

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

ESTUDIO FENOLÓGICO-REPRODUCTIVO DEL LIMÓN
INIA-ANA CLAUDIA

por

Marcelo AREOSA VIDAL

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

MONTEVIDEO
URUGUAY
2012

Tesis aprobada por:

Director: -----
Ing. Agr. Dra. Giuliana Gambetta Romaso

Ing. Agr. MSc. Alfredo Gravina Telechea

Ing. Agr. Beatriz Vignale

Fecha: 14 de septiembre de 2012

Autor: -----
Marcelo Areosa Vidal

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por el apoyo que me brindaron todo este tiempo; en especial a mis padres Silvia y Carlos, a mi esposa Marcela y mi hijo Felipe.

A mis amigos Diego, Fede y Santi por el aguante y por estar ahí siempre.

Al equipo de Ecofisiología de Citrus: Giuliana, Cecilia, Carolina, Florencia, Alfredo, Sebastián, Cristian y Santiago, por la paciencia el apoyo y amistad compartidos.

Al director del departamento de Suelos y Aguas, Mario García y a Juan Olivet, por su apoyo para finalizar este trabajo.

Al personal del establecimiento 'El Espinillo', Adriana, Gonzalo, y Pedro por su colaboración.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	3
2.1. <u>ANTECEDENTES</u>	3
2.1.1. <u>Características de la citricultura nacional</u>	3
2.1.2. <u>Especies y variedades</u>	3
2.1.2.1. <u>Naranjas</u>	3
2.1.2.2. <u>Mandarinas</u>	4
2.1.2.3. <u>Pomelos</u>	5
2.1.2.4. <u>Limonos</u>	5
2.1.3. <u>Fenología y comportamiento productivo del limón en Uruguay</u>	6
2.1.4. <u>Características climáticas del Uruguay y requerimientos del cultivo</u>	8
2.1.4.1. <u>Temperatura</u>	8
2.1.4.2. <u>Régimen hídrico</u>	10
2.1.4.3. <u>Viento</u>	11
2.2. <u>CICLO FENOLÓGICO REPRODUCTIVO</u>	12
2.2.1. <u>Inducción floral</u>	12
2.2.2. <u>Brotación y floración</u>	14
2.2.3. <u>Cuajado y crecimiento de frutos</u>	15
2.3. <u>BIOLOGÍA REPRODUCTIVA</u>	18
2.3.1. <u>Polinización y fecundación</u>	18
2.3.2. <u>Partenocarpia y autoincompatibilidad</u>	19
2.4. <u>OBTENCIÓN DE NUEVOS CULTIVARES</u>	22
2.4.1. <u>Mutaciones</u>	22
2.4.2. <u>Hibridación sexual</u>	23
2.4.3. <u>Producción de triploides</u>	23
2.4.4. <u>Estabilidad de las mutaciones</u>	24
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	26
3.1. <u>MATERIAL VEGETAL</u>	26
3.2. <u>DISEÑO DEL EXPERIMENTO</u>	26
3.3. <u>EVALUACIONES REALIZADAS</u>	28
3.4. <u>DISEÑO ESTADÍSTICO</u>	29

4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	30
4.1. BROTACIÓN Y FLORACIÓN.....	30
4.2. ABSCISIÓN Y CUAJADO FINAL DE FRUTOS.....	36
4.2.1. <u>Abscisión</u>	36
4.2.2. <u>Cuajado final de frutos</u>	38
4.3. CRECIMIENTO DE FRUTOS.....	38
4.4. NUMERO DE FRUTOS Y PRESENCIA DE SEMILLAS.....	39
4.4.1. <u>Datos de cosecha</u>	39
4.4.2. <u>Presencia de semillas, autoincompatibilidad y partenocarpia</u>	40
5. <u>CONCLUSIONES</u>	45
6. <u>RESUMEN</u>	46
7. <u>SUMMARY</u>	47
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	48
9. <u>ANEXOS</u>	56

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Distribución de los estados florales según la escala BBCH en plena floración (26/10/2010) en plantas de limón 'INIA-Ana Claudia' aisladas de polinización y en condiciones de polinización abierta (Testigos).....	30
2. Intensidad de brotación (brotes cada 100 nudos), floración (flores cada 100 nudos) y distribución por tipo de brote en plena floración, en plantas de limón 'INIA-Ana Claudia' aisladas de polinización y en condiciones de polinización abierta (Testigos).....	31
3. Número promedio de brotes florales por rama en plantas de limón 'INIA-Ana Claudia' aisladas de polinización y en condiciones de polinización abierta (Testigos).....	33
4. Número de horas con temperaturas mayores a 30°C en los meses de octubre a enero.....	34
5. Número promedio de flores por planta y porcentaje de cuajado en plantas de limón 'INIA-Ana Claudia' aisladas de polinización y en condiciones de polinización abierta (Testigos).....	38
6. Número de frutos por planta, porcentaje de frutos con semillas y número promedio de semillas por fruto en plantas de limón 'INIA-Ana Claudia' aisladas de polinización y en condiciones de polinización abierta (Testigos).....	39
7. Presencia de semillas en frutos de limón INIA-Ana Claudia aislados de polinización y en condiciones de polinización libre (testigos), provenientes de la floración de primavera.....	41
8. Porcentaje de frutos con semillas y número promedio de semillas por fruto provenientes de flores de la brotación de verano, aisladas de polinización y en condiciones de polinización abierta (Testigos), limón 'INIA-Ana Claudia'.....	44

9. Presencia de semillas en frutos de limón INIA-Ana Claudia aislados de polinización y en condiciones de polinización libre (testigos), provenientes de la floración de verano.....	44
--	----

Figura No.

