, como muestra la Figura 12. Pardo et al. (2010) encontraron para este mismo cultivar una correlación de 0,44 entre el tamaño de frutos y el número de semillas por fruto. Chao (2005b) determinó una correlación de 0,59, mientras que Agustí et al. (2005) determinaron, en sus condiciones experimentales, que el tamaño del fruto estuvo condicionado por el número de semillas, de tal forma que el 97% del tamaño final alcanzado dependió de estas.

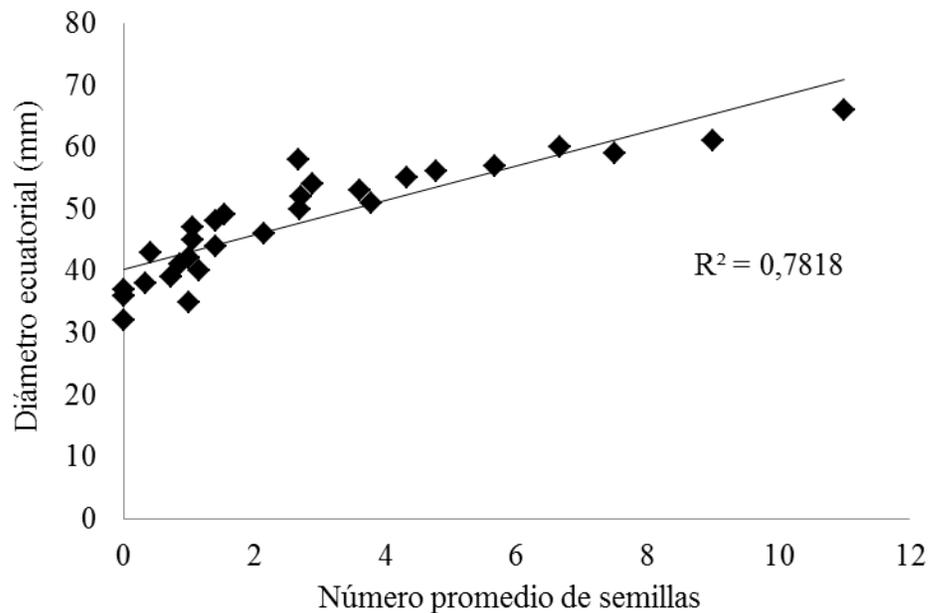


Figura 12. Efecto de la presencia de semillas sobre el tamaño final de fruto de mandarina ‘Afourer’.

Las semillas son sitios de síntesis de hormonas que fortalecen la capacidad sumidero de los frutos (Frost y Soost 1968, Chao 2005b, Iglesias et al. 2007). Por lo tanto las semillas adquieren importancia en el crecimiento de estos, fundamentalmente cuando se desarrollan en condiciones de competencia con frutos sin semillas. Estos resultados indican que solo una parte del tamaño final del fruto puede explicarse por el contenido de semillas, existiendo otros factores que intervienen, como lo son el tipo de brote, la intensidad de floración, la disponibilidad de agua y factores nutricionales, así como el estímulo hormonal (Gravina, 2014).

## **5. CONCLUSIONES**

- El cuajado final logrado en 'Afourer' fue alto, tanto en libre polinización como polinizado con limón tipo 'Lisbon' y con tangor 'Ortanique'. Estos porcentajes de cuajado pueden atribuirse al tipo de brote empleado (brotes uniflorales), que escapan a la competencia inicial entre flores y se desarrollan en condiciones ambientales más favorables para el cuajado.
- Se observó para ambos polinizadores un alto porcentaje de frutos sin semillas y un número bajo de semillas por fruto, lo que podría indicar una baja capacidad del polen de fecundar las flores de 'Afourer'.
- Los frutos de la mandarina 'Afourer' que cuajan en ramas que se les ha impedido la polinización cruzada no presentan semillas, confirmando que la variedad es autoincompatible.
- Los frutos partenocárpicos pueden desarrollarse y competir por nutrientes con frutos con semillas que se desarrollan en iguales condiciones de crecimiento.
- Los diámetros logrados con frutos partenocárpicos son menores a los obtenidos con frutos originados de polinización cruzada, existiendo una alta correlación positiva entre el diámetro ecuatorial y el promedio de semillas por fruto. La polinización cruzada puede incrementar significativamente la cosecha, el número de semillas por fruto y el tamaño del fruto.

