

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

CARACTERIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO
REPRODUCTIVO DE NUEVOS HÍBRIDOS DE MANDARINA
Y CULTIVARES DE NARANJAS TIPO VALENCIAS

Por:

Ana Paula Mautone Monteverdi

Tesis presentada como
uno de los requisitos para
obtener el título de
Magister en Ciencias
Agrarias opción Ciencias
Vegetales

Montevideo
Uruguay
Octubre 2017

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Ing. Agr. (Dra.) Giuliana Gambetta, Ing. Agr. Beatriz Vignale, Dra. Gabriela Speroni y Ing. Agr. (Dr.) Fernando Rivas, el día.... mes.... año..... Autor Ing. Agr. Ana Paula Mautone. Director Ing. Agr. (Msc.) Alfredo Gravina.

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Este manuscrito es producto del trabajo y esfuerzo de muchas personas a quienes deseo agradecer; a mis compañeros de trabajo: Viro, Natalia, Florencia, Carolina y Gerónimo, gracias por la ayuda incondicional pero especialmente por la amistad y los momentos compartidos.

A mi tutor Alfredo, a Giuliana y Beatriz, por la formación en investigación, por los aportes y correcciones realizados en este trabajo.

A docentes y funcionarios de la Estación Experimental de Facultad de Agronomía Salto e INIA Salto Grande por la colaboración brindada en todo momento.

A mi familia, especialmente a Sergio por el apoyo brindado siempre. Gracias!

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	VI
SUMMARY	VII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
1.1.1 <u>Aspectos generales</u>	4
1.1.1.1 El género citrus.....	4
1.1.1.2 Origen de los cítricos.....	4
1.1.2 <u>Biología reproductiva</u>	5
1.1.2.1 Inducción floral	6
1.1.2.2 Floración	7
1.1.2.3 Polinización	11
1.1.2.4 Fecundación	13
1.1.2.5 Cuajado	14
1.1.2.6 Crecimiento y desarrollo de los frutos.....	17
1.1.3 <u>Partenocarpia</u>	20
1.1.4 <u>Esterilidad y compatibilidad</u>	22
2. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	25
2.1 MATERIAL VEGETAL.....	25
2.2 ESTUDIO DE COMPATIBILIDAD Y CAPACIDAD PARTENOCARPICA.....	25
2.3 GERMINACIÓN “ <i>IN VITRO</i> ” DEL POLEN.....	26
2.4 ESTUDIO DE LAS RELACIONES POLEN- PISTILO.....	27
2.5 POLINIZACIONES CRUZADAS, PRESENCIA DE SEMILLAS Y CAPACIDAD PARTENOCAPICA.....	29

2.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	30
3	<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	31
3.1	ESTUDIO DE COMPATIBILIDAD Y CAPACIDAD PARTENOCÁRPICA EN POLINIZACIÓN ABIERTA Y AUTOPOLINIZACIÓN.....	31
3.2	GERMINACIÓN DEL POLEN “ <i>IN VITRO</i> ” E “ <i>IN VIVO</i> ”.....	37
3.3	ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DE LOS ÓVULOS	39
3.4	ESTUDIO DE LAS POLINIZACIONES CRUZADAS, COMPATIBILIDAD Y LA CAPACIDAD PARTENOCÁRPICA.....	42
4	<u>CONCLUSIONES</u>	49
5	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	50
6	<u>ANEXOS</u>	59
6.1	CARACTERIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO DE DOS NUEVOS HÍBRIDOS DE MANDARINA.....	59

RESUMEN

La tendencia mundial en el desarrollo de nuevas variedades de citrus para consumo en fresco es la ausencia de semillas. A nivel nacional el Programa de mejoramiento genético de Citrus obtuvo dos nuevos materiales híbridos de mandarinas (Ellendale x Satsuma Owari) M9 y B30 y dos naranjas Valencias, Victoria y Paylate, que se destacan por presentar bajo número de semillas. Durante dos ciclos anuales, se estudió la compatibilidad en autopolinización, polinización abierta y polinizaciones dirigidas, se evaluó el poder germinativo del polen *in vitro* e *in vivo*, las relaciones polen-pistilo y la viabilidad de los óvulos. Las mandarinas B30 y M9 demostraron presentar autoincompatibilidad tanto en autopolinización como en polinizaciones dirigidas, naranja Valencia Victoria presentó una esterilidad gamética masculina y óvulos viables. El polen de M9, B30 y Valencia Paylate presentó muy baja capacidad de germinación *in vitro* e *in vivo*. En M9 y Valencia Paylate a partir del tercer día post-antesis, se observó una pérdida de viabilidad *in vivo* de sus óvulos, en B30 y Valencia Victoria la pérdida de viabilidad se observó a partir del día 9 aumentando progresivamente hasta el día 15 donde el 70% de los óvulos se tornan inviables. En condiciones de libre polinización M9, Valencia Victoria y Paylate desarrollaron un 80%, 96% y 77% de frutos sin semillas respectivamente, mientras que en B30, el porcentaje alcanzó apenas a 16 %. Adicionalmente, el número promedio de semillas por fruto en condiciones de polinización abierta, fue en B30 de 6,4 semillas por fruto, el resto de los materiales presentaron valores inferiores a 1. Polinado con polen de mandarina Afourer, naranja Valencia y limón tipo Lisbon, M9 solamente desarrolló un 33 % de frutos con semillas con Afourer. B30 desarrolló semillas con todos los polinizadores, alcanzando 100 % con Afourer y Valencia. Valencia Victoria solamente presentó semillas con Afourer en 62,5% de los frutos, Valencia Paylate generó semillas solo en autopolinización en 60% de sus frutos, ambos con promedios menores a una semilla por fruto. Se discuten las diferencias reproductivas entre los cultivares.

Palabras clave: Autoincompatibilidad, capacidad partenocárpica, semillas, viabilidad de polen

CHARACTERIZATION OF REPRODUCTIVE BEHAVIOR OF NEW MANDARIN HYBRIDS AND VALENCIA ORANGE CULTIVARS

SUMMARY

The global trend in the development of new citrus varieties for fresh consumption is the absence of seeds. At the national level the Citrus Genetic Improvement Program obtained two new hybrid materials of mandarins (Ellendale x Satsuma Owari) M9 and B30 and two Valencias, Victoria and Paylate oranges, which stand out for having low number of seeds. During two annual cycles, compatibility was studied in self-pollination, open pollination and directed pollination, pollen germination *in vitro* and *in vivo*, pollen-pistil relationships and ovules viability were evaluated. Mandarins B30 y M9 showed self-incompatibility both in self-pollination as in directed pollinations, orange Valencia Victoria presented male gametic sterility and viable ovules. Pollen from M9, B30 and Valencia Paylate showed very low germination capacity *in vitro* and *in vivo*. In M9 and Valencia Paylate from the third day post-anthesis, there was a loss of *in vivo* viability of their ovules, in B30 and Valencia Victoria the loss of viability was observed from day 9 increasing progressively until day 15 where 70% of the ovules become unviable. Under M9 free-pollination conditions, Valencia Victoria and Paylate developed 80%, 96% and 77% of seedless fruits respectively, whereas in B30 the percentage reached only 16%. In addition, the average number of seeds per fruit under open pollinated conditions was B30 of 6.4 seeds per fruit, the rest of the materials presented values below 1. Pollination with Afourer mandarin pollen, Valencia orange and lemon type Lisbon, M9 only developed 33% of fruits bearing seeds with Afourer. B30 developed seeds with all pollinators, reaching 100% with Afourer and Valencia. Valencia Victoria only presented seeds with Afourer in 62.5% of the fruits, Valencia Paylate generated seeds only in self-pollination in 60% of its fruits, both with averages less than one seed per fruit. The reproductive differences between the cultivars are discussed.

Key words: Autoincompatibility, parthenocarpic capacity, seeds, viability of pollen

1. INTRODUCCIÓN

La citricultura uruguaya es reconocida a nivel mundial por los buenos estándares de calidad y de cumplimiento comercial. Este rubro exportador ha logrado mantener su fuerte inserción en los mercados internacionales en forma sostenida, produciendo en contra-estación al Hemisferio Norte. Actualmente, el sector cítrico nacional enfrenta dificultades no sólo en su capacidad de producción sino también en las cantidades exportadas. La falta de incremento de su potencial productivo, se puede explicar por el mínimo o nulo crecimiento en la superficie total y del porcentaje de área bajo riego, la edad de los montes, calidad y sanidad de plantas, manejo agronómico de las plantaciones y el atraso en la renovación del material genético, lo que determina una baja productividad comparada con la internacional (Caputi y Montes, 2010).

La citricultura está viviendo una reconversión, con nuevas inversiones en infraestructura mayor inserción internacional tras el ingreso al mercado de Estados Unidos, con un programa de investigación y desarrollo a realizar en cinco a diez años y una mesa de diálogo que apunta a la sustentabilidad social. Se prevé el replantado de aproximadamente el 30% (4.850 ha) de la superficie actual e incorporación de riego. De acuerdo con datos nacionales (MGAP. DIEA, 2013) solo el 50% de la producción de cítricos se exporta lo que determina que el crecimiento futuro de la citricultura nacional dependerá de la introducción de mejoras técnicas en la producción, donde la renovación del material genético juega un papel sustancial para lograr la inserción en nuevos mercados (Montes, 2014).

Actualmente los montes cítricos ocupan una superficie efectiva de 14.900 hectáreas; las especies que ocupan mayor área son las naranjas, mandarinas y limones, siendo la producción de pomelos marginal. Las naranjas presentan la mayor superficie alcanzando un 49,9%, seguidas por las mandarinas con 38,7%, limones un 10,6% y pomelos 0,5% (MGAP. DIEA, 2016).

La evolución de los cítricos en los últimos diez años muestra una disminución en la superficie total, producto de la eliminación o muerte de plantas pero un aumento en el porcentaje de plantas en producción con respecto al total. Los nuevos materiales implantados son fundamentalmente mandarinas sin semilla.

El objetivo principal de nuestra citricultura es la exportación de fruta para su consumo en fresco, en la última zafra el volumen de exportación alcanzó 103.524 toneladas que equivale solamente al 38% de la producción cítrica total (MGAP. DIEA, 2016).

La calidad de fruta para exportación es un factor relevante ya que establece el acceso a los mercados y su valor comercial. El concepto de calidad, abarca características externas e internas, y varía según la especie y variedad que se trate.

La tendencia mundial en el desarrollo de nuevas variedades de citrus para consumo en fresco, es la ausencia o presencia de un bajo número de semillas. La definición de fruto sin semillas ha ido cambiando con el tiempo; mientras que en los años 80 se definía comercialmente como aquellos frutos que presentaban menos de cinco semillas, actualmente esa exigencia es en general mayor y para cultivares de fuerte demanda por su calidad organoléptica se acepta hasta una semilla por fruto (Barry, 2004).

A nivel mundial se han desarrollado en los últimos años programas de mejoramiento genético tendientes a lograr cultivares de alta calidad organoléptica que desde el punto de vista reproductivo sean autoincompatibles, y/o que no polinicen ni sean polinizados por otros genotipos mediante la polinización cruzada (Vardi *et al.*, 2008; Handaji *et al.*, 2010; Navarro *et al.*, 2015).

En nuestro país, la estrategia de obtención de nuevos cultivares se realiza a través de la prospección de materiales locales y del Programa de mejoramiento genético en Citrus, llevado a cabo por la Facultad de Agronomía e INIA. Este último

ha obtenido mediante cruzamientos dirigidos, varios híbridos de mandarina que destacan por sus excelentes características organolépticas y algunos de ellos, por el bajo número de semillas (Rivas *et al.*, 2010). Sin embargo, no se cuenta con información sobre sus características reproductivas, como tipos de compatibilidad, presencia de semillas o capacidad partenocárpica.

El objetivo general de este trabajo, es caracterizar el comportamiento reproductivo de dos híbridos de mandarina originados en el mencionado programa y de dos cultivares de naranja Valencia provenientes de la prospección nacional.

Como objetivos específicos se plantea:

Determinar la presencia de autoincompatibilidad o autocompatibilidad.

Conocer la habilidad partenocárpica.

Determinar la presencia de semillas con o sin polinización cruzada.

Evaluar la compatibilidad con otros cultivares en polinizaciones dirigidas.

1.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 Aspectos generales

1.1.1.1 El género citrus

Las principales especies comerciales de cítricos son árboles de hoja perenne, con orígenes tropicales y subtropicales, que pertenecen a la familia Rutaceae, subfamilia Aurantioideae. Las plantas de esta subfamilia, se caracterizan por frutos en forma de baya en hesperidio procedente de un ovario multicarpelar, que contiene vesículas de jugo y una corteza coriácea con alta densidad de glándulas de aceites esenciales (Davies y Albrigo, 1994).

Una segunda característica de muchas de las especies de esta subfamilia, es la presencia de semillas poliembriónicas, que contienen tanto embriones cigóticos como nucelares, producidos sin fecundación previa a partir de la nucela; mediante el fenómeno de la apomixis, las variaciones genéticas tienden a perpetuarse (Davies y Albrigo, 1994).

1.1.1.2 Origen de los cítricos

Aunque el área de origen de los citrus es amplia incluyendo el sur de China, noreste de India, península de Indochina y Burma, la localización del centro primario de origen es todavía controversial. Este centro de origen varía desde la región montañosa del sureste de China y noreste de India (Tolkowsky, 1938) al noreste de India y Burma (Tanaka, 1954) y a la provincia de Yunnan de China (Gmitter y Hu, 1990).

Los tres géneros de cítricos cultivados en la actualidad son: *Fortunella* (Kumquat), *Poncirus*, formado por una sola especie trifoliada y caduca, de gran resistencia al frío y utilizado como portainjerto y *Citrus*, que incluye las especies más importantes desde el punto de vista agronómico (Davies y Albrigo, 1994).

Barret y Rhodes (1976) fueron los primeros en proponer la existencia de tres taxones básicos del género citrus, en base a descriptores morfológicos (*C. maxima* (Burm.) Merr. - los pummelos, *C. medica* L.- las cidras y *C. reticulata* Blanco- (las mandarinas) de los cuales todos los citrus cultivados son originados.

Los pummelos son originales del archipiélago Malayo e Indonesia, las cidras evolucionaron en el noreste de India y la región cercana de Burma y China, las mandarinas fueron diversificadas fuera de la región incluyendo Vietnam, Sureste de China y Japón (Scora, 1975; Webber, 1967). Las otras especies cultivadas (*C. aurantium* L. – el naranjo amargo, *C. sinensis* (L.) Osbeck el naranjo dulce, *Citrus paradisi* Macf.- el pomelo, *Citrus limon* (L.) Burm. f. – el limón y *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle- la lima) aparecieron por recombinación de los taxones básicos (Ollitrault y Navarro, 2012).

1.1.2 Biología reproductiva

La reproducción en los cítricos puede ser sexual o asexual. En la reproducción sexual, se forman células especializadas llamadas gametos y la fusión del gameto masculino y femenino lleva a la formación del embrión y posteriormente a la semilla. El otro tipo de reproducción presente en los cítricos es la apomixis, forma de reproducción asexual, 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 y la apomixis gametofítica. En la primera, que es la forma que aparece en los cítricos, los embriones se desarrollan directamente de una célula nucelar. En el segundo caso, los embriones se generan de una oósfera de un saco embrionario diploide (sin meiosis), originado a partir de una célula madre de la megáspora (apomixis diplosporia) o a partir de una célula nucelar (apomixis aposporia) (Poehlman y Sleper, 2003).

1.1.2.1 Inducción floral

La transición de los meristemas vegetativos que generarían hojas, en meristemas reproductivos que generan flores es el evento inicial en un largo proceso de desarrollo que lleva a la formación de las semillas y de los frutos (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996). Los factores de mayor relevancia en el proceso de inducción floral pueden presentar origen exógeno y endógeno. Entre los exógenos, el estrés hídrico y las bajas temperaturas son las de mayor importancia.

En nuestras condiciones las bajas temperaturas otoñales e invernales son las que promueven la inducción floral teniendo en general una única floración al año, en primavera. En condiciones tropicales el estrés hídrico es el principal factor controlador de la inducción floral, presentándose varios ciclos de floración al año (Gravina, 1999). Dentro de los factores endógenos que inhiben la inducción floral, varios autores reportan la carga de fruta como uno de los principales. La carga de fruta inhibe la floración reprimiendo la expresión de los genes de inducción *CiFT* y *SOCI* (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2011).

Muñoz-Fambuena *et al.* (2012) encontraron una alta correlación entre la aplicación de ácido giberélico (GA3) y la represión del gen de inducción (*CiFT*) en naranjo dulce. La aplicación de GA3 en el período de inducción floral, disminuye significativamente la expresión del gen, y por el contrario la aplicación de paclobutrazol (inhibidor de la síntesis de giberelinas) aumenta la expresión, y el número de flores diferenciadas por brote. Luego se produce la diferenciación y maduración de los verticilos florales (Tadeo *et al.*, 2003). En los cítricos la anthesis ocurre en un lapso de cinco-siete días, pero el período de floración completa del árbol puede llevar más de veinte días (Mesejo *et al.*, 2007).

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. Con la antesis de las primeras flores comienza la floración, la fructificación inicia al terminar el tiempo de vida de la flor.

1.1.2.2 Floración

En cítricos, la floración tiene lugar tras un prolongado periodo juvenil cuya duración depende tanto de las condiciones medioambientales, como de la especie y la variedad. Las especies vigorosas, como la lima (*Citrus aurantifolia*) y el limón (*Citrus limon*) presentan en condiciones de cultivo subtropical, periodos juveniles de aproximadamente dos años, mientras que en las mandarinas (*Citrus sp.*), las naranjas dulces (*Citrus sinensis*) y los pomelos (*Citrus paradisi*) este periodo puede prolongarse entre cinco y diez años (Tadeo *et al.*, 2003).

En general la flor de los cítricos está compuesta por elementos protectores y elementos propiamente reproductivos. La flor presenta cinco sépalos ovales dispuestos en verticilos sobre el receptáculo, que se localiza en la porción apical del pedúnculo. El conjunto de sépalos forma el cáliz, y dispuestos en posición alterna a los sépalos se encuentran cinco pétalos que forman la corola. El cáliz y la corola forman el perianto. Los pétalos envuelven directamente a los órganos propiamente reproductivos, el androceo y el gineceo. El androceo está compuesto por 20 a 40 estambres dependiendo de la variedad, que están formados por un filamento y una antera tetraesporangiada. Los filamentos suelen estar unidos parcialmente por su porción basal y soldados a la base del disco nectarífero, una estructura de origen carpelar localizada en el receptáculo (Schneider, 1968).