1. Temperaturas medias anuales en el territorio nacional.....	9
2. Precipitación media acumulada anual en el territorio nacional.....	10
3. Velocidad del viento media anual en superficie ($m s^{-1}$), período 1961-1990.....	12
4. Tipos de quimeras: 1, periclinal, 2, mericlinal, 3, sectorial.....	25
5. Vista aérea de la plantación, ubicación de la parcela y las variedades próximas.....	26
6. Vista del experimento.....	27
7. Vista de las mallas colocadas para colecta de estructuras reproductivas abscionadas.....	27
8. Flores de la brotación de verano embolsadas.....	28
9. Sensor de temperatura y humedad relativa colocado en las plantas.....	29
10. Imágenes de los diferentes tipos de brotes (05/10/10).....	32
11. Evolución del número de brotes cada 100 nudos (Brotos/100n) y de la proporción de brotes vegetativos (%V) y florales (%F), en plantas de limón 'INIA-Ana Claudia' aisladas de polinización (A) y en condiciones de polinización abierta (T).....	32
12.(A) Temperatura máxima (Max T°C), promedio (\bar{X} T°C), mínima (Min T°C) y (B) humedad relativa máxima (Max Hr%) promedio (\bar{X} Hr%) y mínima (Min Hr%) registrada	

durante el período de aislación en ambos tratamientos; aislado (A) y testigo (T).....	34
13.Precipitaciones mensuales y demanda atmosférica (evaporación del tanque A) durante el período de estudio....	36
14.Abscisión de frutos en plantas de limón 'INIA-Ana Claudia' aisladas de polinización y en condiciones de polinización abierta (Testigos) en el período de estudio.....	37
15.Evolución del diámetro ecuatorial de frutos en plantas de limón 'INIA-Ana Claudia' aisladas de polinización y en condiciones de polinización abierta (Testigos).....	39
16.Presencia de semillas en frutos de plantas de limón 'INIA-Ana Claudia' aisladas de polinización y en condiciones de polinización abierta (Testigos).....	40
17.Rudimentos seminales presentes en frutos de limón 'INIA-Ana Claudia'.....	41
18.Frutos con y sin semillas cosechados en las mismas plantas de limón 'INIA-Ana Claudia' aisladas de polinización y en condiciones de polinización abierta (Testigos).....	43
19.Frutos provenientes de flores de la brotación de verano aisladas individualmente.....	44

1. INTRODUCCIÓN

Los cítricos pertenecen a la familia de las Rutáceas, situándose su centro de origen en el sureste de Asia y China (Vardi et al., 2008). Su cultivo se ha extendido y adaptado a todas las regiones tropicales y subtropicales entre los paralelos 44° N y 41° S (Agustí, 2003a). Uruguay está ubicado entre los paralelos 30° y 35° S por lo que es posible su cultivo en nuestras condiciones.

La producción citrícola uruguaya se caracteriza por concentrar la producción en dos importantes zonas, al norte en los departamentos de Salto y Paysandú, y al sur en Montevideo y San José mayoritariamente. En el norte se destaca la mayor producción de naranjas, mandarinas y algunos híbridos, mientras que en el sur se produce en mayor proporción limón. La citricultura nacional ha adquirido una marcada importancia como rubro exportador llegando a exportar en el 2010, unas 150000 t (48% de la producción total) representando 85,7 millones de dólares. La producción de limón, representó el mismo año el 10% de las exportaciones, con 15600 t y 11,6 millones de dólares (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2011).

Los principales destinos de las exportaciones nacionales son la Comunidad Europea y Rusia, los cuales tienen importantes requisitos en cuanto a la calidad y forma de obtención de los productos. En este sentido, no solo se debe cumplir con las pautas preestablecidas por organismos internacionales, quienes certifican los procesos de obtención y la calidad de los productos, sino que se debe tener una oferta de productos diferenciados para cubrir la demanda del mercado.

Algunas de las tendencias en los estándares de calidad tienen que ver tanto con prácticas de manejo que aseguren inocuidad para el ambiente, productores y consumidores, como con características organolépticas y estéticas de las frutas. Recientemente, la ausencia de semillas en los frutos cítricos se ha convertido en uno de los requisitos de mayor relevancia en la producción de frutas para consumo en fresco.

Tanto a nivel nacional como internacional se han desarrollado programas de mejoramiento y obtención de nuevos cultivares de cítricos, con el fin de lograr en la fase productiva los estándares de calidad exigidos. Así es que se han introducido al país, cultivares probados internacionalmente y se han desarrollado localmente otros, muchos de los cuales se encuentran aún en fase experimental.

