

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

ESTUDIO DE LA AUTO E INTERCOMPATIBILIDAD DE DOS NUEVOS
HÍBRIDOS DE MANDARINA DE ORIGEN NACIONAL

por

Andrés Sebastián DI LORENZI GONZÁLEZ

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

MONTEVIDEO

URUGUAY

2020

Tesis aprobada por:

Director:

Ing. Agr. Dra. Giuliana Gambetta

Ing. Agr. MSc. Alfredo Gravina

Ing. Agr. Dr. Fernando Rivas

Ing. Agr. MSc. Alejandra Borges

Fecha: 2 de abril de 2020

Autor:

Andrés Sebastián Di Lorenzi González

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, especialmente a mis padres, mis hermanos Caro y Nico y mis abuelos, por su amor, confianza y apoyo en este trabajo, a lo largo de la carrera, y por ser el pilar de mi vida.

A mis amigos y compañeros por acompañarme. A Juli, por su apoyo en esto y por su cariño.

A mis tutores, Giuliana y Alfredo, por los aportes y correcciones a lo largo de este trabajo, su paciencia y disponibilidad.

A Alejandra Borges por su asesoramiento en estadística.

A Fernando Rivas por ser parte del tribunal.

Al grupo Ecofisiología de citrus, Fabi, Cele, Lu, Nati y Sofi, por la colaboración y los momentos compartidos.

Al personal de INIA “Las Brujas”, por su colaboración.

Al personal de biblioteca por la constante búsqueda de material bibliográfico.

A Sully Toledo por las correcciones formales del presente trabajo.

A todas aquellas personas que formaron parte en esta primera instancia de mi formación.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1 <u>OBJETIVOS</u>	2
1.1.1 <u>Objetivo general</u>	2
1.1.2 <u>Objetivos específicos</u>	2
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	3
2.1 <u>LOS CÍTRICOS</u>	3
2.1.1 <u>Producción cítrica en Uruguay</u>	3
2.1.2 <u>Origen de los citrus y taxonomía</u>	5
2.2 <u>BIOLOGÍA REPRODUCTIVA</u>	6
2.2.1 <u>Floración</u>	6
2.2.2 <u>Formación de gametos</u>	9
2.2.2.1 <u>Macrosporogénesis y gametogénesis femenina</u>	9
2.2.2.2 <u>Microsporogénesis y gametogénesis masculina</u>	10
2.2.3 <u>Polinización</u>	11
2.2.3.1 <u>Período efectivo de polinización (PEP)</u>	12
2.2.3.2 <u>Factores que afectan la polinización</u>	12
2.2.4 <u>Germinación y crecimiento del tubo polínico</u>	13
2.2.5 <u>Fecundación</u>	14
2.2.6 <u>Formación de semillas</u>	15
2.2.7 <u>Cuajado</u>	15
2.2.8 <u>Manejo del cuajado</u>	15
2.2.9 <u>Crecimiento y desarrollo de frutos cítricos</u>	17
2.2.10 <u>Partenocarpia</u>	21
2.2.11 <u>Esterilidad e incompatibilidad</u>	23
2.2.11.1 <u>Esterilidad gamética o morfológica</u>	24
2.2.11.2 <u>Esterilidad homogenética o factorial</u>	25
2.2.11.3 <u>Esterilidad citológica</u>	26
2.2.12 <u>Mejoramiento genético en cítricos</u>	27
2.2.12.1 <u>Selección clonal, prospección, o mutaciones espontáneas</u>	28
2.2.12.2 <u>Mutagénesis inducida</u>	28
2.2.12.3 <u>Hibridación sexual</u>	29
2.2.12.4 <u>Generación de poliploides</u>	29
2.2.13 <u>Programa de mejoramiento genético nacional</u>	30

2.2.13.1 Características de los híbridos.....	30
2.2.13.2 Características de los parentales.....	31
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	32
3.1 EXPERIMENTOS 1 Y 2.....	32
3.2 EXPERIMENTO 3.....	34
3.2.1 <u>Estudio de autocompatibilidad</u>	34
3.2.2 <u>Estudio de la capacidad partenocárpica</u>	35
3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	35
3.3.1 <u>Experimentos 1 y 2</u>	35
3.3.2 <u>Experimento 3</u>	36
4. <u>RESULTADOS</u>	37
4.1 ESTUDIO DE LA AUTOINCOMPATIBILIDAD E INTERCOMPATIBILIDAD EN CONDICIONES DE POLINIZACIÓN DIRIGIDA Y SU RELACIÓN CON EL CUAJADO DE FRUTOS.....	37
4.1.1 <u>Experimento 1. Híbrido F3P8</u>	37
4.1.1.1 Evolución del cuajado de frutos.....	37
4.1.1.2 Viabilidad de polen.....	38
4.1.1.3 Factores ambientales pre y pos polinización.....	39
4.1.2 <u>Experimento 2. Híbrido F2P3</u>	39
4.1.2.1 Evolución del cuajado.....	39
4.1.2.2 Presencia de semillas inviables.....	41
4.1.2.3 Viabilidad del polen.....	42
4.1.2.4 Factores ambientales pre y pos polinización.....	42
4.2 EXPERIMENTO 3. ESTUDIO DE LA AUTOCOMPATIBILIDAD EN AUSENCIA DE POLINIZACIÓN CRUZADA.....	43
5. <u>DISCUSIÓN</u>	44
6. <u>CONCLUSIONES</u>	50
7. <u>RESUMEN</u>	51
8. <u>SUMMARY</u>	53
9. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	54
10. <u>ANEXOS</u>	67

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.		Página
1.	Número de frutos cosechados, porcentaje de frutos con semillas, número promedio de semillas por fruto, cuajado inicial, y cuajado final, en el híbrido F3P8 según tratamiento auto e interpolinización.....	38
2.	Porcentaje de granos de polen viable e intervalos de confianza para p [IC], de los híbridos F3P8 y F2P3 en la fecha 5/10/18.....	39
3.	Número de frutos cosechados, porcentaje de frutos con semillas, número promedio de semillas por fruto, cuajado inicial, y cuajado final, en el híbrido F2P3 según tratamiento auto e interpolinización.....	40
4.	Porcentaje de granos de polen viable e intervalos de confianza para p [IC], de los híbridos F2P3 y F3P8 en la fecha 11/10/18...	42
5.	Número de frutos cosechados, porcentaje de frutos con semilla, e intervalo de confianza (IC) para “ p ” proporción de frutos con semilla, IC para “ μ ” número de semillas por frutos, totales y por frutos con semillas, según híbrido.....	43
6.	Cuajado inicial y final para ambos híbridos.....	43
Figura No.		
1.	Procesos posibles entre floración y crecimiento del fruto.....	26
2.	Tipos de esterilidad en cítricos.....	27
3.	Emasculación, polinización y enmallado individual de las flores.....	33
4.	Granos de polen del híbrido F2P3 en portaobjetos, para su observación bajo microscopio.....	34
5.	Granos de polen del híbrido F2P3, test de viabilidad con sales	

de tetrazolio.....	34
6. Árboles de los híbridos F3P8 y F2P3, cubiertos con malla excluidora de abejas.....	35
7. Porcentaje de cuajado inicial del híbrido F3P8.....	38
8. Porcentaje de cuajado inicial del híbrido F2P3.....	41
9. Distintos tipos de semillas presentes en el híbrido F2P3.....	42

1. INTRODUCCIÓN

La citricultura uruguaya ocupa una superficie efectiva de 14 mil hectáreas, con 6,8 millones de plantas totales de las cuales el 83% se encuentran en producción. Las principales especies cultivadas son las naranjas, mandarinas, limones, y de forma marginal los pomelos. En el Uruguay el objetivo de la producción de cítricos es la exportación de fruta para el consumo en fresco. En la última zafra el volumen de fruta exportada fue de 87 mil Mg, equivalente a un 41% (MGAP. DIEA, 2019).

El mundo se ha encaminado al desarrollo de clubes de variedades, donde éstas son cultivadas bajo sistemas de trazabilidad estrictos y con una producción limitada, bajo sistemas de licencias. Por lo tanto, la existencia de vínculos fuertes con los obtentores varietales de distintos países permitirá y facilitará la negociación (Rivas et al., 2010).

La citricultura uruguaya se encuentra expuesta a la competencia del mercado internacional, es por ello que debe desarrollar ventajas competitivas. Para ello es necesario la introducción, evaluación y desarrollo de variedades que se adapten a la demanda de los principales mercados de exportación uruguayos. Los estándares de calidad puestos por estos últimos son cada vez mayores. Las características exigidas para mandarinas y sus híbridos son: fácil pelado, sin semillas, excelente calidad de la piel, alto contenido de °Brix, y apropiada relación sólidos solubles/acidez. Esto ha determinado un incremento en la demanda por mandarinas a nivel mundial (Rivas et al., 2010).

El concepto de fruto sin semilla ha ido cambiando en el tiempo. Desde hace 15 años, se consideran como frutos sin semillas, cuando la presencia de estas últimas es de 1 cada 100 frutos (Barry, 2004). La tendencia mundial del mercado a exigir mandarinas con ausencia o baja presencia de semillas ha llevado a que el mejoramiento genético esté fuertemente polarizado a crear cultivares aspermos, mediante inducción de mutaciones, u otras herramientas biotecnológicas (Rivas et al., 2010).

En Uruguay existe un programa de mejoramiento genético de citrus llevado a cabo por Facultad de Agronomía e INIA. En él, mediante cruzamientos dirigidos, se han obtenido varios híbridos de mandarina y se han seleccionado los de mejores características organolépticas, y algunos por la ausencia de

semilla. La información en cuanto a sus características reproductivas es escasa y para algunos de ellos es nula.¹

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es caracterizar el comportamiento reproductivo de los híbridos F3P8 y F2P3, generados en el programa nacional de mejoramiento genético de citrus.

1.1.2 Objetivos específicos

Los objetivos específicos propuestos son:

- a) Comprobar la autoincompatibilidad de estos híbridos.
- b) Determinar si existe intercompatibilidad entre ellos.
- c) Determinar la capacidad de cuajado en auto e interpolinización.

¹ Vignale, B. 2019. Com. personal.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 LOS CÍTRICOS

2.1.1 Producción citrícola en Uruguay

La citricultura uruguaya ocupa una superficie efectiva de 14 mil hectáreas, con 6,8 millones de plantas totales de las cuales el 83% se encuentran en producción. Es el principal rubro frutícola del país. La densidad promedio actual es de 493 plantas por hectárea, el 61% de la superficie se encuentra bajo riego y el rendimiento promedio general para la zafra 2018 fue de 38 kg por planta. Las principales especies cultivadas son las naranjas, mandarinas, limones, y de forma marginal los pomelos. La producción de la zafra 2018, considerando las cuatro especies, fue estimada en 217 mil toneladas (estando por debajo del promedio de los últimos cinco años), de las cuales las naranjas, mandarinas, limones, y pomelos representaron el 49%, 33%, 17,5%, 0,5% respectivamente. Las naranjas ocupan la mayor superficie efectiva (46%), las mandarinas el 37%, los limones el 16%, y los pomelos tan solo 0,5% (MGAP. DIEA, 2019).

Son 421 las explotaciones con citricultura comercial. La gran especialización y el aumento de escala han llevado a la concentración de la producción. Tan solo 5 empresas con más de 200 mil plantas producen el 57% del total, y los productores de menos de 5 mil plantas (70% del total), solamente aportan el 6% de la producción total (MGAP. DIEA, 2019).

Existen dos zonas donde se concentra la producción citrícola en el país: la zona litoral Norte, abarcando los departamentos de Salto, Paysandú y Artigas, y la zona Sur, constituida por plantaciones en los departamentos de San José, Colonia, Canelones y Montevideo. La zona litoral Norte es la principal en cuanto a producción de todas las especies (88%) y superficie efectiva (91%), superando el 94% en naranjas, mandarinas y pomelos, y el 70% de la superficie de limones del país. La superficie efectiva de la zona Sur es de tan solo un 9%, y la producción de un 12%, siendo el 70% limones. Además ambas zonas se diferencian en cuanto a su mesoclima (MGAP. DIEA, 2019).

En el Uruguay el objetivo de la producción de cítricos es la exportación de fruta para el consumo en fresco. En la última zafra el volumen de fruta exportada fue de 87 mil Mg, de fruta destinada al mercado interno 83.819 Mg, e industrializada 43.135 Mg, equivalente a 41%, 39% y 20% respectivamente (MGAP. DIEA, 2019).

El mercado de EEUU tuvo su apertura en el año 2014, al cual se exportó fruta cítrica por un total de 7,3 millones de U\$\$, ascendiendo en el año 2017 a 27 millones de U\$\$. En la zafra 2018, las exportaciones de frutos cítricos a este mercado fueron de 37%, superando a las exportaciones destinadas a la Unión Europea (36%). El mercado de Brasil absorbió el 11% de las ventas y se posicionó en tercer lugar, seguido de Rusia (7%) y Canadá (3%). El mercado chino se encuentra abierto desde el año 2016, aunque las ventas destinadas a éste aún son menores (1%, MGAP. OPYPA, 2018).

Existen diferencias en cuanto a los destinos de los distintos productos. El 60% (24.412 Mg) de las naranjas y el 55% (8.162 Mg) de los limones tienen como destino la Unión Europea, mientras que el 61% (17.389 Mg) de las mandarinas se envía al mercado de EEUU (MGAP. OPYPA, 2018).

El sector cítrico uruguayo se encuentra desde hace años estancado en cuanto al porcentaje de fruta exportada, siendo aproximadamente el 50%. Esto puede ser explicado por el escaso crecimiento en superficie total, en el área bajo riego, montes envejecidos, calidad y sanidad de las plantas, lento recambio en el material genético (Caputi y Montes 2010, MGAP. DIEA 2011, 2013, 2015, 2019)

Una de las grandes importancias del rubro cítrico es la mano de obra empleada, siendo de 3.800 personas para el año 2016 (MTSS, 2018).

La calidad de la fruta determinará el acceso y permanencia a los mercados exportadores, así como también el valor comercial. Según Bono (2000) hay dos clases de calidad, la extrínseca y la intrínseca. La primera refiere a las propiedades que tendrán los frutos luego de los procesos de producción, confección, transporte y distribución, y la segunda, a las características inherentes a la fruta.

En el mundo, los programas de mejoramiento genético de cítricos, además de buscar excelentes calidades organolépticas en el fruto, apuntan a materiales autoincompatibles y/o que no polinicen y sean estériles (Vardi et al. 2008, Navarro et al. 2015). También se ha investigado en la aplicación de medidas de manejo para reducir el número de semillas (Chao et al. 2005a, Mesejo et al. 2008).

Si bien actualmente la tendencia mundial es hacia la producción de mandarinas de fácil pelado y sin semillas, a partir de los resultados de Moltini et al. (2018), en el cual entrevistaron a un gran número de consumidores uruguayos, concluyeron que el sabor y la jugosidad de las mandarinas, así como su contenido de vitaminas, deben tener un rol importante en la selección de nuevas variedades. Por otra parte el tamaño, el precio y las manchas en la

cáscara fueron características de menor importancia al momento de decidir en la compra.

2.1.2 Origen de los cítricos y taxonomía

Los cítricos tienen origen en el Sureste de Asia, incluyendo el Sur de China y el Noreste de India y Burm. Actualmente se sabe la gran diversidad de cítricos que hay en Yunnan, y que sus ríos fueron un gran mecanismo de dispersión. Los pájaros y la actividad humana también actuaron como agentes de dispersión de las semillas (Spiegel-Roy y Goldshmidt, 1996). En 1520, procedente de China, fue introducida en Portugal la naranja dulce (Zaragoza, 2007).

Los españoles introducen los cítricos en América en el segundo viaje de Colón, posteriormente, los inmigrantes españoles y portugueses promovieron el establecimiento y producción durante los siglos XVII y XVIII (Agustí, 2010). De acuerdo a Ortiz de Taranco (2001), en los comienzos del siglo XIX, ya podían distinguirse claramente tres zonas desde donde comenzó a expandirse su producción: Montevideo, Melo y Rivera, y Salto. La expansión de los cítricos hacia África a mediados del siglo XVII la llevaron a cabo los colonos holandeses y portugueses (Zaragoza, 2007).

Casi un siglo más tarde se llevaron a Australia cítricos procedentes de Brasil. El mandarino, fue el último en expandirse a occidente en el siglo XIX (Zaragoza, 2007).

Existen diferentes clasificaciones botánicas para los cítricos, que incluyen entre 16 (Swingle) y 162 (Tanaka) especies en el género *Citrus* (Agustí, 2003b). La filogenia de los *Citrus* es controversial, dada la dificultad de identificar las especies progenitoras puras o salvajes, debido a las sustanciales hibridaciones interespecíficas, que han resultado en numerosos cultivares propagados clonalmente (Wu et al., 2018). Según Ollitrault y Navarro (2012), existen cuatro taxones básicos basados en descriptores morfológicos y datos moleculares: (*C. maxima* (Burm.) Merr., los pummelos; *C. medica* L., las cidras, *C. reticulata* Blanco, las mandarinas y *C. micrantha* Wester). Las otras especies cultivadas (*C. aurantium* L., la naranja agria; *C. sinensis* (L.) Osbeck, la naranja dulce; *C. paradisi* Macf, la toronja; *C. limon* (L.) Burm. F., el limón y *C. aurantifolia* (Christm.) Swingle, la lima) aparecieron por recombinación entre los taxones básicos.

Las especies de cítricos que actualmente tienen valor comercial pertenecen al género *Citrus* de la familia Rutaceae, subfamilia Aurantioideae (Khan, 2007). En ésta última se encuentran también los géneros *Fortunella*

(Kumquat) y *Poncirus*. La única especie de éste género es *Poncirus trifoliata*, de hojas caduca, resistente a bajas temperaturas, muy utilizada como portainjerto en la citricultura mundial (Agustí, 2010), incluyendo el Uruguay (Gravina, 2014).

2.2 BIOLOGÍA REPRODUCTIVA

Los cítricos son plantas apomícticas facultativas, es decir que producen semillas de forma sexual y asexual. En la reproducción sexual se forman células especializadas llamadas gametos, y la fusión del gameto masculino y el femenino lleva a la formación del embrión y posteriormente a la semilla. La otra forma de reproducción es la asexual y es por apomixis, en la cual la formación del embrión se da sin que tenga lugar la fecundación (Poehlman y Sleper, 2003).

Existen dos formas de apomixis, la embrionía adventicia o poliembrionía y la apomixis gametofítica. En la primera, los embriones se desarrollan directamente desde una célula nucelar, y es la que aparece en los cítricos. En el segundo caso los embriones se generan de una oósfera de un saco embrionario diploide, originado a partir de una célula madre de las megásporas (apomixis diplosporia) o a partir de una célula nucelar (apomixis aposporia, Poehlman y Sleper, 2003).

La poliembrionía ha significado una desventaja para los programas clásicos de mejoramiento genético por hibridación, debido a que el parental femenino debe ser monoembriónico, para asegurar que la descendencia sea efectivamente un híbrido. Por otra parte ésta es una ventaja para la forma de propagación por injertos en cítricos, debido a que la obtención de los portainjertos por semilla, mantendrá las características favorables (clones) y limitará e impedirá la propagación de virus y otros organismos transmisibles por injerto (Gravina, 2014).

2.2.1 Floración

Los cítricos son angiospermas y por lo tanto el proceso reproductivo ocurre en el órgano floral.

El proceso reproductivo consta de dos fases, la floración y la fructificación. El primero comienza con la inducción floral, es decir, la captación de estímulos que permitan el pasaje de las yemas vegetativas a reproductivas; posteriormente, próximo a la brotación, tiene lugar la diferenciación floral y la maduración de los verticilos florales. La floración culmina con la antesis, es decir, la apertura de la flor, y da comienzo al crecimiento y desarrollo del ovario,

hasta la maduración comercial del fruto, segunda fase del proceso reproductivo en citrus: la fructificación (Tadeo et al. 2003, Agustí 2003a)

La inducción floral es promovida o inhibida por factores exógenos como endógenos. Entre los promotores exógenos los más importantes son, en zonas tropicales el estrés hídrico y en zonas subtropicales o templadas las bajas temperaturas en los meses de otoño e invierno (Gravina, 2014). Chica y Albrigo (2013), comprueban en naranja dulce, que el déficit de agua y la exposición a bajas temperaturas (5 – 20 ° C) induce la floración a través del aumento de la transcripción del gen CsFT.