## **6. RESUMEN**

Para caracterizar el comportamiento reproductivo de la mandarina ‘Afourer’ en la zona sur de Uruguay, se plantearon como objetivos determinar su capacidad partenocárpica y conocer la eficiencia polinizadora del polen de las variedades de limón tipo ‘Lisbon’ (*Citrus limón* Burm) y tangor ‘Ortanique’ (*Citrus sinensis* L. Obs. x *C. reticulata* Bl.). Se realizaron dos experimentos en una quinta en el departamento de San José. En el primero se estudió la polinización cruzada, cuajado y presencia de semillas a través de la polinización de flores individuales a campo. Se plantearon tres tratamientos: A) Flores emasculadas y polinizadas con polen de limón tipo ‘Lisbon’; B) Flores emasculadas y polinizadas con polen de tangor ‘Ortanique’ y C) Testigo, las flores no fueron emasculadas ni polinizadas y su polinización fue libre. En el segundo experimento se aislaron ramas para impedir la polinización cruzada y se dejaron ramas testigo en condiciones de polinización libre. En condiciones de aislamiento de la polinización con las mallas, el 100% de los frutos no presentaban semillas, confirmando que la variedad es autoincompatible. En los tratamientos de polinización artificial se alcanzó un porcentaje de cuajado superior a 60% en todos los casos, no diferenciándose significativamente del testigo en polinización libre. El porcentaje de frutos con semillas fue significativamente diferentes entre los tratamientos, siendo mejor polinizador el tangor ‘Ortanique’ que el limón tipo ‘Lisbon’. La polinización cruzada de variedades autoincompatibles puede aumentar el rendimiento, el tamaño del fruto y el número de semillas por fruto; estos aspectos deben tenerse en cuenta al momento de planificar nuevas plantaciones y/o implementar medidas de manejo tendientes a mejorar la calidad de la fruta.

Palabras clave: ‘Afourer’; Autoincompatibilidad; Partenocarpia; Polinización; Semillas.

## 7. SUMMARY

In order to characterize the reproductive behavior of 'Afourer' mandarin in the South area of Uruguay, this study pursued the following objectives: to determine the parthenocarpic ability of fruit, and to deepen in the knowledge of the pollination efficiency in varieties of lemon 'Lisbon' type (*Citrus limon* Burm.) and tangor 'Ortanique' (*Citrus sinensis* L. Obs. x *C. reticulata* Bl.). Two experiments were conducted in one orchard in the Department of San José in Uruguay. The first experiment studied cross pollination, fruit set and presence of seeds in procedures of individual flower pollination *in situ*. Three treatments were applied: A) Flowers that were emasculated and pollinized with pollen of lemon 'Lisbon' type; B) Flowers that were emasculated and pollinized with pollen of tangor 'Ortanique'; and C) Control group) Flowers that were neither emasculated nor pollinized, in conditions of free-pollination. In the second experiment some branches were isolated to avoid cross pollination and some others were left in conditions of free-pollination. In isolation conditions of the pollination with anti-bee net, 100% of the fruits presented no seeds, which confirmed that this variety is self-incompatible. In artificial pollination treatments the percentage of fruit set was over 60% in all the cases, with no significant differentiation with the control group of free pollination. The percentage of fruit with seeds was significantly different between treatments. The tangor 'Ortanique' performed as a better pollinator than the lemon 'Lisbon' type. The pollination of the self-incompatible varieties might increase yield, fruit size and number of seeds per fruit. Therefore these are aspect that should be taken in to account at the moment of planning new plantations and/or at the time of implementing management actions towards the improvement of fruit quality.