En Uruguay, el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) liberó en el año 2008 una variedad de limón sin semillas denominada 'INIA-Ana

Claudia'. Esta variedad es de uso libre, existiendo actualmente solo 3 ha plantadas en el país (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2011), sin que existan reportes sobre su comportamiento fenológico-reproductivo. Sin embargo, se ha observado frutos con semillas, tanto en colecciones, como en predios particulares, lo que generó la necesidad de confirmar si la presencia de semillas se debe a la polinización cruzada o a que la autoincompatibilidad no es completa.

Con estos antecedentes se plantearon las siguientes hipótesis de trabajo:

- El limonero 'INIA-Ana Claudia' es autoincompatible, por lo que en condiciones de aislamiento de polinización sus frutos no deben presentar semillas.
- En condiciones de polinización libre los frutos pueden presentar semillas

Los objetivos del presente trabajo fueron:

- Determinar si en condiciones de aislamiento de polinización cruzada, los frutos del cultivar de limón 'INIA-Ana Claudia' presentan semillas.
- Estudiar el ciclo fenológico-reproductivo en las condiciones del sur del país.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ANTECEDENTES

2.1.1. Características de la citricultura nacional

La citricultura es el principal rubro hortifrutícola del país, representando aproximadamente el 6% del producto bruto agropecuario, siendo uno de los principales productos no tradicionales de exportación. En el año 2010, la superficie efectiva ocupada por montes citrícolas fue un 5% superior que en el año 2009, alcanzando las 17018 ha. La producción total del mismo año fue 315200 t, siendo la principal especie la naranja, con 2,5 millones de plantas en producción. Las dos grandes zonas que concentran la producción comercial, presentan características diferentes respecto al clima, la importancia del rubro y la estructura de la producción. La zona norte (Salto y Paysandú) es la más extensa, con el 83% de la superficie citrícola (14200 ha efectivas) concentrando la producción de naranjas y mandarinas y aportando el 85% de la producción de cítricos. La zona sur, posee el 17% de la superficie (2818 ha efectivas) concentrando la mayor producción de limón (1431 ha), la que aportó en la última zafra el 66% de la producción total del sur (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2011).

2.1.2. Especies y variedades

La principal especie es la naranja con 154000 t (48% del volumen total), seguida por mandarina con 121500 t (39%), limón 37600 t (12%) y pomelo con casi 2000 t (1%). La especie con mayor intención de plantación en el año 2010 fue el limón con 144000 plantas (50%), en su mayoría de 'Limón criollo', seguido por naranja con 93000 plantas (33%), principalmente 'Salustiana' y 'Valencia Midknight' (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2011).

2.1.2.1. Naranjas

Dentro de las naranjas, encontramos tres variedades importantes: el grupo de las de ombligo (navel), 'Valencia' y 'Salustiana'. En el grupo navel, 'Navelina' y 'Newhall' comienzan a cosecharse a fines de abril principios de mayo. Posteriormente, se cosecha 'Washington', principal variedad dentro de este grupo. La estación de cosecha se prolonga un tiempo más con otras variedades como 'Lanelate' y 'Navelate' (Carrau, 2004). En 2010 el grupo navel alcanzó una producción de 44290 t; siendo el 29% de la producción de naranjas (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2011).

A partir de junio comienza la cosecha de 'Salustiana' (Carrau, 2004). Esta variedad alcanzó en 2010 las 12690 t, representando el 8% de la producción total de naranjas (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2011).

'Valencia Late' es la principal variedad de naranja, con casi 1,7 millones de plantas, aportando en la última zafra aproximadamente 93000 t y el 60% de la producción total (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2011). Otras variedades importantes de 'Valencia' son 'Midknight' y 'Delta' (Carrau, 2004).

Existen también pequeñas plantaciones de otras variedades como 'Hamlin', 'Cara Cara', 'Criolla', 'Navel Fisher', 'Valencia Seedless'; 'Valencia Pera', 'Pera Pigua', 'Sanguínea', 'NVL7', 'Navel Fukumoto', 'Spring Navel' y otras naranjas sin identificar, las que aportaron conjuntamente en la última zafra 4256 t, el 3% de la producción total (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2011).

2.1.2.2. Mandarinas

Las variedades más importantes en la citricultura nacional son 'Nova', 'Ellendale' y las del grupo Satsuma (predominando 'Okitsu' y 'Owari') (Carrau, 2004), las que aportaron en 2010, 16000, 39000 y 20000 t respectivamente (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2011). Las más tempranas, Satsuma 'Okitsu' y posteriormente Satsuma 'Owari' se cosechan a partir de fines de febrero, principios de marzo (Carrau, 2004). En 2010 el grupo Satsumas representó el 32% de la producción total de mandarinas (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2011).

A fines de abril, principios de mayo comienza la cosecha de las 'Clementinas' y 'Nova', híbrido entre 'Clementina Fina' y tangelo 'Orlando' (Carrau, 2004). El grupo de las 'Clementinas' produjo en el año 2010, 12000 t (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2011).

A partir de mayo - junio, se cosecha la mandarina 'Común', la que tiene como destino el mercado interno (Carrau, 2004). Algunas selecciones de ésta, a partir de mutaciones, como 'Avena', 'Clemendor' y 'Montenegrina', representaron conjuntamente el 13% de la producción de mandarinas, con aproximadamente 15000 t en el año 2010 (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2011).