El factor endógeno más relevante, inhibiendo la inducción floral, es la carga de frutos, a través del contenido de giberelinas. Este efecto puede ser directo durante la tercer fase de desarrollo del fruto, disminuyendo la formación de yemas reproductivas (Martínez-Fuentes et al., 2010), o indirecto en las primeras etapas de desarrollo de los frutos, disminuyendo o inhibiendo la intensidad de las brotaciones de verano y otoño, cuyas yemas son las que poseen mayor capacidad de inducirse en comparación con las formadas en la primavera previa (Verreyne y Lovatt, 2009).

Ha sido demostrado que la presencia de fruta en las ramas inhibe la siguiente floración, reprimiendo tanto en hojas como en yemas los genes CiFT y SOC1 (Muñoz Fambuena et al., 2011). La aplicación de GA3 durante el período inductivo produjo una disminución de un 72 % de la floración respecto al testigo y se vio una reducción en la expresión del CiFT. Cuando la aplicación es con paclobutrazol (PBZ) lo que sucede es inverso, se da aumento de 123 % de la floración, y un aumento de CiFT (Muñoz Fambuena et al., 2012).

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

En los cítricos, la antesis de una flor tiene una duración de 5 a 7 días, pero la floración de toda la población de flores de un árbol dura más de 20 días (Mesejo et al., 2007b). Presentan flores hermafroditas, constituidas por 4 verticilos, el androceo (parte masculina), el gineceo (parte femenina), ambos propiamente reproductivos, y el cáliz y la corola que protegen a los dos primeros hasta el momento de la fecundación.

El receptáculo se encuentra sobre el pedúnculo de la flor. El cáliz está compuesto por 5 sépalos verdes, de forma oval, unidos en la base y dispuestos en círculo sobre el receptáculo. De forma concéntrica al cáliz y por su parte

interna se encuentran 5 pétalos de coloración blanca, o violácea antes de la anthesis en *C. limon* (Tadeo et al., 2003)

El androceo está constituido por 20 a 40 estambres, formados por un filamento blanco y una antera blanca o amarilla, tetralobular. Antes de la elongación de los filamentos, las anteras completan su formación (Agustí, 2003b). Son los granos de polen que le dan la coloración a las anteras, por lo tanto, el color amarillo brillante es indicador de anteras normales y maduras. Por otro lado, si éstas no tienen polen, o éste es defectuoso el color será crema pálido o blanco y usualmente no abrirán (Tadeo et al., 2003). En citrus la diseminación del polen se realiza por dehiscencia, es decir la apertura natural de las anteras (Esau, 1982). Cada teca se abre de forma longitudinal entre los lóbulos, exponiendo el polen como polvo amarillo y pegajoso (Frost y Soost, 1968).

En la cara interna del androceo, se encuentra el otro verticilo reproductivo, el gineceo, compuesto por 7-10 carpelos que forman un ovario, un estilo y un estigma. Los carpelos en su interior alojan 4-5 óvulos anátropos, formados por el funículo, la nucela, el saco embrionario y los tegumentos. Presentan placentación axial (Spiegel-Roy y Goldshmidt, 1996). La pared del ovario o pericarpio se divide en tres regiones de afuera hacia adentro: el exocarpo, el mesocarpo y el endocarpo.

El óvulo de los cítricos es considerado bitégmico, debido a que es envuelto por dos tegumentos. La nucela es el tejido más grande del óvulo y contiene al gametofito femenino o saco embrionario. La zona apical de los tegumentos, denominada micrópilo, es por dónde penetrará el tubo polínico para dar lugar a la doble fecundación que es común a todas las angiospermas. Por otra parte, la región basal donde convergen los tegumentos es llamada chalaza, de donde emerge el funículo, tejido conector del óvulo con la placenta (Esau 1982, Tadeo et al. 2003).

Tanto el estigma como el estilo son estructuras específicamente preparadas para la polinización, germinación del grano de polen (superficie estigmática) y la conducción del tubo polínico (estilo).

El estilo es de forma cilíndrica y conecta la superficie estigmática a cada lóculo. Anatómicamente éste se divide en tres zonas, la epidermis formada por una capa de células parenquimatosas de estructura rectangular, con una pared periclinal externa recubierta de una gruesa cutícula, la corteza formada por varias células parenquimatosas que envuelve los haces vasculares y los canales estilares y las células de los canales estilares que producen y liberan una secreción al canal (Tadeo et al., 2003).

En el extremo del estilo se encuentra el estigma. Éste está compuesto por células papilares epidérmicas, es esférico, y su color cambia según su estado de madurez, iniciando verde, pasando por amarillo hasta el marrón. Se ubica en el extremo del estilo y se divide en dos zonas, una zona estigmática superficial del tipo glandular y una zona estigματοide en el interior, no glandular, constituida por células parenquimáticas, envolviendo a los tejidos conductores y a los canales estilares. La función del estigma es la hidratación y reconocimiento del grano de polen. Su receptividad es variable, comienza poco antes de la antesis y continúa hasta 6-8 días después (Spiegel-Roy y Goldshmidt, 1996). Por otro lado, Mesejo et al. (2007b) observaron que en el estigma de flores de mandarina “Clementina de Nules” y de naranjo “Valencia” polinizadas con polen de “Fortune”, la receptividad se mantuvo hasta 10 días postantesis.

Las zonas glandulares del conjunto estigma-estilo secretan al exterior un exudado compuesto por azúcares, lípidos y proteínas, que el grano de polen utiliza para hidratarse y germinar, y también para la nutrición del tubo polínico. La producción se da a expensas de la desintegración del almidón almacenado en los amiloplastos. Éstos exudados son secretados previo a la apertura floral (botón alargado), hasta la caída de pétalos (Tadeo et al., 2003). Un anillo en la zona de unión del estilo con el ovario, marca la senescencia del conjunto estigma-estilo.

Entre las piezas del androceo y el pistilo, se encuentra el disco nectarífero, donde se apoya el ovario. El disco nectarífero secreta al momento de la antesis y hasta las 48 horas posteriores a ésta, una gran cantidad de néctar acuoso. Éste, en conjunto con las piezas de la corola, son los responsables de atraer a los agentes polinizadores y por lo tanto de la polinización cruzada (Agustí 2003b, Tadeo et al. 2003). Este néctar, producido en las flores de citrus, contiene cafeína que ayuda a aprender y recordar a la abeja el aroma floral, tres veces más que un néctar únicamente con sacarosa (Wright et al., 2013).

2.2.2 Formación de gametos

2.2.2.1 Macrosporogénesis y gametogénesis femenina

En la zona micropilar, previo a la formación de los tegumentos, una célula distinguible por su tamaño y núcleo prominente, la célula arqueosporica, originará al gametofito femenino: el saco embrionario. La célula madre de las megásporas crece y se elonga, y mediante meiosis origina cuatro megásporas haploides de las cuales tres degeneran y solo la más cercana a la zona chalazal

continúa su desarrollo. Ésta sufrirá tres divisiones mitóticas dando como resultado ocho núcleos dentro del saco embrionario. En la zona chalazal están las tres células antipodales, en el centro los dos núcleos polares, y en la zona micropilar la oósfera (gameto femenino) y las dos células sinérgidas (Frost y Soost 1968, Esau 1982, Jackson 1997).

Según Jackson (1997), la maduración del saco embrionario ocurre varios días previos a la antesis en pomelo "Foster", en antesis en naranja dulce "Pineapple" y días posteriores a la antesis en naranja "W. navel" y en mandarina "Satsuma".

2.2.2.2 Microsporogénesis y gametogénesis masculina

En cada uno de los 4 lóculos de las anteras, habrá un microesporangio: o saco polínico, dónde se formarán las micrósporas y posteriormente, éstas darán lugar a los granos de polen o gametofitos masculinos. En el saco polínico, a partir de las células arqueospóricas se formará el tejido arqueospórico, el cual dará lugar a células parietales y esporógenas. Las primeras formarán al tapete, tejido de reserva que nutre a las células madre del polen y las segundas darán lugar a las células madres de la micróspora. Se destaca el rol del tapete en depositar sustancias responsables de reacciones de incompatibilidad en el estigma. En cada antera los cítricos producirán aproximadamente 16.000 granos de polen (Esau 1982, Lersten 2004).

La micróspora experimentará una división mitótica dando lugar a dos núcleos uno vegetativo y otro generativo y así queda constituido el grano de polen (gametofito bicelular). Éste tiene dos cubiertas, la exina, muy resistente debido a una sustancia llamada esporopolenina y cuya función es la protección de ambos núcleos hasta el momento de la germinación, y la intina, formada por capas delgadas de celulosa, cumpliendo la función de formar el tubo polínico (Agustí 2003b, Tadeo et al. 2003).

Cuando los granos de polen están maduros, el endotecio, tejido que recubre al tapete, lo deshidrata y se produce la dehiscencia

Luego de la dehiscencia de las anteras y la polinización entomófila, el núcleo vegetativo formará el tubo polínico y previo a la fecundación, el núcleo generativo se dividirá mitóticamente dando lugar a los dos gametos masculinos o anterozoides. Uno de ellos se unirá a la oósfera y el otro a los dos núcleos polares, dándose de esta forma la doble fecundación característica de las angiospermas (Frost y Soost 1968, Esau 1982, Agustí 2003b).

2.2.3 Polinización

La polinización es la transferencia de los granos de polen de la antera al estigma (Frost y Soost, 1968). La forma natural de transporte de los granos de polen en especies monoicas o dioicas, es anemófila, es decir por el viento. Las angiospermas han desarrollado diversidad de formas florales, colores o de aromas, que por una parte atraen animales y/o néctar para alimentarse, y por otra, hacen de los animales un vector, que asegura el contacto del polen con la superficie estigmática. La viscosidad de los granos de polen facilita la adherencia tanto del estigma como del animal portador (Agustí, 2010). En el caso de los cítricos, el polen es pesado y pegajoso, y por lo tanto, difícilmente es transportado por el viento, por lo que la polinización es principalmente entomófila, y son las abejas melíferas (*Apis mellifera*) las principales polinizadoras. La corola vistosa, el fuerte perfume, su polen y abundante néctar hacen muy atractivas a las flores de los cítricos (Frost y Soost 1968, Wright et al. 2013).

Se denomina autopolinización cuando el polen de una flor es transportado al estigma de la misma, o de una flor de la misma planta o clon. Por otro lado se denomina polinización cruzada cuando el polen es transportado al estigma de una flor de otra variedad o especie, diferente genéticamente (Frost y Soost, 1968).

La polinización cruzada es un problema para la citricultura, debido que aumenta el número de semillas por fruto, disminuyendo el valor comercial, y por lo tanto la aceptación por los mercados para consumo en fresco. En contraposición la presencia de semillas aumenta el tamaño de los frutos y promueve el cuajado (Vithanage, 1991).

Chao et al. (2005a) demostraron que el polen de las mandarinas “Clementina de Nules” y “Afourer” puede ser transportado 500 y 960 metros respectivamente. Esta capacidad de transporte a largas distancias hace casi inevitable que se lleve a cabo el cruzamiento entre variedades intercompatibles y como consecuencia la presencia de semillas en variedades autoincompatibles.

2.2.3.1 Período efectivo de polinización (PEP)

El período efectivo de polinización (PEP) es el tiempo durante el cual la flor es capaz de cuajar a fruto, bajo polinización no limitada. Este período se puede expresar como la longevidad del óvulo, menos el tiempo transcurrido entre la polinización y la fertilización, considerando que el tiempo final calculado no exceda el período de receptividad del estigma (Williams, 1965). Éste condiciona la fecundación y por lo tanto la presencia de semillas en los frutos. Los principales factores que determinan la PEP son la receptividad estigmática, el crecimiento del tubo polínico y la longevidad del óvulo (Mesejo, 2007a).

Mesejo et al. (2007b) han demostrado para cítricos que el PEP es dependiente del genotipo, alcanzando una duración de 8-9 días en mandarina “Clementina”, y naranjo “Valencia”, siendo el factor limitante la receptividad del estigma, y 2-3 días en mandarina “Satsuma”, siendo en ésta la escasa longevidad de los óvulos, el factor limitante. La degeneración del óvulo está relacionada con la aparición de calosa en el extremo chalazal. La calosa inhibe el transporte de azúcares hacia los óvulos (Rodrigo y Herrero, 1998).

2.2.3.2 Factores que afectan la polinización

La polinización puede verse afectada por factores ambientales, hormonales y nutricionales. Dentro de los ambientales, la temperatura y la humedad relativa son los más importantes (Agustí, 2010).

La temperatura puede afectar la polinización de forma indirecta, sobre la eficacia de las abejas, o directamente sobre la germinación de los granos de polen, crecimiento de los tubos polínicos y longevidad de los óvulos (Sozzi 2007, Agustí 2010). A temperaturas medias de 20-22 °C la eficacia de las abejas como transportadoras de polen es máxima, y nula a temperaturas inferiores a 12°C (Azcón–Bieto y Talón, 2008). El viento y la lluvia dificultan su vuelo, disminuyendo su eficacia como polinizadoras (Agustí, 2010). Cuando la humedad relativa se encuentra por debajo del 50%, se reduce la retención de los granos de polen por el estigma; por encima del 90% dificulta la dehiscencia de las anteras o reduce la fijación del polen (Agustí, 2010). Las temperaturas alcanzadas en los estadios fenológicos 55 y 56 (BBCH, Agustí et al., 1995), tienen un mayor efecto en la viabilidad del polen, que las ocurridas durante toda la floración (Pardo et al., 2007).

Distefano et al. (2012), no observaron germinación de polen *in vitro* a temperaturas menores a 10°C, en “pummelo”, mandarino “Dancy”, citrón y Clementina. Al aumentar la temperatura, desde 15 a 25°C, aumenta el

porcentaje de germinación del polen, siendo el máximo a 25°C, esto último refleja el origen subtropical de los cítricos. Rubio et al. (2017), trabajando con diferentes variedades de limones, registran que días con temperaturas iguales o menores a 25°C en los momentos de floración y polinización, aumenta el porcentaje de frutos sin semillas, y disminuye el número de semillas por fruto, indicando una disminución en la germinación de los granos de polen.

La fertilidad masculina y femenina esta positivamente correlacionada. Pardo et al. (2007) reportan diferencias importantes en la capacidad de germinar del polen de los cítricos, siendo valores de 70% o superiores para mandarinas e híbridos de mandarinas, valores bajos de 17,7% en naranjos, y muy bajos en mandarina Satsuma (6%).

En cítricos, la capacidad germinativa del polen es altamente variable, pero porcentajes de germinación en el estigma superiores al 10%, son suficientes para asegurar la fecundación en condiciones no limitantes de temperatura (Gravina, 2014).

2.2.4 Germinación y crecimiento del tubo polínico

Los granos de polen que logren llegar a la superficie estigmática de la flor, son retenidos por las secreciones estigmáticas, se rehidratan y liberan proteínas que reaccionan con otras proteínas liberadas por el propio estigma. El reconocimiento favorable entre el polen y el estigma estimula la germinación. Puede ocurrir que el grano de polen sea inhibido por el estigma (incompatibilidad esporofítica) y no haya germinación, o que el tubo polínico detenga el crecimiento en el estigma, en el estilo, o en el ovario (incompatibilidad gametofítica). La apertura de la exina marca la germinación del grano de polen, y la célula del tubo polínico inicia la formación de éste alargando la intina (Lersten, 2004).

Los tubos polínicos comienzan su crecimiento en el estigma, creciendo por canales estilares o por espacios entre éstos, hacia los óvulos (Tadeo et al., 2003). En las partes más viejas del tubo polínico se va depositando calosa, la que se deposita en la porción terminal del tubo y ayuda a mantener la turgencia necesaria para el crecimiento (Esau 1982, Vasil 1987). El ovario y el óvulo proporcionan señales que orientan y dirigen el tubo polínico en el curso correcto. Existen tres evidencias que respaldan esta hipótesis. Una se relaciona con los cambios en el desarrollo de los tejidos femeninos y cómo afectan el crecimiento del tubo de polen. El segundo se refiere a mutantes defectuosos del óvulo, que inducen una guía defectuosa del tubo de polen. Y el tercero se refiere a las posibles moléculas involucradas en esta señalización (Herrero 2001, Mesejo et al. 2007b).

Mesejo et al. (2006), estudiando la aplicación de sulfato de cobre en la inhibición del crecimiento del tubo polínico y en la germinación de los granos de polen, establecen que el momento adecuado para su aplicación es el eje central de esta técnica, ya que una flor se encuentra abierta 5-7 días, mientras que el período de plena flor es de por lo menos 20 días. Sin embargo estos autores concluyen que la aplicación al momento del 60% de plena flor, es efectivo para reducir el número de semillas por fruto, y el número de frutos sin semilla. Garmendia et al. (2019), trabajando en mandarina “Afourer” en búsqueda de medidas de manejo para la reducción del número de semillas, encuentran que el tratamiento con sulfato de cobre + GA₃ redujo el número de semillas por fruto solo en 35%, y esta eficiencia claramente no fue suficiente para reducir el número de semillas con fines comerciales. Para condiciones de Uruguay, los resultados fueron similares; la aplicación de GA₃ durante el período de floración redujo el porcentaje de frutos con semilla y el número de semillas por fruto, siendo el tratamiento más eficiente el de la triple aplicación de GA₃ (50 mg l⁻¹) combinadas con CuSO₄ (25 mg l⁻¹), que aumentó la fruta sin semillas de 19% a 31% y redujo de 3,7 a 2,3 el número de semillas por fruta (Gambetta et al., 2013).

Chouza et al. (2011), trabajando en mandarina “Montenegrina” (autocompatible) en Uruguay, determinaron el efecto de distintas combinaciones, concentraciones, y número de aplicaciones de GA₃, CuSO₄, y ANA, en la germinación del polen *in vitro*, en el crecimiento del tubo polínico, y en la inducción de la partenocarpia a campo. De todos los tratamientos inductores de partenocarpia, el GA₃ y CuSO₄, fueron los más efectivos en inhibir la germinación de polen *in vitro* y el crecimiento del tubo polínico. Sin embargo, cuando las aplicaciones se realizaron a los árboles y no a flores individuales, no fue posible eliminar la presencia de semillas en los frutos. El tratamiento más efectivo fue la aplicación simple o doble de GA₃, con una reducción promedio de 2 semillas por fruto.

2.2.5 Fecundación

La fecundación es la etapa reproductiva en la cual se forma el cigoto y el endospermo. En este proceso uno de los núcleos espermáticos se une con la oósfera y el otro con la célula media, llevándose a cabo la doble fecundación (Esau, 1982)

Luego de la fecundación los óvulos se transforman en semillas, en cambio los otros abortan. En variedades partenocárpicas los óvulos no son fecundados, y por tanto, las semillas no se desarrollan, quedando reducidas a pequeños rudimentos seminales (Agustí, 2010).

2.2.6 Formación de semillas

Según Frost y Soost (1968) las semillas de los cítricos son mono o poliembriónicas, y pueden contener entre 1 a 7 embriones. Únicamente uno de los embriones es originado de forma sexual, y genera variabilidad genética, mientras que el resto (nucelares) serán clones de la planta madre (Tadeo et al., 2003). En el caso de los cítricos es común la formación de embriones nucelares. El estímulo de la actividad del tubo polínico y de los reguladores del crecimiento es necesario para promover el desarrollo de estos embriones (Frost y Soost 1968, Jackson 1997).

Los cotiledones son de color blanco, crema o verdes y constituyen la mayor parte de la semilla madura (Jackson, 1997).