Los estambres rodean el gineceo, que está compuesto por el ovario, el estilo y el estigma. El ovario contiene un número variable de carpelos fusionados, cada uno define un lóculo y son los precursores de los segmentos en el fruto. Cada carpelo contiene entre cuatro y cinco óvulos que podrán transformarse o no en semillas. Al

exterior de los lóculos se encuentra la pared del ovario, en la que se distinguen tres regiones, una externa denominada exocarpo, una intermedia, el mesocarpo y una más interna denominada endocarpo. En la porción distal del ovario se encuentra el estilo, que presenta una estructura cilíndrica y está atravesado por tantos canales estilares como lóculos tiene el ovario. Estos canales constituyen el tejido de transmisión por el que crecen los tubos polínicos para alcanzar los lóculos del ovario. En el extremo superior del estilo, se ubica un estigma globular que recibe durante su período receptivo a los granos de polen. El período receptivo del estigma, dependiendo de la especie y de la variedad de cítricos, puede extenderse desde tres días antes de la antesis o apertura de la flor hasta ocho días después. En la antesis, el estigma es receptivo a los granos de polen que han madurado ya en las anteras y pueden comenzar la polinización. En las variedades de cítricos autocompatibles, la autopolinización puede producirse por contacto directo de las anteras con el estigma o por medio de insectos polinizadores (Tadeo *et al.*, 2003).

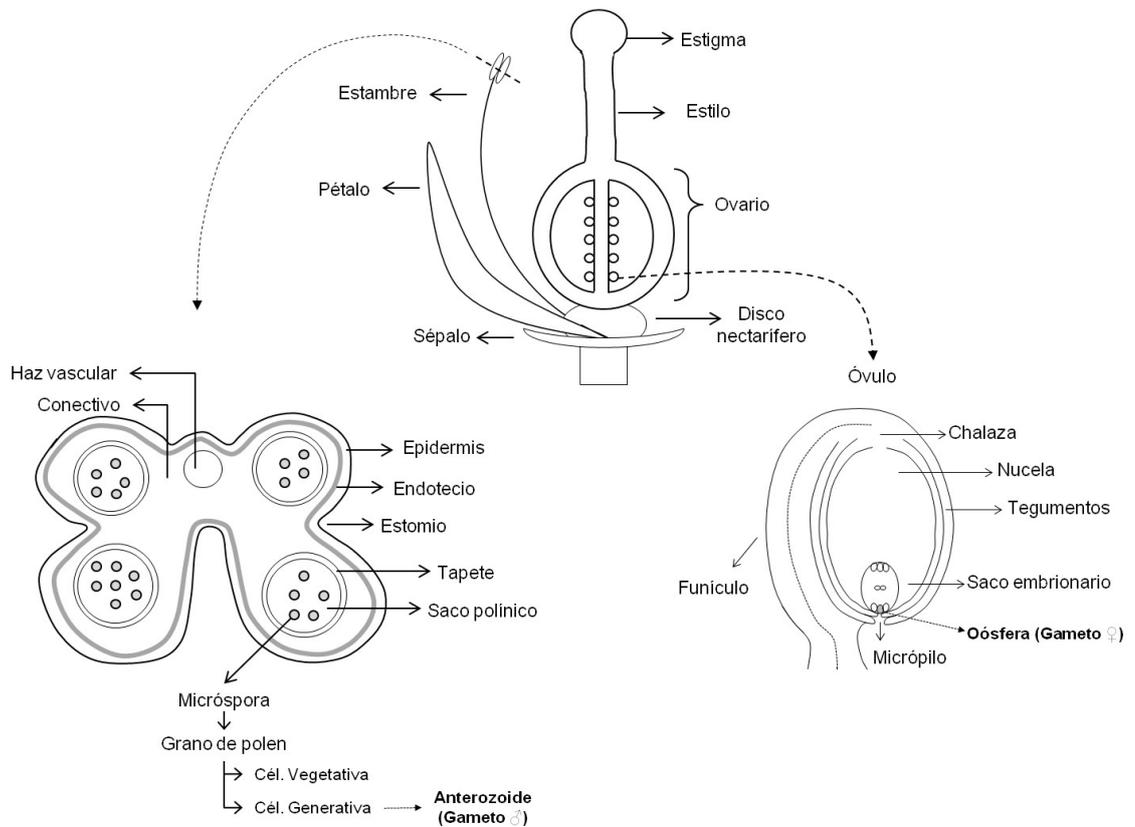


Figura 1. Esquema de la morfología de la flor de los cítricos, microesporangios y megasporangios, (Modificado de Speroni y Bonifacino, 2010)

Cuando los botones florales son aún muy pequeños, aparecen en la placenta pequeños rudimentos seminales, los cuales una vez maduros, tienen la constitución general de las angiospermas, estando formados por el funículo y la nucela, rodeada por dos tegumentos (Frost y Soost, 1968).

En primera instancia se diferencia el tegumento interior, luego el tegumento exterior que da lugar a la testa de la semilla, y el micrópilo por el cual ingresará el tubo polínico. Luego en la zona micropilar del nucelo se forma una célula llamada arqueosporica, esta luego de una división mitótica da lugar a la célula madre de megáspora o megasporocito. El megasporocito se divide por meiosis, produciendo

cuatro megásporas haploides, que se disponen en forma longitudinal en el nucelo, tres de ellas degeneran. La megáspora restante funcional sufre tres divisiones mitóticas formándose el saco de ocho núcleos, tres en la zona micropilar, conformado por el gameto femenino y dos sinérgidas, tres núcleos que constituyen las tres células antípodas en la zona chalazar y una gran célula binucleada que es la célula media. Aquí culmina el desarrollo del saco embrionario, siendo el tiempo requerido variable en función de la especie. Por otra parte la etapa de desarrollo del saco embrionario varía dentro de los óvulos de la misma fruta (Jackson, 1997).

En las anteras jóvenes se distinguen con facilidad por su coloración y núcleo de gran tamaño, las células arqueosporicas, las que tienen un origen hipodérmico. Estas células se dividen periclinalmente produciendo una capa externa de células parietales y una capa interna de células esporógenas. La capa externa de células parietales forma el tapetum y las otras capas de la pared del saco polínico. Los núcleos de las células del tapetum se dividen varias veces, originándose así células multinucleadas que se desintegran sirviendo de alimento al polen. Las células internas esporógenas forman las células madres del polen que se distinguen por presentar un mayor tamaño y un solo núcleo. Estas células se dividen por meiosis originando una tétrada de microsporas con sus núcleos haploides. Cada una de las cuatro células de las tétradas evoluciona y da lugar a un grano de polen. Esta evolución consiste en su propio crecimiento, la formación de dos capas protectoras (intina y exina) y la división del núcleo en dos: núcleo vegetativo y el generativo, el cual se divide una vez más para formar los dos núcleos espermáticos. El desarrollo de los gametos masculinos y femeninos de una misma flor no es siempre simultáneo. Según Osawa (1912), la formación de los granos de polen se produce antes que la célula madre del saco embrionario haya pasado la profase de la primera división; al abrirse la flor, generalmente el saco embrionario está en estado octonucleado. (Frost H. y Soost R., 1968; Tadeo *et al.*, 2003).

1.1.2.3 Polinización

La polinización consiste en la transferencia de polen desde las anteras hasta el estigma. La polinización de un pistilo puede realizarse por el polen procedente de la misma planta o de otra planta distinta; en el primer caso hay autopolinización y en el segundo polinización cruzada. Para que desde el punto de vista genético, haya diferencia entre ambos tipos de polinización, es preciso que la polinización cruzada tenga lugar entre plantas de constitución genética distinta, lo que no ocurre cuando la polinización se realiza entre dos plantas pertenecientes a un mismo clon (Frost y Soost, 1968).

El polen de los cítricos no puede ser transportado por el viento ya que es pesado y pegajoso. A su vez las flores presentan una corola conspicua, fuerte perfume, polen y néctar abundante, que resultan atractivas para los insectos, principalmente abejas melíferas (*Apis mellifera*) (Frost y Soost, 1968; Guardiola *et al.*, 1977).

Los principales agentes polinizadores en los cítricos son las abejas; estudios realizados por Chao *et al.* (2005) en California utilizando marcadores moleculares, demostraron que el polen de las mandarinas Clementina de Nules y Afourer puede ser transportado 500 y 960 metros respectivamente.

El período efectivo de polinización es definido como el tiempo durante el cual la flor es capaz de cuajar un fruto, siempre que la polinización no sea limitada. Este periodo 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 periodo de receptividad del estigma (Williams, 1965).

Mesejo *et al.* (2007) estudiando periodos efectivos de polinización de diferentes cultivares, reportan que la mandarina Satsuma Owari no produce semillas

si la polinización ocurre dos días luego de la antesis. Esto es explicado por el corto período de receptividad de la flor, causado por el bajo período de longevidad del óvulo sumado a factores anatómicos de la flor, como una mayor longitud del pistilo, lo que genera la necesidad de más días para que el tubo polínico alcance el micrópilo en el saco embrionario.

La temperatura puede afectar la polinización de diferentes maneras, ya sea por afectar la movilidad de las abejas o directamente por el enlentecimiento del proceso de germinación del grano de polen, crecimiento del tubo polínico y longevidad de los óvulos (Agustí, 2010).

Las variaciones de temperatura tienen un fuerte efecto en la germinación del polen y en la cinética del tubo polínico. El rango óptimo de temperatura para el crecimiento del tubo polínico, es entre 15 °C y 25 °C, dependiendo de la interacción particular polen-estigma. Además, la temperatura parece tener un efecto en la reacción de autoincompatibilidad, por afectar el lugar donde los tubos polínicos detienen su crecimiento. El comportamiento del polen no solo es una característica inherente a su genotipo, sino que depende fuertemente de la particular combinación polen-estigma y de la interacción genotipo-temperatura (Distefano *et al.*, 2011).

Pardo *et al.* (2007) trabajando con limonero Fino y naranja Sucreña, encontraron que existe una relación inversa entre el número de horas inferiores a 10 °C, acumuladas durante la formación de la flor y la viabilidad del polen, mientras que al número de óvulos viables no parece afectarle, puesto que no se encontraron diferencias significativas en el número de semillas. 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.

La fertilidad masculina y femenina está positivamente relacionada. Cuanto mayor es el porcentaje de germinación del polen de una variedad, mayor es el

número de semillas que forma en sus frutos cuando es polinizada con polen fértil y compatible (Pardo *et al.*, 2007). Este autor menciona que existen diferencias importantes en la capacidad germinativa del polen de los cítricos, reportando valores muy altos (70,2%) para mandarinas e híbridos de mandarina, valores bajos (17,7%) en naranjos y muy bajos en mandarina Satsuma (5,9%).

Estudios realizados en diferentes variedades de naranja dulce, evaluando la viabilidad del polen a través del método de tinción con carmín acético, demostraron que los menores porcentajes de viabilidad correspondieron a naranja Pera sin semilla (12%), Valencia Late (20,9%) y Natal (21,3%), no observando polen viable en naranjas del grupo Navel (Domingues *et al.*, 1999).

1.1.2.4 Fecundación

En la antesis, el estigma es receptivo a los granos de polen que han madurado ya en las anteras y pueden comenzar la polinización. En las variedades de cítricos autocompatibles, la autopolinización puede producirse por contacto directo de las anteras con el estigma o por medio de insectos polinizadores (Tadeo *et al.*, 2003).

Una vez que el grano de polen ha alcanzado el estigma, se hidrata gracias a las secreciones estigmáticas y germina formando el tubo polínico que es producido por la generación de membrana y pared celular. El citoplasma de la célula vegetativa es trasladado en el extremo del tubo polínico junto con los dos gametos masculinos, uno fecundará la oófera para formar el cigoto el otro fecundará la célula media para formar la célula endospermogénica. El tubo polínico penetra en el estigma y desciende por el estilo hasta alcanzar los lóculos del ovario, siguiendo el camino marcado por los canales estilares. Sin embargo, pueden seguir también un camino más tortuoso por el estilo a través de los espacios intercelulares de sus células corticales (células de naturaleza parenquimática que envuelven los haces vasculares y los canales estilares). Este camino a través del córtex, exige constantes cambios en la dirección del crecimiento del tubo polínico, que están marcados por una fuerte

deposición de calosa. Ya en los lóculos, los tubos polínicos alcanzan la nucela del óvulo a través del micrópilo y contactan con el saco embrionario produciendo la fecundación (Tadeo *et al.*, 2003).

La calosa ayuda a mantener la turgencia (necesaria para el crecimiento) en la porción terminal del tubo. La acumulación de calosa es mayor cuando existe incompatibilidad, debido a la inhibición del crecimiento mientras que en condiciones óptimas de desarrollo, la deposición de calosa es menor pero de forma regular (Vasil, 1987).

Las semillas derivan de los óvulos a través de diversos cambios en el desarrollo de éstos. Como en otras Eudicotiledóneas, los primordios seminales constan de una zona pedicular, el funículo, un núcleo de tejido compacto, la nucela, una región basal, la chalaza, y las envolturas o tegumentos. En algunos agrios las semillas son poliembriónicas, y los diversos embriones están envueltos por una cubierta interna el (tegmen), muy fina, seca y coloreada, y otra externa (la testa), resistente, rugosa y de color paja cuando se humedece. Los óvulos son anátropos, con el micrópilo dirigido hacia el eje del ovario donde termina el canal estilar. Están formados por el funículo, la nucela, el saco embrionario y los tegumentos. Como en otras Eudicotiledóneas, la radícula se localiza en el extremo del micrópilo; en el extremo opuesto, o extremo de la chalaza, se sitúan los cotiledones.

Tras la fecundación, los óvulos se transforman en semillas que se desarrollan hasta su maduración. Otros sin embargo, abortan. En las variedades partenocárpicas, los óvulos no son fecundados, y por tanto, las semillas no se desarrollan, quedando reducidas a pequeños rudimentos seminales (Agustí *et al.*, 2003).

1.1.2.5 Cuajado

El proceso que determina el tránsito del ovario de la flor a fruto en desarrollo, se denomina cuajado. Dicho tránsito exige el reinicio del crecimiento del ovario

detenido durante la antesis, y está regulado por una serie de factores, fundamentalmente endógenos. Si dicho crecimiento no se reinicia o una vez reiniciado cesa, el ovario se desprende, y por tanto, no cuaja (Agustí y Almela, 1991). En el sentido amplio, el cuajado comprende el período de crecimiento durante el cual el fruto puede sufrir abscisión. El proceso de abscisión de frutos es un mecanismo interno de regulación en el cual la planta ajusta el número de frutos que puede sostener (Spiegel-Roy y Goldsmichdt, 1996).

El cuajado de los frutos se encuentra regulado por factores hormonales y nutricionales (Gillaspy *et al.*, 1993). Luego de la activación hormonal en el crecimiento inicial del fruto, el desarrollo subsecuente es soportado por el aporte de carbohidratos. La abscisión observada luego de la antesis tiene una base hormonal (Talón *et al.* 1990, 1992), porque depende de la acción de las giberelinas.

El hecho de que variedades con una capacidad similar de cuajado, con y sin semillas, tengan contenidos semejantes de giberelinas, sugiere que estas hormonas tienen un rol preponderante en el cuajado en los cítricos (Talón *et al.*, 1990).

El mecanismo ha sido estudiado comparativamente en la mandarina Satsuma (especie con esterilidad gamética masculina) con alto grado de partenocarpia natural, y en mandarina Clementina (autoincompatible) con baja capacidad partenocárpica (Talón *et al.*, 1992). Estudios recientes comprobaron que a elevada capacidad partenocárpica en Satsuma se asocia a altos contenidos endógenos de giberelinas en los ovarios en desarrollo, mientras que la reducida capacidad de cuajado en Clementina se asocia a contenidos bajos de esta hormona (Mesejo *et al.*, 2013).

La aplicación de fitoreguladores para aumentar el cuajado en los agrios, ha sido repetidamente ensayada y actualmente constituye una práctica común en muchas variedades en cultivo (Agustí y Almela, 1991).

El ácido giberélico se presenta como el inhibidor más potente de la inducción floral, su uso como promotor del cuajado en forma directa, cuando es aplicado en antensis, no ha dado resultados consistentes, estando asociada la respuesta a la concentración, momento de aplicación y especialmente a la variedad.

Gambetta *et al.* (2008) reportan que la aplicación de ácido giberélico en el mes de junio, durante la ecodormición invernal en mandarina Nova, provoca la reducción en la intensidad de floración a través de la disminución en la brotación e incremento en el porcentaje de brotes con hojas. El cuajado final de las plantas tratadas con GA3 invernal fue significativamente mayor al control.

Otra técnica agronómica que logra aumentar el número de frutos cuajados es el anillado de tronco o ramas principales (Agustí *et al.*, 1992). Esta práctica consiste en la interrupción temporal del floema mediante un corte de aproximadamente 1 mm de espesor, evitando así el transporte de sustancias nutritivas hacia las raíces y provocando su acumulación en la parte aérea.

Experiencias realizadas en España y Uruguay en mandarina Ellendale, anillando en caída de pétalos y 30 días después de antesis lograron disminuir la abscisión de estructuras reproductivas, aumentando el cuajado de frutos (Gravina *et al.*, 1998).

Los factores ambientales exógenos también regulan el proceso de cuajado, siendo las altas temperaturas y radiación (Talón *et al.*, 1999) y/o el estrés hídrico (Bower, 2000), los principales factores del clima promotores de la abscisión. 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 a 900 micromoles fotones m² 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).

Borges *et al.* (2009), estudiando el efecto de distintas situaciones de estrés ambiental sobre el cuajado de los frutos en el tangor Ortanique, reportan que la disminución de la luz y temperatura mediante mallas de sombra, incrementó el porcentaje de cuajado final, respecto de aquellos sin sombra; comprueban asimismo, que el sombreado promovió un aumento significativo de la conductancia estomática en hojas en horas del mediodía. El efecto positivo del sombreado de los árboles sobre el cuajado verificado en este trabajo, puede relacionarse a varios factores vinculados a situaciones de estrés (temperatura en hoja, conductancia estomática, potencial hídrico foliar y xilemático)

Por otra parte Fasiolo *et al.* (2010), en un experimento sobre tangor Ortanique utilizando mallas de sombra (30%), comprobaron que la modificación de la temperatura del aire y la luz PAR actúan sobre el cuajado de frutos.