La mandarina 'Ellendale', tangor natural (híbrido de mandarino y naranjo dulce) madura a partir de mediados de julio (Carrau, 2004), alcanzando en 2010 el 16% del total de mandarinas (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2011).

La variedad 'Murcott' produjo 4265 t en 2010, representando el 4% del total. La mandarina 'Afourer', que probablemente sea un híbrido producto del

cruzamiento del tangor 'Murcott' por un donador de polen desconocido (Nadori, 2004), no presenta semillas en condiciones de aislamiento (Nicotra, 2001). Esta mandarina ha sido incorporada recientemente a nuestra citricultura, alcanzando excelentes precios de exportación. En 2006 ocupaba el 0.8 % del área total de mandarinas, mientras que en 2010 alcanzó un 3,2 % (214 ha) (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2011).

Finalmente 'Ortanique', la más tardía, produjo 9243 t en el 2010, representando el 8% de la producción de mandarinas (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2011).

2.1.2.3. Pomelos

Esta especie ocupa 217 ha de superficie efectiva, con 85000 plantas. La variedad más numerosa es el pomelo rojo o rosado con 30000 plantas, aproximadamente el 35% del total. La producción de pomelo en la zafra 2010 totalizó las 1900 t. Es una especie que tiende a su desaparición por problemas productivos asociados al clima y susceptibilidad a enfermedades (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2011).

2.1.2.4. Limones

La superficie total es de 1935 ha efectivas, de las cuales 1709 ha se encuentran en producción, alcanzando las 37656 t en el año 2010, con un promedio de 22 t ha⁻¹ y 48 kg por planta. Esto representa el 12% del total de la producción de cítricos. La exportación en el mismo año alcanzó el 10% del volumen total exportado (15600 t), representando el 18% del valor total de las exportaciones. En el 2010 alcanzó el mayor precio por tonelada de los cítricos exportados (749 U\$S t⁻¹), (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2011).

Durante varias décadas no se diferenciaron las variedades de limón plantadas en el país. A partir de los trabajos en mejoramiento y del Programa Nacional de Certificación de Cítricos (PNCC), comenzaron a identificarse los distintos grupos varietales. En base a relevamientos realizados por la Facultad de Agronomía y por el INIA, estudiando las características generales y el comportamiento de las plantaciones comerciales de limoneros, se piensa que a nivel nacional la variedad más cultivada sería tipo 'Lisbon', siendo el limón 'Común o Criollo', una selección local de la anterior (Carrau, 2005).

La constitución varietal de la producción de limón está formada en su gran mayoría por 3 variedades: 'Limón criollo' o 'Lisbon', 'Fino' y 'Eureka', y algunas pequeñas plantaciones de otros cultivares ('Génova', 'Verna', 'L13',

'Seedless', 'INIA-Ana Claudia' y 'Limoneira'). La participación en la producción de cada una de estas variedades es del 86%, 9% y 3%, respectivamente, ocupando el resto de las variedades el 2% restante. Con respecto al 'Limón Común' o 'Lisbon', existen 647000 plantas, de las cuales el 89% se encuentra en producción (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2011).

2.1.3. Fenología y comportamiento productivo del limón en Uruguay

En estudios fenológicos realizados en las condiciones del sur de Uruguay en limón 'Lisbon' (Espino et al., 2005), se reporta una intensidad de floración menor a 20 flores cada 100 nudos, ubicándose el 60% de las flores en brotes solitarios. Este cultivar presenta varios flujos de brotación, siendo el principal el de primavera, predominando los brotes reproductivos. Las brotaciones posteriores son menos intensas, generando una superposición de frutos en diferentes estados de desarrollo. El cuajado final es elevado, entre un 15 y 27%, con una concentración del período de abscisión en los 45 días post floración. El período de cosecha más importante es en los meses de junio a agosto, siendo las cosechas posteriores de primavera y verano, de menor volumen. El mayor rendimiento exportable obtenido en dicho estudio, alcanzó las 33 t ha⁻¹, con un promedio de 100 kg y 750 frutos por planta; siendo necesaria la intervención con medidas de manejo sobre floración y cuajado para optimizarlo.

En las condiciones climáticas de Uruguay, el limón tipo 'Lisbon' alcanza buenos rendimientos, no obstante presenta problemas de calidad de fruta, especialmente daños por rameado y tamaño (Gravina, 1999).

El limón 'Fino 49' es una selección de 'Limón Fino' proveniente de España. Sus principales características son la alta productividad, calidad interna del fruto y cosecha temprana (Carrau, 2005). De acuerdo a Chouza (2004), en nuestras condiciones presenta la mayor brotación y floración concentrada en primavera, con una intensidad de 24 brotes y 21 flores cada 100 nudos. Presenta un porcentaje de cuajado del 16%, concentrando la abscisión de estructuras reproductivas, en los 30 días post floración. El mayor volumen de cosecha se concentra en los meses de junio y julio, obteniéndose rendimientos en el entorno de los 95 kg por planta. Comparando la variedad 'Fino 49' con 'Lisbon', ambas presentan similar peso promedio de fruto, para un similar número de frutos (130 g y 128 g para 735 y 819 frutos por árbol, respectivamente). Presenta un bajo número de semillas, 4 a 5 por fruto. Esto último es una diferencia importante con respecto al limón 'Lisbon' el que presenta de 8 a 15 semillas promedio por fruto (Espino et al., 2005).