2.2.7 Cuajado

En sentido estricto el cuajado es el reinicio del crecimiento del ovario posterior a la antesis, y por lo tanto su transición del ovario de la flor, a fruto en desarrollo. Este proceso está regulado por factores exógenos y endógenos (nutricionales y hormonales, Talón, 1990). En sentido amplio el cuajado comprende el período de crecimiento durante el cual el fruto puede sufrir abscisión (Sozzi, 2007). La abscisión de frutos es un mecanismo interno de regulación, en el cual la planta ajusta el número de frutos (Spiegel-Roy y Goldsmichdt, 1996).

Inicialmente el cuajado es dependiente del balance hormonal, para posteriormente depender del aporte de carbohidratos. Las giberelinas aumentan la capacidad de fosa de los frutitos, y por lo tanto la nutrición mineral y el aporte de carbohidratos. Por otro lado, el ácido abscísico en condiciones de estrés, estimula la abscisión de frutitos. Lo mismo sucede si la demanda de carbohidratos no es satisfecha (Agustí 2003a, Iglesias 2007). Los factores exógenos, como pueden ser los climáticos o el manejo, inciden también en el cuajado de los frutos cítricos (Agustí, 2003a).

2.2.8 Manejo del cuajado

El rol de las giberelinas en el reinicio del crecimiento del ovario, ha sido ampliamente estudiado. En las variedades que presentan semillas, éstas son la fuente principal del aporte de giberelinas, por lo tanto es necesaria la polinización, y posterior fecundación para asegurar el cuajado del fruto, de lo contrario ocurrirá abscisión. Fasiolo y Rey (2013), trabajando con mandarina "Afourer", encuentran que una menor presencia de semillas en frutos de libre polinización, determinó un menor cuajado final de éstos. Más recientemente

Gravina et al. (2016), comprueban que la aplicación de GA₃ en plena floración combinado con anillado de tronco 30 días después, permite incrementar la productividad de 'Afourer' en condiciones de polinización impedida, alcanzando niveles similares a los obtenidos en libre polinización; verificándose el rol de las giberelinas y carbohidratos en el cuajado. En las variedades partenocárpicas la pared del ovario en activo crecimiento es la que cumple el rol de sintetizar las giberelinas y asegurar el cuajado (Agustí 2003a, Iglesias et al. 2003, 2007).

Mesejo et al. (2013) comprobaron que la alta capacidad de cuajado de la mandarina Satsuma se asocia a altos contenidos endógenos de giberelinas en los ovarios en desarrollo, mientras que en mandarina "Clementina" los contenidos de dicha hormona son bajos y por lo tanto su porcentaje de cuajado se ve reducido notoriamente. Además, aplicaciones de ácido giberélico incrementan el cuajado en "Clementina", pero no tienen efecto en Satsuma (Talón et al., 1992).

Los cítricos producen brotes con hojas o sin hojas, y la proporción de éstos dependerá de las especies y variedades. Por ejemplo, el grupo de las mandarinas "Satsuma" producen únicamente en brotes solitarios y brotes vegetativos. El tipo de brote donde se desarrolle el fruto afectará la probabilidad de cuajado de éste, siendo mayor en los brotes con hojas (Da Cunha Barros y Gravina 2006, Agustí et al. 2014).

Por otro lado, flores ubicadas en brotes mixtos de brotación tardía de primavera, poseen mayor porcentaje de cuajado, debido a la menor competencia inicial, a que se desarrollan a temperaturas más altas (Lovatt, 1984), y que presentan mayor área vascular (Erner y Shomer, 1996) en comparación con los brotes sin hojas. Esto último aumenta la capacidad de transporte de agua en brotes mixtos.

Altas floraciones determinan una mayor competencia de las flores en desarrollo y muchas de ellas abscisionan. Una medida de manejo para aumentar el cuajado es la aplicación de GA₃ invernal, la cual tendrá efecto en inhibir la inducción floral de varias yemas. En la siguiente primavera habrá una redistribución del tipo de brotes, incrementando los vegetativos y reduciendo los generativos, por lo tanto, una mayor probabilidad de cuajado. Gambetta et al. (2008) trabajando en mandarina Nova en condiciones de Uruguay, comprueban que el cuajado en plantas tratadas con GA₃ invernal fue significativamente mayor al control.

El anillado de tronco es otra medida de manejo muy utilizada, que logra aumentar el número de frutos cuajados. Consiste en interrumpir de forma transitoria el floema, mediante un corte de aproximadamente 1 mm de espesor. Esto hace que se acumulen nutrientes minerales y carbohidratos en la parte

aérea de la planta, fundamentales para el cuajado (Agustí et al., 2014). Meohuachi et al. (1995) obtienen correlaciones positivas entre los niveles de sacarosa y el crecimiento de la fruta y negativas con la abscisión de la fruta. El aporte de carbohidratos en mandarina Satsuma es más importante a partir de 35 días post-floración que en el período previo (Meohuachi et al., 1995).

Los factores ambientales más importantes que limitan el proceso de cuajado, son condiciones de altas temperaturas, alta radiación, y/o estrés hídrico.

Fasiolo et al. (2010) trabajando en tangor “Ortanique”, encontraron que para la zona Norte del Uruguay, la acumulación de temperaturas superiores a 30°C, produce una importante caída de frutitos. Estos autores comprueban que el cuajado final es mayor cuando las plantas son cubiertas con mallas negras, dónde se acumularon menos horas de temperaturas superiores a 30°C. Correlaciones negativas entre temperatura y cuajado fueron reportadas también por Borges et al. (2009) en el mismo híbrido.

Los cítricos tienen una tasa de asimilación neta de CO₂ relativamente baja con respecto a otros frutales y un punto de saturación también bajo, en el rango de 700-900 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Blanke, 2000), aproximadamente un tercio de la luz total incidente (Syvertsen et al., 2003). Condiciones de alta radiación, en presencia de algún otro factor de estrés (estrés hídrico), puede dar lugar al proceso de fotoinhibición, esto es, la disminución en la fotosíntesis por exceso de luz (Blanke, 2000).

Los suelos de Uruguay con gran capacidad de retención de agua, y las precipitaciones distribuidas a lo largo del año, contribuyen a que en esta etapa fisiológica, no se generen frecuentemente condiciones de estrés hídrico. En experimentos realizados en naranja “Valencia” y tangor “Ortanique”, al Sur del país, no se logró incrementar el cuajado de las parcelas regadas, en comparación con las testigo (García y Castel 2007, Borges et al. 2009).

2.2.9 Crecimiento y desarrollo de frutos cítricos

El fruto de los cítricos es una baya denominada hesperidio. Está formado por aproximadamente diez carpelos alrededor del eje floral, en contacto entre sí, formando así los lóculos. Dentro de éstos últimos se alojan las semillas y las vesículas de jugo (Agustí, 2003a).

En la zona exterior a los lóculos se encuentra la pared del ovario, que una vez formado el fruto se denomina pericarpio, el cual se subdivide en tres zonas. La más externa y visible del fruto es el exocarpo o flavedo, formada por

una epidermis, cubierta por una cutícula y unida a ella varias células parenquimáticas. Es de color verde en fases inmaduras de desarrollo, y naranja o amarillo (según la especie) en la madurez (Agustí, 2003a). La zona más interna del pericarpio es el endocarpo, y constituye parte de la membrana locular. Está formado por una epidermis en su región más interna y varias células parenquimáticas. Durante la fase uno de desarrollo del fruto, sus células originan las vesículas de jugo. El mesocarpo o albedo se encuentra entre ambos, formado por tejidos parenquimáticos de varias filas de células, y con grandes espacios intercelulares. Cuando el fruto madura la corteza (flavedo y albedo) se separan del endocarpo.

En los cítricos el desarrollo del fruto sigue una curva sigmoide, desde la floración a maduración del fruto. Se caracteriza por presentar tres fases bien diferenciadas (Bain, 1958).

La fase 1 se caracteriza por un rápido crecimiento del fruto, y se extiende desde la antesis hasta fin de la caída fisiológica. El crecimiento de forma exponencial es el resultado de la alta división celular en todos los tejidos en desarrollo a excepción del eje central. El aumento en el tamaño del fruto en esta fase se debe principalmente al crecimiento de la corteza (flavedo y albedo). También hay un aumento del volumen del endocarpo (Agustí, 2003a). Existen dos períodos de abscisión: en el primero la zona de abscisión es entre el pedúnculo y el tallo, en el segundo se da por la región de unión entre el disco floral y el ovario (Spiegel-Roy y Goldshmidt, 1996). Aquí se determina el número final de células que tendrá el fruto, y el potencial de crecimiento del mismo (Agustí y Almela, 1991)

La fase 2 o crecimiento lineal se prolonga por varios meses, ésta va desde final de caída fisiológica hasta poco antes de cambio de color. En esta fase predomina la elongación celular, y es promovida por la presencia de giberelinas y auxinas. La aplicación de auxinas promueve el crecimiento del fruto (Guardiola et al., 1993). Los lóculos son los responsables del aumento de tamaño del fruto en esta fase. En su interior las vesículas de jugo alcanzarán su máxima longitud y volumen (Agustí, 2003a).

La fase 3 o maduración, tiene una baja tasa de crecimiento, y en ella se desarrollan características externas (color) e internas (contenido de jugo, azúcares, acidez, etc). El cambio de color de la corteza es debido a la degradación enzimática de clorofilas en el flavedo y a la síntesis de carotenoides (Alós et al. 2006, Gambetta 2009). Entre los carotenoides, la violaxantina es el que más se incrementa y el más abundante en la piel de los cítricos. Por otro lado pigmentos como β -cryptoxantina (naranja) y la β -citaurina (rojo) son los que promueven el color de los cítricos a la madurez (Alós et al., 2006). La aplicación exógena de etileno, produce cambio de color

en el flavedo, promoviendo la degradación de clorofilas (Pons et al., 1992). El ABA se acumula en el flavedo al momento de la maduración (Rodrigo et al., 2003). Gambetta et al. (2012), demuestran que la presencia de giberelinas al momento de la maduración en el flavedo, impide el cambio de color. Los mismos autores notan un incremento de azúcares reductores en el flavedo al momento de la maduración. El cambio de color se produce cuando la temperatura del aire disminuye por debajo de 12,8 ° C (Stearns y Yung, 1942). Normalmente este proceso coincide con la maduración interna, en la cual se da un aumento de azúcares, y compuestos nitrogenados, y una disminución de la acidez como consecuencia de su dilución y metabolización (Agustí, 2003a).

Existen factores endógenos y exógenos que afectan el crecimiento final del fruto. Dentro de los primeros, se destacan los genéticos, la posición del fruto en el brote y la competencia entre órganos en desarrollo.

Se ha demostrado que la presencia de hojas en el brote estimula el desarrollo del fruto a través de una mayor velocidad de crecimiento de éste. En un trabajo en tangor "Ortanique" en el cual se consideraron los distintos tipos de brotes, el porcentaje de cuajado de los terminales fue de 39.2%, seguidos por los mixtos (16.8%), los solitarios (9.9%) e inflorescencias (7.2%, Da Cunha Barros y Gravina, 2006). Las hojas jóvenes adquieren un papel fundamental como fuente de carbohidratos. Las diferencias en el tamaño final del fruto se inician en estados muy precoces del desarrollo del ovario (Guardiola et al., 1984), y son consecuencia del mayor contenido hormonal de los ovarios situados en brotes con hojas (Sagee y Erner, 1991). Estos autores, trabajando en naranja dulce (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) encuentran que la proporción de GA a ABA en frutitos, siempre fue mayor en inflorescencias con hojas que en sin hojas, alcanzando un pico un mes después de la apertura de la flor. Esto último aumenta la capacidad de estos frutos de atraer nutrientes del resto de la planta, en momentos que las hojas en desarrollo actúan de sumidero y no cubren con las exigencias de los frutos (Agustí, 2003a).

Cuanto mayor es la intensidad de la floración, antes comenzará la abscisión de frutitos. Es por eso que al reducir la intensidad de floración, el tamaño de los ovarios al momento de la antesis serán mayores, revelando que la competencia comienza en etapas tempranas del desarrollo floral (Guardiola et al., 1984)

Es clave la disponibilidad de carbohidratos no solamente para la supervivencia de los frutos, sino que también para su crecimiento (Mehouachi et al., 1995). La competencia entre órganos en desarrollo, es el otro factor interno que afecta de forma significativa el tamaño final del fruto. Cuanto mayor es el número de frutos, mayor será la competencia entre ellos, por minerales y carbohidratos, habrá menor crecimiento de cada órgano y por lo tanto menor

será el tamaño final. El tamaño final de un fruto se encuentra inversamente correlacionado con el número de frutos por árbol (Agustí, 2003a). Por otra parte existen correlaciones significativas entre el número de frutos y el número de semillas (Pardo et al., 2010)

Entre los factores exógenos que presentan una marcada influencia en la determinación del tamaño final, los más destacados son las condiciones climáticas, y edáficas, así como las prácticas culturales.

La acumulación de carbohidratos y nutrientes en el fruto, y por lo tanto su crecimiento están directamente relacionados con la temperatura. Altas temperaturas en etapas iniciales de crecimiento del fruto provocan una reducción de la tasa de crecimiento y hasta una abscisión masiva de frutos (Reuther 1973, Borges et al. 2009, Fasiolo et al. 2010). También las temperaturas promueven la reducción del tiempo transcurrido entre plena floración y maduración (Agustí, 2003a).

Dentro de los factores del ambiente, la disponibilidad hídrica es el más importante (González-Altozano y Castell, 1999). El tamaño final del fruto se verá notoriamente reducido si el suministro de agua no es suficiente en fase 2 de crecimiento, mientras que lluvias o riegos frecuentes logran un tamaño mucho mayor (Agustí, 2003a) El período más crítico en cuanto a la reducción del riego es en la primavera, en la etapa de floración cuajado. Sin embargo, el riego deficitario al final del verano-otoño reduce el tamaño de los frutos, disminuyendo su valor comercial. Por otra parte, el riego deficitario controlado, durante la fase de crecimiento inicial del fruto (pleno verano) permitió ahorros de agua entre 6% y 22% sin afectar la producción, ni el tamaño de los frutos (González-Altozano y Castel, 2003). Garzón (2012) afirma que el uso de riego luego de una época seca de dos meses mejora la calidad del fruto aumentando su diámetro ecuatorial y el número de frutos por árbol. La aplicación de riego por goteo desde el inicio de primavera al principio del otoño, cuando se aplica el 100% de la ETC incrementa el rendimiento y el tamaño de fruta exportable (García y Castel, 2007). Los frutos ubicados en brotes con hojas, presentan pedicelos con una mayor área vascular, favoreciendo el transporte de agua y nutrientes (Erner y Shomer, 1996), y obteniéndose frutos de mayor tamaño (Bustan et al., 1995)

La nutrición mineral es otro factor que afecta el tamaño final del fruto, ya que la falta de nutrientes altera el desarrollo de la planta. El efecto de estas deficiencias sobre el tamaño y calidad del fruto, son variables y depende del elemento mineral en cuestión y del momento que ocurra. Los elementos con mayor incidencia en el crecimiento del fruto son potasio y magnesio (Agustí, 2003a).

2.2.10 Partenocarpia

La formación de frutos sin que ocurra fecundación recibe el nombre de partenocarpia (Figura 1, Vardi et al. 2008, Agustí 2010). La principal característica que presentan estos frutos es la ausencia de semillas. Para explotar esta característica tan apreciada por el mercado, es necesario que la variedad tenga una fuerte esterilidad. Para el caso de variedades autoincompatibles, es posible la aplicación de diferentes mediadas de manejo, como son: utilización de mallas, o la aislación de otras variedades que actúan como fuentes de polen.

Son muchos los factores que condicionan la partenocarpia, tanto de origen endógeno como exógeno. En cuanto a las condiciones ambientales se ha observado que temperaturas por encima de 20°C y humedades relativas por encima de 85% promueven la formación de frutos partenocárpicos (Pardo et al. 2007, Agustí 2010, Distefano et al. 2012, Rubio 2017). El papel de las hormonas vegetales como promotores de la partenocarpia es claro. El crecimiento de los tejidos del ovario es consecuencia de la síntesis de giberelinas en ellos. En variedades de baja habilidad partenocárpica es posible la aplicación de ácido giberélico, para aumentar el número de frutos que completan el desarrollo (El-Otmani et al. 2000, Agustí 2010).

Vardi et al. (2008) clasifican la partenocarpia en obligatoria cuando siempre se producen frutos sin semillas, y en facultativa en la que la formación de frutos sin semilla será posible impidiendo la polinización.

La polinización, la germinación del grano de polen, y el desarrollo del tubo polínico, siempre y cuando no ocurra fecundación, pueden actuar como estímulos para iniciar el desarrollo del ovario. En los casos que la formación del fruto requiera de alguno de estos estímulos, Agustí (2010) la clasifica como partenocarpia estimulativa, y la que no requiera ningún estímulo externo como partenocarpia autónoma. A esta última Vardi et al. (2008) le llaman partenocarpia vegetativa.

En condiciones de Uruguay Gambetta et al. (2013) comprueban que la mandarina "Afourer", presenta autoincompatibilidad gametofítica, partenocarpia autónoma y facultativa, y que en condiciones de polinización aislada, genera frutos sin semilla. Borges et al. (2009) estudiando distintos factores que determinan el cuajado en tanger "Ortanique", encuentran que las flores 'sin emascular' (control) presentaron mayor porcentaje de cuajado que las flores emasculadas y embolsadas, lo que sugiere que esta variedad presenta partenocarpia de tipo estimulativa.

Mesejo et al. (2013), demuestran que la partenocarpia en dos variedades de Clementinas (“Clemenules” y “Marisol”), es independiente del estímulo de la polinización (autónoma), y su habilidad para cuajar depende de los niveles de hormonas en las paredes del ovario.

Las aplicaciones de auxinas no promovieron el cuajado, ya sea en mandarina “Satsuma” o mandarina “Clementina”. Por lo tanto, parece poco probable que la concentración de IAA libre sea un factor limitante en la activación del cuajado de los cítricos. Por otra parte, las aplicaciones de giberelinas suprimieron el crecimiento natural del ABA libre durante el desarrollo de mandarina “Clementina” (Talón et al., 1992)

Los resultados de Talón et al. (1992), sugieren que la concentración de giberelina endógena en ovarios en desarrollo, es el factor limitante que controla el desarrollo de la partenocarpia en citrus. La concentración de esta hormona en los ovarios se incrementa durante la caída de pétalos y en la transición de la fase uno (división celular) a la fase dos (elongación celular) de crecimiento de fruto (Talón et al., 1990). Complementariamente, los resultados de Mesejo et al. (2016), sugieren que en los cítricos partenocárpico, la síntesis específica de giberelinas en las paredes del ovario, desencadena la división celular y, por lo tanto, la tasa de crecimiento del ovario necesaria para el cuajado y posterior crecimiento del fruto. El nivel de giberelinas en los ovarios también parece estar relacionada con la acumulación de carbohidratos en estos (Bermejo et al., 2015).

El número de frutos cosechados y el rendimiento, puede ser incrementado con la aplicación de ácido giberélico (GA_3 50 mg L⁻¹) en plena floración, en conjunto con un anillado de tronco 30 días post-floración. Además en los experimentos realizados en plantas de mandarina “Afourer”, con polinización impedida, entre el 95 % y el 96 % de los frutos no presentaron semillas; el porcentaje de jugo, los sólidos solubles totales y la acidez no fueron afectados por los tratamientos (Gravina et al., 2016).

Las mandarinas híbridas M9 y B30, y la naranja valencia “Victoria”, son ejemplos nacionales de variedades de buena habilidad partenocárpica (Mautone, 2016). Por otro lado en cultivares de baja habilidad partenocárpica, como mandarina “Nova”, la presencia de cultivares polinizadores incrementa el cuajado y el tamaño de frutos (Papadakis et al., 2009).