La acumulación de temperaturas superiores a 30°C provoca mayor abscisión de frutitos, siendo el cuajado final mayor en plantas bajo malla negra, donde se acumularon menos horas a temperaturas superiores a 30°C. Las altas temperaturas pueden llevar a reducciones de la tasa de asimilación neta de CO₂ cuyo óptimo en cítricos se ubica entre 25-30°C (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996).

1.1.2.6 Crecimiento y desarrollo de los frutos

El crecimiento de los frutos cítricos, es bien representado por una curva sigmoide típica, con tres fases bien definidas (Bain, 1958). La primera fase de crecimiento abarca desde la fecundación hasta el final de la caída fisiológica, teniendo una duración de dos meses aproximadamente. Es caracterizada por un rápido crecimiento debido al aumento en el número de células, provocado por la división celular, básicamente en el albedo del fruto. En este momento queda definido

el tamaño potencial del fruto. La segunda fase de crecimiento se prolonga por varios meses, desde el fin de caída fisiológica hasta poco antes del inicio de cambio de color. En esta fase hay una marcada expansión de los tejidos como consecuencia del agrandamiento celular. El aumento de tamaño es principalmente debido al desarrollo de los lóculos, en cuyo interior las vesículas de jugo alcanzan su máxima longitud y volumen y el contenido de jugo de sus células aumenta. La fase final del ciclo es asociada a la maduración de los frutos; en este período existe una reducida tasa de crecimiento y comprende todos los cambios de color asociados a la maduración. Los cambios de color en el albedo son consecuencia de la degradación enzimática de las clorofilas del flavedo y de la síntesis de carotenoides. Normalmente este proceso coincide con la maduración interna, aunque estos procesos están sujetos a controles distintos. El contenido en sólidos solubles, principalmente azúcares y compuestos nitrogenados aumenta, por otro lado los ácidos libres disminuyen progresivamente a consecuencia de su dilución y metabolización (Bain, 1958; Agustí *et al.*, 2003).

El crecimiento y tamaño del fruto es el resultado de las propiedades genéticas y de su capacidad para acumular metabolitos (Agustí y Almela, 1991). En la fase primera de crecimiento del fruto, división celular, queda determinado el número final de células que tendrá el fruto y es en última instancia, donde se determina el potencial crecimiento final de la fruta.

Dentro de los factores endógenos se presentan los genéticos, la posición del fruto en el brote y la competencia entre órganos en desarrollo. La presencia de hojas en el brote estimula el desarrollo del fruto a través de una mayor velocidad de crecimiento, apareciendo las primeras diferencias en el momento del cuajado y aumentando con el tiempo hasta la recolección. Estas diferencias son consecuencia de un mayor contenido hormonal de los ovarios situados en brotes con hojas, tanto de giberelinas como de citoquininas, lo que podría aumentar la capacidad de estos frutos para atraer nutrientes del resto de la planta.

El tamaño final que alcanza un fruto tiene una relación inversa con el número

de frutos (Goldschmidt y Monselise, 1977) y con el número de flores (Guardiola, 1997). Este autor sugiere que la floración afecta el tamaño de frutos debido a dos aspectos: 1) el tamaño del ovario en antesis, por ende un incremento en el número de flores resulta en la formación de flores con ovarios pequeños; 2) una intensa competencia por metabolitos en etapas tempranas de desarrollo, afecta el posterior crecimiento del fruto.

El tamaño final de los frutos cítricos, puede mejorarse aumentando la disponibilidad de carbohidratos o incrementando la capacidad sumidero del fruto. La aplicación de auxinas de síntesis puede actuar en ambos sentidos, dependiendo de la época en que se apliquen. Durante la caída fisiológica de los frutos aumenta la intensidad de la abscisión reduciendo así la competencia por carbohidratos entre los frutos en desarrollo, cuando se aplican al inicio de la fase lineal del crecimiento del fruto aumenta su capacidad sumidero y la acumulación de carbohidratos en este se incrementa.

De acuerdo a Agustí *et al.* (1995), el número de flores producidas por un árbol tiene gran influencia en el tamaño final del fruto, encontrándose correlaciones más estrechas que entre el número y el tamaño de éstos.

En el momento de la antesis, los ovarios procedentes de plantas de alto nivel de floración, ya son más pequeños que los procedentes de plantas con menor nivel de floración (Guardiola *et al.*,1984). La reducción en la floración, aumenta el tamaño del fruto al disminuir la competencia en las primeras fases del desarrollo.

Los factores ambientales también afectan el tamaño final de los frutos. La temperatura afecta la acumulación de metabolitos en el fruto y por tanto, su crecimiento, está directamente asociado a la temperatura. El fruto es altamente susceptible a las altas temperaturas en algunas fases de su desarrollo inicial, resultando en un efecto permanente que causa una reducción de su tasa de crecimiento a lo largo del ciclo de desarrollo y hasta en una abscisión masiva de

frutos.

La disponibilidad hídrica es uno de los factores ambientales más relevantes en la determinación del tamaño final del fruto. El suministro de agua en cantidades insuficientes provoca reducción del tamaño final del fruto, mientras que riegos frecuentes logran aumentarlo significativamente (Agustí *et al.*, 2003).

La nutrición mineral afecta también el tamaño final del fruto, los elementos con mayor incidencia en el crecimiento de los frutos son el potasio y el magnesio. Una alta nutrición de potasio, promueve en general un incremento en el tamaño de los frutos sin afectar en forma negativa su calidad. En el caso del magnesio, en condiciones de deficiencia la partición de asimilados se resiente, su llegada al fruto se limita y su tamaño se ve reducido (Agustí *et al.*, 2003).

1.1.3 Partenocarpia

La producción de frutos sin semillas se denomina partenocarpia (Frost y Soost, 1968) y puede adoptar diferentes formas, dependiendo del momento en el cual el desarrollo de la semilla es interrumpido (Varoquaux *et al.*, 2000). La partenocarpia puede ser de dos tipos: obligada o estimulativa, entendiéndose a la primera como el cuajado de los frutos sin ningún estímulo externo. La tendencia partenocárpica y la esterilidad del óvulo pueden variar independientemente. La capacidad partenocárpica de las variedades está relacionada con los diferentes tipos de esterilidad gamética que se pueden producir. En variedades con partenocarpia obligada, se relaciona a la esterilidad gamética absoluta tanto masculina (incapacidad para producir polen funcional), como femenina (incapacidad para producir sacos embrionarios). La esterilidad gamética femenina absoluta no es muy común en los cítricos, aunque existen variedades en donde la mayoría de los óvulos que producen sus flores, están desprovistos de saco embrionario (Tadeo *et al.*, 2003).

La partenocarpia estimulativa requiere de algún tipo de estímulo para la producción de frutos. En este caso los estímulos pueden ser la polinización, la germinación del polen, o el crecimiento del tubo polínico sin la presencia de la fecundación. Muchas veces la fertilidad del óvulo y la presencia de polen compatible, enmascara la partenocarpia estimulativa (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996).

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

En nuestro país estudios realizados sobre mandarina Afourer comprobaron que este material genera frutos sin semilla en condiciones de polinización aislada, que su partenocarpia es de tipo autonómica, presentando una capacidad partenocárpica variable (Gravina *et al.*, 2011; Gambetta *et al.*, 2013).

Un mecanismo adicional de autoincompatibilidad y desarrollo de frutos partenocárpicos ha sido propuesto en el cultivar de mandarina Wuzishatangju por Ye *et al.* (2009), quienes reportan que en condiciones de autopolinización, el polen logra germinar, crecer en el estilo y penetrar al ovario pero no logra penetrar al saco embrionario, por lo que se bloquea la fecundación en el propio ovario. Algunos cultivares que usualmente producen semillas, pueden ser capaces de un grado variable de partenocarpia, especialmente los autoincompatibles (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996). Un caso puede ser el de las denominadas variedades partenocárpicas facultativas, donde en condiciones de monocultivo, pueden formar frutos sin semillas, como el tangor Ellendale (Vithanage, 1991), Ortanique (Borges *et*

al., 2009) y la mandarina Clementina de nules (Soler, 1999).

En algunos cultivares de *Citrus* se ha reportado la estenospermocarpia, que es la fecundación seguida de un aborto post-zigótico que resulta también en la producción de frutos sin semillas (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996). Existe una base genética de la partenocarpia, que en muchos casos se ha demostrado que está asociada con los niveles de ciertas fitohormonas como las giberelinas (Ben-Cheik *et al.*, 1995; Talón *et al.*, 1990; Pozo, 2001) y más recientemente con el ácido indolacético (Talón *et al.*, 1992).

1.1.4 Esterilidad y compatibilidad

La existencia de flores hermafroditas es una ventaja reproductiva que presentan las angiospermas, ya que aunque existen excepciones, es esperable una lógica coordinación en el desarrollo de las diferentes partes de una misma flor bajo las mismas condiciones ambientales. Este hermafroditismo asegura en gran medida la autogamia, con la consiguiente consanguinidad. Por esto las angiospermas han desarrollado variaciones florales tendientes a facilitar la alogamia, con el fin de asegurar la diversidad. Por lo tanto estigma y estilo desempeñan un papel muy importante, ya que es en estos, es donde se produce el impedimento de la germinación del polen del mismo individuo y hasta de la misma flor. Este fenómeno se lo conoce como incompatibilidad (Agustí, 2010).

Las condiciones ambientales pueden provocar en algunos casos la esterilidad de las plantas, pero principalmente, ésta se debe a factores genéticos. Se han descrito tres tipos de esterilidad genética. La primera, esterilidad homogenética, ocurre cuando el polen funcional no puede fecundar flores del mismo cultivar (autoincompatibilidad) o de otro cultivar (incompatibilidad de cruzamiento). En segundo lugar, la esterilidad gamética tiene lugar cuando existe desarrollo deficiente o ausencia de estambres (androesterilidad) o de ovarios (ginoesterilidad). Por último, la esterilidad citológica hace referencia a alteraciones de la meiosis durante la

gametogénesis (Agustí, 2010). La esterilidad junto a la partenocarpia son necesarias para la producción estable de frutos sin semilla (Ollitrault *et al.*, 2007).

La autoincompatibilidad es definida como la inhabilidad que presentan plantas que poseen gametos viables para producir un cigoto luego de la autopolinización (de Nettancourt, 1977). Cuando se presenta incompatibilidad, los granos de polen y los óvulos son fértiles y mediante sistemas de reconocimiento genético polen-pistilo, se detiene el crecimiento del tubo polínico impidiendo la fecundación (Agustí *et al.*, 2003).

El mecanismo de rechazo es activo y está basado en mensajes bioquímicos-genéticos, liberados desde el polen y del carpelo para que ocurra el reconocimiento y luego generar la respuesta (Lersten, 2004). Este reconocimiento, le permite al pistilo de las flores distinguir entre su propio polen (genéticamente relacionado), del polen foráneo (genéticamente no relacionado). Así, su propio polen es rechazado mientras que el polen foráneo es aceptado para la fertilización (Kao y McCubbin, 1996).

Existen dos sistemas de autoincompatibilidad, en base a si las reacciones de autoincompatibilidad están determinadas en el genotipo del propio polen (gametofítica) o en el genotipo de la planta de la cual proviene el polen (esporofítica). Mientras que la autoincompatibilidad esporofítica, generalmente implica una relación entre el estigma y el grano de polen germinado, la autoincompatibilidad gametofítica genera una inhibición de crecimiento del tubo polínico en el estilo (de Nettancourt, 1977; Newbigin *et al.*, 1993).

El sistema de autoincompatibilidad en citrus parece ser del tipo gametofítico, mientras que la esterilidad masculina y femenina se debe a genes de esterilidad, anomalías cromosómicas y triploidía (Ollitrault *et al.*, 2007). En el caso de la autoincompatibilidad gametofítica, el grano de polen germina al entrar en contacto con el exudado del estigma y comienza el crecimiento del tubo polínico; sin embargo, este no progresa más allá de las papilas estigmáticas y, morfológicamente,

presenta deposiciones irregulares de calosa (Khan y DeMason, 1988).

Ejemplos de este tipo de autoincompatibilidad son el mandarino Clementina de Nules, en el cual el crecimiento de los tubos polínicos no progresa más allá del extremo apical del estilo cuando se fuerza la autopolinización en el estado de flor abierta o anthesis (Pérez-Botella *et al.*, 1997) y la mandarina Afourer en que no superan el 40% de la longitud del estilo en autopolinización forzada (Gambetta *et al.* 2013).

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. Este resultado indica que la esterilidad femenina está directamente relacionada a la presencia de semillas en la fruta. Estudios realizados por Koltunow *et al.*, 1995 en naranja dulce Valencia sugieren que la baja capacidad de formar semillas (una a cuatro semillas por fruto) de este cultivar se debe a defectos durante el proceso de gametogénesis femenina y masculina.

Jackson (1997) definen la esterilidad gamética como la incapacidad de producir polen o sacos embrionarios funcionales. Es causada por diversos factores genéticos como ser la presencia de genes de esterilidad, anormalidades cromosómicas y triploidia (Ollitrault *et al.*, 2007).

Las variedades que producen polen y óvulos no funcionales, presentan frutos sin semillas sin importar su cercanía a otras variedades cítricas. Dos ejemplos de esterilidad gamética masculina son el naranjo dulce Washington navel (*Citrus sinensis* L. Osbeck) y la mandarina Satsuma (*Citrus unshiu* Marc.). En las naranjas del grupo navel se diferencian las células madres de polen, pero luego degeneran antes de dividirse y, por lo tanto, no se produce polen maduro y viable en las anteras (Frost y Soost, 1968). En estas dos variedades, puede presentarse la esterilidad gamética femenina, en donde la célula madre de la megáspora, muchas veces degenera antes de dividirse (Iwamasa, 1966).

2.MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

Los experimentos se realizaron en la Estación Experimental San Antonio, de la Facultad de Agronomía y en el INIA Salto Grande, ambos ubicados en el departamento de Salto, Uruguay (31° 21' LS, 57° 45' LO), y en el departamento de Paysandú, localidad de Villa Constancia (empresa Citrícola Salteña).

Los materiales estudiados fueron las mandarinas clon M9 (seedling de mandarina híbrida Ellendale x Satsuma Owari) injertado sobre *Poncirus trifoliata* y el clon B30 (híbrido de Ellendale x Satsuma Owari) injertados sobre *Citrangue Quintela* VI 2 y VII 4; la naranja Valencia Paylate y la naranja Valencia NVA 036 o Victoria, ambos originados en prospección nacional e injertados sobre *Poncirus trifoliata*.

2.2 ESTUDIO DE COMPATIBILIDAD Y CAPACIDAD PARTENOCÁRPICA

En el primer experimento se estudió la compatibilidad a nivel de campo, la capacidad partenocárpica y el potencial productivo de los cultivares. Para ello se seleccionaron y marcaron ramas secundarias de similar tamaño, 10 en M9 y B30, 16 en Valencia Victoria y 22 en Valencia Paylate. El número de flores promedio por rama fue de 217 en M9, 161 en B30, 132 en Valencia Victoria y 194 en Valencia Paylate. La mitad de estas ramas se cubrieron con malla antiabejas y previo al embolsado, se eliminaron las flores abiertas y se contabilizó la cantidad de botones florales iniciales. Una vez transcurrido el periodo de floración se procedió al retiro de las mallas.

A partir de la caída de pétalos, se inició un seguimiento del cuajado y diámetro ecuatorial de los frutos, cada 15 días y hasta la cosecha comercial. El

cuajado final se determinó evaluando presencia o ausencia de los frutos en ramas marcadas, y el diámetro fue medido con calibre digital. En la cosecha se evaluó la presencia y número de semillas en frutos en ramas embolsadas y en ramas sujetas a polinización abierta. Durante el desarrollo de los frutos se midió el porcentaje de cuajado en ambos tratamientos.



Figura 2. Fotografía de ramas embolsadas en Valencia Paylate.

2.3 GERMINACIÓN “*IN VITRO*” DEL POLEN

En el segundo experimento se estudió la capacidad germinativa del polen “*in vitro*”. Para ello se colectaron 20 flores al inicio de antesis, estado 59 de la escala BBCH (Agustí *et al.*, 1997), se colocaron en sílica gel durante 24 horas para promover la apertura de las anteras, y luego se hidrataron en heladera a 4°C.

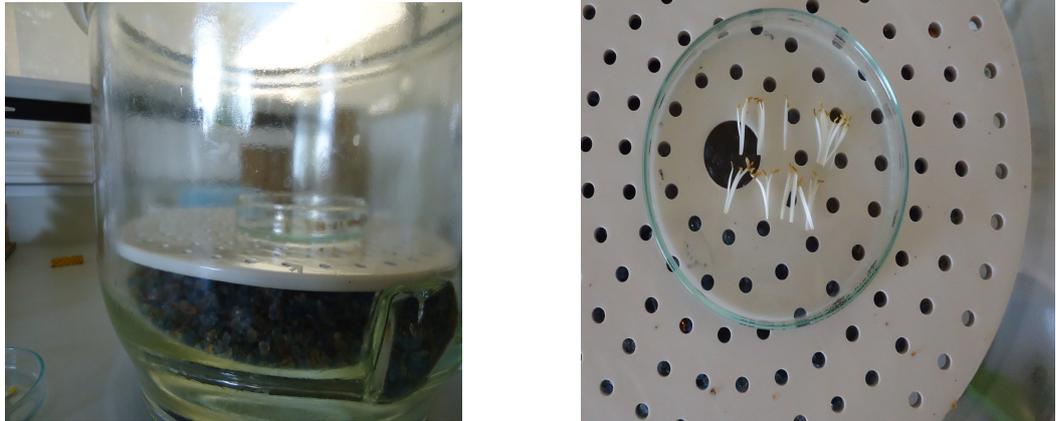


Figura 3. Fotografías del proceso de secado de anteras utilizando sílica gel.

La siembra se realizó en una cámara de flujo laminar sobre portaobjetos conteniendo el medio de cultivo Brewbaker y Kwack (1963) solidificado con Phytigel al 1% y cubierto con 30 u L de medio líquido. Los preparados se colocaron en cámara oscura a 25°C y 80% de humedad durante 72 horas. Una vez germinados se fijó con solución de FAA (5% formaldehído, 5% acético, 90% etanol al 70%). La germinación de polen se evaluó contabilizando un promedio de 200-300 granos de polen en siete repeticiones por cultivar, utilizando un microscopio óptico (Nikon E100). Se consideró grano de polen germinado cuando el tubo polínico duplicaba el tamaño del grano.