Key words: 'Afourer'; Autoincompatibility; Parthenocarpy; Pollination; Seeds.

## 8. **BIBLIOGRAFÍA**

1. Agustí, M.; Zaragoza, S.; Bleiholder, H.; Buhr, L.; Hack, H.; Klose, R.; Staub, R. 1995. Escala BBCH para la descripción de estadios fenológicos del desarrollo de los agrios (Gén. Citrus). Levante Agrícola. 332: 189-199.
2. \_\_\_\_\_. 2003a. Citricultura. 2a. ed. Madrid, Artes Gráficas Cuesta. 422 p.
3. \_\_\_\_\_.; Martínez-Fuentes, A.; Mesejo, C.; Juan, M.; Almela, V. 2003b. Cuajado y desarrollo de los frutos cítricos. Valencia, Generalitat Valenciana. 80 p. (Serie de Divulgación Técnica no. 55).
4. \_\_\_\_\_. 2004. Fruticultura. Madrid, Mundi-Prensa. 493 p.
5. \_\_\_\_\_.; Martínez-Fuentes, A.; Reig, C.; Mesejo, C. 2005. Comportamiento agronómico del tangor “Afourer”. Levante Agrícola. 375: 124-128.
6. Azcón-Bieto, J.; Talón, M. 2008. Fundamentos de fisiología vegetal. 2a.ed. Madrid, McGraw-Hill. 651 p.
7. Barry, G. H. 1995. A prediction model to determine the cross-pollination ability of *Citrus* spp. Thesis MSc. Pietermaritzburg, South Africa. University of Natal. Agriculture Department of Horticultural Science. 128 p.
8. Ben Cheikh, W.; Perez-Botella, J.; Tadeo, F.; Talon, M.; Primo-Millo, E. 1997. Pollination increases gibberellin levels in developing ovaries of seeded varieties of Citrus. Plant Physiology. 114: 557-564.
9. 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.
10. Borges, A.; da Cunha Barros, M.; Pardo, E.; García, M.; Franco, J.; Gravina, A. 2009. Cua-jado de frutos en tangor ‘Ortanique’ en respuesta a la polinización y a distintas situaciones de estrés ambiental. Agrociencia (Montevideo). 13 (1): 7-18.
11. Brewbaker, J. L.; Kwack, B. H. 1963. The essential role of calcium ion in the pollen tube growth. American Journal of Botany. 50 (9): 859-865.
12. Caputi, P.; Montes, F. 2010. Plan estratégico y diseño institucional para el sector citrícola en Uruguay. (en línea). Montevideo, MGAP. 108 p. Consultado 6 may. 2015. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/portal/agxppdwn.aspx?7,1,77,O,S,0,2404%3BS%3B1%3B100>.