La estenospermocarpia es el desarrollo de frutos con semillas parcialmente formadas, debido a un aborto de los embriones luego de la fecundación (Figura 1). En los frutos maduros se podrán observar esbozos rudimentarios, y no semillas (Podestá, 2007), por lo que ésta es otra forma de formación de frutos sin semilla en la cual ocurre fecundación. Los factores que

regulan la estenospermocarpia en los cítricos son desconocidos (Mesejo et al., 2014).

Mesejo et al. (2014), en mandarina “Afourer”, trabajaron interfiriendo en la división celular de los óvulos con hidrazida maleica (MH), un regulador del crecimiento sistémico, induciendo estenospermocarpia en condiciones de polinización cruzada, obteniendo un número y tamaño de semillas significativamente reducidos, y aumentando el porcentaje de frutos sin semilla. La MH también obstaculizó la división celular en las paredes ováricas, mesocarpio y endocarpio, reduciendo así el crecimiento diario de los frutos y aumentando su abscisión. La estenospermocarpia solo se pudo inducir por un corto período de tiempo de 7 a 21 días post antesis, y la magnitud de la respuesta fue óptima a una concentración de de 600 mg.l⁻¹ de HM, aplicado 14 días post antesis.

Las naranjas “Navel” y las mandarinas “Satsumas” poseen polen estéril, y la mayoría de los sacos embrionarios abortan, por eso producen frutos partenocárpicos aún en libre polinización. Por otra parte, la mandarina “Clementina de Nules”, el tangor “Ellendale” (Vithangae, 1991) y “Ortanique” (Borges et al., 2009) son autoincompatibles, y formarán frutos con semillas en polinización cruzada, pudiendo formar frutos partenocárpicos en aislación.

2.2.11 Esterilidad e incompatibilidad

Bajo el punto de vista frutícola, la existencia de flores hermafroditas puede verse como una gran ventaja. Pero por otro lado, su existencia asegura la autogamia, y con ella la consanguinidad. Es por ello que las angiospermas han desarrollado variaciones florales tendientes a facilitar la alogamia, con el fin de asegurar diversidad (Agustí, 2010). Diversas causas pueden impedir la fecundación (Podestá, 2007); el estilo y el estigma tienen un papel importante, impidiendo, en muchos casos, la germinación del polen del mismo individuo y hasta de la misma flor (Agustí, 2010), lo que se denomina autoincompatibilidad.

La esterilidad puede verse inducida por causas climáticas. Así, la carencia de algunos nutrientes como son el boro, y el calcio, pueden disminuir la capacidad germinativa del polen, el bajo contenido de nitrógeno puede provocar aborto de ovarios, la falta de horas de frío puede afectar la formación de órganos sexuales (Podestá, 2007). Sin embargo las que tienen verdadera importancia son las causas genéticas (Agustí, 2010).

Se han descrito tres tipos de esterilidad genética. La primera, esterilidad gamética o también llamada morfológica, tiene lugar cuando existe desarrollo deficiente o ausencia de estambre (androesterilidad) o de ovarios

(ginoesterilidad). En segundo lugar, la esterilidad homogenética o factorial, que ocurre cuando el polen funcional no puede fecundar flores del mismo cultivar (autoincompatibilidad) o de otro cultivar (interincompatibilidad). En último lugar, la esterilidad citológica, que hace referencia a alteraciones de la meiosis durante la gametogénesis (Podestá 2007, Agustí 2010).

2.2.11.1 Esterilidad gamética o morfológica

La esterilidad gamética es la inhabilidad de producir polen o sacos embrionarios funcionales (Figura 2, Jackson, 1997). Es causada por diversos factores genéticos tales como presencia de genes de esterilidad, anomalías cromosómicas y triploidía (Ollitrault et al., 2007).

Dos ejemplos de esterilidad gamética masculina, son el grupo de las naranjas “Navel” o de ombligo y las mandarinas “Satsuma”. En las naranjas del grupo navel, las células madres del polen se diferencian, pero luego degeneran antes de dividirse y, por lo tanto, no se produce polen maduro y viable en las anteras. En mandarina “Satsuma” la esterilidad es consecuencia de un bajo número de células madre y/o de la degeneración de las mismas durante su desarrollo, lo que resulta en un bajo número de granos de polen funcionales. En ambas variedades puede presentarse la esterilidad gamética femenina, debido a la degeneración de la célula madre de las megásporas (Frost y Soost, 1968). Las variedades que presenten óvulos no funcionales, producirán frutos sin semillas sin importar su cercanía a otras variedades de cítricos. Yamamoto et al. (1995) proponen que el grado de fertilidad o esterilidad femenina, puede ser clasificada sobre la base del número medio de semillas por fruto, obtenidas a través de la polinización manual.

En el Programa de mejoramiento genético de citrus nacional, se obtuvo el híbrido F4P2 que es triploide (Giambiasi et al., 2019), y se encuentra en evaluación por INIA y FAgro.

2.2.11.2 Esterilidad homogenética o factorial

La autoincompatibilidad es definida por de Nettancourt (1997) como la inhabilidad de una planta hermafrodita, de producir cigotos luego de una autopolinización.

En la llamada esterilidad homogenética, tanto el polen como los óvulos son fértiles, por lo que no sería un fenómeno de esterilidad en sí mismo, sino que la ausencia de semillas sería debido a la presencia de incompatibilidad. En este tipo de incompatibilidad, existen sistemas de reconocimiento genético

polen-pistilo, que interfieren el desarrollo del tubo polínico impidiendo que se lleve a cabo la fecundación (Figura 2). Si la incompatibilidad ocurre en flores de una misma planta o entre dos plantas de un mismo cultivar se denomina autoincompatibilidad. Si, por el contrario, la incompatibilidad es entre dos plantas de distinto cultivar se denomina incompatibilidad de cruce o interincompatibilidad (Agustí, 2003b). Como ejemplo de ésta última, Fasiolo y Rey (2013) encuentran para condiciones de Uruguay, que tanto el polen de limón “Lisbon” como el del tangor “Ortanique”, resultaron ser eficientes polinizadores de mandarina “Afourer”, autoincompatible, llegando a los óvulos a los 6 días post antesis.

Por otra parte, la esterilidad homogenética puede ser gametofítica o esporofítica (Agustí, 2003b), siendo la primera sugerida como sistema dominante por Soost (1969), en base a la segregación en plántulas autoincompatibles provenientes de diversos cruzamientos.

El sistema de autoincompatibilidad esporofítico (SAE) resulta de la interacción entre los fenotipos de esporofitos diploides, mientras que el sistema de autoincompatibilidad gametofítico (SAG), es el resultado de la interacción del gametofito masculino con el esporofito femenino.

En el SAE, el grano de polen no germina en la superficie estigmática, mientras que en el SAG sí lo hace. Si el alelo de incompatibilidad del polen, es idéntico a uno de los dos alelos del tejido estilar, el crecimiento de tubo polínico se retrasa y la fecundación rara vez ocurre (Poehlman y Sleper, 2003). Esto es debido a que comenzarán a sintetizarse RNA-asas que descompondrán el ARN del tubo polínico y como consecuencia inhibirá su crecimiento (McCure et al., 1990).

Según Lersten (2004), existe un mecanismo de rechazo activo, controlado genéticamente, que se da entre el polen y el pistilo basado en mensajes bioquímicos, y tendrá como consecuencia el reconocimiento por parte de la flor, entre su propio polen y polen foráneo.

Como ejemplos de autoincompatibilidad, se encuentra la mandarina “Clementina de Nules”, que en polinización forzada los tubos polínicos no progresan más de allá del extremo apical (Perez-Botella et al., 1997), y en condiciones del Uruguay, en mandarina “Afourer”, Gambetta et al. (2013) encuentran que el polen es capaz de germinar en el estigma, de desarrollarse en el estilo, pero no más de un 40-50% de su longitud total. Los tubos polínicos de “Afourer” detuvieron su crecimiento en la primera mitad del estilo 8 días post-antesis, confirmando que la reacción de autoincompatibilidad es de tipo gametofítico (Fasiolo y Rey, 2013). También para condiciones de Uruguay,

Inzurralde et al. (2010) demuestran la autoincompatibilidad del tanger Oranique.

2.2.11.3 Esterilidad citológica

Es un tipo de esterilidad que depende de las anomalías en la meiosis, durante los procesos de esporogénesis (Figura 2). Las flores son morfológicamente normales y las anteras producen polen, aunque la mayoría de las veces es escaso, o tiene poca capacidad germinativa. Este tipo de esterilidad afecta especialmente a las variedades triploides (Podestá, 2007). Los gametos de éstos, durante la meiosis, reciben distinto número de cromosomas, dando lugar a cigotos incapaces de desarrollarse. Esto no impide el desarrollo del fruto, pero las semillas de éstos no contienen embrión y no pasan de ser meros rudimentos seminales. La obtención de variedades triploides es de gran importancia en todos los planes de mejoramiento genético de cítricos, debido a que la ausencia de semillas es un factor de alta calidad (Agustí, 2010).

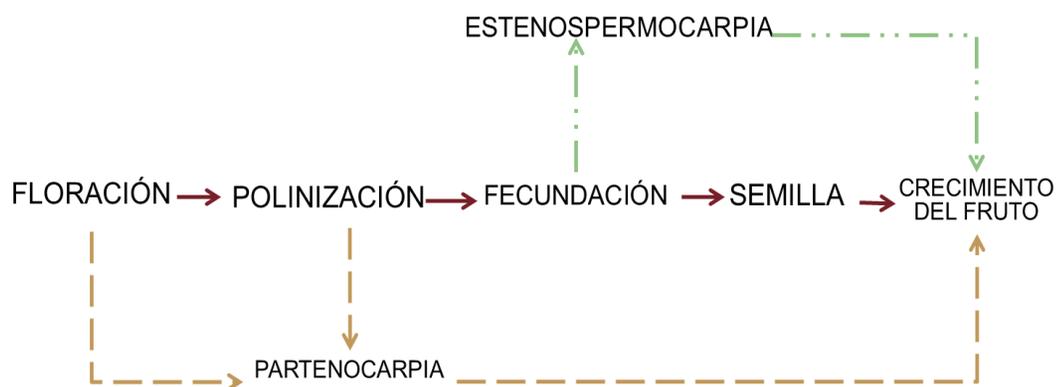


Figura 1. Procesos posibles entre floración y crecimiento del fruto

Fuente: adaptado de Podestá (2007).

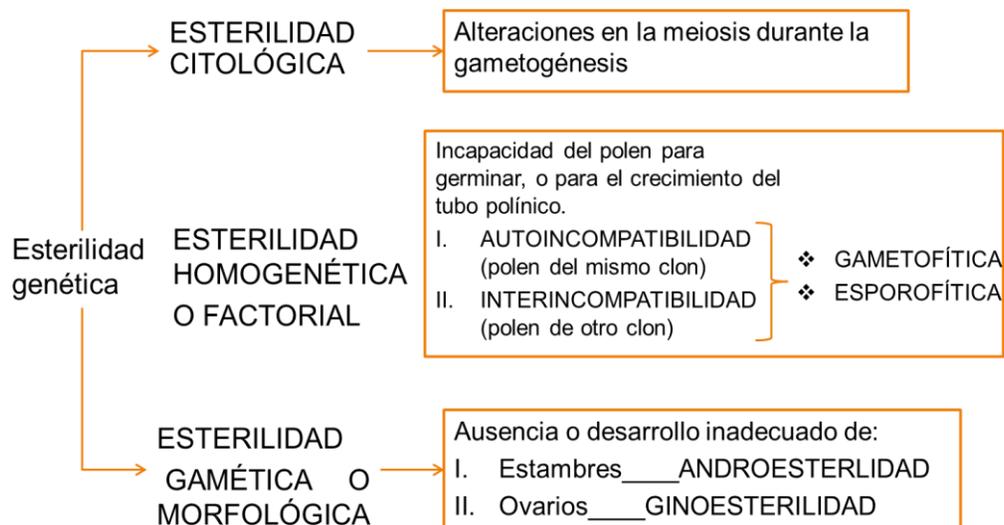


Figura 2. Tipos de esterilidad en cítricos

Fuente: adaptado de Podestá (2007), Agustí (2010).

2.2.12 Mejoramiento genético en cítricos

Los mercados, en los últimos años, han incrementado notoriamente las exigencias de calidad, considerándose dentro de los estándares, frutos sin semillas, de fácil pelado, buen color y textura de piel, alto contenido de azúcares, e inocuidad (Rivas et al., 2010). Dentro de un programa de mejoramiento genético (PMG), se abordan estas exigencias impuestas por consumidores y productores y se buscan soluciones a nivel genético (Giambiasi, 2014). Al mismo tiempo Agustí (2003a), señala que en un PMG deben ser considerados caracteres de producción y de calidad, y que los objetivos pueden variar de una región a otra (Khan et al., 2007).

Entre las líneas de mejora genética que actualmente se utilizan en la citricultura, se destacan: la selección clonal, la mutagénesis inducida, la hibridación sexual y la generación de poliploides, entre otras (Giambiasi, 2014).

2.2.12.1 Selección clonal, prospección, o mutaciones espontáneas

Los cítricos han sido propagados vegetativamente por varias generaciones, lo que genera una gran acumulación de mutaciones espontáneas (Giambiasi, 2014). Este hecho genera variabilidad, que puede ser utilizada en el mejoramiento genético (Ollitrault et al., 2012). La selección clonal busca identificar plantas o partes de ellas, con características de interés, generadas por mutaciones espontáneas. La gran mayoría de las variedades cultivadas tienen este origen, y por lo tanto éste es el método de mejora genética más utilizado. Entre ellas se destacan las del grupo “Navel”, “Clementinas”, “Satsumas” (Gmitter et al., 2007).

No todas las mutaciones detectadas, y ni siquiera las seleccionadas, tienen éxito garantizado; las mutaciones inestables y quimeras son algunas de las causas (Agustí 2003a, Roose y Williams 2007). Al mismo tiempo, existe una gran dificultad para la detección a campo de éstas. Sin embargo, este método permite obtener variedades mejoradas en alguna característica, sin perder la mayor parte de las propiedades de las mismas, y además porque al ser yemas el material de propagación, las nuevas plantas no presentarán características juveniles (Agustí, 2003a).

2.2.12.2 Mutagénesis inducida

Esta técnica permite el cambio de una o pocas características negativas de una variedad, sin modificar de forma significativa el fondo genético. La reducción del número de semillas se plantea como una de sus principales aplicaciones (Gmitter et al., 2009). Se basa en la aplicación de agentes mutagénicos sobre semillas o yemas, siendo el más utilizado la irradiación con rayos Gamma (De Rocca Serra et al. 1992, Ollitrault et al. 2012). Por otro lado la ventaja de utilizar tejidos haploides (generalmente polen o micrósporas), es que no se producen quimeras. Una vez encontrada y evaluada la mutación, el mejorador genético puede utilizarla como parental, en hibridaciones dentro de un PMG (Roose y Williams, 2007).

En la práctica, resulta complicado la obtención de variedades por éste método, debido a quimeras, mutaciones inestables, etc (Roose y Williams, 2007). Sin embargo, tiene las grandes ventajas ya mencionadas para mutaciones espontáneas (Agustí, 2003a).

2.2.12.3 Hibridación sexual

La hibridación convencional es un procedimiento para la obtención de nuevas variedades cítricas, que puedan utilizarse a nivel de producción comercial (Williams, 2005). Los pasos para realizar la hibridación según Williams (2005) son:

- Selección de los padres para el cruzamiento
- Hibridación de forma manual
- Cosecha del fruto híbrido
- Extracción y cultivo del embrión (en el caso de variedades poliembriónicas, se aísla el embrión cigótico para su cultivo in vitro) o semilla.
- Siembra de dichos híbridos, y estudio de la calidad de fruta, crecimiento vegetativo, resistencia a enfermedades y plagas, etc.

Sin embargo, el número de genotipos de interés obtenidos por hibridación sexual ha sido muy limitado. Las limitantes según Gmitter et al. (2009) son: el tiempo y espacio necesario, la poliembriónía, la depresión por endogamia y la juvenilidad.

2.2.12.4 Generación de poliploides

En el género *Citrus* los individuos diploides son los más habituales, sin embargo, se han encontrado e inducido triploides y tetraploides. Los triploides son estériles y por lo tanto tienen la capacidad de producir frutos sin semilla, y de no inducir la formación de semillas en otras variedades. Los tetraploides sirven como parentales para la obtención de triploides (Giambiasi, 2014).

Los triploides no poseen endospermo desarrollado, esto ocasiona la muerte del embrión, aunque la lima "Tahiti" es un triploide natural que logró sortear estas barreras y hoy en día es cultivada de forma comercial (Viloria et al. 2005, Ollitrault et al. 2007).

Los triploides pueden ser obtenidos por cruzamientos de individuos $2x \times 2x$, en el que en uno de los parentales debe ocurrir la formación de gametos no reducidos, o cruzamientos de individuos $4x \times 2x$. En todos los casos, es necesario rescatar los embriones formados, mediante técnicas de cultivos in vitro (Viloria et al., 2005).

Los tetraploides pueden formarse por dos vías: 1) por duplicación somática, la que puede ocurrir de forma natural, o inducirse mediante productos

químicos, o 2) por hibridación somática, basada en aislar, y posteriormente unir protoplastos, formando una única célula híbrida, de la cual se regenera una planta mediante cultivo in vitro (Ollitrault et al., 2012).

2.2.13 Programa de mejoramiento genético nacional

El Programa de Mejoramiento Genético de Cítricos que llevan adelante el INIA y la Facultad de Agronomía, cuenta con una selección de variedades nacionales que fueron creadas a partir de cruzamientos dirigidos entre padres con características destacadas (Moltini et al., 2018).

2.2.13.1 Características de los híbridos

Rivas et al. (2014), evaluaron durante 4 años las características organolépticas de diferentes híbridos de “Ellendale” x “Page”, entre los que se destacan, F3P8 y F2P3. El híbrido F3P8, presenta fruto de tamaño medio, buen color, forma achatada, quedando pocos residuos de albedo en la pulpa al pelarla, cáscara fina y consistencia intermedia, sabor excelente, jugoso y fundente, posee semillas en polinización cruzada, la cosecha es en el mes de julio. Como características del árbol, en general presenta vigor medio, hábito semi-erecto, buena densidad de follaje, sin espinas, buena productividad, y fructifica en ramilletes (Rivas et al., 2014). Algo muy valorado por los consumidores es el porcentaje de jugo, destacándose F3P8 dentro de las variedades existentes en el mercado, con valores superiores a 50% (Moltini et al., 2018).

F2P3 presenta frutos de tamaño medio, buena coloración, forma achatada, consistencia y calidad de piel muy buena (lisa), fácil pelado, adherencia a la planta en todo el ciclo, sabor excelente, textura crocante pero jugosa, muy alto contenido de azúcar y acidez aceptable, capacidad de producir frutos sin semilla en aislamiento aunque presenta semillas en polinización cruzada y tiene un período de cosecha extenso (junio a noviembre aproximadamente). Los árboles presentan vigor medio y porte abierto, con buena densidad de follaje y sin espinas. Los frutos se disponen de forma homogénea en la planta. Como resultado de 3 años de evaluación, Moltini et al. (2018), destacan el nivel de sólidos solubles (°Brix) de F2P3, alcanzando los 19°Brix, un contenido muy poco común en mandarinas.

Moltini et al. (2018) demuestran que la coloración de la pulpa de los híbridos de Ellendale x Page (ICC menor a 6), el contenido de vitamina C (25-32mg/100g), y la acidez, son las menores de los híbridos nacionales. Ésta última característica se combina con un nivel interesante de sólidos solubles. El

híbrido F2P3 en conjunto con A210 (híbrido de “Ellendale” x “Mandarina común”), y B30 (híbrido de “Ellendale” x “Satsuma Owari”), se destacan en la presencia de carotenoides (31-34 ug por gramo de pulpa), y en el contenido de fenoles (99 mg AG/pulpa, Moltini et al., 2018).