2.4 ESTUDIO DE LAS RELACIONES POLEN-PISTILO

En la tercera experiencia se marcaron y embolsaron 90 flores ubicadas en brotes terminales en estado 59 de la escala BBCH (Agustí *et al.*, 1997) de cada cultivar. A los 0, 3, 6, 9, 12 y 15 días se colectaron 15 flores de cada uno y se fijaron en solución FAA. Las muestras se conservaron a 4° C hasta su observación en microscopio de fluorescencia (Olympus Vanox AH3 y filtro U BH2- DMU para rango de emisión Hg 334-365 nm). Los pistilos fueron seccionados en ovario y estilo-estigma y colocados en una solución de sulfito sódico (5%) durante 12 horas. Luego de este periodo fueron enjuagados en agua destilada y se colocaron en una

nueva solución de sulfito sódico. Las secciones de estilos florales se tiñeron con azul de anilina al 0,1% en K_2HPO_4 0,1 N y se colocaron en portaobjetos con una gota de glicerina para evitar la deshidratación. La evaluación de la germinación de los granos de polen en el estigma, se realizó contabilizando 200 a 300 granos por flor y el desarrollo del tubo polínico en el estilo, se determinó como el porcentaje del estilo recorrido por el tubo más largo.



Figura 4. Fotografías de seccionado de pistilos y tinción en azul de anilina.

Para determinar la viabilidad de los óvulos, las flores almacenadas fueron enjuagadas con agua destilada, los ovarios fueron reblandecidos en microondas durante 15-20 segundos a 700 W. Los mismos se seccionaron ecuatorialmente y se realizó el mismo procedimiento de tinción. Los óvulos se rescataron y depositaron en portaobjeto con una gota de glicerina líquida. El porcentaje de óvulos viables se determinó contabilizando al azar 15 a 20 óvulos por flor considerándose viables aquellos que no presentaran depósito de calosa en la zona de la chalaza, no emitiendo fluorescencia

2.5 POLINIZACIONES CRUZADAS, PRESENCIA DE SEMILLAS Y CAPACIDAD PARTENOCÁRPICA

El cuarto experimento se realizó durante el segundo año de evaluación. Los materiales donadores de polen fueron: naranja Valencia, mandarina Afourer y limón tipo Lisbon. Estos se seleccionaron considerando la superficie que abarcan en las empresas citrícolas a nivel nacional y la capacidad germinativa de su polen. Previo a la apertura floral, estado 59 de la escala BBCH (Agustí *et al.*, 1997), se marcaron 500 brotes de flor terminal en los cultivares estudiados. Se aplicaron 5 tratamientos: autopolinización artificial y embolsado; emasculado y embolsado; emasculado, polinizado con polen de mandarina Afourer y embolsado; emasculado, polinizado con polen naranja de Valencia y embolsado; emasculado y polinizado con polen de limón y embolsado, y testigo de polinización abierta. El polen se colectó de flores en anthesis y se conservó por 24 horas en sílica gel a una temperatura de 20 °C., al día siguiente, se realizó la emasculación, polinización artificial y embolsado de flores.

También en el segundo año se evaluó la viabilidad del polen de los cultivares donadores y de los materiales en estudio. Para ello se colectaron 10 flores en el estado 59 de la escala BBCH (Agustí *et al.*, 1997), se extrajeron los estambres y con un pincel fino de espolvoreo el polen sobre un portaobjeto realizándose 5 repeticiones por cultivar. Posteriormente se le agregó una gota de solución compuesta por 0,5 % de cloruro de tetrazolio y 10 % de sacarosa, se cubrió inmediatamente con portaobjeto para excluir el oxígeno, y se incubó a 60 °C durante 1 hora (Bolat y Pirlak, 1999). Posteriormente se evaluó la viabilidad del polen utilizando un microscopio óptico (Nikon E100) considerando viables aquellos que presentaban tinción del polen, considerando los granos teñidos de rojo como viables, y los amarillos como no viables.

Aproximadamente a los 15 días de realizada las polinizaciones se retiraron las bolsas y se evaluó en forma quincenal el porcentaje de cuajado hasta el fin de caída fisiológica (fin de diciembre-enero) y el diámetro de los frutos hasta la maduración.

En cosecha se determinó la presencia, número de semillas, el porcentaje de cuajado y diámetro final de los frutos.



Figura 5. Fotografía de brotes polinizados artificialmente y embolsados en naranja Valencia Victoria.

2.6 ANALISIS ESTADÍSTICO

El porcentaje de cuajado y frutos con semillas se analizó estadísticamente con un modelo lineal generalizado en el programa estadístico INFOSTAT (versión 2013) interfase con R (versión 3.0.1), y se utilizó el test DGC para la separación de medias. El número medio de semillas por fruto se analizó mediante un análisis de varianza. La separación de medias se hizo por test de Tukey.

3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ESTUDIO DE COMPATIBILIDAD Y CAPACIDAD PARTENOCÁRPICA EN POLINIZACIÓN ABIERTA Y EN AUTOPOLINIZACIÓN.

Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 1, en el caso de las mandarinas en condiciones de polinización cerrada (autopolinización), el 100 % de los frutos del híbrido de mandarina B30, y el 98% de los de mandarina M9, no presentaron semillas. En cambio, en condiciones de polinización abierta, el comportamiento reproductivo fue diferente, la mandarina M9 presentó un 80% de frutos sin semilla contrastando con el híbrido de mandarina B30 que alcanzó solamente un 16 % de frutos sin semilla.

Adicionalmente, el número promedio de semillas por fruto en condiciones de polinización abierta, fue muy bajo en M9 (0,57 semillas por fruto) y de los frutos con semillas un 73 % presentaron solo una o dos semillas. La mandarina híbrida B30 en las mismas condiciones, presentó un promedio de 6,4 semillas por fruto y solamente un 16 % de éstos tuvo una o dos semillas. Esto indica que M9, aún en condiciones de libre polinización, presenta alta capacidad para cuajar frutos aspermos, lo que constituye una característica de alto valor comercial.

Resultados similares fueron encontrados por Mesejo *et al.*, (2007) trabajando con mandarinas Satsuma Owari y Clemenules polinizadas con mandarina Fortune, en el caso de Satsuma, las flores polinizadas en el momento de antesis presentaron un valor promedio máximo de cuatro semillas por fruto, no obteniendo semillas en las flores polinizadas cuatro días luego de antesis, lo que se asemeja al comportamiento encontrado en M9. Por el contrario en mandarina Clemenules se obtuvieron valores promedios de 25 semillas por fruto cuando las flores fueron polinizadas un día luego de antesis y siete semillas por fruto cuando se polinizaron ocho días post-antesis semejante a lo encontrado en mandarina híbrida B30.

Cuadro 1. Presencia de semillas y porcentaje de cuajado final en los híbridos de mandarina M9 y B30, y en las naranjas Valencia Paylate y Victoria en condiciones de polinización abierta y autopolinización.

	Tratamiento	Frutos sin semilla (%)	Nº promedio de semillas por fruto	Cuajado final de frutos (%)
M9	Polinización abierta	80 a	0,57 a	3,0 a
	Autopolinización	98 a	0,04 a	3,8 a
B30	Polinización abierta	16 b	6,4 a	3,5 a
	Autopolinización	100 a	0 b	2,7 a
Paylate	Polinización abierta	77 a	1,0 a	1,3 a
	Autopolinización	100 b	0 b	1,6 b
Victoria	Polinización abierta	96 a	0,04 a	3,3 a
	Autopolinización	100 b	0 b	2,8 b

Letras diferentes en columnas para cada cultivar, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Se han descrito tres tipos de esterilidad genética. La primera, esterilidad homocigótica, ocurre cuando el polen funcional no puede fecundar flores del mismo cultivar (autoincompatibilidad) o de otro cultivar (incompatibilidad de cruzamiento). En segundo lugar, la esterilidad gamética tiene lugar cuando existe desarrollo deficiente o ausencia de estambres (androesterilidad) o de ovarios (ginoesterilidad). Por último, la esterilidad citológica hace referencia a alteraciones de la meiosis durante la gametogénesis (Agustí, 2010). En el caso de las mandarinas evaluadas

B30 concuerda claramente con la esterilidad homogenética o fenómeno de autoincompatibilidad no presentando semillas en autopolinización pero si en polinización abierta y con elevado número de semillas por fruto. Por el contrario mandarina híbrida M9 se presenta como un material autoincompatible, no formando semillas en condiciones de autopolinización ni cuando fue polinizada con su propio polen (Cuadro 4) pero con una alta capacidad de formar frutos sin semillas en condiciones de polinización abierta.

La autoincompatibilidad en cítricos permite la obtención de frutos sin semillas. Varios cultivares de mandarinas e híbridos (Clementinas, Nova, Ortanique, Afourer) presentan esta característica y por lo tanto la capacidad de producir frutos partenocápicos (Soost, 1956; Hearn *et al.*, 1969; Soler, 1999; Gambetta *et al.*, 2013).

En el caso de la naranja Valencia Victoria, en condiciones de polinización cerrada (autopolinización) presentó un 100% de frutos sin semillas y un número promedio de semillas por fruto en polinización abierta extremadamente bajo (0,04 semillas por fruto). Este comportamiento reproductivo puede explicarse, en parte, por la nula capacidad de germinación y viabilidad de su polen evaluado durante el primer y segundo año (Cuadro 2), lo que sugiere que este material presenta una esterilidad gamética masculina.

El comportamiento reproductivo de Valencia Victoria en condiciones de polinización abierta alcanzó un 96% de frutos sin semilla, con un promedio de semillas por fruto de 0,04, a pesar de que sus óvulos permanecieron viables hasta el día 12 DPA (Cuadro 3). Durante el segundo año de evaluación, Valencia Victoria produjo semillas solamente cuando fue polinizado con mandarina Afourer presentando un alto porcentaje de frutos con semilla (62,5%) pero un promedio de semillas por fruto muy bajo (0,8) lo que sugiere una parcial viabilidad de sus óvulos (Cuadro 6).

En el caso de naranja Valencia Paylate el comportamiento reproductivo fue diferente en ambos años, no generando frutos con semilla el primer año en condiciones de polinización aislada (autopolinización) pero obteniendo el segundo año un 60 % de frutos con semilla cuando fue polinizado con su propio polen aunque con un promedio de semillas por fruto muy bajo (0,6).

El comportamiento reproductivo de Valencia Victoria y Paylate fue similar al encontrado por Mesejo *et al* (2007) en Valencia (*C. sinensis* (L.) Osbeck) donde en flores polinizadas con polen de mandarina Fortune en el momento de antesis y hasta ocho días post-antesis obtuvieron un valor máximo de cinco semillas por fruto en la primer fecha de polinización, no presentando semillas en flores polinizadas luego de 10 días post-antesis. Esto último se produce por el impedimento en el crecimiento del tubo polínico dado por las deposiciones de lignina en las paredes celulares del tejido estigmático y estigματοide que limitan la *receptividad* estigmática y por lo tanto el periodo de polinización efectivo en Valencia (*C. sinensis* (L.) Osbeck)

La dinámica de abscisión de estructuras reproductivas mostró un patrón diferente en todos los materiales y condiciones de polinización. Al retirar las mallas, 40 días post-antesis, M9 presentaba un mayor cuajado que B30, aunque durante el periodo de abscisión las diferencias disminuyeron, finalizando en valores similares (Figura 3).

En M9, durante todo el periodo evaluado, el porcentaje de cuajado fue levemente superior en las ramas con polinización impedida, en relación al testigo de polinización abierta. Por el contrario, en B30, el porcentaje de cuajado con o sin malla se mantuvo en niveles similares hasta mediados de diciembre, pero durante la fase final de abscisión, el cuajado en polinización abierta fue levemente superior a la autopolinización. El cuajado final en ambos cultivares fue relativamente elevado, sin diferencias significativas entre autopolinización o polinización abierta, aunque con

tendencias diferentes. En M9, el cuajado final bajo malla fue levemente superior al de polinización abierta, mientras que en B30 ocurrió lo contrario (Cuadro 1).

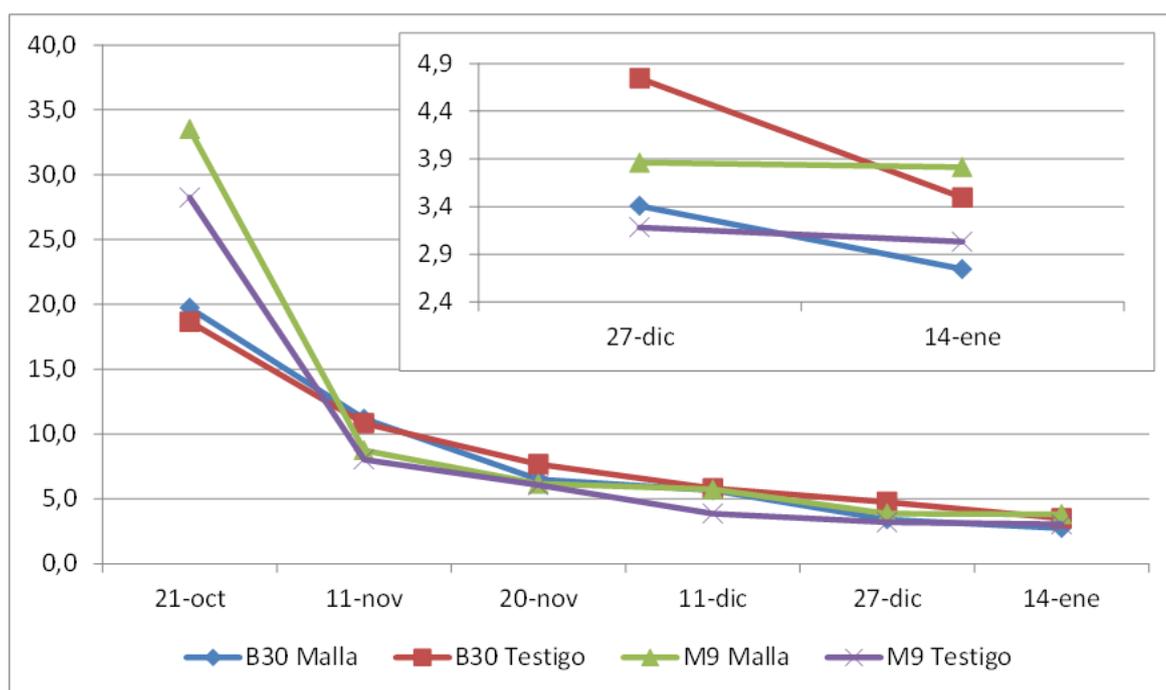


Figura 6. Evolución del porcentaje de cuajado de los híbridos M9 y B30 en condiciones de autopolinización y polinización abierta.

En el caso de las naranjas, Valencia Victoria fue la que obtuvo un mayor porcentaje de cuajado, con valores de 3,3% en condiciones de polinización abierta y 2,8% en autopolinización. La dinámica de abscisión fue similar en ambas condiciones siendo siempre superior el cuajado en libre polinización. Valencia Paylate presentó menor porcentaje de cuajado comparado con Valencia Victoria, en ambas condiciones de polinización, con un porcentaje levemente superior en condiciones de autopolinización 1,6% frente a 1,3% en polinización abierta.

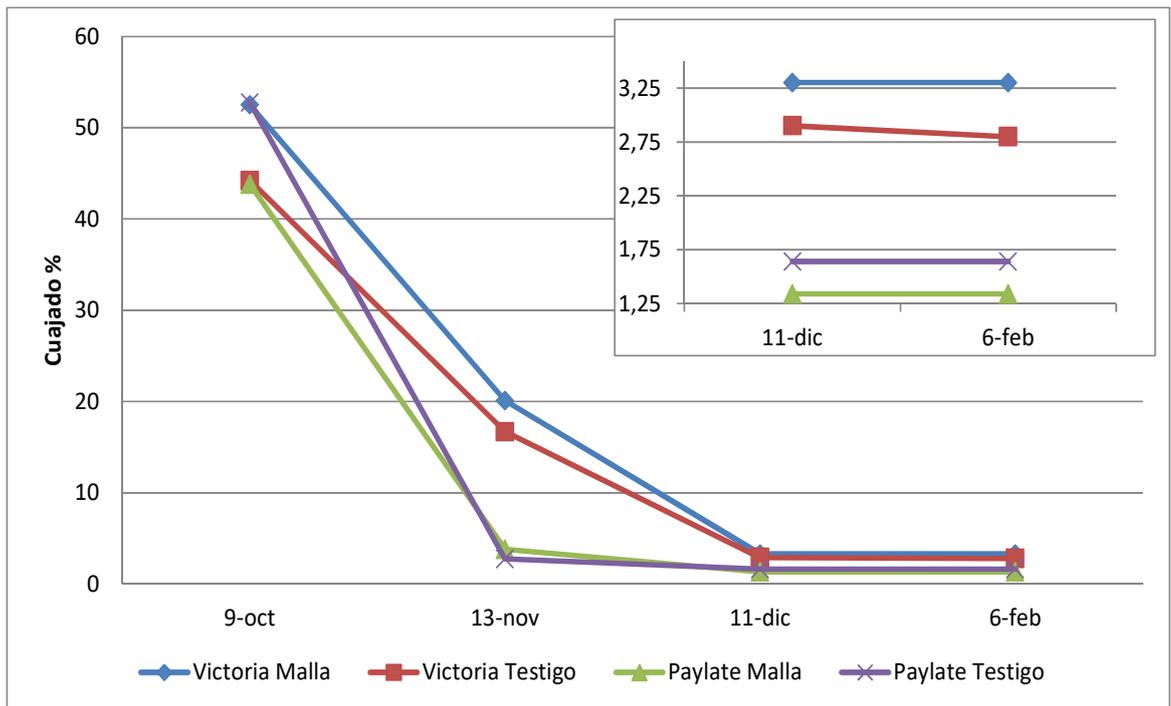


Figura 7. Evolución del porcentaje de cuajado de naranjas Valencias Victoria y Paylate en condiciones de autopolinización y polinización abierta.