Arbiza et al. (2005) presentan los resultados de cuatro años de estudio de la fenología, producción y calidad de fruta en 'Lisbon' y dos en 'Fino 49'. La brotación de primavera inicia en la primera quincena de setiembre para las dos variedades, con algunas variaciones según el año. 'Lisbon' mostró un mayor número de brotaciones en verano y otoño, con una intensidad de brotación inferior a la de primavera y una alta proporción de brotes reproductivos. La floración principal de primavera, ocurre entre mediados y fines de octubre para ambos, presentando 'Fino', mayor intensidad de floración que 'Lisbon', con mayor número de inflorescencias y menos brotes terminales. 'Lisbon' tuvo varios flujos de floración en el año, mientras que 'Fino' presentó solo una floración importante en primavera. Las intensidades de floración registradas tanto en 'Fino' como en 'Lisbon' son relativamente bajas, no superando las 25 flores cada 100 nudos, lo que se compensa con los altos porcentajes de cuajado, alcanzando 20% en 'Lisbon' y 17% en 'Fino'. En 'Lisbon' los brotes terminales alcanzaron el mayor porcentaje de cuajado, mientras que en 'Fino' lo alcanzaron los brotes de flor solitaria. 'Lisbon' presenta una producción de invierno más extendida en el tiempo, así como producciones de verano, mientras que 'Fino' tiene una producción más concentrada y esencialmente de invierno.

El cultivar 'Eureka' produce fruta todo el año, pudiendo observarse en un mismo momento prácticamente todos los estados de desarrollo del fruto. Es una variedad introducida de California, muy cultivada en otras áreas limoneras del mundo, existiendo un número importante de selecciones dentro de la misma. Es muy precoz, productivo y el fruto es muy parecido al de 'Lisbon'. Presenta incompatibilidad con trifolia y sus híbridos, razón por la cual no está muy extendido en nuestro país, debido al amplio uso y adaptación de estos portainjertos en la citricultura nacional. También se le atribuye mayor sensibilidad al frío que el limonero 'Lisbon' (Carrau, 2005).

Entre los materiales nacionales, el cultivar de limón INIA-Ana Claudia proviene de una prospección de materiales en la que se encontró una planta de limón portando una rama con frutos sin semillas. Se injertaron yemas de ese individuo y se le denominó INIA-Ana Claudia la cual ha sido registrada en INASE y es de libre disposición a nivel nacional.¹ Esta variedad, en condiciones de aislamiento, presenta poca o nula presencia de semillas. Estudios in vitro, de la viabilidad de su polen revelaron que, comparado con 'Lisbon' y 'Fino 95', su polen presenta baja capacidad germinativa, siendo una posible causa que explica el bajo número de semillas en aislamiento. Sin embargo, en condiciones de polinización cruzada con 7 variedades de limón, es posible que sus frutos presenten semillas (Rivas et al., 2008).

¹ Rivas, F. 2012. Com. personal.

2.1.4. Características climáticas del Uruguay y requerimientos del cultivo

Los principales factores climáticos que afectan a los cítricos en nuestro país son la temperatura, el régimen hídrico y el viento. Estos factores afectan, tanto las condiciones para su desarrollo, como los procesos fisiológicos de inducción floral y cuajado de frutos que son determinantes de la producción final.

Los requerimientos ambientales para satisfacer las diferentes fases del ciclo fenológico-reproductivo de los cítricos y en especial del limón se ven en general cubiertos en las condiciones de cultivo nacionales, salvo por períodos de sequías, ocurrencia de heladas y otros eventos climáticos como vientos fuertes o granizo que interrumpen e interfieren con los fines comerciales de la citricultura. En el 2010 hubo pérdidas de calidad originadas por heladas, provocando que la fruta del 19% de los productores de limón no alcanzara calidad de exportación (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2011).

2.1.4.1. Temperatura

La temperatura es un factor que determina las zonas en las que es posible producir cítricos, y dentro de éstas, cuáles son mejores para cada variedad.

La temperatura media anual en el Uruguay es de 17,7°C (Castaño et al., 2011), la que favorece el correcto desarrollo de los cítricos, estimulando los ciclos de brotación, floración, cuajado y crecimiento de frutos. Sin embargo, diferencias entre temperaturas máximas y mínimas y la probabilidad de ocurrencia de heladas en la zona norte y sur, determinan dos zonas bien diferenciadas en cuanto a las características climáticas para la producción de cítricos.