2.2.13.2 Características de los parentales

Los parentales son “Ellendale” y “Page”. “Ellendale” es una variedad australiana de alta calidad, descubierta como seedling en 1878 por E.A.Burridge en su propiedad en “Ellendale”, cerca de Bundaberg, en el estado de Queensland. Es un híbrido de naranja-mandarina (tangor) y su parentesco es desconocido (Saunt, 2000).

Los árboles son de gran tamaño, sin espinas, propensos a quebradura de ramas, aunque las selecciones nuevas se ven menos afectadas. El fruto es de tamaño medio a grande, aplanado y de maduración en media estación. La cáscara usualmente alcanza buenas coloraciones anaranjadas, es suave, y los frutos no presentan bufado (puffing). Presenta tendencia al rajado estilar, en condiciones de crecimiento de altas temperaturas y humedad. Presenta altos niveles de acidez, por eso es necesario dar tiempo a que estos valores bajen antes de la cosecha (Saunt, 2000).

La presencia de frutos sin semilla es variable. En polinización cruzada se puede encontrar hasta 20 semillas por fruto, pero en plantaciones de “Ellendale” en bloque pueden obtenerse frutos sin semilla (Saunt, 2000).

En las condiciones de España y Uruguay presenta altas floraciones y muy bajo porcentaje de frutos cuajados (rara vez supera el 5% en forma natural), por lo que requiere medidas de manejo para incrementar su productividad (Gravina et al., 1998).

Page, fue creada en Florida (EEUU) por Reece y Gardner en 1942, por cruzamiento del tangelo “Minneola” (pomelo “Duncan” x mandarino “Dancy”) con mandarina “Clementina”. Por lo tanto está compuesto por $\frac{3}{4}$ mandarina y $\frac{1}{4}$ pomelo, y se refiere a él como “híbrido de tangelo” (Saunt, 2000).

El árbol no presenta espinas, es muy vigoroso, y extremadamente productivo. Esto último provoca que las ramas se quiebren, y se plantea la necesidad de un soporte para evitarlo. Se destaca una notable caída de hojas en el período invernal. Sus frutos son bien coloreados, redondos, suaves, con gran cantidad de semillas (12), muy parecidos a una naranja pequeña, pero de fácil pelado. Sin embargo, no reúne características suficientemente buenas como para tener un potencial comercial (Saunt, 2000).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplir los objetivos de esta tesis se llevaron a cabo tres experimentos en condiciones de aislamiento de polinización cruzada; en dos de ellos se realizaron polinizaciones manuales y en el tercero, para confirmar la autoincompatibilidad y aproximarse a las condiciones comerciales de manejo, se cubrieron las plantas con malla excluidora de abejas.

3.1 EXPERIMENTOS 1 Y 2

Los dos primeros experimentos se realizaron en la estación experimental Wilson Ferreira Aldunate (Las Brujas), del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), ubicado en el departamento de Canelones, Uruguay (34°40'27.26''S; 56°19'31.13''O), en la temporada 2018-2019. Los mismos se llevaron a cabo en el módulo de evaluación de cultivares del programa nacional de mejoramiento genético de cítricos.

Se seleccionaron 15 plantas de los híbridos F3P8 y F2P3 (seedlings de mandarina híbrida "Ellendale" x "Page"), de las cuales 5 de cada uno se encontraban sobre el portainjerto citrange "Carrizo" [*Citrus sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], 5 sobre "Trifolia" (*P. trifoliata* (L.) Raf.), y 5 sobre "Flying Dragon" (*P. trifoliata* (L.) Raf.). Los árboles fueron plantados en el año 2015, en condiciones de riego localizado y recibieron un plan de fertirriego estándar.

En cada uno de los híbridos se marcaron 400 brotes de flor terminal en estado 59 de la escala BBCH (Agustí et al., 1995). Previo a la antesis se recolectaron otras flores de ambos híbridos, para la posterior extracción de las anteras y obtención del polen. Éstas se depositaron en placas de Petri con sílica gel durante 12 horas para la deshidratación y dehiscencia. Al día siguiente, los brotes marcados se emascularon con pinza y fueron polinizados artificialmente con un pincel fino (Figura 3). Aproximadamente la mitad de los brotes fueron autopolinizados y a los restantes se les realizó la polinización cruzada con el otro híbrido; el número de flores iniciales por tratamiento varió entre 172 y 194. Posteriormente a cada polinización, se colocó un capuchón de aluminio sobre el pistilo de las flores, y se embolsó el brote con malla blanca de tul hasta caída de pétalos.

Los experimentos se instalaron con una semana de diferencia, de acuerdo al estado fenológico de cada cultivar. El experimento 1 se realizó con el híbrido F3P8, que alcanzó el estado 59 de la escala BBCH el 5/10/2018 (fecha

1) y el experimento 2, con el híbrido F2P3, que lo alcanzó una semana después (fecha 2).



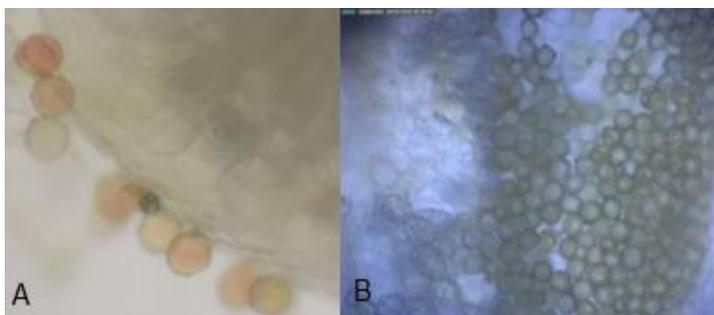
Figura 3. Emasculación, polinización y enmallado individual de las flores

A partir de caída de pétalos (aproximadamente 15 días después de la polinización) y hasta fin de caída fisiológica (enero), se registró semanalmente el porcentaje de frutos cuajados. El 22 de marzo se cosecharon los frutos de ambos híbridos. Se evaluó la presencia de semillas, el tipo de semilla (normal, vana, rudimentos seminales), peso y sus dimensiones. Posteriormente se calculó el número medio de semillas por fruto y el porcentaje de frutos con semillas.

En ambas fechas, previo a la polinización se analizó la viabilidad de polen de las dos variedades. Se tomó una muestra del material colectado para polinizar manualmente, se depositaron las anteras sobre un portaobjeto y se le agregó una gota de solución compuesta por 0,5 % de cloruro de tetrazolio y de 10 % de sacarosa y 100 mL de agua destilada, y se cubrió rápidamente evitando así la interacción con el oxígeno del aire, de acuerdo a lo propuesto por Bolat y Prilak (1999). Se realizaron 4 repeticiones por variedad (Figura 4). Se esperó durante una hora y posteriormente se evaluó la viabilidad del polen utilizando un microscopio óptico (Nikon, modelo Eclipse LV150N). Los granos teñidos de rojo (reacción positiva), fueron considerados viables, y los amarillos, no viables (Figura 5).



Figura 4. Granos de polen del híbrido F2P3 en portaobjetos, para su observación bajo microscopio



Granos de polen viables de color rosado (A) y no viables de color amarillo (B).

Figura 5. Granos de polen del híbrido F2P3, test de viabilidad con sales de tetrazolio

3.2 EXPERIMENTO 3

3.2.1 Estudio de autoincompatibilidad

Para determinar la autoincompatibilidad natural de ambos híbridos (F3P8 y F2P3), en la estación experimental “INIA Salto Grande” (31° 21’ LS, 57° 45’ LO) 4 árboles de cada híbrido, injertados sobre “Trifolia” se cubrieron previo a la floración y hasta fin de caída de pétalos con malla excluidora de abejas

(Figura 6). Los árboles, plantados en el año 2015, se encontraban en condiciones de riego localizado y recibieron un plan de fertilización estándar.

Los frutos de F3P8 se cosecharon en junio y los de F2P3 en agosto. Posteriormente se cuantificó la presencia de semillas por fruto (normal, vana, rudimentos seminales), y se calculó el porcentaje de frutos con semillas.



Figura 6. Árboles de los híbridos F3P8 y F2P3, cubiertos con malla excluidora de abejas

3.2.2 Estudio de capacidad partenocárpica

Para determinar el porcentaje de cuajado inicial (21 DPF) y final (80 DPF) se utilizaron los 4 árboles con malla excluidora de abejas descritos en 3.2.1. En plena floración se contó en dos ramas de cada uno, el número de nudos y flores totales y a los 21 DPF y 80 DPF se contabilizó el número de frutos cuajados.

3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.3.1 Experimentos 1 y 2

Se utilizó un diseño en bloques completos generalizados con 2 tratamientos, 3 bloques (portainjertos) y 5 plantas por bloque, en el cual se usó un árbol como unidad experimental.

El porcentaje de cuajado inicial y de polen viable se analizó estadísticamente con un modelo lineal generalizado mixto (MLGM) en el programa estadístico INFOSTAT (versión 2019) interfase con R (versión 3.4.4), y se utilizó un test DGC para la separación de medias (Di Rienzo et al., 2019). Para la primera variable solo se realizó el análisis en las primeras fechas,

debido a que el porcentaje de cuajado fue muy bajo, impidiendo estimar el error experimental en las fechas posteriores.

Se realizaron intervalos de confianza (IC) para la proporción (p) de la variable porcentaje de granos de polen viables para cada uno de los híbridos en cada fecha, asumiendo distribución normal para \hat{p} . El cálculo se realizó aplicando la siguiente ecuación:

$$IC(1 - \alpha)_p = \left[\hat{p} \pm z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{\hat{p}(1-\hat{p})}{n}} \right] \text{ (ecuación 1)}$$

Siendo \hat{p} el estimador de la verdadera proporción (p), $z_{\alpha/2}$ un valor de tabla de la distribución normal estándar tal que $P(Z \geq z_{\alpha/2}) = 0.025$ y n el número total de granos de polen evaluados.

3.3.2 Experimento 3

Para el porcentaje de frutos con semilla se realizó un IC para p (ecuación 1) y para el número de semillas por fruto se realizó un IC para la media (μ), asumiendo una distribución normal. Este último se calculó con la siguiente ecuación:

$$IC(1 - \alpha)_\mu = \left[\bar{X} \pm t_{n-1; \alpha/2} \frac{s}{\sqrt{n}} \right] \text{ (ecuación 2)}$$

Siendo \bar{X} el estimador de la verdadera media (μ), $t_{n-1; \alpha/2}$, un valor de tabla de la distribución T de Student tal que $P(T_{n-1} \geq t_{n-1; \alpha/2}) = 0.025$, $\frac{s}{\sqrt{n}}$ el error estándar de la media estimada y n el número total de frutos evaluados.

Para el cuajado a los 23 DPF y final (80 DPF) en el híbrido F2P3, también se realizó un IC para p (ecuación 1).

4. RESULTADOS

4.1 ESTUDIO DE LA AUTOINCOMPATIBILIDAD E INTERCOMPATIBILIDAD EN CONDICIONES DE POLINIZACIÓN DIRIGIDA Y SU RELACIÓN CON EL CUAJADO DE FRUTOS

4.1.1 Experimento 1. Híbrido F3P8

4.1.1.1 Evolución del cuajado de frutos

En condiciones de autopolinización, de las 194 flores polinizadas solamente cuajaron 3 frutos, todos aspermos (Cuadro 1). El bajo porcentaje de cuajado final (1,5%) sugiere algún mecanismo de autoincompatibilidad y baja habilidad partenocárpica (Cuadro 1).

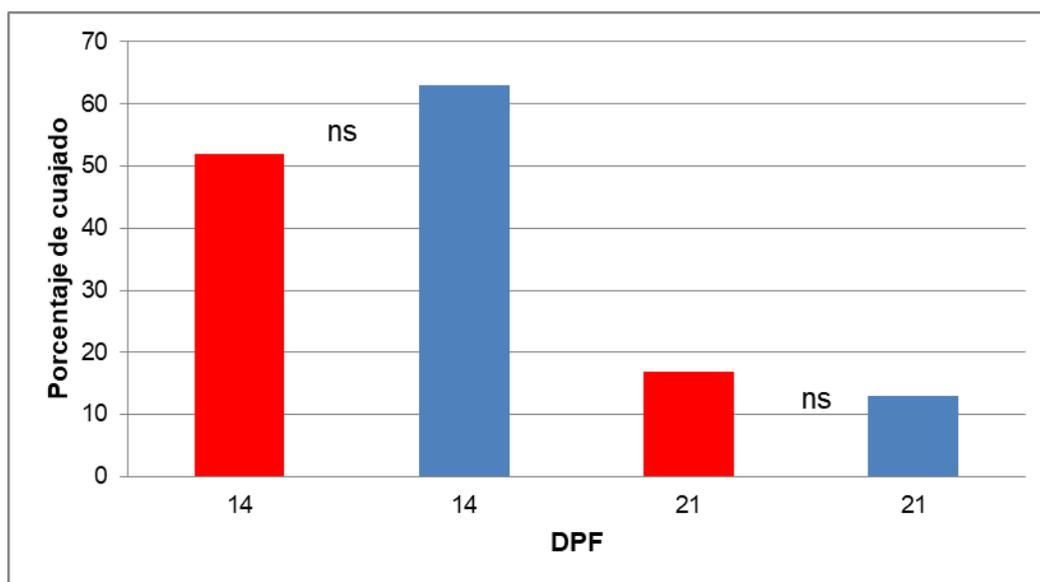
Por otra parte el cuajado final para el híbrido F3P8 con polen de F2P3 fue de 0 frutos de un total de 172 flores, lo que sugiere que el polen de F2P3 no es compatible con el híbrido F3P8.

El cuajado inicial a los 14 y 21 días post floración (DPF) no fue afectado por los tratamientos (Figura 7). En el tratamiento de autopolinización, a los 14 DPF se comprobó una caída del 50% de los frutos, mientras que a los 21 DPF la caída de frutos superaba el 80%. Para el otro tratamiento a los 14 DPF y 21 DPF la caída de frutos fue 34% y 86% respectivamente. El cuajado final quedó definido 29 DPF para el tratamiento autopolinización y a los 42 DPF para el tratamiento polinización cruzada. Se continuó analizando en fechas posteriores (datos no presentados), pero la gran cantidad de “ceros” generados por la caída de frutitos, no permite tener una buena estimación del error estándar como para realizar una inferencia estadística.

En este híbrido a los 21 DPF se encontró un efecto significativo diferencial de los portainjertos sobre el cuajado de frutos, siendo mayor en los árboles injertados sobre “Flying Dragon”, intermedio sobre Citrange “Carrizo” y menor sobre “Trifolia” (datos no presentados).

Cuadro 1. Número de frutos cosechados, porcentaje de frutos con semillas, número promedio de semillas por fruto, cuajado inicial y cuajado final, en el híbrido F3P8 según tratamiento de auto e interpolinización

Tratamiento	Número de frutos cosechados	Frutos con semillas (%)	Número de semillas por fruto	Cuajado inicial (21 dpf)	Cuajado final
Autopolinización	3	0	0	16,5 a	1,5
Interpolinización (F2P3 ♂)	0	-	-	14,0 a	0



Rojo: autopolinización.

Azul: interpolinización.

Figura 7. Porcentaje de cuajado inicial del híbrido F3P8

4.1.1.2 Viabilidad de polen

La viabilidad de los granos de polen de F3P8 y F2P3 fue de 0,71% y de 1,53% respectivamente (Cuadro 2), muy bajo en ambos casos y sin diferencias significativas entre ellos.

Cuadro 2. Porcentaje de granos de polen viable e intervalos de confianza para p [IC], de los híbridos F3P8 y F2P3 en la fecha 5/10/18

Híbrido	Porcentaje granos de polen viables	IC para p
F3P8	0,71a	[0,19 ; 1,23]
F2P3	1,53a	[1,04 ; 2,03]

4.1.1.3 Factores ambientales pre y pos polinización

La temperatura promedio en los 5 días previos a la polinización fue de 12,5°C, la mínima promedio fue de 4,5°C y las máximas promedio de 17,5°C (Anexo 1). La temperatura promedio en los 5 días posteriores a la polinización fue de 17,5°C, la mínima promedio fue de 10°C y las máximas promedio de 22,5°C. (Anexo 1). En la semana previa a la polinización la humedad relativa (HR) promedio se encontró entre 60 y 80%, no hubo precipitaciones 7 días posteriores a la polinización.

4.1.2 Experimento 2. Híbrido F2P3

4.1.2.1 Evolución del cuajado de frutos

En condiciones de autopolinización, de las 194 flores polinizadas solamente cuajaron 3, presentando 5, 7 y 9 semillas cada uno, con un promedio de 7 semillas por fruto (Cuadro 3). El bajo porcentaje de cuajado final (1,7%) sugiere algún mecanismo de autoincompatibilidad y baja habilidad partenocárpica.

En el tratamiento de polinización cruzada con F3P8, se obtuvieron 26 frutos finales de los cuales el 96,3% presentó semillas; el promedio de semillas por fruto fue de 9 (Cuadro 3 y Figura 8). Este mayor porcentaje de cuajado final (13,9%) sugiere compatibilidad entre ambos híbridos y estímulo del cuajado de frutos a través de la fecundación.

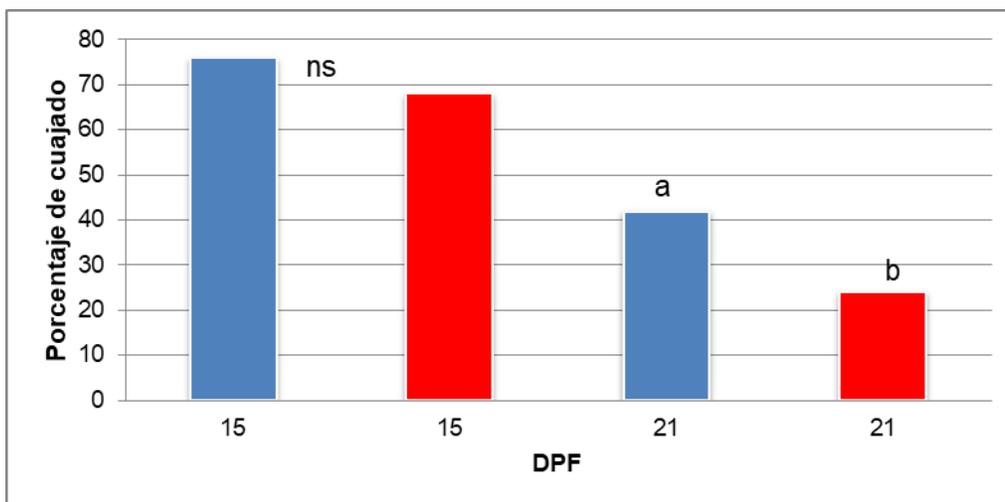
Cuadro 3. Número de frutos cosechados, porcentaje de frutos con semillas, número promedio de semillas por fruto, cuajado inicial y cuajado final, en el híbrido F2P3 según tratamiento auto e interpolinización

Tratamiento	Número frutos cosechados	Frutos con semillas (%)	Número de semillas por fruto	Cuajado inicial (21 DPF)	Cuajado final (%)
Autopolinización	3	100	7	28,4 b	1,7
Interpolinización (F3P8 ♂)	26	96.3	9	41,2 a	13,9

Dependiendo de la fecha considerada, el cuajado fue afectado por los tratamientos. A los 15 días post floración (DPF) no se encontraron diferencias significativas entre ellos (Figura 8). Sin embargo, a los 21 DPF en condiciones de autopolinización solamente quedaba el 24,4% de los frutos, mientras que con el polen de F3P8 permanecía el 41,2%. A los 50 DPF, en autopolinización se comprobó una importante caída, quedando prácticamente definido el porcentaje de cuajado final (1,7%). Con el tratamiento de polinización cruzada a los 50 DPF se mantenía un 23% de frutos cuajados, abscisionando gradualmente hasta final de la caída fisiológica (100 DPF), alcanzando un cuajado final de 13,9% (Cuadro 3).

En este híbrido a los 21 DPF también se encontró un efecto significativo diferencial de los portainjertos sobre el cuajado de frutos, siendo mayor en los árboles injertados sobre "Flying Dragon", intermedio sobre Citrange "Carrizo" y menor sobre "Trifolia" (datos no presentados).