13. Chao, C. C.; Fang, 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.
14. \_\_\_\_\_. 2005b. Pollination study of mandarins and the effect on seediness and fruit size; implications for seedless mandarin production. *HortScience*. 40 (2): 362- 365.
15. da Cunha Barros, M.; Gravina, A. 2006. Influencia del tipo de brote en el cuajado y crecimiento del fruto del Tangor Ortanique. *Agrociencia (Montevideo)*. 10 (1): 37-46.
16. Di Rienzo, J. A.; Casanoves, F.; Balzarini, M. G.; González, L.; Tablada, M.; Robledo, C. W. 2011. Grupo InfoStat. (en línea). Córdoba, Argentina, Universidad Nacional de Córdoba. s.p. Consultado 18 nov. 2011. Disponible en <http://www.infostat.com.ar>
17. Fasiolo, A.; Rey, F. 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.
18. Fornero, C.; Galiger, S.; Inzaurrealde, C. 2012. Estudio del comportamiento reproductivo de la mandarina ‘Afourer’ (*Citrus reticulata* Blanco). Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 54 p.
19. Fos, M.; Nuez, F.; García-Martínez, J. L. 2000. The gene pat-2, which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries. *Plant Physiology*. 122: 471-480.
20. \_\_\_\_\_.; Proano, K.; Nuez, F.; García-Martínez, J. L. 2001. Role of gibberellins in parthenocarpic fruit development induced by the genetic system pat-3/pat-4 in tomato. *Plant Physiology*. 111: 545-550.
21. Frost, H. B.; Soost, R. K. 1968. Seed reproduction; development of gametes and embryos. In: Reuther, W.; Batchelor, L.; Webber, H. eds. *The citrus industry*. Berkeley, University of California. v.2, cap. 4, pp. 290 – 319.
22. Gambetta, G.; Borges, A.; Espino, M.; da Cunha Barros, M.; Rivas, F.; Arbiza, H.; Gravina, A. 2008. Mejora de la productividad de la mandarina ‘Nova’: aspectos fisiológicos y medidas de manejo. *Agrociencia (Montevideo)*. 12 (2): 1-9.

23. \_\_\_\_\_.; Gravina, A.; Fasiolo, C.; Fornero, C.; Galiger, S.; Inzaurrealde, C.; Rey, F. 2013. Self-incompatibility, parthenocarpy and reduction of seed presence in “Afourer” mandarin. *Scientia Horticulturae*. 164: 183–188.
24. Gravina, A. 1999. Ciclo fenológico-reproductivo en citrus; bases fisiológicas y manejo. Montevideo, Facultad de Agronomía. 55 p.
25. \_\_\_\_\_.; Fornero, C.; Galiger, S.; Inzaurrealde C.; Fasiolo, C.; Gambetta, G. 2011. Partenocarpia, polinización cruzada y presencia de semillas en mandarina ‘Afourer’. *Agrociencia (Montevideo)*. 15 (2): 40-47.
26. \_\_\_\_\_.; Gambetta, G.; Rivas, F. 2012. Nutrient-hormone interactions in citrus; physiological implications. *In*: Srivastava, A. K. ed. *Advances in citrus nutrition*. New York, Springer. pp. 303-320.
27. \_\_\_\_\_. 2014. *Fisiología de citrus*. Montevideo, Facultad de Agronomía. 145 p.
28. Goldschmidt, E. E.; Monselise, S. P. 1977. Physiological assumptions toward the development of a citrus fruiting model. *In*: International Citrus Congress (2<sup>nd</sup>., 1977, Orlando). *Proceedings. Proceedings of International Society of Citriculture*. 2: 668-672.
29. Guardiola, J.; García-Mari, F.; Agustí, M. 1984. Competition and fruit set in the Washington navel orange. *Physiology Plantarum*. 62: 297-302.
30. \_\_\_\_\_. 1997. Overview of flower bud induction, flowering and fruit set. (en línea). *In*: Short Course and Workshop (1997, Gainesville, FL). *Proceedings Gainesville, FL, University of Florida. Institute of Food and Agricultural Sciences*. s.p. Consultado ago. 2011. Disponible en [http://irrec.ifas.ufl.edu/flcitrus/pdfs/short\\_course\\_and\\_workshop/citrus\\_flowering\\_97/Gardiola-Overview\\_of\\_Flower\\_Bud\\_Induction.pdf](http://irrec.ifas.ufl.edu/flcitrus/pdfs/short_course_and_workshop/citrus_flowering_97/Gardiola-Overview_of_Flower_Bud_Induction.pdf)
31. Hofman, P. 1990. Abscisic acid and gibberellins in the fruitlets and leaves of "Valencia" orange in relation to fruit growth and retention. *Scientia Horticulturae*. 42: 257-267.
32. Iglesias, D.; Cercós, M.; Colmenero-Flores, J.; Naranjo, M.; Ríos, G.; Carrera, E.; Ruiz-Rivero, O.; Lliso, I.; Morillon, R.; Tadeo, F.; Talon, M. 2007. Physiology of citrus fruiting. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 19 (4): 333-362.
33. Jackson, L. K.; Futch, S. H. 1986. Pollination and fruit set, pollination requirement. (en línea). *In*: Citrus Flowering and Fruiting Short Course an Workshop (1986, Gainesville, FL). *Proceedings. Gainesville, FL, University of Florida*.