La habilidad partenocárpica de Valencia Victoria puede considerarse alta logrando cuajar 2,8% de los frutos durante el primer año en polinización cerrada (autopolinización) y mejorando considerablemente en segundo año donde las flores emasculadas y autopolinizadas alcanzaron 12,5% y 8% de frutos cuajados, respectivamente. Esto sugiere que las flores de Valencia Victoria presentan una alta capacidad de sintetizar giberelinas incluso sin la necesidad del estímulo del polen para desencadenar el proceso partenocárpico. En estudios similares, Mesejo *et al.* (2013), demuestra que la partenocarpia en dos variedades de Clementinas (Marisol y Clemenules), es independiente al estímulo de la polinización y que su habilidad de cuajar depende de los niveles hormonales en el ovario, principalmente de los niveles de GA1.

3.2 GERMINACIÓN DEL POLEN “*IN VITRO*” E “*IN VIVO*”.

El comportamiento *in vitro* del polen de los cuatro materiales en estudio fue similar, presentando bajos porcentajes de germinación. La mandarina híbrida M9 fue la que obtuvo mayores valores alcanzando un 4,2 % mientras que las restantes no superaron el 1%. En los diversos cortes realizados a nivel del estigma no se observó germinación de granos de polen en ninguno de los materiales evaluados.

Cuadro 2. Germinación *in vitro* e *in vivo* del polen de los cultivares M9, B30, Paylate y Victoria. Datos correspondientes a siete repeticiones de 300 y 400 granos de polen promedio por placa *in vitro* para M9, B30, Victoria y Paylate, respectivamente y 5 flores *in vivo* a los 3, 6 y 9 días post antesis.

	Germinación de polen <i>in vitro</i>	Germinación polen <i>in vivo</i>
	%	%
M9	4,2	0
B30	0,5	0
Paylate	0,5	0
Victoria	0	0

Figura 8. Granos de polen en el estigma de mandarina híbrida M9, 12 días post antesis.

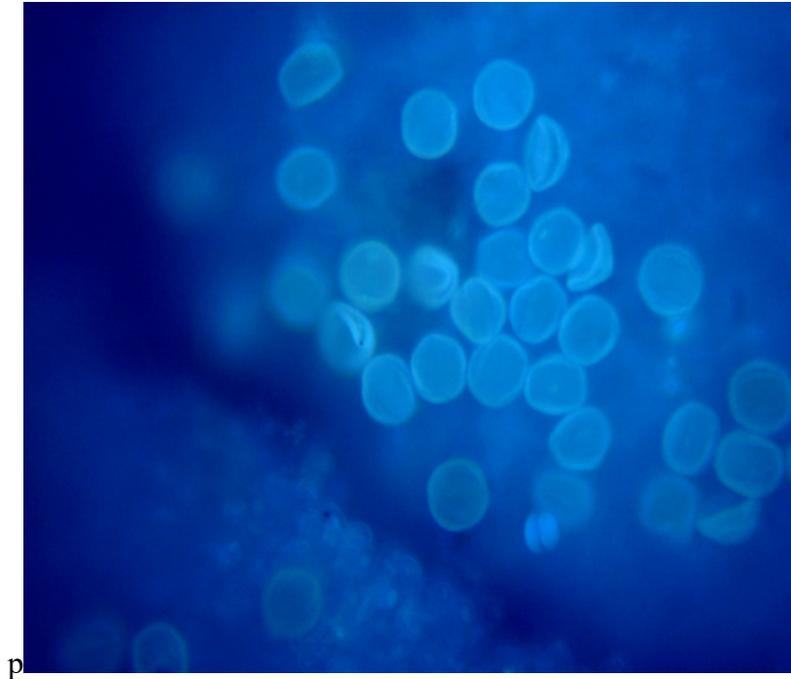
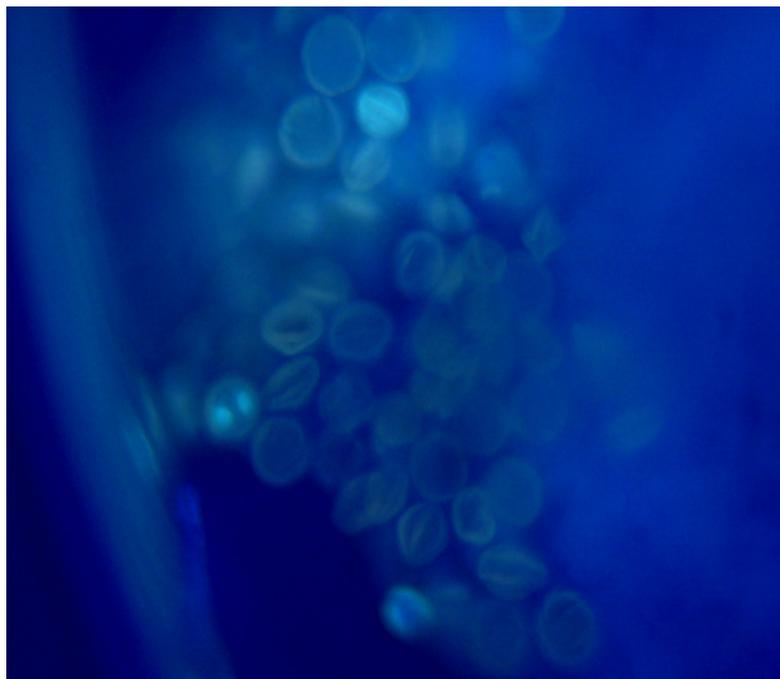


Figura 9. Granos de polen en el estigma de naranja Valencia Victoria, día 9 post antesis.



La muy escasa germinación de polen *in vitro* y nula *in vivo* de los materiales no parecen relacionarse con factores de clima prevalentes antes y durante la antesis, ya que en los 10 días previos a la obtención del polen para su análisis, las temperaturas medias se ubicaron en 20,2 °C y la HR en 82 %, que pueden considerarse adecuadas para la germinación, de acuerdo a Distefano *et al.* (2012). Temperaturas menores a 10 °C durante los días previos a la antesis, han sido reportadas como críticas para la germinación del polen *in vitro* (Pardo *et al.*, 2007, 2010), lo que no ocurrió durante el período considerado.

3.3 ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DE LOS ÓVULOS

La viabilidad de los óvulos presentó también un comportamiento diferente en todos los cultivares. En M9, ya a partir del día 3 post-antesis (DPA), se evidenció deposición de calosa en la zona de la chalaza, la cual se incrementó hasta los 12 DPA, en donde se verificó un 77 % de óvulos no viables. En B30, recién a los 9 DPA, se observaron los primeros síntomas de pérdida de viabilidad, alcanzando a los 12 DPA un 66 % de óvulos inviables.

Naranja Valencia Paylate presentó un comportamiento similar a M9 con una pérdida de viabilidad de los óvulos a partir del día 3 DPA incrementándose hasta el día 9 DPA donde se registró un 41 % de los óvulos inviables. En naranja Victoria recién a partir del día 9 DPA se evidencia pérdida de viabilidad de los óvulos alcanzando a 23,3 % el día 12 DPA.

Cuadro 3. Evolución de la pérdida de viabilidad de los óvulos *in vivo*. Valores expresados como porcentaje de óvulos con deposición de calosa sobre el total de óvulos contabilizados.

	Días post antesis				
	0	3	6	9	12
M9	0	14,1	21,4	69,4 c	77,5 b
B30	0	0	0	57,1 c	66 b
Paylate	0	21,4	49,5	41,3 b	30,5 a
Victoria	0	0	0	3,2 a	23,3 a

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

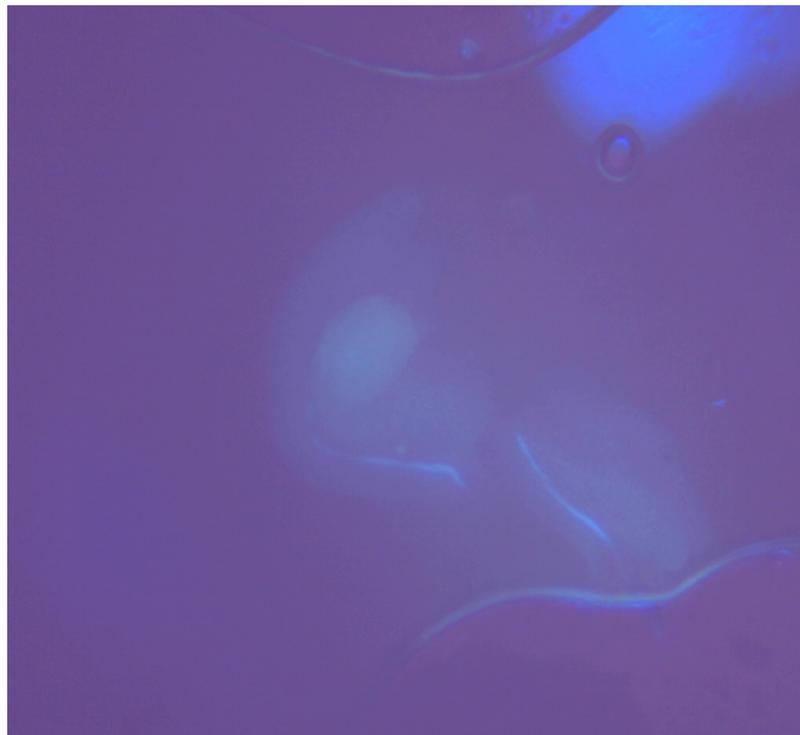


Figura 10. Fotografía de óvulos de mandarina híbrida B30, 9 días post antesis.

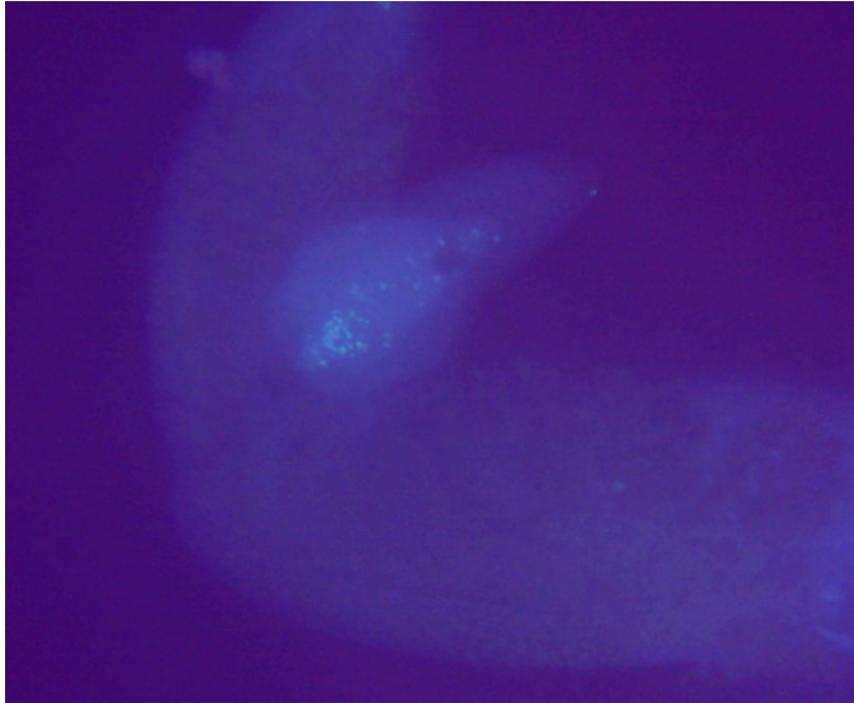


Figura 11. Fotografía de óvulos de naranja Valencia Victoria, 12 días post antesis.



Figura 12. Fotografía de óvulos de naranja Valencia Paylate, 12 días post antesis.

En M9, la viabilidad de sus óvulos comenzó a disminuir desde el tercer DPA, lo que puede explicar la baja capacidad de formación de semillas en condiciones de libre polinización. Este comportamiento sugiere un período efectivo de polinización de corta duración, lo que limitaría su capacidad de formación de semillas, similar al reportado por Mesejo *et al.* (2007) en mandarina Satsuma Owari. En B30, recién a los 9 DPA se observaron óvulos con signos de pérdida de viabilidad, lo que puede explicar -al menos parcialmente- la alta capacidad de formar frutos con semillas de este híbrido en condiciones de libre polinización.

3.4 ESTUDIO DE LAS POLINIZACIONES CRUZADAS, COMPATIBILIDAD Y LA CAPACIDAD PARTENOCÁRPICA.

Los resultados de los tratamientos de polinizaciones dirigidas, en términos de porcentaje de frutos con semilla y número de semillas por fruto en todos los materiales, se presentan en los cuadros 4, 5, 6 y 7. En mandarina híbrida M9, se observa la presencia de semillas solo cuando fue polinizado con polen de mandarina Afourer obteniendo un 33% de frutos con semilla, siendo nulo con naranja Valencia y en condiciones de autopolinización. Por el contrario, los frutos de mandarina híbrida B30 presentaron semillas con todos los polinizadores utilizados, alcanzando el 100 % con mandarina Afourer y naranja Valencia (Cuadro 4 y 5 respectivamente).

El estudio del comportamiento con polinizaciones dirigidas, demostró que M9 presenta una baja capacidad de formación de semillas, alcanzando solamente un 33 % de frutos con semillas con polen de Afourer y frutos aspermos con polen de naranja Valencia y limón tipo Lisbon. Esto podría ser explicado por el corto período efectivo de polinización en M9; adicionalmente se pudo observar factores anatómicos de la flor, como ser el largo del pistilo, que provocan la necesidad de mayor tiempo para la llegada del tubo polínico al micrópilo no logrando efectuar la fecundación y formación de semillas. Mandarina híbrida B30 por el contrario, presentó el total de sus frutos con semillas cuando fue polinizada con los dos primeros. Considerando las temperaturas medias ocurridas entre 10 días pre-

polinización y 10 días post-polinización, las mismas se ubicaron en 16,2 °C en M9 y 14,7 °C para B30, por lo que la baja presencia de semillas en el primero no debe atribuirse a factores exógenos.

Los resultados obtenidos indican que la mandarina híbrida M9 presenta una buena capacidad partenocárpica, ya que en ausencia de polen compatible alcanzó porcentajes de cuajado similares o superiores a los obtenidos en condiciones de polinización abierta. A su vez, las flores emasculadas en el segundo año, presentaron una abscisión total, no pudiendo cosecharse frutos, mientras que las polinizadas manualmente con su propio polen, alcanzaron un 6,7 % de cuajado, desarrollando todos sus frutos sin semillas. Esto sugiere que la partenocarpia en este híbrido es de tipo estimulativo. La capacidad partenocárpica de mandarina B30, resultó menor a la de M9, tanto en condiciones de aislamiento de polinización cruzada, como polinizada manualmente con su propio polen. De acuerdo a su habilidad de cuajar frutos en ausencia de polinización cruzada, los cultivares autoincompatibles se pueden clasificar, en improductivos o de baja capacidad partenocárpica y productivos, o de elevada capacidad de cuajado (Guardiola, 1992). Las causas de la falla en el cuajado inicial son fundamentalmente el bajo contenido de giberelinas en los ovarios (Talón *et al.*, 1990, 1992; Mesejo *et al.*, 2013) y la menor capacidad de atraer los carbohidratos en condiciones de alta competencia (Gómez-Cadenas *et al.*, 2000; Iglesias *et al.*, 2003).

El estudio de viabilidad del polen realizado durante el segundo año dio como resultado para naranja Valencia un 10,5 % de granos viables, mandarina Afourer 8,5 % y limón tipo Lisbon un 18 %. Dentro de los materiales en estudio la mandarina híbrida M9 presentó una mayor viabilidad de polen, alcanzando un 38 %, B30 19 % y Paylate solamente 2,2%; no observando polen viable en naranja Victoria.

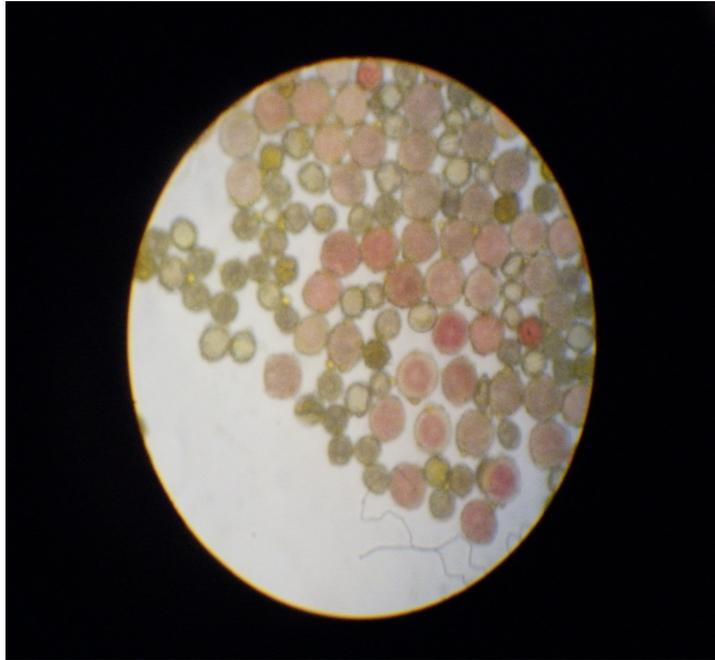


Figura 13. Fotografía de granos de polen de mandarina híbrida M9, test de viabilidad con sales de tetrazolio.

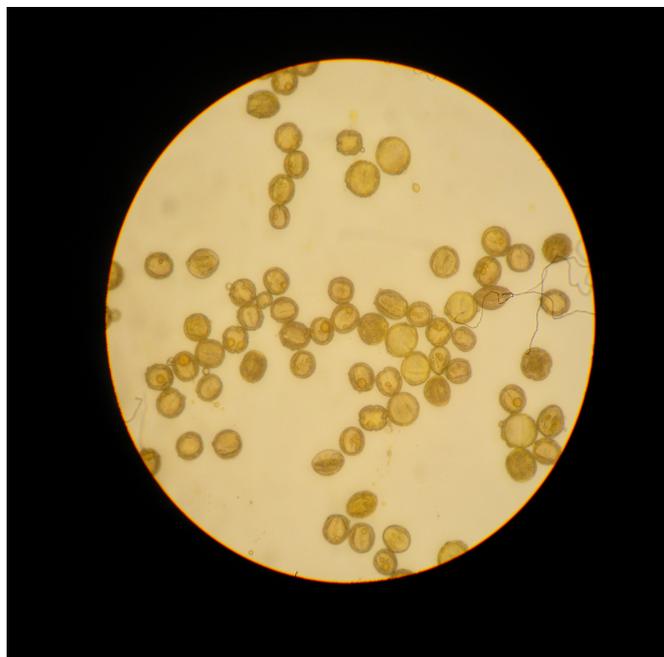


Figura 14. Fotografía de granos de polen de Valencia Victoria, test de viabilidad con sales de tetrazolio.