Al final de la caída fisiológica, si bien por el bajo número de frutos cuajados no pudo realizarse análisis estadístico, también la mayoría se encontraba en árboles injertados sobre "Flying Dragon" y no hubo frutos cuajados sobre "Trifolia".



Rojo: autopolinización.

Azul: interpolinización.

Figura 8. Porcentaje de cuajado inicial del híbrido F2P3

4.1.2.2 Presencia de semillas inviables

En ambos tratamientos, además de las semillas normales se encontraron semillas vanas y rudimentos seminales (Figura 9). En autopolinización los tres frutos cuajados presentaban semillas normales y dos de ellos presentaron semillas vanas y rudimentos seminales (Anexo 2). En el tratamiento de polinización cruzada, el 96,3% de los frutos presentó semillas normales, el 55% también presentó semillas vanas y el 63% rudimentos seminales.

Las semillas normales presentaron en promedio 9,01 cm, 5,02 cm y 4,03 cm de largo, ancho y grosor respectivamente, siendo 0,7cm; 0,75 cm, y 3 cm respectivamente mayor que en las vanas (Anexo 3). El peso fresco y seco de las semillas normales fue 1,8 y 1,6 veces mayor que en las semillas vanas respectivamente (Anexo 4). Por otro lado, los rudimentos seminales presentaron un largo 3 veces menor que las normales, y su peso fue despreciable (Anexo 3).



En verde a la izquierda: rudimentos seminales.

Arriba a la derecha: semillas vanas.

Abajo a la derecha: semillas normales.

Figura 9. Tipos de semilla del híbrido F2P3

4.1.2.3 VIABILIDAD DE POLEN

La viabilidad de los granos de polen de F3P8 y F2P3 fue de 1,71% y 3,39% respectivamente, muy bajo en ambos casos y sin diferencias significativas entre ellos (Cuadro 4). Al comparar la viabilidad de polen de ambos híbridos en las dos fechas (experimentos 1 y 2) tampoco presentaron diferencias significativas.

Cuadro 4. Porcentaje de granos de polen viable e intervalos de confianza para p [IC], de los híbridos F3P8 y F2P3 en la fecha 11/10/18

Híbrido	Porcentaje granos de polen viables	IC para p
F3P8	1,71a	[0,97 ; 2,45]
F2P3	3,39a	[1,93 ; 4,85]

4.1.2.4 Factores ambientales pre y pos polinización

La temperatura promedio en los 5 días previos a la polinización fue de 16°C, la mínima promedio fue de 10°C y las máximas promedio de 20°C (Anexo 1). Todas fueron superiores en comparación con las temperaturas de los días previos a la primera polinización (experimento 1). Se sugiere que la tendencia a un mayor porcentaje de viabilidad en la segunda fecha en ambos híbridos puede deberse al factor temperatura. La temperatura promedio en los 5 días posteriores a la polinización fue de 17°C, la mínima promedio fue de 12°C y las máximas promedio de 22°C. Los otros factores ambientales fueron similares a los de la primera fecha de polinización.

4.2 EXPERIMENTO 3. ESTUDIO DE LA AUTOINCOMPATIBILIDAD EN AUSENCIA DE POLINIZACIÓN CRUZADA

En F3P8, en condiciones de polinización cruzada impedida con malla excluidora de abejas, el porcentaje de frutos con semilla fue de 18% con un IC entre 13% y 23%; para F2P3 se determinó un 19% de frutos con semillas con un IC entre 14% y 24% (Cuadro 5). Considerando el total de frutos evaluados en F3P8, el número de semillas por fruto se ubicó entre 0,25 y 0,72 y en F2P3 entre 0,25 y 0,48 (Cuadro 5). Al considerar solo los frutos con semillas, el número ascendió a 2,7 y 1,92 en F3P8 y F2P3 respectivamente (Cuadro 5).

En F3P8 el cuajado de frutos fue muy bajo desde el inicio (2,6% a los 21 DPF) y nulo en las ramas evaluadas al final de caída fisiológica (Cuadro 6), confirmando la baja capacidad partenocárpica encontrada en el experimento 1. En F2P3 el cuajado inicial fue mayor (15,2%) a los 21 DPF y levemente superior al final de la caída fisiológica (1,1%), muy similar al determinado en el experimento 2 (Cuadro 6).

Cuadro 5. Número de frutos cosechados, porcentaje de frutos con semilla, e intervalo de confianza (IC) para “p” proporción de frutos con semilla, IC para “μ” número de semillas por frutos, totales y por frutos con semillas, según híbrido

Híbrido	Número frutos cosechados	Frutos con semillas (%)	Número de semillas por frutos totales	Número de semillas por frutos con semillas
F3P8	238	18 (IC: 13-23)	0,49 (IC: 0,25-0,72)	2,7 (IC: 1,38-4,02)
F2P3	261	19 (IC: 14-24)	0,37 (IC: 0,25-0,48)	1,9 (IC: 0,249-3,591)

Cuadro 6. Cuajado inicial y final para ambos híbridos

Híbrido	Cuajado inicial 21 DPF (%)	Cuajado final (%)
F3P8	2,6 ± 0,7	0
F2P3	15,2 ± 2,1	1,1 ± 0,6

5. DISCUSIÓN

Considerando los resultados de los tres experimentos, los híbridos F3P8 y F2P3 no pueden considerarse totalmente autoincompatibles. En condiciones de autopolinización manual (experimentos 1 y 2), solamente cuajaron tres frutos en cada híbrido; sin semillas los tres de F3P8 y con semillas los de F2P3. Sin embargo, en el experimento 3, en autopolinización bajo malla excluidora de abejas, el porcentaje de frutos con semillas fue 18 % en F3P8 y 19 % en F2P3. El mínimo número de frutos obtenido en los experimentos 1 y 2, no permite concluir en forma definitiva si los híbridos presentan autoincompatibilidad. La información obtenida en el experimento 3, indica que en ambos estaría operando algún mecanismo limitante de la fecundación.

Además de algún mecanismo genético, no estudiado en este trabajo, una de las posibles causas del diferente comportamiento de los híbridos al realizar las autopolinizaciones dirigidas, podría ser la viabilidad del polen o su capacidad de germinación. La temperatura media los 5 días previos a la primera fecha de polinización se ubicó entre 10°C y 15°C, mientras que en la segunda fecha fue levemente superior a los 15°C. Adicionalmente, durante esos días la temperatura mínima en la primera fecha estuvo próxima a los 5 °C, mientras que en la segunda, se mantuvo en el entorno de los 10 °C. Pardo et al. (2007) determinaron una alta correlación entre la temperatura media mínima durante el período de floración y el número de semillas formadas, evidenciando el efecto negativo de las bajas temperaturas en la polinización y fecundación. Las bajas temperaturas dificultan el apareamiento de los cromosomas durante la meiosis, lo que favorece la esterilidad de los gametos, la malformación del polen y por lo tanto se reduce el porcentaje de germinación. En los experimentos 1 y 2, las temperaturas registradas durante los días previos a la polinización pueden explicar la baja viabilidad del polen determinada en ambos híbridos, pero especialmente en la primera fecha de polinización (autopolinización de F3P8).

Moreira y Gurgel (1941) observaron que si bien pueden encontrarse diferencias en la viabilidad del polen entre ramas, plantas, portainjertos y estados fenológicos, generalmente son pequeñas, ya que las mayores diferencias se encuentran entre los genotipos. En Uruguay Mautone et al. (2016) reportaron una viabilidad de polen de 13,5% en mandarina híbrida M9, 19% en mandarina híbrida "B30", 2,2% en naranja Valencia "Paylate", 18,2% en limón tipo "Lisbon" y 8,5% en mandarina "Afourer". Además, en otros experimentos nacionales se ha determinado la viabilidad de granos de polen en diferentes cultivares, presentando en algunos casos, grandes variaciones entre experimentos ("Afourer" entre 3% y 21,2%, limón tipo "Lisbon" entre 3% y

15,3%, naranja Valencia “CV64” 1,7 %, tangor “Ortanique” 43,8 %).² En Brasil, Domingues et al. (1999) evaluaron la viabilidad de polen usando la tinción de carmín acético, encontrando 12% para el cultivar “Pera Sem Sementes” de naranja y 88,8% para el cultivar de naranja “Hamlin Reserva”.

Moreira y Gurgel (1941) definieron como baja viabilidad del polen hasta un 30%, media del 31 al 69% y alta por encima del 70%. Por lo tanto, los híbridos F3P8 y F2P3 entrarían en la categoría menor a 30%, siendo muy baja la viabilidad en ambos y estando muy cerca de una androesterilidad.

La temperatura promedio los 5 días post polinización en ambas fechas (experimentos 1 y 2) fue de 17°C. Distefano et al. (2012) no observaron germinación de polen *in vitro* a temperaturas menores a 10°C en el pumelo “Sha Tian Yu”, citrón “Vozza Vozza” y los mandarinos “Dancy” y Clementina “Comune”. Además demuestran que la germinación del polen en estas especies aumenta de 10°C a 25°C y presenta una fuerte disminución al llegar a 30°C. Para el desarrollo del tubo polínico Agustí (2010) sugiere un umbral de 13°C, existiendo un rápido crecimiento de éste entre 25-30°C. Por otra parte, Distefano et al. (2012) afirman que la temperatura en el rango de 15 a 25 °C determinará el lugar dónde se interrumpe el crecimiento del tubo polínico, pero al mismo tiempo dependerá de la interacción de ambos genotipos (masculino y femenino). Por lo tanto, en los experimentos 1 y 2, aun sin alcanzar el rango óptimo de temperatura para la germinación de los granos de polen, éstas se presentaron dentro de un rango favorable en ambos períodos post polinización. Lo mismo sucede para el crecimiento del tubo polínico.

Con respecto a los restantes factores ambientales, en la semana previa y post polinización de cada híbrido, la humedad relativa (HR) promedio se encontró entre 60 y 80%. Cuando la humedad relativa se encuentra por debajo del 50%, se reduce la retención de los granos de polen por el estigma y por encima del 90% dificulta la dehiscencia de las anteras o reduce la fijación del polen (Agustí, 2010). Por lo tanto, esta variable no sería en estos experimentos una limitante para la polinización. El viento y las precipitaciones son dos factores abióticos que afectan la retención de los granos de polen (Agustí, 2010). En este caso, el capuchón de aluminio sobre el pistilo de las flores y la malla minimizan el posible efecto de ambos factores. Adicionalmente, no hubo precipitaciones 7 días posteriores a las polinizaciones.

Moreira y Gurgel (1941) reportan una correlación positiva significativa entre la fertilidad del polen y el número promedio de semillas de diferentes especies y variedades de cítricos. En contraposición a lo anterior, Domingues et al. (2000) no encuentran correlación entre el porcentaje de polen viable y la

² Gambetta, G.; Gravina, A. 2020. Com. personal.

producción de frutos por planta, ni con el número de semillas producidas por fruto en naranja "Pera". En el experimento 3, una semana previa y una semana posterior a la plena floración (PF), las temperaturas máximas, medias y mínimas, se ubicaron en 25°C, 20°C y 15°C respectivamente. Si bien no se realizó el estudio de viabilidad de polen, las mayores temperaturas registradas los días previos y posteriores a PF, con respecto a los experimentos 1 y 2, podrían haber afectado favorablemente su viabilidad, germinación o desarrollo del tubo polínico. Esto puede explicar el mayor porcentaje de frutos con semillas encontrados en F3P8, pasando de 0% (experimento 1) a 18% (experimento 3).

En Uruguay, Gambetta et al. (2013) trabajando en mandarina "Afourer" bajo malla encontraron entre 1 y 2% de frutos con semilla y 0,04 semillas por fruto. Mautone et al. (2017) reportaron para el híbrido "M9" bajo malla, un 2% de frutos con semilla y 0,04 semillas por fruto. Los porcentajes de frutos con semilla, y número de semillas por fruto son menores que los hallados para los híbridos F2P3 y F3P8.

Los resultados obtenidos, sugieren, que los óvulos de ambos híbridos son viables. En posteriores estudios, se podrá confirmar este aspecto, así como la receptividad estigmática, el porcentaje de germinación de los granos de polen y la capacidad de crecimiento de los tubos polínicos, para determinar la duración del período efectivo de polinización (PEP). Con este trabajo se sugiere que estos híbridos presentan bajo porcentaje de frutos con semilla bajo malla, debido a su bajo porcentaje de polen viable.

Se sugiere que ambos híbridos presentan baja habilidad partenocárpica. En el caso de F3P8, el bajo porcentaje de frutos cuajados registrado en el experimento 1 (1.5 %), también se determinó en el experimento 3, siendo muy bajo desde el inicio (2,6% a los 23 DPF) y nulo en las ramas evaluadas, al final de caída fisiológica (Cuadro 6). En F2P3 el porcentaje de cuajado final en autopolinización fue muy bajo en ambos experimentos (1,7% y 1 %, respectivamente), lo que también sugiere una baja capacidad partenocárpica.

Estímulos como la polinización, la germinación del grano de polen, y el desarrollo del tubo polínico, siempre y cuando no ocurra fecundación, pueden ser requeridos para la formación del fruto partenocárpico, lo que se denomina partenocarpia estimulativa. En ambos híbridos, el bajo cuajado inicial puede deberse a que, de ser necesario el estímulo de la polinización para el reinicio del crecimiento de ovario, existió un muy bajo porcentaje de polen viable con capacidad de germinar en el estigma y actuar como señal disparadora del cuajado. En este trabajo no hubo un tratamiento emasculado y enmallado, pero se sugiere realizarlo en trabajos posteriores, ya que se podría confirmar si estos híbridos presentan o no partenocarpia del tipo estimulativa. El híbrido "M9",

también seleccionado del programa nacional de mejoramiento genético de cítricos, tiene alta capacidad partenocárpica, ya que, el porcentaje de cuajado en ausencia de polen compatible fue similar o superior al obtenido en polinización abierta. Además, el 100% de las flores emasculadas y embolsadas, presentaron abscisión. Esto sugiere que la partenocarpia de este híbrido es estimulativa. Por otro lado, las flores autopolinizadas, alcanzaron un 6,7% de cuajado de frutos y éstos eran aspermos (Mautone et al., 2016). Similar comportamiento reportaron Borges et al. (2009) en tanger "Ortanique".

La partenocarpia que no requiere ningún estímulo externo, se conoce como autónoma o vegetativa (Vardi et al., 2008). Un ejemplo de este tipo de partenocarpia, ha sido reportado por Fornero et al. (2012) en mandarina "Afourer" en las condiciones de Uruguay.

Otra razón que permite explicar el bajo porcentaje de cuajado obtenido, que puede ser complementaria a la anterior, es la existencia de una baja capacidad de síntesis de giberelinas en el ovario, y por lo tanto ausencia del principal factor del cuajado inicial. Esto último es común en las variedades clasificadas como de baja capacidad partenocárpica. Inicialmente el cuajado es mayormente dependiente del balance hormonal, para posteriormente depender del aporte de carbohidratos. Talón et al. (1990, 1992) encuentran que en mandarina Satsuma, de alta capacidad partenocárpica, el nivel de giberelinas activas al momento de la antesis, es mayor que en las mandarinas Clementinas, de baja capacidad de cuajado y concluyen que éstas son el principal estímulo que controla el desarrollo inicial del ovario. Las giberelinas aumentan la capacidad de fosa de los frutitos, y por lo tanto la nutrición mineral y el aporte de carbohidratos.

A pesar de que las flores seleccionadas fueron de brotes terminales, que presentan una mayor capacidad de cuajado en relación a flores solitarias o ubicadas en inflorescencias, en las autopolinizaciones de los dos experimentos realizados, el porcentaje de cuajado fue bajo o nulo. Los brotes con hojas, en general, presentan mayor cuajado debido a la cercanía de la fuente de fotoasimilados, requeridos en la fase de división celular. A su vez, al aparecer más tarde en la brotación, escapan de la competencia inicial entre flores (Lovatt et al., 1984). La menor abscisión de este tipo de brotes también puede deberse a que éstos 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, y por lo tanto, mejores condiciones de competencia (Erner 1989, Mesejo et al. 2003).

Los factores ambientales también puedan afectar el cuajado de frutos. Para tanger "Ortanique", Fasiolo et al. (2010) reportan que la acumulación de temperaturas mayores a 30 °C durante la fase 1 de crecimiento del fruto sería el

principal factor exógeno que afecta negativamente el cuajado final. En condiciones de polinización abierta, Borges et al. (2009) trabajando con “Ortanique” bajo malla sombra y sin ésta, encontraron que el cuajado inicial en el primer caso fue mayor, debido a la disminución del estrés térmico y lumínico, descendiendo recién a los 50 DPF, mientras que en el segundo caso disminuyó drásticamente a los 20 DPF. En los experimentos realizados en esta tesis, no hubo temperaturas mayores a 30 °C durante el mes posterior a la polinización de cada tratamiento, por lo que se descarta este factor como posible causante del bajo cuajado. Otro factor externo que limita el cuajado de frutos es el estrés hídrico ocurrido durante la fase I de crecimiento, desencadenando el proceso de abscisión a través del incremento del ácido abscísico (Iglesias et al., 2007). Los experimentos se realizaron en condiciones de riego localizado, por lo que, aunque no se determinó el estado hídrico de las plantas, se considera que ésta no sería la mayor limitante para el cuajado.

En el híbrido F3P8 en polinización cruzada con polen de F2P3, no se obtuvieron frutos. Este resultado podría deberse a la baja viabilidad del polen y/o a una baja o nula compatibilidad entre ambos. Por el contrario, en el híbrido F2P3, en polinización cruzada con polen de F3P8 se obtuvieron 26 frutos, con un promedio de 9 semillas por fruto y solo un fruto sin semillas (Cuadro 3 y Figura 8). De todos los tratamientos, este fue el que presentó mayor cuajado final, lo que sugiere que el polen de F3P8 es compatible con el híbrido F2P3 y que la baja viabilidad de polen de F3P8 no fue una limitante para lograr la fecundación y cuajado de frutos.

En el caso del híbrido F3P8, hasta los 21 DPF no se encontró diferencias en el cuajado entre auto e interpolinización (Figura 7). Similar a lo ocurrido en el híbrido F2P3 hasta los 14 DPF (Figura 8). Sin embargo, en este híbrido a los 21 DPF se encontró un mayor porcentaje de cuajado cuando el polen era de F3P8, sugiriendo que el polen de este último estimula el cuajado inicial. La misma tendencia se presentó en el cuajado final, que en el tratamiento autopolinizado fue de 1,7% y en el cruzamiento con polen de F3P8, fue de 13,9% (Cuadro 3). Fasiolo y Rey (2013) trabajando en mandarina “Afourer”, polinizada con Limón tipo “Lisbon”, con “Ortanique” y en libre polinización, determinaron que hasta los 50 días post-antesis todos los tratamientos presentaban la misma cantidad de frutos, y recién a partir de esa fecha se produjo una caída importante. Por otra parte, en mandarina “Nova” el cuajado a los 20 DPF era solamente de 30% (Gambetta et al., 2008), similar a los resultados obtenidos en F3P8 y F2P3 a los 21 DPF, que en polinización cruzada presentaron un 14% y 41% de frutos cuajados, respectivamente.

El híbrido F2P3 presentó, además rudimentos seminales, de 3 mm de largo en promedio (Anexo 3 y Figura 9), que por ser tan pequeños, pueden

pasar desapercibidos cuando el fruto es maduro, por lo que no afectan la calidad de los frutos (Bono, 2000). Los rudimentos seminales sugieren la presencia de estenospermocarpia, desarrollo de frutos con semillas parcialmente formadas debido a un aborto de los embriones luego de la fecundación. A diferencia de la partenocarpia, en estos casos ocurre fecundación (Podestá, 2007), aunque de acuerdo a Mesejo et al. (2014) los factores que regulan este fenómeno no son conocidos en la actualidad.