- Institute of Food and Agricultural Sciences. pp. 25-32. Consultado ago. 2011. Disponible en [https://irrec.ifas.ufl.edu/flcitrus/pdfs/short\\_course\\_and\\_workshop/citrus\\_flowering\\_97/Jackson-Futch-Pollination\\_and\\_Fruit\\_Set.pdf](https://irrec.ifas.ufl.edu/flcitrus/pdfs/short_course_and_workshop/citrus_flowering_97/Jackson-Futch-Pollination_and_Fruit_Set.pdf)
34. \_\_\_\_\_. 1997. Seed development in citrus. (en línea). In: Short Course and Workshop (1997, Gainesville, FL). Proceedings Gainesville, FL, University of Florida. Institute of Food and Agricultural Sciences. s.p. Consultado ago. 2011. Disponible en [http://irrec.ifas.ufl.edu/flcitrus/pdfs/short\\_course\\_and\\_workshop/citrus\\_flowering\\_97/Jackson-Seed\\_Development.pdf](http://irrec.ifas.ufl.edu/flcitrus/pdfs/short_course_and_workshop/citrus_flowering_97/Jackson-Seed_Development.pdf)
  35. Khan, I. 2007. Citrus genetics, breeding and biotechnology. Wallingford, CABI. 370 p.
  36. Krezdorn, A. H. 1967. The influence of seeds and pollen source on the size of fruit. Florida Agricultural Experiment Stations Journal. no. 2863: 37-48.
  37. \_\_\_\_\_. 1986. Flowering and fruit set of citrus. (en línea). In: Citrus Flowering and Fruiting Short Course and Workshop (1986, Gainesville, FL). Proceedings. Gainesville, FL, University of Florida. Institute of Food and Agricultural Sciences. s.p. Consultado 20 may. 2015. Disponible en [https://irrec.ifas.ufl.edu/flcitrus/pdfs/short\\_course\\_and\\_workshop/citrus\\_flowering\\_97/Jackson-Seed\\_Development.pdf](https://irrec.ifas.ufl.edu/flcitrus/pdfs/short_course_and_workshop/citrus_flowering_97/Jackson-Seed_Development.pdf)
  38. Lord, E. M.; Eckard, K. J. 1985. Shoot development in *Citrus sinensis* L. (Washington Navel orange). I. Floral and inflorescence ontogeny. Botanical Gazette. 146: 320-326.
  39. Lovatt, C.; Streeter, S.; Minter, S.; O'Connell, N.; Flaherty, D.; Freeman, M.; Goodell, P. 1984. Phenology of flowering in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, cv. "Washington navel orange". In: International Society of Citriculture (5<sup>th</sup>., 1984, San Pablo). Proceedings. Proceedings of International Society of Citriculture. 1:186-190.
  40. McClure, B. A.; Gray, J. E.; Anderson, M. A.; Clarke, A. E. 1990. Selfincompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen RNA. Nature. 347: 757-760.
  41. 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.