Las polinizaciones dirigidas con polen compatible, promueven en general un elevado cuajado de frutos (Borges *et al.*, 2009; Gravina *et al.*, 2011), y aún más, considerando que se seleccionan brotes de flor terminal, que naturalmente presentan mayor capacidad de cuajado (Erner y Shomer, 1996; daCunha Barros y Gravina, 2006; Rivas *et al.*, 2007). Esta fue la situación en B30, especialmente con polen de Afourer y Valencia. En M9, el porcentaje de cuajado con los mismos polinizadores fue bajo e inferior al alcanzado en condiciones de autopolinización, similar a los resultados del primer año, donde en condiciones de autopolinización, las flores de M9 presentaron igual o más capacidad de cuajado que en condiciones de polinización abierta. Esto confirma la alta capacidad partenocárpica de este híbrido.

Cuadro 4. Porcentaje de frutos con semilla y número de semillas por fruto en M9 polinizados con polen de mandarina Afourer, naranja Valencia, limón tipo Lisbon y Autopolinizado.

M9		
Polinizado	Frutos con semillas (%)	Semillas por fruto (Nº)
Afourer	30 a	0,7 a
Valencia	0 b	0 b
Lisbon	-	-
Autopolinizado	0 b	0 b

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Cuadro 5. Porcentaje de frutos con semilla y número de semillas por fruto en B30 polinizados con polen de mandarina Afourer, naranja Valencia, limón tipo Lisbon y Autopolinizado.

B30		
Polinizado	Frutos con semillas (%)	Semillas por fruto (N°)
Afourer	100	21 b
Valencia	100	6 b
Lisbon	67	0,7 a
Autopolinizado	0	0 c

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

En el caso de las naranjas, Valencia Victoria presentó semillas únicamente cuando fue polinizada con mandarina Afourer pero con número medio de semillas por fruto significativamente bajo (0,8), no formando semillas con polen de Valencia ni con su propio polen (autopolinización). Valencia Paylate presentó semillas solo en condiciones de autopolinización pero también con valores medios de semillas por fruto muy bajos (0,6). Adicionalmente en caso de Valencia Paylate, se presenta una temprana inviabilidad de los óvulos (tercer día post-antesis), lo que genera un corto periodo de efectivo polinización.

Cuadro 6. Porcentaje de frutos con semilla y número de semillas por fruto en Victoria polinizado con polen de mandarina Afourer, naranja Valencia, limón tipo Lisbon y Autopolinizado.

Victoria		
Polinizado	Frutos con semillas (%)	Semillas por fruto (N°)
Afourer	62,5 a	0,8 a
Valencia	0 b	0 b
Lisbon	0 b	0 b
Autopolinizado	0 b	0 b

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Cuadro 7. Porcentaje de frutos con semilla y número de semillas por fruto en Paylate polinizado con polen de mandarina Afourer, naranja Valencia, limón tipo Lisbon y Autopolinizado.

Paylate		
Polinizado	Frutos con semillas (%)	Semillas por fruto (N°)
Afourer	0 b	0 b
Valencia	-	-
Lisbon	0 b	0 b
Autopolinizado	60 a	0,6 a

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

La capacidad partenocárpica de todos los materiales, cuando sus flores fueron emasculadas o emasculadas y polinizadas manualmente con su propio polen, fue diferente. El cuajado fue nulo en M9 y B30 en flores emasculadas, con autopolinización, M9 alcanzó a 6,7% mientras que B30 solamente cuajó un 2,5 de sus flores (Cuadro 8). La respuesta a los cultivares polinizadores utilizados, también fue diferente en las mandarina y se relacionó con la presencia de semillas. Con polen de Afourer y Valencia, M9 presentó un porcentaje de cuajado relativamente bajo,

inferior inclusive al tratamiento de autopolinización, mientras que B30 cuajó 5 y 4 veces más, respectivamente.

Cuadro 8. Porcentaje de cuajado final en M9, B30, Paylate y Victoria de flores emasculadas, emasculadas y autopolinizadas, o polinizadas con Afourer, Valencia y limón tipo Lisbon. Número inicial de flores en cada tratamiento: 80 en M9, 100 en B30, Victoria y Paylate.

Hibrido/Polinizador	Porcentaje de frutos cuajados				
	Autopolinizado	Emasculado	Afourer	Valencia	Limón
M9	6,7 a *	0	5,0 b	3,3 b	-
B30	2,5 c	0	25,7 a	12,6 b	1,9 c
Paylate	4,7 a	1,2 b	2,0 b	-	2,0 b
Victoria	8,0 a	12,5 a	7,8 a	4,0 b	-

* Letras diferentes en filas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

En el caso de las naranjas, Valencia Victoria presentó altos porcentajes de cuajado en todos los tratamientos destacándose el resultado obtenido en flores emasculadas con un 12,5 % de frutos cuajados. Por el contrario Valencia Paylate tuvo un mayor porcentaje de cuajado en condiciones de autopolinización alcanzando a 4,5%, siendo relativamente bajo en las polinizaciones con Afourer, Limón y en flores emasculadas (Cuadro 8).

4. CONCLUSIONES

- Mandarina híbrida M9: se presenta como un material autoincompatible, con un periodo de polinización efectiva muy reducido, generado por una temprana inviabilidad de sus óvulos, por lo que de implantarse puede considerarse un material con alta capacidad de formar frutos con muy pocas semillas o aspermos. Presenta una buena habilidad partenocárpica.
- Mandarina híbrida B30: se presenta como un material autoincompatible, con alta intercompatibilidad por presentar óvulos completamente viables durante todo el periodo evaluado. De llegar a implantarse debería aislarse de la polinización con cultivares que sean fuente de polen compatible para evitar la formación de semillas. Presenta una buena capacidad partenocárpica.
- Naranja Valencia Victoria: presenta esterilidad gamética masculina producto de la inviabilidad de su polen y óvulos viables. Presenta una buena capacidad partenocárpica.
- Naranja Valencia Paylate: presentó un periodo de polinización efectivo reducido, por una disminución en la viabilidad de sus óvulos y una muy baja viabilidad de su polen. Presenta una habilidad partenocárpica aceptable.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Agustí M. 2010. Fruticultura. Madrid, Mundi-Prensa. 507 p
- Agustí M, Martínez-Fuentes A, Reig C, Mesejo C. 2005. Comportamiento agronómico del tangor ‘Afourer’. *Levante Agrícola*, 375: 124-128.
- Agustí M, Martínez-Fuentes A, Mesejo C, Juan M, Almela V. 2003. Cuajado y desarrollo de frutos Cítricos. Valencia, Generalitat Valenciana, Conselleria D’Agricultura, Peixca I Alimentació. 80 p. (Sèrie Divulgació Tècnica no. 55)
- Agustí M, Zaragoza S, Bleiholder H, Buhr L, Hack H, Klose R, Staub R. 1995. Escala BBCH para la descripción de estadios fenológicos del desarrollo de los agrios (Gén. Citrus). *Levante Agrícola*, 332: 189-199.
- Agustí M, Almela V, Pons J. 1992. Effects of girdling on alternate bearing in citrus. *Journal of Horticultural Science*, 67: 203-210.
- Agustí M, Almela V. 1991. Aplicaciones de fitoreguladores en citricultura. Primera Edición. Ed Aedos, 261p.
- Bain JM. 1958. Morphological, anatomical and physiological changes in the developing fruit of the “Valencia” orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Australian Journal of Botany*, 6: 1-24.
- Barret HC, Rhodes ML. 1976. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated citrus and its close relatives. *Systematic Botany*, 1: 105-136.
- Barry GH. 2004. The quest for seedless citrus fruit. En: International Citrus Congress (10th, 2004, Agadir, Marruecos). Proceedings. Agadir, Marruecos, International Society of Citriculture. v.1, p. 346
- Ben-Cheik W, Perez-Botella J, Tadeo FR, Talón M, Primo-Millo E. 1995. Pollination increases gibberellin levels in developing ovaries of seeded varieties of Citrus. *Plant Physiology*, 114, 557-564.
- Blanke MM. 2000. Photoinhibition in citrus. Proceedings International Society of Citriculture, 1:619-622.

- 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.
- Borges A, daCunha Barros M, Pardo E, García M, Franco J, Gravina A. 2009. Cuajado de frutos en tangor Ortanique en respuesta a la polinización y a distintas situaciones de estrés. *Agrociencia (Uruguay)*, 13(1): 7 - 18.
- Bower JP. 2000. Water stress in citrus and its alleviation. *Proceedings of International Society of Citriculture*, 1: 630-633.
- Brewbaker J L, Kwack B H. 1963. The essential role of calcium ion in the pollen tube growth. *American Journal of Botany*. 50 (9): 859-865.
- Caputi P, Montes F, 2010. Plan estratégico y diseño institucional para el sector cítrico en Uruguay Proyecto TCP/URU/3301- FAO
- Chao CT, Fang, J, Devanand PS. 2005. Long distance pollen flow in mandarin orchards determined by AFLP markers – implications for seedless mandarin production. *Journal of the American Society Horticultural Science*, 130(3):374-380.
- daCunha 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
- Davies F, Albrigo L. 1994. Cítricos. Ed. Acribia, Zaragoza, España. de Nettancourt D. 1977. Incompatibility in angiosperms. Berlin, Springer. 230 p.
- Domingues E, Neto A, Sobrinho J. 1999. *Scientia Agricola*, vol. 56 n.2.
- 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.
- Distefano G, Gentile A, Herrero M. 2011. Pollen-pistil interactions and early fruiting in parthenocarpic citrus. *Annals of Botany*, 108: 499-509.
- Erner Y, Shomer I. 1996. Morphology and anatomy of stems and pedicels of spring flush shoots associated with citrus fruit set. *Annals of Botany*, 77: 537-545.
- Fasiolo C, Inzaurrealde C, Cakic V, Gravina A. 2010. Cuajado de frutos en tangor ‘Ortanique’: su relación con factores exógenos. En: Simposio de

- Investigación y Desarrollo Tecnológico en Citrus (3°, 2010, Salto). Trabajos presentados. Montevideo, Facultad de Agronomía. 68-71.
- Frost HB, Soost RS. 1968. Seed reproduction: development of gametes and embryos. En: Reuther W, Batchelor LD, Webber HJ (Eds.). The Citrus Industry. Vol. 2 Berkeley: University of California Press. 290 - 319.
- Gambetta G, 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.
- Gambetta G, Borges A, Espino M, DaCunha 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)*, 2 (2): 1-9. 28.
- Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W. 1993. Fruits a developmental perspective. *Plant Cell* 5: 1439-1451.
- Gmitter FG, Hu X. 1990. The possible role of Yunnan Citrus species (Rutaceae). *Economic Botany*, v 44(2): 267-277.
- Goldschmidt EE, Monselise SP. 1977. Physiological assumptions toward the development of a citrus fruiting model. En: International Citrus Congress (1977, Orlando). Proceedings. Proceedings of International Society of Citriculture. Florida. 2: 668-672.
- Gómez-Cadenas A, Mehouchi J, Tadeo FR, Primo-Millo E, Talón M. 2000. Hormonal regulation of fruitlet abscission induced by carbohydrate shortage in citrus. *Planta*, 210: 636 – 643.
- Gravina A, Fornero C, Galiger S, Inzaurrealde C, Fasiolo C, Gambetta G. 2011. Partenocarpia, polinización cruzada y presencia de semillas en mandarina Afourer. *Agrociencia (Uruguay)*, 15(2): 40 - 47.
- Gravina A. 1999. Ciclo fenológico-reproductivo en citrus, bases fisiológicas y manejo. Montevideo, Facultad de Agronomía. CSIC. 55 p.
- 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)*. 2.112-116.

- Guardiola JL. 1997. Overview of flower bud induction, flowering and fruit set. (en línea). Florida, s.e. Consultado ago. 2011. Disponible en http://irrec.ifas.ufl.edu/flcitrus/pdfs/short_course_and_workshop/citrus_flowering_97/Guardiola-Overview_of_Flower_Bud_Induction.pdf
- Guardiola JL. 1992. Fruit set and growth. En: 2nd International Seminar on Citrus Physiology; 10 - 13 agosto, 1992; Bebedouro, San Pablo, Brasil. Bebedouro: Editora Legis Summa. 1 - 30.
- Guardiola JL, Chuliá M, Sancho J. 1984. The accumulation of mineral elements in the leaves of 'Clementine' mandarin as related to position. International Citrus Congress (5th: 1984: São Paulo, Brazil), 1: 220-224.
- Guardiola L J, Agustí M, García-Marí F. 1977. Giberellic acid and flower bud development in sweet orange. Proceeding of the international Society of Citriculture. 2: 696-699.
- Handaji N, Arsalane N, Ben Azouz A, Benyahia H, Gaboneet F, Srairi I, Esagide A. 2010. A diversification program of mandarin and orange varieties in Morocco. En: XI International Citrus Congress; 26 - 30 octubre, 2008; Wuhan, China. Beijing: China Agricultural Press. 59 - 61.
- Hearn CJ, Reece PC, Fenton R. 1969. Self-incompatibility and the effects of different pollen sources upon fruit characteristics of four Citrus hybrids. En: Chapman HD. (Ed.). Proceedings of the 1st International Citrus Symposium. Riverside: University of California. 183 - 187
- 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.
- Iwamasa, M. 1966. Studies on the sterility in genus citrus with special reference to the seedlessness. Bulletin of the Horticulture Research Station B. (6): 1-81.
- Jackson LK. 1997. Seed development in citrus. (en línea). Riverside, s.e. Consultado feb 2017. Disponible en http://irrec.ifas.ufl.edu/flcitrus/pdfs/short_course_and_workshop/citrus_flowering_97/Jackson-Seed_Development.pdf

- Kao T, Mc Cubbin AG. 1996. How flowering plants discriminate between self and non-self-pollen to prevent inbreeding. En: *Frontiers in Plant Biology: How Plants Communicate* (133, 1996, s.l.). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. s.n.t. 12059-12065
- Kearns CA, Inouye DW. 1993. *Techniques for pollination biologists*. Niwot: University of Colorado Press. 538p.
- Khan TL, DeMason DA. 1988. Citrus pollen tube development in cross-compatible gynoecia, self-incompatible gynoecia, and “*in vitro*”. *Canadian Journal of Botany*. 64: 2548-2555.
- Lersten NR. 2004. Flowering plant embryology with emphasis on economic species. (en línea). Ames, Iowa, Blackwell. Consultado set. 2017. Disponible en http://www.fagro.edu.uy/~botanica/www_botanica/recursos/curso_botanica/botanica_recursos_bibliograficos.html
- Lord EM, Eckard KJ. 1985. Shoot development in *Citrus sinensis* L. (Washington Navel orange). I. Floral and inflorescence ontogeny. *Botanical Gazette*. 146: 320-326.
- Mesejo C, 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.
- Mesejo C, Martínez-Fuentes A, Reig C, Agustí M. 2007. The effective pollination period in “Clemenules” mandarin, “Owari” Satsuma mandarin and “Valencia” sweet orange. *Plant Science*. 173: 223-230.
- MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias, UY). 2016. Encuesta cítrica “Primavera 2016”. Ed. MGAP, Montevideo, Uruguay 10 p.
- Montes F. 2014. Producción y comercio Cítrica. (en línea). Consultado marzo 2017. Disponible en <http://www.uruguayxxi.gub.uy/informacion/wp-content/uploads/sites/9/2015/09/Sector-C%C3%ADtricos-Setiembre-2015-Uruguay-XXI.pdf>

- Muñoz-Fambuena N, Mesejo C, Gonzalez-Mas MC, Iglesias D, Primo-Millo E, Agustí M. 2012. Gibberellic acid reduces flowering intensity in sweet Orange (*Citrus sinensis* (L) Osbeck) by repressing CiFT gene expression. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31(4): 529-536.
- Muñoz-Fambuena N, Mesejo C, González-Mas MC, Primo-Millo E, Agustí M, Iglesias DJ. 2011. Fruit regulates seasonal expression of flowering genes in alternate-bearing 'Moncada' mandarin. *Annals of Botany*. 108: 511-519.
- Navarro L, Aleza P, Cuenca J, Juárez J, Pina J, Ortega C, Navarro A, Ortega V. 2015. The mandarin triploid breeding program in Spain. *Acta Horticulturae*, 1065: 389 - 395.
- Newbigin E, Anderson MA, Clarke E. 1993. Gametophytic selfincompatibility systems. *The Plant Cell*. 5: 1315-1324.
- Ollitrault, P. and Navarro, L. 2012 *Citrus*. En: *Fruit Breeding: Handbook of Plant Breeding* 8 (Badenes, M.L. and Byrne, D.H., eds), pp. 623–662. New York, USA: Springer.
- Ollitrault P, Froelicher Y, Dambier D, Luro F, Yamamoto M. 2007. Seedlessness and ploidy manipulation. En: Khan, I. ed. *Citrus; genetics, breeding and biotechnology*. London, CAB International. pp. 197-218.
- Osawa I. 1912. Cytological and experimental studies in *Citrus*. *Journal of the College of Agriculture* 4: 83-116.
- Pardo J, Cano A, Bermejo A, Zaragoza S. 2010. La temperatura, la viabilidad del polen y la formación de semillas en los cítricos. *Levante Agrícola*. 399 (1): 20-29.
- 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.
- Pérez-Botella J, Tadeo FR, 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'. En: Reunión Nacional de la SEFV (12ª.), Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal (5º, 1997, Córdoba). Trabajos presentados. Sevilla, Junta de Andalucía. 456 p.