Las temperaturas medias sobre el territorio nacional varían desde 19,8°C en la zona noroeste (Bella Unión), hasta 16,6°C en la costa sur. Las temperaturas máximas medias se encuentran en torno a los 22,6°C y las mínimas medias, en torno a los 12,9°C, en los meses de enero-febrero y junio-julio respectivamente, existiendo un gradiente creciente de las temperaturas, de sur a norte, de 4°C para las temperaturas mínimas medias y 5°C para las máximas medias. En el mes más cálido (enero) el promedio de las temperaturas registradas es de 29,6°C, 24°C y 18,5°C, para máximas, medias y mínimas respectivamente, mientras que para el mes más frío (julio), es de 15,8°C, 11,6°C, y 7,3°C, en el mismo orden. La región más fría es el centro sur (departamentos de Florida, Durazno y norte de Canelones), y la Cuchilla de Haedo al norte del Río Negro, mientras que la más cálida se ubica al noroeste, en los departamentos de Artigas Salto y Paysandú (Castaño et al., 2011). En la

figura 1 se observa el gradiente creciente de sur a norte de las temperaturas medias anuales. La información detallada de las temperaturas mensuales de diferentes zonas del país se presenta en los cuadros I y II en anexos. En ellos se observa que en la zona sur, en las estaciones meteorológicas con mayor cercanía al mar, se obtienen registros de temperatura menores que en el resto, por la influencia de la brisa marina.

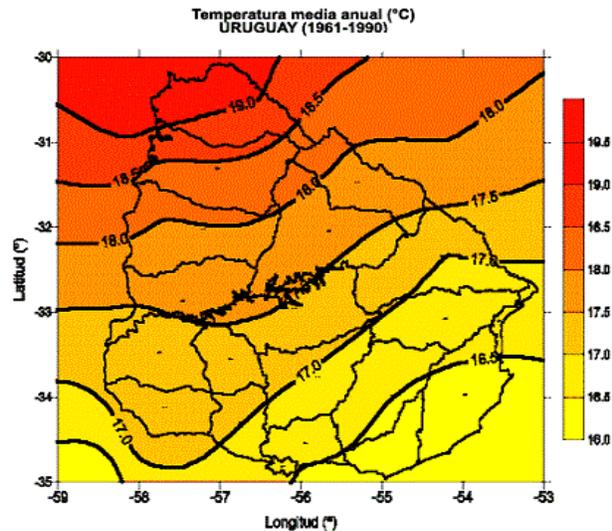


Figura 1. Temperaturas medias anuales en el territorio nacional (tomado de URUGUAY. MDN. DNM, s.f.).

La ocurrencia de heladas es mayor en la zona norte, con un máximo de 9 días promedio en el mes de julio en la zona de Paysandú (cuadro III, anexos).

Los cítricos pueden desarrollarse entre temperaturas límites de 0 °C a 52 °C, pero para ser cultivados comercialmente se requieren temperaturas medias anuales de 13 a 14 °C, con temperaturas medias en verano de 22 °C y en invierno de 10 °C. Temperaturas de 25 a 30 °C se consideran óptimas para la actividad fotosintética, mientras que por encima de los 35 °C ésta se detiene (Ferrerías et al., 2003).

Temperaturas por debajo de -2 a -3 °C, provocan daño por frío en los cítricos. Por debajo de los 10 °C comienzan a aparecer efectos secundarios y cesa la actividad de la planta. Sólo las temperaturas muy frías, por debajo de 4 °C, tienen efectos pronunciados sobre la calidad del fruto (Ferrerías et al., 2003).

En el sur del país se encuentra la mayor producción de limón, especie más sensible al frío; la cercanía al mar atenúa los extremos de temperatura y la

severidad de las heladas (Muller, 1993), disminuyendo los daños por frío y haciendo posible su producción rentable.

2.1.4.2. Régimen hídrico

Las necesidades hídricas de los cítricos estimadas como pérdidas por evapotranspiración (ET), en condiciones de riego en la zona sur del Uruguay, se estiman en los 767 mm anuales (García, 2002).

La precipitación acumulada anual promedio del Uruguay es de 1100 a 1600 mm (Castaño et al. 2011, URUGUAY. MDN. DNM, s.f.), lo que supera los requerimientos hídricos del cultivo (figura 2). Sin embargo, existen períodos críticos, fundamentalmente en verano, en los cuales esos requerimientos no son cubiertos.

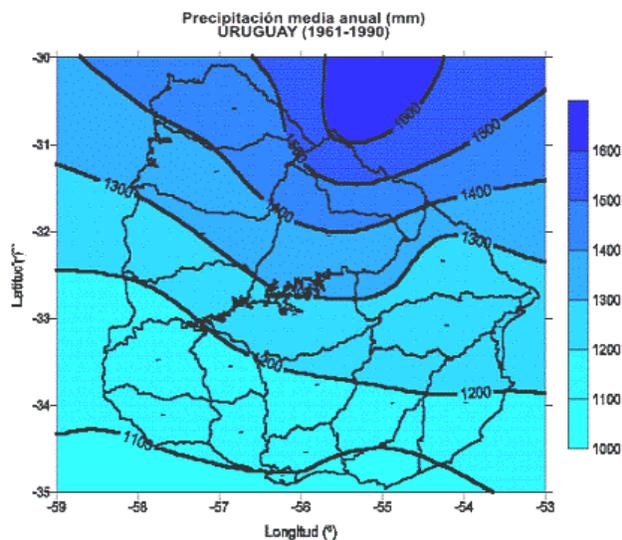


Figura 2. Precipitación media acumulada anual en el territorio nacional (tomado de URUGUAY. MDN. DNM, s.f.).