Para el diseño de una plantación cítrica debe tenerse en cuenta la biología reproductiva de las variedades para poder cumplir con la producción de frutos sin semillas, actualmente exigida por los mercados. Aunque Barry (2004) reportó que se consideran frutos sin semilla cuando la presencia de estas es de 1 cada 100 frutos, a nivel comercial las exigencias para la exportación de mandarinas a EEUU en 2019 fueron menores, permitiendo en categorías “premium” la presencia de semillas hasta en un 6% o 15% de los frutos.³ Por lo tanto, para la exportación a mercados exigente, los frutos de los híbridos estudiados en condiciones de autopolinización, no alcanzarían la clasificación de frutos sin semillas de las categorías más exigentes.

Las naranjas navel, y las mandarinas Satsumas se caracterizan por presentar esterilidad masculina y femenina, y por lo tanto son utilizadas como variedades filtro en muchos diseños de plantación (Mesejo et al., 2007). Como resultado de la baja viabilidad de los granos de polen de F3P8 y F2P3, es probable que estos híbridos no actúen como polinizadores eficientes de otras especies plantadas en cuadros cercanos. En próximos trabajos debería confirmarse que la baja viabilidad de polen encontrada en este estudio sea una característica permanente para poder utilizarlos como variedades filtro, impidiendo que variedades de mayor valor comercial, como la mandarina “Afourer” presenten alto número de semillas.

En California se estudió que el polen de las mandarinas “Clementina de Nules” y “Afourer” puede ser transportado por las abejas entre 500 y 960 metros respectivamente (Chao et al., 2005b). Si bien no existe un estudio de estas características en el Uruguay, es importante tener en cuenta las distancias entre variedades para evitar interpolinización. Otero y Rivas (2017), midieron la distribución espacial del número de frutos con semilla en mandarina “Afourer” en Uruguay y propusieron una distancia mínima de 250 m con árboles de otra especie de cítrico o variedad, para que no haya interferencia de polinización cruzada.

³ García y Santos, F. 2020. Com. personal.

6. CONCLUSIONES

- En los experimentos de autopolinización dirigida, solamente cuajaron 3 frutos de cada híbrido por lo que no se puede comprobar si presentan autocompatibilidad o autoincompatibilidad.
- En ausencia de polinización cruzada con el uso de mallas excluidoras de abejas, ambos híbridos presentaron casi 20 % de frutos con semillas, por lo que no pueden considerarse totalmente autoincompatibles.
- Ambos híbridos presentaron una muy baja viabilidad del polen, pudiendo ser uno de los mecanismos limitantes de la fecundación.
- La capacidad partenocárpica de los híbridos fue muy baja, no superando en autopolinización el 1,7 % de cuajado final.
- No se obtuvieron frutos provenientes del cruzamiento de F3P8 con polen de F2P3, no pudiendo confirmar su intercompatibilidad.
- Las flores de F2P3 polinizadas con F3P8 presentaron alto porcentaje de cuajado (14 %) y en promedio 9 semillas por fruto, indicando compatibilidad entre ambos.

7. RESUMEN

La tendencia mundial del mercado a exigir mandarinas sin semillas ha llevado a que el mejoramiento genético esté fuertemente dirigido a crear cultivares autoincompatibles o estériles. De los cultivares obtenidos en el programa nacional de mejoramiento genético de Citrus, se han seleccionado dos híbridos de "Ellendale" x "Page", que son promisorios en cuanto a sus características organolépticas y por presentar bajo número de semillas. El objetivo general de este trabajo fue caracterizar el comportamiento reproductivo de los híbridos F3P8 y F2P3. Se realizaron dos experimentos en la estación experimental INIA Las Brujas, y otro en la INIA Salto Grande. En los dos primeros experimentos, se estudió la autocompatibilidad, mediante autopolinización manual y la intercompatibilidad, emasculando y polinizando con polen del otro cultivar. Se marcaron 200 flores de brotes de flor terminal para cada tratamiento. Posteriormente a cada polinización, se colocó un capuchón de aluminio sobre el pistilo de las flores y se embolsó el brote con malla blanca de tul hasta caída de pétalos. En el experimento de Salto Grande, se cubrieron 4 árboles de cada híbrido con malla excluidora de abejas y se evaluó el porcentaje de frutos cuajados y la presencia de semillas. En condiciones de autopolinización manual (experimentos 1 y 2), solamente cuajaron tres frutos en cada híbrido; sin semillas los tres de F3P8 y con semillas los de F2P3. Sin embargo, en el experimento 3, en autopolinización bajo malla excluidora de abejas, el porcentaje de frutos con semillas fue 18 % en F3P8 y 19 % en F2P3. El cuajado de frutos en el híbrido F3P8 en autopolinización, fue en el primer y tercer experimento de 1,5% y 0% respectivamente. En F2P3, también fue muy bajo en ambos experimentos (1,7% y 1 %, respectivamente). En el híbrido F3P8 en polinización cruzada con polen de F2P3 no se obtuvieron frutos. Por el contrario, en el híbrido F2P3 en polinización cruzada con polen de F3P8 se obtuvieron 26 frutos, con un promedio de 9 semillas por fruto y solo uno sin semillas. Los resultados de autopolinización dirigida, en los que solo cuajaron 3 frutos, no permiten comprobar la existencia de autoincompatibilidad. Los resultados del experimento 3, permiten concluir que los híbridos F3P8 y F2P3 no pueden considerarse totalmente autoincompatibles, ya que en ausencia de polinización cruzada presentaron casi 20 % de frutos con semillas, aunque se sugiere la existencia algún mecanismo limitante de la fecundación, ya que éstos solo presentaron entre 1 y 3 semillas. Ambos híbridos presentaron una muy baja viabilidad del polen, pudiendo ser una de las limitantes. La capacidad partenocárpica de los híbridos fue muy baja, no superando en autopolinización el 1,7 % de cuajado final. No se obtuvieron frutos provenientes del cruzamiento de F3P8 con polen de F2P3, no pudiendo confirmar su intercompatibilidad. Las flores de F2P3 polinizadas con F3P8 presentaron alto

porcentaje de frutos cuajados (14 %) y la mayoría de ellos con semillas, indicando compatibilidad entre ambos.

Palabras clave: Autocompatibilidad; Intercompatibilidad; Mandarinas híbridas nacionales; Semillas; Viabilidad de polen.

8. SUMMARY

The global market trend highly demanding seedless mandarins has led to create self-incompatible or sterile Citrus cultivars. Two “Ellendale” x “Page” hybrids obtained at National Citrus Breeding Program have been selected, due to their organoleptic characteristics and low number of seeds per fruit. General objective of this work was to characterize the reproductive behavior of F3P8 and F2P3 hybrids. Two experiments were conducted at INIA Las Brujas experimental center, and another one at INIA Salto Grande. In the first two experiments, self-compatibility was studied through manual self-pollination and intercompatibility, emasculating and pollinating with pollen from the other cultivar. Two hundred flowers of terminal flower shoots were used for each treatment. After each pollination, an aluminum foil cap was placed on the pistil of the flowers and shoot was bagged with a white tulle mesh until petals fall. In the Salto Grande experiment, 4 trees of each hybrid were covered with bee-excluding mesh; fruit set percentage and seed presence were evaluated. Under manual self-pollination (experiments 1 and 2), only three fruits were set in each hybrid; fruits of F3P8 were seedless and those of F2P3 were seeded. However, in experiment 3, in self-pollination under bee-excluding mesh, the percentage of fruits with seeds was 18% in F3P8 and 19% in F2P3. Fruit set in F3P8 hybrid in self-pollination was 1,5% and 0%, in the first and third experiments respectively. In F2P3, fruit set was also very low in both experiments (1,7% and 1%, respectively). F3P8 hybrid cross pollinated with F2P3 did not set any fruit. On the contrary, in the the experiment of F2P3 hybrid crosspollinated with F3P8 pollen, 26 fruits were obtained, with an average of 9 seeds per fruit, and only one without seeds. The results obtained at manual self-pollination experiments, with only three fruits set in each hybrid, do not allow us to conclude about their autocompatibility. Results obtained in experiment 3 allow us to suggest that F3P8 and F2P3 hybrids cannot be considered totally self-incompatible, since in the absence of cross-pollination, they presented almost 20% of seeded fruits. However, a limiting mechanism of fertilization is suggested as only 1 to 3 seeds per fruit were found. Both hybrids had a very low pollen viability, which may be one of the limiting factors. The parthenocarpic capacity of both hybrids was very low, not exceeding 1,7% of final fruit set in self-pollination. No fruits were obtained from F3P8 crosspollinated with F2P3, unable to confirm its intercompatibility. On the contrary, F2P3 flowers pollinated with F3P8 had a high percentage of fruit set (14%) and most fruits were seeded, indicating compatibility between them.

Keywords: Intercompatibility; National mandarin hybrids; Polen viability; Seeds; Selfcompatibility.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Agustí, M.; Almela, V. 1991. Aplicaciones de fitoreguladores en citricultura. Barcelona, Aedos. 261 p.
2. _____.; 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. Levante Agrícola. 332: 189-199.
3. _____. 2003a. Citricultura. 2ª. ed. Madrid, Mundi-Prensa. 422 p.
4. _____.; Martínez-Fuentes, A.; Mesejo, C.; Juan, M.; Almela, V. 2003b. Cuajado y desarrollo de frutos cítricos. Valencia, Generalitat Valenciana. Conselleria D'Agricultura, Peixca I Alimentació. 80 p. (Sèrie Divulgació Tècnica no. 55)
5. _____. 2010. Fruticultura. Madrid, Mundi-Prensa. 507 p.
6. _____.; Mesejo, C.; Reig, C.; Martínez-Fuentes, A. 2014. Producción de cítricos. In: Dixon, G; Aldous, D. eds. Horticultura: plantas para personas y lugares. Dordrecht, Springer. pp. 159-195.
7. Alós, E.; Cercós, M.; Rodrigo, M.; Zacarías, L.; Talón, M. 2006. Regulación de la rotura de color en cítricos: cambios en el perfil del pigmento y la expresión génica inducida por giberelinas y nitrato, dos retardadores de la maduración. Revista de Química Agrícola y Alimentaria. 54 (13):4888-4895.
8. Azcón-Bieto, J.; Talón, M. 2008. Fundamentos de fisiología vegetal. 2a.ed. Madrid, McGraw-Hill. 651 p.
9. Bain, J. 1958. Cambios morfológicos, anatómicos y fisiológicos en el fruto en desarrollo de la naranja de Valencia (*Citrus sinensis* (L) Osbeck). Australian Journal of Botany 6 (1):1-23.
10. Barry, G. H. 2004. The quest for seedless citrus fruit. In: International Citrus Congress (10th, 2004, Agadir, Marruecos). Proceedings. s.l., International Society of Citriculture. v.1, pp. 346-350.
11. Bermejo, A.; Primo-Millo, E.; Agustí, M.; Mesejo, C.; Reig, C.; Iglesias, D. J. 2015. Hormonal profile in ovaries of mandarin varieties with

differing reproductive behaviour. *Journal of Plant Growth Regulation*. 34 (3):584-594.

12. Blanke, M. M. 2000. Photoinhibition in citrus. *Proceedings International Society of Citriculture*. 1:619-622.
13. Bolat, I.; Pirlak, L. 1999. An investigation on pollen viability, germination and tube growth in some stone fruits. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 23(4):383-388.
14. 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.
15. Borges, A.; daCunha-Barros M.; Pardo, E.; García, M.; Franco, J.; Gravina A. 2009. Cuajado de frutos en tangerina en respuesta a la polinización y a distintas situaciones de estrés. *Agrociencia (Uruguay)*. 13(1):7-18.
16. Bustan, A.; Erner, Y.; Goldschmidt, E. 1995. Interacciones entre cítricos en desarrollo y su sistema vascular de soporte. *Anales de Botánica*. 76 (6):657-666.
17. Caputi, P.; Montes, F. 2010. Plan estratégico y diseño institucional para el sector cítrico en Uruguay Proyecto TCP/URU/3301 FAO. (en línea). s.n.t. 107 p. Consultado mar. 2019. Disponible en http://www.sistemanacionaldebioseguridad.gub.uy/sites/default/files/multimedia/plan_estrategico_citricultura_2010_caputi-montes.pdf
18. Chao, C. T.; 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.
19. _____.;_____.;_____. 2005b. Pollination study of mandarins and the effect on seediness and fruit size: implications for seedless mandarin production. *HortScience*. 40(2):362-365.
20. Chica, E.; Albrigo, L. 2013. Expresión de genes promotores de flores en naranja dulce durante los déficits de agua inductivos florales. *Revista de la Sociedad Americana de Ciencias Hortícolas*. 138(2): 88-94.

21. Chouza, X.; Gravina, A.; Borges, A. 2011. Control de la autopolinización, germinación del polen y crecimiento del tubo polínico en mandarina "Montenegrina". *Agrociencia (Uruguay)*. 15(1):27-36.
22. Da Cunha Barros, M.; Gravina, A. 2006. Influencia del tipo de brote en el cuajado y crecimiento del fruto del tangor "ortanique". *Agrociencia (Uruguay)*. 10(1):37-46
23. De Nettancourt, D. 1977. *Incompatibility in angiosperms*. Berlin, Springer. 230 p.
24. De Rocca Serra, D.; Ollitrault, P. 1992. L' amélioration des agrumes. I Les ressources génétiques. *Fruits*. 47:115-123.
25. Di Rienzo, J. A.; Casanoves, F.; Balzarini, M. G.; González, L.; Tablada, M.; Robledo, C. W. 2019. InfoStat versión 2019. (en línea). Córdoba, Universidad Nacional de Córdoba. FCA. s.p. Consultado 18 jul. 2019. Disponible en <http://www.infostat.com.ar>
26. Distefano, G.; Hedhly, A.; Las Casas, G.; La Malfa, S.; Herrero, M.; Gentile, A. 2012. Male-female interaction and temperature variation affect pollen performance in Citrus. *Scientia Horticulturae*. 140:1-7.
27. Domingues, E. T.; Tulmann N, A.; Teofilo S, J. 1999. Viabilidad del polen en variedades de naranja dulce. *Scientia Agrícola*. 56(1):s.p.
28. _____.; _____.; _____. 2000. Viabilidad del polen en clones de naranja Pêra y otras variedades similares. *Ciencia Rural*. 30(1): 85-89.
29. El-Otmani, M.; Coggins, C.; Agustí, M.; Lovatt, C. 2000. Plant growth regulators in citriculture: world current uses. *Plant Science*. 19: 395-447.
30. Erner, Y. 1989. Citrus fruit set: carbohydrate, hormone and leaf mineral relationship. In: Wright, C. ed. *Manipulation of fruiting*. London, Butterworths. pp. 233-242.
31. _____.; Shomer, I. 1996. Morphology and anatomy of stems and pedicels of spring flush shoots associated with Citrus fruit set. *Annals of Botany*. 78(5):537-545.

32. Esau, K. 1982. Anatomía de las plantas con semilla. Buenos Aires, Hemisferio Sur. 512 p.
33. Fasiolo, C.; Inzaurrealde C.; Cakic, V.; Gravina, A. 2010. Cuajado de frutos en tangor "Ortanique": su relación con factores exógenos. In: Simposio de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Citrus (3°. , 2010, Salto, Uruguay). Memorias. Montevideo, Universidad de la República. Facultad de Agronomía. pp. 68-71.
34. _____.; Rey, F. 2013. Contribución al conocimiento de la biología reproductiva de la mandarina "Afourer" (*Citrus reticulata* Blanco). Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 57 p.
35. Fornero, C.; Galiger, S.; Inzaurrealde, C. 2012. Estudio del comportamiento reproductivo de la mandarina "Afourer" (*Citrus reticulata* Blanco). Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 54 p.
36. Frost, H. B.; Soost, R. S. 1968. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: Reuther, W.; Batchelor, L. D.; Webber, H. J. eds. The citrus industry. Berkeley, University of California. v. 2, cap. 4, pp. 290 - 319.
37. 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* (Uruguay). 12(2):1-9.
38. _____. 2009. Control endógeno y exógeno de la maduración externa de frutos cítricos. Tesis doctoral. Valencia, España, Universidad Politécnica de Valencia. 184 p.
39. _____.; Martínez-Fuentes, A.; Bentancur, O.; Mesejo, C.; Reig, C.; Gravina, A.; Agustí, M. 2012. Hormonal and nutritional changes in the flavedo regulating rind color development in sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osb.]. *Journal of Plant Growth Regulation*. 31(3):273-282.
40. _____.; 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.

41. García, M.; Castel, J. 2007. Balance hídrico y estimación del coeficiente de cultivo en un huerto de cítricos en Uruguay. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 5(2):232-243.
42. Garmendia, A.; Beltránb, R.; Zornozac, C.; Breijob, F.; Reigd, J.; Bayonab, I.; Merleb, H. 2019. Insect repellent and chemical agronomic treatments to reduce seed number in 'Afourer' mandarin: effect on yield and fruit diameter. *Scientia Horticulturae*. 246:437-447.
43. Garzón D. 2012. Evaluación de la influencia del déficit hídrico en el crecimiento y desarrollo de la naranja "valencia" (*Citrus sinensis* O) en el piedemonte llanero de Colombia. Tesis de Maestría. Bogotá, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. 110 p.
44. Giambiasi, M. 2014. Obtención y caracterización de poliploides en citrus. Tesis MSc. en Ciencias Agrarias. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 79 p.
45. _____; Arruabarrena, A.; Britos, A.; Castillo, A.; Bertalmío, A.; Rolón, R.; Bertoni, E.; Goncalvez, L.; Laxague, J.; Adalid, E.; Vignale, B.; Rivas, F. 2019. Creando las bases genéticas de la competitividad cítrica: tecnologías aplicadas a la creación de variedades sin semillas. *Revista INIA*. no. 57:13-17.
46. Gmitter, F.; Chen, Ch.; Rao, M.; Soneji, J. 2007. Citrus Fruits. *In*: Kole, C. ed. *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*. Berlin, Springer-Verlag. pp. 265-279.
47. _____; Soneji, J.; Rao, M. 2009. Citrus Breeding. *In*: Jain, S. ed. *Breeding Plantation Tree Crops: temperate Species*. New York, Springer. pp. 105-134.
48. González-Altozano, P.; Castel J. R. 1999. Regulated deficit irrigation in Clementina de Nules citrus trees: yield and fruit quality effects. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 74 (6):706-713.
49. _____; _____. 2003. Regulated deficit irrigation in " Clementina de Nules" citrus tree: yield and fruit quality effects during four years. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 1(2):81-92.