- Poehlman, JM, Sleper DA. 2003. Mejoramiento genético de las cosechas. 2ª. ed. México, Limusa. 511 p.
- Pozo LV. 2001. Endogenous hormonal status in citrus flowers and fruitlets: relationships with post-bloom fruit drop. *Scientia Horticulturae*, 91: 251-260.
- Rivas F, Vignale B. 2014. Nuevas oportunidades varietales de Citrus para la mejora de la competitividad. Resultados de Investigación en Citricultura. Jornada de Divulgación INIA. 129 p. (Serie de Actividades de Difusión N° 752)
- Rivas F, Gravina A, Agustí M. 2007. Girdling effects on fruit set and quantum yield efficiency of PSII in two Citrus cultivars. *Tree Physiology*, 27: 527 - 535.
- Schneider H. 1968. The anatomy of Citrus. En: Reuther, W.; Batchelor, L.; Webber, H. eds. *The Citrus Industry*. Berkeley, University of California. v. 2, cap. 1, pp. 1-85.
- Scora RW. 1975. On the history and origin of Citrus. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 102: 369-375.
- Soler J. 1999. Reconocimiento de variedades de cítricos en campo. Valencia, Generalitat Valenciana. 188 p. (Serie de Divulgación Técnica no. 43).
- Soost RK. 1956. Unfruitfulness in the Clementine mandarin. *Proceedings of the American Society for Horticulturae Science*, 67: 171 - 175.
- Speroni, G., Bonifacino, M. 2010. Morfología vegetal. Aspectos fisiológicos y ecológicos. Pp. 51-78, en Vallarino A. (El Vegetal en) *El diseño del paisaje*. Universidad de la República. Uruguay
- Spiegel-Roy P, Goldshmidt E. 1996. *Biology of citrus*. Cambridge, Cambridge University Press. 230 p.
- 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.
- 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)

- Talón M, Mehouchi J, Moltalván J, Tudela E, Villalba D. 1999. Factores que afectan la abscisión y el cuajado de los frutos de los cítricos. *Levante Agrícola*, 346:5-13.
- Talón M, Zacarías L, Primo-Millo E. 1992. Gibberellins and parthenocarpic ability in developing ovaries of seedless mandarins. *Plant Physiology*. 99: 1575-1581.
- Talón M, Zacarias 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.
- Tanaka T. 1954. Species problem in citrus (*Revisio aurantiacearum IX*). Japanese Society for the Promotion of Science, Tokio. 152 pp.
- Tolkowsky S. 1938. *Hesperides, a History of the Culture and Use of Citrus Fruits*. John Bale, Sons and Curnow, London. 371 pp.
- 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.
- Varoquaux F, Blanvillain R, Delseny M, Gallois P. 2000. Less is better: New approaches for seedless fruit production. *Trends Biotechnol*. 18:233–242.
- Vasil IK. 1987. Physiology and culture of pollen. *International Review of Cytology*. 107: 127-174.
- Vithanage V. 1991. Effect of different pollen parents on seediness and quality of 'Ellendale' tangor. *Scientia Horticulturae*. 48: 253-260.
- Webber HJ, Reuther W, Lawton W. 1967. History and development of the Citrus industry. En: Reuther, W., Batchelor, L.D., Webber, H.J. (editores). *The Citrus Industry*. Volume 1. University of California, Berkeley, USA. 1-39 pp.
- Williams RR. 1965. The effects of summer nitrogen applications on the quality of apple blossom. *The Journal of Horticulture Science*. 40: 31-34.
- 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.

Ye W, Qin Y, Ye Y, Teixeira Da Silva JA, Zhang L, Wu X, Lin S, Hu G. 2009. Seedless mechanism of a new mandarin cultivar "Wuzishatangju" (*Citrus reticulata* Bl). *Plant Science*. 177 (1): 19-27.

6. ANEXOS

Caracterización del comportamiento reproductivo de dos nuevos híbridos de mandarina

Mautone Ana Paula¹, Rey Florencia¹, Pereira das Neves Virginia¹, Guimaraes Natalia¹, Gambetta Giuliana¹, Gravina Alfredo¹

¹Universidad de la República, Facultad de Agronomía, Departamento de Producción Vegetal. Avenida Garzón 780, 12900 Montevideo, Uruguay. Correo electrónico: agravina@fagro.edu.uy

Recibido: 21/12/15 Aceptado: 10/11/16

Resumen

Durante dos ciclos anuales se estudió el comportamiento reproductivo de dos nuevos híbridos de mandarinas (tangor 'Ellendale' x Satsuma 'Owari'), denominados M9 y B30, desarrollados en el Programa de Mejoramiento Genético de Citrus de Uruguay. Ambos demostraron presentar autoincompatibilidad, tanto en autopolinización natural como en polinizaciones dirigidas. El polen de ambos híbridos presentó baja capacidad de germinación *in vitro* y en el caso de M9, a partir del tercer día post-antesis, se evidenció pérdida de viabilidad *in vivo* de sus óvulos. En condiciones de libre polinización, M9 desarrolló un 80 % de frutos aspermos, mientras que en B30, el porcentaje alcanzó apenas a 16 %. Polinizado con polen de mandarina 'Afourer', naranja 'Valencia' y limón tipo 'Lisbon', M9 solamente con 'Afourer' desarrolló frutos con semillas (33%). B30 por el contrario, presentó 100 % de frutos con semillas al ser polinizada con 'Afourer' y 'Valencia'. Se discuten las diferencias reproductivas entre ambos híbridos.

Palabras clave: autoincompatibilidad, capacidad partenocárpica, semillas, viabilidad de polen

Summary

Characterization of the Reproductive Behavior of Two New Mandarin Hybrids

The reproductive behavior of M9 and B30, two new hybrids of mandarin ('Ellendale' tangor x Satsuma 'Owari') developed at the Uruguayan Citrus Breeding Program, was studied during two annual cycles. Self-incompatibility of both cultivars was demonstrated, both in natural self-pollination and in directed pollination. In both hybrids, low *in vitro* pollen germination ability was found. In M9, since 3rd day after anthesis, an *in vivo* ovule viability loss was evident. At open pollination, 80 % of M9 fruit was seedless, while in B30 the percentage scarcely reached 16 %. After pollinated with 'Afourer' mandarin, 'Valencia' orange and 'Lisbon' lemon, M9 had only 33 % of seedy fruit when 'Afourer' was the pollinator. On the contrary, B30 presented 100 % of seedy fruit after being pollinated with 'Afourer' and 'Valencia'. Reproductive differences between both hybrids are discussed.

Keywords: self-incompatibility, parthenocarpic ability, seeds, pollen viability

Introducción

La tendencia actual en el desarrollo de variedades de *Citrus* indica que una de las principales características requeridas en la fruta para consumo en fresco, es la ausencia o bajo número de semillas. Aunque ese atributo no es estricto o absoluto y ha variado en el tiempo y en los diferentes mercados, una variedad puede considerarse sin semillas si el número de estas no excede a una cada doce frutos.

Con ese objetivo, se han desarrollado en los últimos años programas de mejoramiento genético tendientes a lograr cultivares de alta calidad organoléptica que desde el punto de vista reproductivo sean autoincompatibles, y/o que no polinicen ni sean polinizados por otros genotipos mediante la polinización cruzada (Vardi *et al.*, 2008; Handaji *et al.*, 2010; Navarro *et al.*, 2015).

La autoincompatibilidad en *Citrus* -incapacidad de producir la fecundación en condiciones de autopolinización- es

fundamentalmente de tipo gametofítico (Soost, 1969; Ditefano *et al.*; 2009). Los ejemplos más conocidos de cultivares partenocárpicos y autoincompatibles son las naranjas de ombligo, las mandarinas Satsumas y las Clementinas (Frost y Soost, 1968; Soler, 1999). En nuestras condiciones, Inzaurrealde *et al.* (2010) demuestran la autoincompatibilidad del tangor 'Ortanique', el cual es eficientemente polinizado por la mandarina 'Nova' (Borges *et al.*, 2009). También la mandarina 'Afourer' se comporta en Uruguay como autoincompatible, pero es polinizada por varios cultivares, por lo que sus frutos presentan semillas en condiciones de polinización abierta (Gravina *et al.*, 2011; Gambetta *et al.*, 2013).

El polen de los cítricos es pesado y con capacidad de adherencia, por lo que la polinización entre cultivares compatibles es fundamentalmente entomófila, siendo las abejas los insectos de mayor importancia en el proceso. Aunque se ha demostrado que el polen puede ser transportado varios cientos de metros por las abejas (Chao *et al.*, 2005), su eficiencia en la polinización y posterior presencia de semillas se va perdiendo, disminuyendo de un rango de 52-80 % a 13-39 % de frutos con semillas entre los primeros 60 m y los 100-250 m de distancia de la fuente de polen (Otero y Rivas, 2010). En el caso de cultivares autoincompatibles pero no estériles, las alternativas para obtener frutos sin semillas son principalmente el aislamiento, ya sea geográfico o mediante mallas antiabejas colocadas sobre las plantas durante la floración (Nadori, 2006).

En el marco del Programa de Mejoramiento Genético de *Citrus* en Uruguay (Rivas *et al.*, 2014), se han obtenido varios híbridos de mandarina, entre los cuales se destacan por la calidad de su fruta los denominados M9 y B30 ('Ellendale' x Satsuma 'Owari'). Para la zona de Salto, M9 alcanza su maduración en julio con buen tamaño de fruta y 11,5 °Brix; B30 madura en agosto superando los 15 °Brix con tamaños similares a M9. Observaciones preliminares indican que en condiciones de libre polinización, ambos presentan semillas, aunque en diferentes proporciones. En este trabajo se planteó como objetivo la caracterización del comportamiento reproductivo de M9 y B30 con énfasis en su tipo de compatibilidad, capacidad partenocárpica y formación de semillas en condiciones de polinización libre y dirigida.

Materiales y métodos

Los experimentos se realizaron en la Estación Experimental San Antonio, de la Facultad de Agronomía, ubicada en el departamento de Salto, Uruguay (31° 21' LS, 57° 45' LO), en los ciclos productivos 2013-2014 y 2014-2015.

En los tres experimentos se utilizaron plantas adultas de M9 y B30 (tangor 'Ellendale' x Satsuma 'Owari'), injertadas sobre *Poncirus trifoliata* L. Raf. y citrange Q VII (*C. sinensis* L. Osb. x *P. trifoliata*), respectivamente. Los árboles se encontraban en una colección varietal del programa de mejoramiento genético de la Facultad de Agronomía. Los árboles de mandarina 'Afourer', naranja 'Valencia' y limón tipo 'Lisbon', utilizados en el Experimento 3 como donadores de polen, se encontraban en el mismo predio.

Experimento 1. Estudio de la autocompatibilidad y aptitud partenocárpica

En plantas de M9 y B30 se marcaron diez ramas secundarias de similar tamaño por cultivar, con un promedio de 217 y 161 flores respectivamente. A cinco ramas, se les colocaron estructuras de alambre, las cuales se cubrieron con malla antiabejas durante todo el período de floración. Finalizado el mismo, las mallas fueron retiradas y quince finalmente se evaluó el número de frutos presentes hasta el final de la caída fisiológica. Con esos datos, se construyó la curva de abscisión de flores y frutos en cada situación y cultivar y se determinó el porcentaje de cuajado final. En la madurez se contabilizó el número de semillas por fruto.

Experimento 2. Germinación de polen *in vitro*

Se colectaron 20 flores al inicio de anthesis y se colocaron en sílica gel durante 24 h para promover la apertura de las anteras. Posteriormente se hidrataron los granos de polen en heladera a 4 °C. La siembra se realizó en cámara de flujo laminar sobre portaobjetos conteniendo el medio de cultivo Brewbaker y Kwack (1963) solidificado con Phytigel al 1 % y cubierto con 30 µL de medio líquido. Los preparados se colocaron en cámara oscura a 25 °C y 80 % de humedad durante 72 h y posteriormente se fijaron con solución de FAA (5 % formol aldehído, 5 % ácido acético, 90 % etanol al 70 %). La germinación de polen se evaluó contabilizando siete repeticiones de 300 y 400 granos de polen por placa para M9 y B30, respectivamente, utilizando un microscopio óptico (Nikon E100). Se consideró grano de polen germinado cuando el tubo polínico duplicaba el tamaño del grano.

Germinación de polen, crecimiento del tubo polínico y viabilidad de óvulos *in vivo*

En cada cultivar se marcaron y embolsaron 90 brotes de flor terminal en estado 59 de la escala BBCH (Agusti *et al.*, 1995). A los 0, 3, 6, 9 y 12 días se colectaron 15 flores por cultivar y se fijaron en solución FAA, conservándose a 4 °C hasta su observación en microscopio de fluorescencia

(Olympus Vanox AH3 y filtro U BH2-DMU para el rango de emisión Hg 334-365 nm). Los pistilos fueron seccionados en ovario y estilo-estigma, y colocados en una solución de sulfito sódico (5 %) durante 12 h. Luego de este período se enjuagaron en agua destilada y se colocaron en una nueva solución de sulfito sódico. El ablandamiento de los tejidos se realizó en microondas (15-20 segundos, 700 W). Las secciones de los estilos se tiñeron con azul de anilina al 0,1 % en K_2HPO_4 0,1 N (Kearns e Inouye, 1993), y se colocaron en portaobjetos con una gota de glicerina para evitar la deshidratación. La evaluación de la germinación de los granos de polen en el estigma se realizó con microscopio de fluorescencia, contabilizando los granos germinados por flor en un total de 200-270 granos por fecha y cultivar. Para evaluar la viabilidad de los óvulos, los ovarios reblandecidos se seccionaron ecuatorialmente y bajo lupa binocular se rescataron los óvulos con la ayuda de pinzas. Estos fueron colocados en portaobjetos y para teñirlos, se les agregó unas gotas de solución de azul de anilina al 0,1 % en tampón K_2HPO_4 0,1N (Kearns e Inouye, 1993). Luego de 20 minutos, se secaron con papel de filtro, se les agregó glicerina, se cubrieron con cubreobjetos y se realizó un 'squash'. Los preparados fueron observados en microscopio de fluorescencia. La viabilidad de óvulos se determinó contabilizando al azar, en promedio 70 y 38 óvulos por fecha en M9 y B30 respectivamente, considerándose no viables aquellos que presentaron depósito de calosa en la zona de la chalaza, emitiendo fluorescencia.

Experimento 3. Estudio de polinización cruzada

Previo a la antesis, se seleccionaron para cada tratamiento 80 y 100 brotes de flor terminal en M9 y B30, respectivamente. Al alcanzar el estado 59 de la escala BBCH, se aplicó con un pincel polen de naranja 'Valencia', limón tipo 'Lisbon', mandarina 'Afourer' y polen propio, obtenido en forma similar a lo descrito en el Experimento 2 y poste-

riormente se cubrieron con bolsas de tul. A los 15 días se retiraron las bolsas y quincenalmente se cuantificó el número de ovarios/frutitos presentes, hasta el final de la caída fisiológica, para determinar el cuajado final. Además, para estudiar la viabilidad de los granos de polen de los genotipos M9 y B30, se colectaron 10 flores en el estado 59, y la extracción del polen se realizó según lo descrito anteriormente. Con un pincel fino se espolvoreó el polen sobre un portaobjeto que contenía una gota de solución al 0,5 % de cloruro de tetrazolio y 10 % de sacarosa; se cubrió inmediatamente con portaobjeto para excluir el oxígeno, y se incubó a 60 °C durante 1 h (Bolat y Pirlak, 1999). En microscopio óptico se evaluó la viabilidad del polen, considerando los granos teñidos de rojo como viables, y los amarillos como no viables.

Resultados

Nuestros resultados indican que en condiciones de autopolinización, el 98 % y el 100 % de los frutos de los híbridos M9 y B30, respectivamente, no presentaron semillas, por lo que puede afirmarse que ambos genotipos son auto-incompatibles. Por el contrario, en condiciones de polinización abierta, el comportamiento reproductivo fue diferente, ya que en M9, el 80 % de los frutos no presentó semillas, mientras que en B30 ese porcentaje alcanzó solamente el 16 % (Cuadro 1). Adicionalmente, el número promedio de semillas por fruto en condiciones de polinización abierta fue muy bajo en M9 (0,57 semillas por fruto) y de los frutos con semillas un 73 % presentaron solo una o dos semillas. En las mismas condiciones, B30 presentó 6,4 semillas por fruto y solamente un 16 % de estos tuvo una o dos semillas. Esto indica que M9, aun en condiciones de libre polinización, presenta alta capacidad para cuajar frutos aspermos, lo que constituye una característica de alto valor comercial.

La dinámica de abscisión de flores y frutitos fue diferente entre ambos híbridos y condiciones de polinización. Al retirar

Cuadro 1. Presencia de semillas y porcentaje de cuajado final en los híbridos M9 y B30 en condiciones de polinización abierta y autopolinización.

Híbrido	Tratamiento	Frutos sin semillas (%)	Nº promedio de semillas por fruto	Cuajado final de frutos (%)
M9	Polinización abierta	80 a*	0,57 a	3,0 a
	Autopolinización	98 a	0,04 a	3,8 a
B30	Polinización abierta	16 b	6,40 a	3,5 a
	Autopolinización	100 a	0	2,7 a

*Letras diferentes en columnas para cada híbrido indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

las mallas 40 días post-antesis, M9 presentaba un mayor cuajado que B30, aunque durante el período de abscisión las diferencias disminuyeron, finalizando en valores similares (Figura 1). En M9, durante todo el período evaluado, el porcentaje de cuajado fue levemente superior en las ramas en condiciones de autopolinización, en relación al testigo de polinización abierta. Por el contrario, en B30 el porcentaje de cuajado con o sin malla se mantuvo en niveles similares hasta mediados de diciembre, pero durante la fase final de abscisión el cuajado en polinización abierta fue levemente superior a la autopolinización (Figura 1). El cuajado final en ambos cultivares fue relativamente elevado, sin diferencias significativas entre autopolinización o polinización abierta, aunque con tendencias diferentes. En M9, el cuajado final bajo malla fue levemente superior al de polinización abierta, mientras que en B30 ocurrió lo contrario (Cuadro 1).

Ambos cultivares presentaron baja capacidad de germinación de polen *in vitro*, en especial B30, que fue inferior a 1 %. La germinación *in vivo* fue nula en ambos híbridos hasta los 12 días post antesis (Cuadro 2).

La viabilidad de los óvulos también fue diferente en ambos híbridos. En M9 a partir del día 3 post-antesis (DPA) se evidenció deposición de calosa en la chalaza, la cual se

Cuadro 2. Germinación *in vitro* e *in vivo* del polen de los híbridos M9 y B30. Datos correspondientes a siete repeticiones de 300 y 400 granos de polen promedio por placa *in vitro* para M9 y B30, respectivamente y cinco flores *in vivo* a los tres y seis días post-antesis.

Híbrido	Germinación de polen <i>in vitro</i> (%)	Germinación de polen <i>in vivo</i> (%)
M9	4,2	0
B30	0,5	0

incrementó hasta los 12 DPA. En B30 los primeros síntomas de pérdida de viabilidad se observaron a los nueve días post-antesis (Cuadro 3).