Árboles en condiciones de secano presentan una reducción de productividad del entorno del 31% en comparación con árboles regados con la dosis necesaria para cubrir la ET del cultivo. La respuesta en rendimiento al riego es significativa y del tipo cuadrático, a pesar de la alta pluviometría que se registra anualmente en Uruguay (García, 2002).

Las precipitaciones medias mensuales varían de 60 a 140 mm/mes en los meses menos y más lluviosos respectivamente, presentándose una gran

variabilidad interanual. En otoño y primavera se registran los valores más altos de precipitación (Castaño et al., 2011) (cuadro IV, anexos).

En las condiciones de Uruguay, las lluvias acumuladas de otoño e invierno superan la ET. Es probable que se llegue a la primavera con los suelos cargados de agua, situación que evitaría un déficit en las etapas de floración y cuajado (García, 2002).

2.1.4.3. Viento

Según Gravina (1999), a partir de datos de plantas de empaque, los daños causados por el viento provocan el descarte de un mínimo de 10% en todos los cultivares evaluados, alcanzando en los más sensibles como la naranja 'Washington' navel y el limón hasta un 40% de la fruta producida.

El viento y el descarte de frutos por rameado, es un problema importante en nuestra citricultura. La implementación de cortinas rompevientos artificiales con densidad de orificios homogénea, ha dado muy buenos resultados, disminuyendo la energía del viento, bajando los descartes por rameado y aumentando el porcentaje de fruta exportable entre un 11 y un 28% (Gravina et al., 2011).

Las direcciones de viento predominantes en el sur de Uruguay son NE y SE. La media anual para el viento, medido a 10 m sobre el suelo en la zona suroeste del Uruguay, resulta de 5 m s^{-1} , mientras que en la región noroeste, la media anual es de $4,3 \text{ m s}^{-1}$. Estas regiones son las que concentran la mayor producción citrícola del país (Cataldo et al., 2011). En la figura 3 se presenta la media anual de velocidad de viento para el período 1961-1990 (URUGUAY. MDN. DNM, s.f.). La zona sur queda enmarcada dentro de las isolíneas entre 4 y 7 m s^{-1} , mientras que la zona norte se ubica en la isolínea de $3,5 \text{ m.s}^{-1}$ y menores, lo que determina una diferencia importante en cuanto a la magnitud de los vientos, y su influencia sobre la producción. Según URUGUAY. MDN. DNM (s.f.), el régimen de vientos muestra un predominio de velocidades del orden de 4 m s^{-1} , con un máximo medio sobre la costa suroeste de 7 m s^{-1} , siendo relativamente frecuentes, vientos superiores a 30 m s^{-1} .

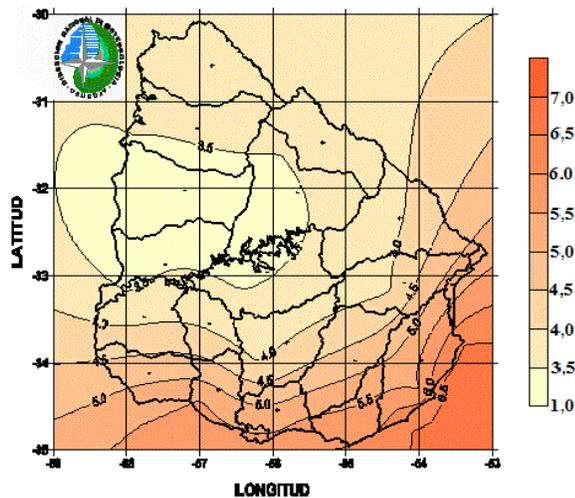


Figura 3. Velocidad del viento media anual en superficie (m s^{-1}), período 1961-1990 (tomado de URUGUAY. MDN. DNM, s.f.).

2.2. CICLO FENOLÓGICO REPRODUCTIVO

El ciclo fenológico-reproductivo en cítricos comprende las etapas de inducción y diferenciación floral, brotación, floración, cuajado, crecimiento y maduración de frutos, hasta la senescencia y abscisión de los mismos. El proceso de floración abarca las etapas de inducción, iniciación y diferenciación floral, culminando en la antesis, cuando el ovario retoma el crecimiento y comienzan las etapas de cuajado y crecimiento de frutos.

2.2.1. Inducción floral

La inducción floral se define como un mecanismo de activación o desrepresión de genes dentro de las yemas, que por efecto de la interacción de las condiciones ambientales y factores endógenos, conduce a las células meristemáticas a sintetizar sustancias inductoras de la formación de estructuras florales (Davenport, 1990).

En cítricos, luego de la etapa de juvenilidad, todos los tejidos meristemáticos están determinados a ser flores, siempre y cuando se den las condiciones favorables y no existan inhibiciones (Lord y Eckard, 1987).

El estrés hídrico promueve la inducción floral; interfiere con la fotosíntesis afectando la regulación estomática y detiene el crecimiento radicular (Agustí, 2003a). La duración y severidad del estrés hídrico provocan una respuesta inductiva progresiva en los cítricos (Southwick y Davenport 1987, Manzi 2011).