50. Gravina, A.; Juan, M.; Arbiza, H.; Almeda, V.; Coello, V.; Agustí, M. 1998. Respuesta productiva del tangor "Ellendale" a diferentes fechas de anillado. *Agrociencia (Uruguay)*. 2(1):112-116.
51. _____. 2014. Fisiología de citrus. Montevideo, Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 145 p.
52. _____.; Gambetta, G.; Rey F.; Guimaraes, N. 2016. Mejora de la productividad en mandarina 'Afourer' en aislamiento de polinización cruzada. *Agrociencia (Uruguay)*. 20(2):22-28.
53. Guardiola, J.; García - Marí, F.; Agustí, M. 1984. Competencia y fruta ambientadas en la naranja "Washington Navel". *Physiologia Plantarum*. 62(3):297-302.
54. _____.; Barres, T.; Albert, C.; García-Louis, A. 1993. Efectos de los reguladores de crecimiento exógenos en el desarrollo del fruto en *Citrus unshiu*. *Anales de la Botánica*. 71(2):169-176.
55. Herrero, M. 2001. Ovary signals for directional pollen tube growth. *Sex Plant Reproduction*. 14:3-7.
56. Iglesias, D.; Ibáñez, R.; Tadeo, F.; Primo-Millo, E.; Talón, M. 2003. La disponibilidad de carbohidratos mejora el cuajado de los frutos de los cítricos. *Levante Agrícola*. 365:160-166.
57. _____.; Cercós, M.; Colmenero-Flores, J. M.; Naranjo, M. A.; Rios, G.; Carrera, E.; Ruiz-Rivero, O.; Liso, I.; Morillon, R.; Tadeo, F. R.; Talón, M. 2007. Physiology of citrus fruiting. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 19(4):333-362.
58. Inzaurrealde, C.; Fasiolo, C; Fornero, C; Galiger, S; Chouza X; Gambetta, G; Gravina, A. 2010. Autoincompatibilidad, capacidad partenocárpica y mejora del cuajado en el tangor "Ortanique". In: Congreso Argentino de Citricultura (6°. 2010, Tucumán, Argentina). Memorias. Tucumán, s.e. pp. 2-4.
59. Jackson, L. K. 1997. Seed development in citrus. (en línea). Gainesville, FL, University of Florida. IFAS. pp. 33-42. Consultado mar. 2019. Disponible en http://irrec.ifas.ufl.edu/flcitrus/pdfs/short_course_and_workshop/citrus_flowering_97/Jackson-Seed_Development.pdf

60. Khan, I.; Kender, W. 2007. Citrus Breeding. In: Khan, I. ed. Citrus: genetics, breeding and biotechnology. Cambridge, CABI. pp. 1-9.
61. Lersten, N. R. 2004. Flowering plant embryology with emphasis on economic species. Ames, Iowa, Blackwell. 211 p.
62. 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.
63. Lovatt, C. J.; Streeter, S. M.; Minter, T. C.; O'Connell, D. L.; Flaherty, D. L.; Freeman, M. W.; Goodell, P. B. 1984. Phenology of flowering of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Washington navel orange. In: International Citrus Congress (5th., 1984, San Pablo, Brasil). Proceedings. s.l., International Society of Citriculture. pp.186-190.
64. McClure, B. A.; Gray, J. E.; Anderson, M. A.; Clarke, A. E. 1990. Self-Incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA. *Nature*. 347:757-760.
65. Martínez-Fuentes A.; Mesejo, C.; Reig, C.; Agustí M. 2010. Timing of the inhibitory effect of fruit on return Bloom of "Valencia" sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Science of Food and Agriculture*. 90(11):1936-1943.
66. _____; Rey, F.; Pereira das Neves, V.; Guimaraes, N.; Gambetta, G.; Gravina, A. 2016. Caracterización del comportamiento reproductivo de dos nuevos híbridos de mandarina. *Agrociencia* (Uruguay). 20(2):29-35.
67. Mautone, A. 2017. Caracterización del comportamiento reproductivo de nuevos híbridos de mandarina y cultivares de naranjas tipo valencias. Tesis MSc. en Ciencias Agrarias. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 58 p.
68. Meohuachi, J.; Serna, D.; Zaragoza, S.; Agustí, M.; Talón, M. and Primo-Millo, E. 1995. Defoliation increases fruit abscisión and reduces carbohydrate levels in developing fruits and woody tissues of *Citrus unshiu*. *Plant Science*. 107:189-197.

69. Mesejo, C.; Martínez-Fuentes, A.; Juan, M.; Almela, V.; Agustí, M. 2003. Vascular tissues development of citrus fruit peduncle is promoted by synthetic auxins. *Plant Growth Regulation*. 39(2):131-135.
70. _____.; _____.; Reig, C.; Rivas, F.; Agustí, M. 2006. The inhibitory effect of CuSO₄ on Citrus pollen germination and pollen tube growth and its application for the production of seedless fruit. *Plant Science*. 170:37-43.
71. _____. 2007a. El control de la polinización cruzada en los cítricos. Tesis Doctoral. Valencia, España. Universitat Politècnica de València. 120 p.
72. _____.; Martínez-Fuentes, A.; Reig, C.; Agustí, M. 2007b. The effective pollination period in 'Clemenules' mandarin, 'Owari' Satsuma mandarin and 'Valencia' sweet orange. *Plant Science*. 173:223-230.
73. _____.; _____.; _____.; _____. 2008. Gibberellic acid impairs fertilization in Clementine mandarin under cross-pollination conditions. *Plant Science*. 175 (3):267-271.
74. _____.; Yuste, R.; Martínez-Fuentes, A.; Reig, C.; Iglesias, D. J.; Primo-Millo, E.; Agustí, M. 2013. Self-pollination and parthenocarpic ability in developing ovaries of self-incompatible Clementine mandarins (*Citrus clementina*). *Physiologia Plantarum*. 148:87-96.
75. _____.; Muñoz-Fambuena, N.; Reig, C.; Martínez-Fuentes, A.; Agustí, M. 2014. Cell division interference in newly fertilized ovules induces stenospermocarpy in cross-pollinated citrus fruit. *Plant Science*. 225:86-94.
76. _____.; Yuste, R.; Reiga, C.; Martínez-Fuentes, A.; Iglesias, D.; Muñoz-Fambuena, N.; Bermejo, A.; Germanà, M.; Primo-Millo, E.; Agustí, M. 2016. Gibberellin reactivates and maintains ovary-wall cell division causing fruit set in parthenocarpic. *Citrus Species*. 247:13-24.
77. MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias, UY). 2011. Encuesta cítrica "primavera 2010". Montevideo, Uruguay. 28 p.

78. _____. 2013. Encuesta citrícola "primavera 2012". Montevideo. 28 p.
79. _____. 2015. Encuesta citrícola "primavera 2014". Montevideo. 27 p.
80. _____. 2019. Encuesta citrícola "primavera 2018". Montevideo. 12 p.
81. _____. OPYPA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Oficina de Programación y Política Agropecuaria, UY). 2018. Anuario 2018. Montevideo. 668 p.
82. Moltini, A.; Luque, E.; Pintos, P.; Rivas, F.; Ares, G.; Alcaire, F.; Ibañez, F.; Lado, Joanna. 2018. Los frutos cítricos: color, sabor y salud. Revista INIA. no. 54:45-48.
83. Moreira, S.; Gurel, J. T. A. 1941. A fertilidade do pólen e sua correlação com o número de sementes, em espécies e formas do gênero Citrus. *Bragantia*. 1:669-711.
84. MTSS (Ministerio de Trabajo y Seguridad Social, UY). 2018. Estudios sobre trabajo y seguridad social. (en línea). Montevideo. 158 p. Consultado mar. 2019. Disponible en https://www.mtss.gub.uy/c/document_library/get_file?uuid=54565c54-22ed-4222-9804-d1895ef806a7&groupId=11515
85. Muñoz-Fambuena, N.; Mesejo, C.; González-Mas, C.; Primo-Millo, E.; Agustí, M.; Iglesias, D. 2011. La fruta regula la expresión estacional de genes de floración en mandarina 'Moncada' de portación alternativa. *Annals of Botany*. 108(3):511-519.
86. _____.; _____.; _____.; _____.; _____.; _____. 2012. La carga de fruta modula la expresión génica relacionada con la floración en brotes de mandarina 'Moncada' portadora alternativa. *Annals of Botany*. 110(6):1109-1118.
87. _____.; Aleza, P.; Cuenca, J.; Juárez, J.; Pina, J. A.; Ortega, C.; Navarro, A. 2015. El programa de cría triploide de mandarina en España. *Acta Horticulturae*. no. 1065:389-395.

88. Oliitraul, P.; Froelicher, Y.; Dambier, D.; Luro, F.; Yamamoto, M. 2007. Seedlessness and ploidy manipulation. In: Khan, I. ed. Citrus: genetics, breeding and biotechnology. London, CABI. pp. 197-218.
89. _____; Navarro, L. 2012. Citrus. In: Badenes, M. ed. Fruit Breeding. New York, Springer. pp. 623-662.
90. Ortiz de Taranco, J. 2001. Historia de la citricultura del Uruguay. Montevideo, Ediciones de la Plaza. 302 p.
91. Otero, A.; Rivas, F. 2017. Field spatial pattern of seedy fruit and techniques to improve yield on “Afourer” mandarin. *Scientia Horticulturae*. 225:264-270.
92. Papadakis, I.; Protopapadakis, E.; Therios, I. 2009. Yield and fruit quality of ‘Nova’ hybrid [*Citrus clementina* Hort. ex Tanakax(*C. reticulata* Blancox *C. paradisi* Macfad)] and two Clementine varieties (*C. clementina* Hort. ex Tanaka) as affected by self-and cross-pollination. *Scientia Horticulturae*. 121(1):38-41.
93. Pardo, J.; Bermejo, A.; Cano, A.; Zaragoza, S. 2007. La germinación de polen y la formación de las semillas en los cítricos. *Levante Agrícola*. 384(1):16-20.
94. _____. 2010. La temperatura, la viabilidad del polen y la formación de las semillas en los cítricos. *Levante Agrícola*. 399:20-29.
95. Pérez-Botella, J.; Tadeo, F. R.; Primo-Millo, E.; Talón, M. 1997. Influencia de la polinización en el crecimiento y abscisión del fruto de los cítricos: relación entre giberelinas y partenocarpia en el híbrido ‘Fortune’. In: Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal (5º., 1997, Córdoba). Trabajos presentados. Sevilla, Junta de Andalucía. pp. 446-456.
96. Podestá, L. 2007. Floración, polinización y cuaje. In: Sozzi, G. O. ed. Árboles frutales: ecofisiología, cultivo y aprovechamiento. Buenos Aires, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Agronomía. pp. 285-305.
97. Poehlman, J. M.; Sleper, D. A. 2003. Mejoramiento genético de las cosechas. 2ª. ed. México, Limusa. 511 p.

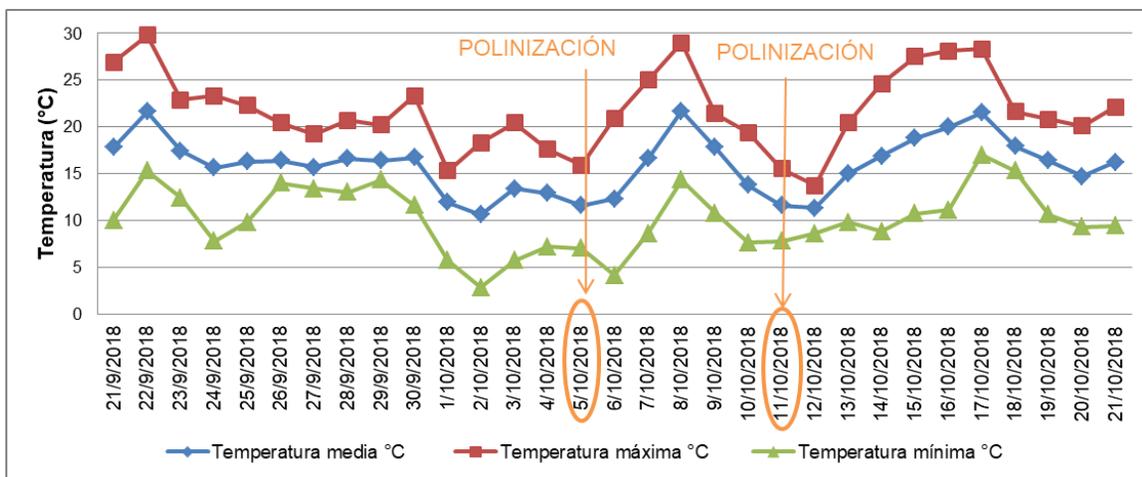
98. Pons, J.; Almela, V.; Juan, M.; Agustí, M. 1992. Use of ethephon to promote colour development in early ripening clementine cultivars. *Proceedings of the International Society of Citriculture*. 1:459-462.
99. Reuther, W. 1973. Climas y comportamiento cítrico. *In*: Reuther, W. ed. *La industria de los cítricos*. Riverside, University of California Press. v.1, cap.9, pp. 280-337.
100. Rivas, F.; Bertalmío, A.; Manzi, M. 2010. La reconversión varietal en la citricultura uruguaya : un enfoque holístico en tiempos de cambio. *Revista INIA*. no. 21:41-44.
101. _____.; Vignale, B. 2014. Nuevas oportunidades varietales de Citrus para la mejora de la competitividad. *In*: Jornada de Divulgación (2014, Salto). Resultados de Investigación en citricultura. Montevideo, INIA. pp. 8-12 (Actividades de Difusión no. 752).
102. Rodrigo, J.; Herrero, M. 1998. Influence of intraovular reserves on ovule fate in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Sexual Plant Reproduction*. 11:86-93.
103. Rodrigo, M.; Marcos, J.; Alférez, F.; Mallent, M.; Zacarías, L. 2003. Caracterización del pinalato, un nuevo mutante de *Citrus sinensis* con una alteración específica de la fruta que resulta en pigmentación amarilla y disminución del contenido de ABA. *Journal of Experimental Botany*. 54(383):727-738.
104. Roose, L.; Williams, E. 2007. Mutation Breeding. *In*: Khan, I. ed. *Citrus: genetics, breeding and biotechnology*. Cambridge, CABI. pp. 345-353.
105. Rubio, D.; López-Pérez, A.; Navarro-García, N.; Córdoba López, F.; Rabadán, M.; Moreno Verdú, M.; Porras, I.; Pérez-Tornero, O. 2017. Efecto de la compatibilidad y la temperatura en la germinación del polen de limonero. *Levante Agrícola*. 435:12-19.
106. Sagee, O.; Erner, Y. 1991. Las giberelinas y contenidos ácido abscísico durante la floración y cuajado de los frutos de naranja 'Shamouti'. *Scientia Horticulturae*. 48(1-2):29-39.

107. Saunt, J. 2000. Citrus varieties of the world, an illustrated guide. 2nd. ed. Norwich, Sinclair. 156 p.
108. Sozzi, G. O. 2007. Árboles frutales: ecofisiología, cultivo y aprovechamiento. Buenos Aires, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Agronomía. 848 p.
109. Spiegel-Roy, P.; Goldshmidt, E. 1996. Biology of citrus. Cambridge, Cambridge University Press. 230 p.
110. Stearns, C.; Yung, G. 1942. The relation of climatic conditions to color development in citrus fruit. Florida State Horticultural Society. 56: 39-61.
111. Syvertsen, J. P.; Goñi, C.; Otero, A. 2003. Fruit load and canopy shading affect leaf characteristics and net gas exchange of 'Spring' navel orange trees. Tree Physiology. 23:899-906.
112. Tadeo, F. R.; Moya, J. L.; Iglesias, D. J.; Talón, M.; Primo-Millo, E. 2003. Histología y citología de cítricos. Valencia, Generalitat Valenciana. Conselleria D'Agricultura, Peixca I Alimentació. 99 p. (Sèrie Divulgació Tècnica no. 54)
113. Talón, M.; Zacarías, L.; Primo-Millo, E. 1990. Hormonal changes associated with fruit set and development in mandarins differing in their parthenocarpic ability. Plant Physiology. 79:400-406.
114. _____.; _____.; _____. 1992. Gibberellins and parthenocarpic ability in developing ovaries of seedless mandarins. Plant Physiology. 99:1575-1581.
115. Vardi, A.; 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(1):117-126.
116. Vasil, I. K. 1987. Physiology and culture of pollen. International Review of Cytology. 107:127-174.
117. Verreyne, J.; Lovatt, C. 2009. The effect of crop load on budbreak influences return bloom in alternate bearing 'Pixie' mandarin. Journal of the American Society for Horticultural Science. 134(3): 299-307.

118. Vilorio, Z.; Grosser, J.; Bracho, B. 2005. Immature embryo rescue, culture and seedling development of acid citrus fruit derived from interploid hybridization. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 82(2):159-167.
119. Vithanage, V. 1991. Effect of different pollen parents on seediness and quality of 'Ellendale' tangor. *Scientia Horticulturae*. 48:253-260.
120. Williams, R. R. 1965. The effects of summer nitrogen applications on the quality of apple blossom. *The Journal of Horticulture Science*. 40:31-41.
121. Williams, T. 2005. Obtención de nuevas variedades de cítricos. In: Congreso Argentino de Citricultura (5°. 2005, Concordia). Comercialización y protección legal de variedades. Concordia, s.e. pp. 2-4.
122. Wright, G. A.; Baker, D. D.; Palmer, M. J.; Stabler, D.; Mustard, J. A.; Power, E. F. 2013. Caffeine in floral nectar enhances a pollinator's memory of reward. *Science*. 339:1202-1204.
123. Wu, G.; Terol, J.; Ibanez, V.; López-García, A.; Pérez-Román, E.; Borredá, C.; Curk, F. 2018. Genomics of the origin and evolution of Citrus. *Nature*. 554(7692):311-316.
124. Yamamoto, M.; Matsumoto, R.; Yamada, Y. 1995. Relationship between sterility and seedlessness in Citrus. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 64(1):23-29.
125. Zaragoza, S. 2007. Aproximación a la historia de los cítricos: origen, dispersión y evolución de su uso y cultivo. s.n.t. 156 p.

10. ANEXOS

Anexo 1. Temperaturas máxima, media y mínima, en las fechas próximas previas y posteriores a los momentos de polinización



Anexo 2. Promedio de semillas por fruto y porcentaje de frutos con semilla según tipo de semilla (normal, vana o rudimento seminal), para ambos tratamientos del híbrido F2P3

Tratamiento	Variable	Tipo de semilla		
		Normal	Vanas	Rudimentos seminales
Cruzamiento	Promedio de semillas por fruto	9,04	1,44	8,07
Cruzamiento	Porcentaje de frutos con semilla	96,30	55,56	62,96
Autopolinizado	Promedio de semillas por fruto	7,00	0,67	8,67
Autopolinizado	Porcentaje de frutos con semilla	100,00	66,67	66,67

Anexo 3. Clasificación de semillas encontradas en los frutos del tratamiento “polinización cruzada” y sus dimensiones

Número	Semillas							
	Vanas			Normales			Rudimentos seminales	
	Largo (mm)	Ancho (mm)	Gro-sor (mm)	Largo (mm)	Ancho (mm)	Gro-sor (mm)	Largo (mm)	Ancho (mm)
1	8,93	3,6	0,7	10,42	4,1	2,13	2,5	-
2	8,97	4,18	0,66	9,7	5,01	2,79	3,37	-
3	9,42	3,72	0,72	9,03	5	2,4	2,89	-
4	10,87	4,1	0,94	8,91	4,72	3,84	2,24	-
5	5,6	4,1	0,76	8,94	5,14	3,08	2,86	-
6	8,24	6,14	1,71	8,02	5,09	3,71	2,63	-
7	7,73	5,11	1,1	8,64	5,27	3,75	2,58	-
8	7,1	2,08	1,01	10,58	5,04	2,92	2,93	-
9	6,52	2,88	0,96	11,27	4,68	2,38	2,93	-
10	8,57	5,13	0,84	9,57	5,41	3,83	2,05	-
11	7,73	5,31	0,94	9,36	5,52	3,67	4,44	-
12	11,4	2,93	1,11	7,64	5,21	3,55	2,59	-
13	8,07	4,89	1,13	8,88	4,94	3,32	3,74	-
14	5,76	4,46	1,07	8,43	4,91	3,83	4,41	-
15	9,58	4,54	0,93	7,53	4,41	3,57	3,24	-
16	10,97	2,98	1	8,64	5,7	3,38	2,88	-

17	9,27	4,72	1,33	9,15	5,75	4,35	3,64	-
18	8,6	4,35	0,99	7,88	5,31	4,11	4,07	-
19	6,47	4,45	1,19	8,4	4,16	12,53	2,57	-
20	6,93	5,27	1,14	9,21	5,03	7,38	2,25	-
Media	8,33	4,25	1,01	9,01	5,02	4,03	3,04	2,00

Anexo 4. Peso seco y fresco de semillas normales y vanas, para el híbrido F2P3

Tipo de semilla	Número de semillas	Peso fresco medio por semilla (mg)	Peso seco medio por semilla (mg)
Normal	168,00	109,29	21,79
Vana	33,00	60,61	13,33

Anexo 5. Proporción de cuajado en el híbrido F2P3 a los 21 DPF según portainjerto

Portainjerto	Media	Error estándar
Flying Dragon	0,58 A	0,05
Citrangle	0,31 B	0,04
Trifolia	0,15 C	0,03
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)		