42. Matilla, A. J. 2008. Desarrollo y germinación de semillas. *In*: Azcón-Bieto J.; Talón, M. eds. Fundamentos de fisiología vegetal. Madrid, McGraw-Hill Interamericana. pp. 537-558.
43. Mesejo, C.; Martínez-Fuentes, A.; Reig, C.; Rivas, F.; Agustí, M. 2006. The inhibitory effect of CuSO<sub>4</sub> on Citrus pollen germination and pollen tube growth and its application for the production of seedless fruit. *Plant Science*. 170: 37-43.
44. \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; Agustí, M. 2007. The effective pollination period in ‘Clemenules’ mandarin, ‘Owari’ Satsuma mandarin and ‘Valencia’ sweet orange. *Plant Science*. 173: 223–230.
45. \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 2008. Gibberellic acid impairs fertilization in Clementine mandarin under cross-pollination conditions. *Plant Science*. 175 (3): 267-271.
46. \_\_\_\_\_.; Yuste, R.; Martínez-Fuentes, A.; Reig, C.; Iglesias, D. J.; PrimoMillo, E.; Agustí, M. 2013. Self-pollination and parthenocarpic ability in developing ovaries of self-incompatible *Clementine mandarins* (*Citrus Clementina*). *Physiologia Plantarum*. 148: 87-96.
47. MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias, UY). 2011. Encuesta citrícola “primavera 2010”. Montevideo. 25 p.
48. \_\_\_\_\_. 2013. Encuesta citrícola “primavera 2012”. (en línea). Montevideo. 24 p. Consultado 15 jun. 2015. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/portal>
49. \_\_\_\_\_. 2014. Anuario estadístico agropecuario 2014. (en línea). Montevideo. 243 p. Consultado 15 jun. 2015. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-anuario-2014,O,es,0>,
50. Monselise, S. P. 1977. Citrus fruit development; endogenous system and external regulation. *In*: International Citrus Congress (2<sup>nd</sup>., 1977, Orlando). Proceedings. Proceedings of International Society of Citriculture. 2: 664-668.
51. Montalt, R.; Llácer, G.; Aleza, R.; Ollitrault, P. 2009. Partenocarpia en cítricos. Estudio preliminar para la caracterización del banco de germoplasma de cítricos del IVIA. Tesis MSc. Valencia, España. Universidad Politécnica de Valencia. 63 p.

52. Moss, G.; Steer, B.; Kriedemann, P. 1972. The regulatory role of inflorescence leaves in fruit setting by sweet oranges (*Citrus sinensis*). *Physiologia Plantarum*. 27: 432-438.
53. Muñoz-Fambuena, N.; Mesejo, C.; Iglesias, D. J.; Primo-Millo, E.; Agustí, M. 2012. Gibberellic acid reduces flowering intensity in sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] by repressing *CiFT* gene expression. *Journal of Plant Growth Regulation*. 31: 529-536.
54. Nadori, E. B. 2004. Nadorcott mandarin, a promising new variety. In: International Citrus Congress (10<sup>th</sup>., 2004, Agadir, Morocco). Proceedings. Agadir, Morocco, International Society of Citriculture. v.1, pp. 356-359.
55. Nitsch, J. P. 1970. Hormonal factors in growth and development. In: Hulme, A. C. ed. *The biochemistry of fruit and their products*. London, Academic Press. pp. 427-472.
56. \_\_\_\_\_. 1971. Perennation through seeds and other structures; fruit development. In: Steward, F. C. ed. *Plant physiology, a treatise*. London, Academic Press. pp. 413-501.
57. Otero, A.; Rivas, F. 2010. Producción de semillas y métodos de control en el tanger 'Afourer' en el litoral norte de Uruguay. In: Simposio de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Citrus (3<sup>o</sup>., 2010, Salto, Uruguay). Trabajos presentados. Montevideo, Facultad de Agronomía. pp. 96-99.
58. Pardo, E.; Borges, A.; Gravina, A. 2010. Relación entre tamaño de fruto y número de semillas en mandarina 'Afourer'. In: Simposio de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Citrus (3<sup>o</sup>., 2010, Salto, Uruguay). Trabajos presentados. Montevideo, Facultad de Agronomía. pp. 68-71.
59. 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: 16-20.
60. Raghavan, V. 2003. Some reflections on double fertilization, from its discovery to the present. *New Phytologist*. 159: 565-583.
61. Raza, H.; Khan, M. M.; Khan A. A. 2003. Seedlessness in citrus. *International Journal of Agriculture and Biology*. 5 (3): 388-391.
62. Rivas, F.; Arbiza, H.; Gravina, A. 2004. Caracterización del comportamiento reproductivo de la mandarina 'Nova' en el sur del Uruguay. *Agrociencia* (Montevideo). 5 (8): 79 – 88.