Los resultados de los tratamientos de polinizaciones dirigidas, en términos de porcentaje de frutos con semilla y número de semillas por fruto se presentan en el Cuadro 4. En M9 solamente se obtuvieron frutos con semilla cuando sus flores fueron polinizadas con polen de mandarina 'Afourer'. Esto confirma tanto la autoincompatibilidad de este híbrido como la escasa capacidad de sus flores de ser fecundadas con polen foráneo. Por el contrario, los frutos de B30 presentaron semillas con todos los polinizadores utilizados, alcanzando el 100 % con mandarina 'Afourer' y

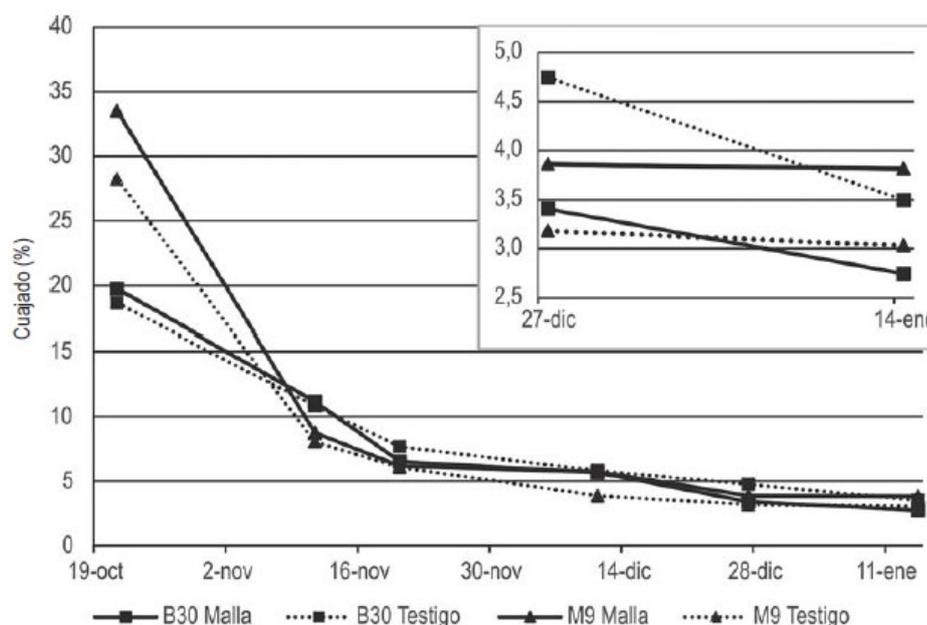


Figura 1. Evolución del porcentaje de cuajado de frutos de los híbridos M9 y B30 en condiciones de autopolinización (Malla) y polinización abierta (Testigo).

Cuadro 3. Evolución de la pérdida de la viabilidad de los óvulos de los híbridos M9 y B30 *in vivo*, en condiciones de autopolinización. Valores expresados como porcentaje de óvulos con deposición de calosa sobre el total de óvulos contabilizados.

Híbrido	Días post -antesis				
	0	3	6	9	12
M9	0	14,1	21,4	69,4 a*	77,5 a
B30	0	0	0	57,1 a	66,0 a

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

Cuadro 4. Porcentaje de frutos con semilla y número promedio de semillas por fruto en los híbridos M9 y B30, polinizados con polen de mandarina 'Afourer', naranja 'Valencia' y limón tipo 'Lisbon'.

Híbrido/Polinizador	Mandarina 'Afourer'		Naranja 'Valencia'		Limón tipo 'Lisbon'	
	Frutos con semillas (%)	Semillas por fruto (N°)	Frutos con semillas (%)	Semillas por fruto (N°)	Frutos con semillas (%)	Semillas por fruto (N°)
M9	33 b*	0,7 b	0	-	-	-
B30	100 a	21,0 a	100	6	67	0,7

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

naranja 'Valencia' (Cuadro 4). La viabilidad de los granos de polen de naranja 'Valencia' alcanzó el 10,5 %, el de 'Afourer' 8,5 %, el de limón tipo 'Lisbon' el 18,2 %, el de M9 13,5 % y el de B30 19 %.

La aptitud partenocárpica de ambos híbridos fue diferente cuando sus flores fueron emasculadas, o emasculadas y polinizadas manualmente con su propio polen. El cuajado fue nulo en M9 y B30 en flores emasculadas, pero con autopolinización M9 alcanzó 6,7 % mientras que B30 solamente cuajó un 2,5 % de sus flores (Cuadro 5). La respuesta a los cultivares polinizadores utilizados también fue diferente entre los híbridos y se relacionó con la presencia de semillas. Con polen de 'Afourer' y 'Valencia', M9 presentó un porcentaje de cuajado relativamente bajo, inferior inclusive al tratamiento de autopolinización, mientras que B30 cuajó cinco y cuatro veces más, respectivamente (Cuadro 5).

Discusión

La autoincompatibilidad en cítricos es una característica de alto valor comercial, ya que en cultivos aislados de polinización cruzada permite la obtención de frutos sin semillas. Varios cultivares de mandarinas e híbridos (Clementinas, Satsumas, 'Nova', 'Ortanique', 'Afourer') presentan esta característica y por lo tanto la capacidad de producir frutos partenocárpicos (Soost, 1956; Hearn *et al.*, 1969; Soler, 1999; Gambetta *et al.*, 2013). De acuerdo a los resultados obtenidos, proponemos que los híbridos M9 y B30 son autoincompatibles, ya que no presentaron semillas ni en condiciones de autopolinización, ni cuando fueron polinizados manualmente con su propio polen.

En condiciones de polinización abierta, en una parcela con un elevado número de variedades y por lo tanto una

Cuadro 5. Porcentaje de cuajado final en M9 y B30, de flores emasculadas, emasculadas y autopolinizadas, o polinizadas con 'Afourer', 'Valencia' y limón tipo 'Lisbon'. Número inicial de flores en cada tratamiento: 80 en M9 y 100 en B30.

Híbrido/Polinizador	Porcentaje de frutos cuajados				
	Autopolinizado	Emasculado	'Afourer'	'Valencia'	'Lisbon'
M9	6,7 a*	0	5,0 b	3,3 b	0
B30	2,5 c	0	25,7 a	12,6 b	1,9 c

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

fuerte presión de polen, M9 presentó solamente 20 % de frutos con semillas y una media de 0,6 semillas por fruto. Un estudio similar en nuestro país determina que la mandarina 'Tango', una mutación generada a partir de la mandarina 'Afourer' patentada en California, presenta el 12 % de los frutos con semillas y una media de 0,15 semillas por fruto en condiciones de polinización abierta (Gravina, sin publicar), asemejándose a lo encontrado en M9. Por el contrario B30, en condiciones de polinización abierta, solamente alcanzó un 16 % de sus frutos sin semillas.

La escasa germinación de polen *in vitro* y nula *in vivo* de ambos híbridos, parecen no relacionarse con factores de clima prevalentes antes y durante la antesis, ya que en los 10 días previos a la obtención del polen para su análisis, la temperatura media fue 20,2 °C y la HR 82 %, que pueden considerarse adecuadas para la germinación del polen de acuerdo a Distefano *et al.* (2012). Temperaturas menores a 10 °C durante los días previos a la antesis han sido reportadas como críticas para la germinación del polen *in vitro* (Pardo *et al.*, 2007, 2010), lo que no ocurrió durante el período considerado. A su vez, esa baja germinación no permitió determinar el tipo de autoincompatibilidad que presentan ambos híbridos. Hasta el momento, en el género *Citrus* solamente ha sido reportada la autoincompatibilidad de tipo gametofítico (Soost, 1969; Distefano *et al.*, 2009; Gambetta *et al.*, 2013), caracterizada por la germinación de los granos de polen en el estigma y el desarrollo parcial del tubo polínico en el estilo, sin sobrepasar el 50 % de la longitud del mismo.

En M9 la viabilidad de los óvulos comenzó a disminuir desde el tercer DPA, incrementándose la deposición de calosa a los 12 DPA, lo que puede explicar la baja capacidad de formación de semillas en condiciones de libre polinización. Este comportamiento sugiere un período efectivo de polinización de corta duración, lo que limitaría su capacidad de formación de semillas, similar al reportado por Mesejo *et al.* (2007) en mandarina Satsuma 'Owari'. En B30, recién a los 9 DPA se observaron óvulos con signos de pérdida de viabilidad, lo que puede explicar al menos parcialmente la alta capacidad de formar frutos con semillas de este híbrido en condiciones de libre polinización.

Nuestros resultados indican que M9 presenta partenocarpia estimulativa, ya que las flores emasculadas presentaron una abscisión total, no pudiendo cosecharse frutos, mientras que las polinizadas manualmente con su propio polen, alcanzaron un 6,7 % de cuajado, desarrollando todos sus frutos sin semillas. A su vez, en ramas aisladas, el porcentaje de cuajado fue similar al obtenido en condiciones de polinización abierta. La capacidad partenocárpica de B30, resultó menor a la de M9, tanto en condiciones de aisla-

miento de polinización cruzada, como polinizada manualmente con su propio polen. De acuerdo a su habilidad de cuajar frutos en ausencia de polinización cruzada, los cultivos autoincompatibles se pueden clasificar en improductivos o de baja capacidad partenocárpica, y productivos o de elevada capacidad de cuajado (Guardiola, 1992). Las causas de la falla en el cuajado inicial son fundamentalmente el bajo contenido de giberelinas en los ovarios (Talón *et al.*, 1990, 1992; Mesejo *et al.*, 2013) y la menor capacidad de atraer los carbohidratos en condiciones de alta competencia (Gómez-Cadenas *et al.*, 2000; Iglesias *et al.*, 2003).

El estudio del comportamiento con polinizaciones dirigidas demostró que M9 presenta una baja capacidad de formación de semillas con polen de 'Afourer' y frutos aspermos con polen de naranja 'Valencia'. B30 por el contrario, presentó el total de sus frutos con semillas en las polinizaciones con mandarina 'Afourer' y naranja 'Valencia', mientras que con limón tipo 'Lisbon' alcanzó el 67 %. Considerando las temperaturas medias ocurridas entre 10 días pre-polinización y 10 días post-polinización, las mismas se ubicaron en 16,2 °C el experimento en M9 y 14,7 °C en el B30, por lo que la baja presencia de semillas en el primero no debe atribuirse a factores exógenos. Las polinizaciones dirigidas con polen compatible promueven en general un elevado cuajado de frutos (Borges *et al.*, 2009; Gravina *et al.*, 2011), y aún más, considerando que se seleccionan brotes de flor terminal, que naturalmente presentan mayor capacidad de cuajado (Ermer y Shommer, 1996; daCunha Barros y Gravina, 2006; Rivas *et al.*, 2007). Esta fue la situación en B30, especialmente con polen de 'Afourer' y 'Valencia'. Inesperadamente, en M9 el porcentaje de cuajado con los mismos polinizadores fue bajo e inferior al alcanzado en condiciones de autopolinización, lo que sugiere la existencia de algún mecanismo de esterilidad parcial en este híbrido. Esto confirma los resultados del primer año donde en condiciones de autopolinización las flores de M9 presentaron igual o más capacidad de cuajado que en condiciones de polinización abierta.

Considerando en su conjunto las características reproductivas de los híbridos en estudio, ambos presentan autoincompatibilidad. M9 se presenta como muy promisorio para la producción de frutos con pocas semillas o aspermos, aun en condiciones de producción comercial en convivencia con otras variedades. B30, por el contrario, en condiciones de polinización abierta presenta muy buena intercompatibilidad y un alto número de semillas, por lo que de implantarse comercialmente deberán tomarse las precauciones para su aislamiento de cultivares que sean fuente de polen compatible.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el marco del proyecto FMV_2_2011_6997, financiado por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII).

Bigbliografía

- Agusti M, Zaragoza S, Bleiholder H, Buhr L, Hack H, Klose R, Staub R. 1996. Escala BBCH para la descripción de los estadios fenológicos del desarrollo de los agrinos (Género *Citrus*). *Levante Agrícola*, 332: 189 - 199.
- 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.
- Borges A, daCunha Barros M, Pardo E, García M, Franco J, Gravina A. 2009. Cuajado de frutos en tangor Ortanique en respuesta a la polinización y a distintas situaciones de estrés. *Agrociencia (Uruguay)*, 13(1): 7 - 18.
- Brewbaker JL, Kwack BH. 1963. The essential role of calcium ion in the pollen tube growth. *American Journal of Botany*, 50(9): 859 - 865.
- Chao C-CT, Fang J, Devanand PS. 2005. 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.
- daCunha Barros, Gravina A. 2006. Influencia del tipo de brote en el cuajado y crecimiento de frutos del tangor 'Ortanique'. *Agrociencia (Uruguay)*, 10(1) : 37 - 46.
- 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.
- Distefano G, Caruso M, La Malfa S, Gentile A, Tribulato E. 2009. Histological and molecular analysis of pollen-pistil interaction in clementine. *Plant Cell Report*, 28: 1439 - 1451.
- Erner Y, Shomer I. 1996. Morphology and anatomy of stems and pedicels of spring flush shoots associated with citrus fruit set. *Annals of Botany*, 77: 537 - 545.
- Frost HB, Soost RS. 1968. Seed reproduction : development of gametes and embryos. En: Reuther W, Batchelor LD, Webber HJ [Eds.]. *The Citrus Industry*. Vol. 2 Berkeley : University of California Press. pp. 290 - 319.
- Gambetta G, 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.
- Gómez-Cadenas A, Mehouchi J, Tadeo FR, Primo-Millo E, Talón M. 2000. Hormonal regulation of fruitlet abscission induced by carbohydrate shortage in citrus. *Planta*, 210: 636 - 643.
- Gravina A, Fornero C, Galiger S, Inzaurrealde C, Fasiolo C, Gambetta G. 2011. Partenocarpiya, polinización cruzada y presencia de semillas en mandarina Afourer. *Agrociencia (Uruguay)*, 15(2): 40 - 47.
- Guardiola JL. 1992. Fruit set and growth. En: 2nd International Seminar on Citrus Physiology; 10 - 13 agosto, 1992; Bebedouro, San Pablo, Brasil. Bebedouro : Editora Legis Summa. pp. 1 - 30.
- Handaji N, Arsalane N, Ben Azouz A, Benyahia H, Gaboneet F, Srairi I, Esagide A. 2010. A diversification program of mandarin and orange varieties in Morocco. En: XI International Citrus Congress; 26 - 30 octubre, 2008; Wuhan, China. Beijing : China Agricultural Press. pp. 59 - 61.
- Hearn CJ, Reece PC, Fenton R. 1969. Self-incompatibility and the effects of different pollen sources upon fruit characteristics of four *Citrus* hybrids. En: Chapman HD. [Ed.]. *Proceedings of the 1st International Citrus Symposium*. Riverside : University of California. pp. 183 - 187.
- 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.
- Inzaurrealde C, Fasiolo C, Fornero C, Galiger S, Chouza X, Gambetta G, Gravina A. 2010. Autoincompatibilidad, capacidad partenocárpica y mejora del cuajado en tangor 'Ortanique' [Cd-Rom]. En: VI Congreso Argentino de Citricultura; 2 - 4 junio; Tucumán, Argentina. pp. 37 - 39.
- Kearns CA, Inouye DW. 1993. *Techniques for pollination biologists*. Niwot : University of Colorado Press. 538p.
- Mesejo C, Yuste R, Martínez-Fuentes A, Reig C, Iglesias DJ, Primo-Millo E, Agusti M. 2013. Self-pollination and parthenocarpic ability in developing ovaries of self-incompatible Clementine mandarins (*Citrus Clementina*). *Physiologia Plantarum*, 148: 87 - 96.
- Mesejo C, Martínez-Fuentes A, Reig C, Agusti M. 2007. The effective pollination period in 'Clemenules' mandarin, 'Owari' Satsuma mandarin and 'Valencia' sweet orange. *Plant Science*, 173: 223 - 230.
- Nadori E. 2006. Nadorcott mandarin : a promising new variety. En: X International Citrus Congress; 15 - 20 febrero, 2004; Agadir, Marruecos. Agadir: International Society of Citricultura. pp. 356 - 359.
- Navarro L, Aleza P, Cuenca J, Juárez J, Pina J, Ortega C, Navarro A, Ortega V. 2015. The mandarin triploid breeding program in Spain. *Acta Horticulturae*, 1065: 389 - 395.
- Otero A, Rivas F. 2010. Producción de semillas y métodos de control en el tangor 'Afourer' en el litoral norte de Uruguay [Cd-Rom]. En: III Simposio Investigación y desarrollo tecnológico en Citrus; 15 - 17 noviembre, 2010; Salto, Uruguay. pp. 96 - 99.
- Pardo J, Bermejo A, Cano A, Zaragoza S. 2010. La temperatura, la viabilidad del polen y la formación de las semillas en los cítricos. *Levante Agrícola*, 399(1): 20 - 29.
- 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.
- Rivas F, Laxague J, Menes R, Suarez D, Varela P, Spina M, Luque E, Pintos P, Vignale B. 2014. Nuevas oportunidades varietales para la Citricultura : Mandarinas M9, M19 y B30 [Cd-Rom]. En: I Congreso Latinoamericano de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Citrus; 3 - 5 noviembre, Salto, Uruguay. pp. 1 - 4.
- Rivas F, Gravina A, Agusti M. 2007. Girdling effects on fruit set and quantum yield efficiency of PSII in two *Citrus* cultivars. *Tree Physiology*, 27: 527 - 535.
- Soler J. 1999. Reconocimiento de variedades de cítricos en campo. Valencia : Generalitat Valenciana. 188p. (Serie divulgación Técnica; N° 43).
- Soost RK. 1969. The incompatibility gene system in *Citrus*. En: Chapman HD. [Ed.]. *Proceedings of the 1st International Citrus Symposium*. Riverside : University of California. pp. 189 - 190.
- Soost RK. 1956. Unfruitfulness in the Clementine mandarin. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 67: 171 - 175.
- Talón M, Zacarias L, Primo-Millo E. 1992. Gibberellins and parthenocarpy ability in developing ovaries of seedless mandarins. *Plant Physiology*, 95: 1575 - 1581.
- Talón M, Zacarias L, Primo-Millo E. 1990. Hormonal changes associated with fruit set and development in mandarins differing in their parthenocarpic ability. *Physiologia Plantarum*, 79: 400 - 406.
- 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.