63. \_\_\_\_\_.; Bernal, R.; Bertalmío, A.; Buenahora, J.; Goñi, C.; Lado, J.; Pérez, E.; Otero A.; Mara, H. 2009. La citricultura bajo estrés; un enfoque integral. (en línea). Revista INIA. no 17: 68-72. Consultado mar. 2015. Disponible en <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/18429270409114413.pdf>
64. Saunt, J. 2000. Citrus varieties of the world, an illustrated guide. 2nd. ed. Norwich, Sinclair. 156 p.
65. Soost, R. K.; Cameron, J. W. 1980. Oroblanco; a new grapefruit hybrid. California Agriculture. 6: 16-17.
66. Spiegel-Roy, P.; Goldschmidt, E. 1996. Biology of citrus. Cambridge, Cambridge University. 230 p.
67. Stanley, R. G.; Linkeens, H. F. 1974. Pollen; biology, chemistry, management. New York, Springer. 307 p.
68. Tadeo, F. R.; Moya, J. L.; Iglesias, D. J.; Talón, M.; Primo-Millo, E. 2003. Histología y citología de cítricos. Valencia, Generalitat Valenciana. 99 p.
69. Talón, M.; Hedden, P.; Primo-Millo, E. 1990. Gibberellins in *Citrus sinensis*, a comparison between seeded and seedless varieties. Journal of Plant Growth Regulation. 9: 201- 206.
70. \_\_\_\_\_.; Zacarías, L.; Primo-Millo, E. 1992. Gibberellins and parthenocarpic ability in developing ovaries of seedless mandarins. Plant Physiology. 99: 1575-1581.
71. \_\_\_\_\_. 1997. Regulación del cuajado del fruto en cítricos; evidencias y conceptos. Levante Agrícola. 338:27-37.
72. \_\_\_\_\_; Mehouchi, J.; Moltalván, J.; Tudela, E.; Villalva, D. 1999. Factores que afectan a la abscisión y cuajado de los frutos de los cítricos. Levante Agrícola. 346: 5-13.
73. USPTO (United States Patent and Trademark Office, US). 1998. Mandarin tangerine called Nadorcott. (en línea). Washington, D. C. s.p. Consultado nov. 2011. Disponible en <http://www.google.com.uy/patents?hl=es>
74. Vardi, A.; Neumann, H.; Frydman-Shani, A.; Yaniv, Y.; Spiegel-Roy, P. 2000. Tentative model on the inheritance of juvenility, self-incompatibility and parthenocarpy. Acta Horticulturae. no. 535: 199-205.

75. \_\_\_\_\_.; Levin, I.; Carmi, N. 2008. Induction of seedlessness in citrus; from classical techniques to emerging biotechnological approaches. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 133:117–126.
76. Vithanage, V. 1991. Effect of different pollen parents on seediness and quality of ‘Ellendale’ tangor. *Scientia Horticulturae*. 48: 253-260.
77. Ye, W.; Qin, Z.; Ye, J.; Teixeira da Silva, A.; Zhang, L.; Wu, X.; Lin, S.; Hu, G. 2009. Seedless mechanism of a new mandarin cultivar “Wuzishatangju” (*Citrus reticulata* Blanco). *Plant Science*. 177:19–27.