Las bajas temperaturas inducen un estrés a la planta, el que genera el comienzo de la inducción floral. Temperaturas por debajo de 15 °C, promueven la inducción floral en citrus, existiendo una correlación positiva entre la duración del período de frío y el número de flores que se forman (Lovatt et al., 1988).

Las temperaturas inductivas se asocian a contenidos hormonales, compuestos nitrogenados y carbohidratos que intervienen en el proceso de floración. Se encontraron menores niveles de actividad de giberelinas en árboles mantenidos a bajas temperaturas (15/15 °C día/noche), las que produjeron el mayor número de flores, en relación a los expuestos a altas temperaturas (30/30 °C día/noche), que no produjeron flores (Poerwanto e Inoue, 1990a).

La respuesta de la planta a distintos tipos de estrés en relación a la inducción floral, también se explica por el cambio en la dinámica de las giberelinas en la planta. Un estrés provocado por un déficit hídrico o por bajas temperaturas, provoca inactividad radicular, haciendo que disminuya la síntesis de giberelinas producidas en la raíz y se reduzca su transporte hacia la copa, favoreciendo la inducción floral (Davenport 1990, Spiegel-Roy y Goldschmidt 1996).

Condiciones climáticas subtropicales o templadas como las de nuestro país, presentan bajas temperaturas en otoño e invierno, las que desencadenan la inducción floral. Períodos de sequía en el verano también pueden desencadenar la ocurrencia de floraciones, en condiciones de cultivo sin riego y con baja carga de fruta (Gravina, 1999).

La edad y posición de las yemas en las ramas influyen en el proceso de inducción floral en cítricos (Hall et al 1977, Guardiola 1997). Las yemas apicales producen más flores que las basales, ya que estas últimas necesitan mayores niveles de inducción por estar más lejos del ápice (Valiente y Albrigo, 2004).

El factor más importante de control de la floración en los cítricos son las giberelinas endógenas producidas por el fruto (Davenport 1990, Agustí 2003a, Muñoz-Fambuena et al. 2011). La carga de frutos en el momento que se dan las condiciones necesarias para la inducción floral, estará determinando indirectamente el número de yemas que se van a inducir. Elevadas concentraciones de giberelinas en pedicelos de frutos de naranja 'Valencia' durante el período inductivo, se correlacionaron en forma negativa con la siguiente floración (Plummer et al., 1989). La aplicación exógena de GA₃ en tanger 'Ellendale' durante otoño-invierno, muestra una reducción sobre la siguiente floración (Gravina et al., 1997).

En relación a las reservas acumuladas en el árbol, estas no actuarían en forma directa en el proceso de inducción floral, aunque podrían modificarlo en forma cuantitativa. Probablemente sean quienes aporten la energía para la diferenciación de las yemas florales (Spiegel-Roy y Goldschmidt 1996, Martínez-Fuentes et al. 2010, Monerri et al. 2011).

2.2.2. Brotación y floración

La brotación depende de varios factores, entre ellos, la temperatura del aire y del suelo, siendo esta última la más importante para la iniciación de los brotes (Hall et al., 1977). El inicio de la brotación ocurre en nuestro país a partir de fines de agosto, adelantándose dos semanas la zona norte con respecto a la zona sur (Gravina, 1999).

En zonas subtropicales y templadas, donde las estaciones están bien definidas, los cítricos presentan un período de reposo invernal, mostrando una brotación principal uniforme en primavera al elevarse la temperatura y dos más en verano y otoño (Agustí, 2003a). En las condiciones de Uruguay, los flujos de verano y otoño normalmente son vegetativos, a excepción del limonero el que presenta varias floraciones al año, siendo también la de primavera, la brotación y floración principal (Gravina, 1999).

Los brotes de *Citrus* se clasifican en cinco tipos: vegetativos (solo hojas), mixtos uniflorales (hojas y una flor terminal), mixtos multiflorales (hojas y flores), inflorescencias (solo flores) y flores solitarias (una sola flor) (Moss, 1969). La proporción relativa de los distintos tipos de brote, está en función de la regulación endógena de balances hormonales y de las reservas de carbohidratos de la planta (Agustí, 1986).

La tasa de desarrollo floral se ve afectada tanto por la temperatura, como por la posición de la flor en la inflorescencia y la presencia de hojas. Las flores apicales muestran dominancia sobre las basales, por lo que brotan antes, mientras que la presencia de hojas determina que su brotación sea posterior (Lord y Eckard, 1985). Las inflorescencias con hojas, al brotar más tarde en la estación, logran desarrollarse con temperaturas mayores, por lo tanto sus ovarios son más grandes y tienen mayores probabilidades de desarrollo (Lovatt et al., 1984).

Poerwanto e Inoue (1990b) estudiaron los efectos de la temperatura del aire y del suelo en el desarrollo y la morfología de flores de la mandarina 'Satsuma'. Encontraron que los días necesarios para la floración y el período de floración, el número de flores por árbol y la tasa de brotación son mayores, cuanto menor es la temperatura del aire durante la brotación. Temperaturas del

aire cercanas a 30 °C disminuyen la tasa de brotación, el número de flores por nudo y el número de flores por árbol. Los árboles sometidos a altas temperaturas del aire desarrollan flores y ovarios más pequeños. A una temperatura ambiente de 15 °C y temperaturas del suelo cercanas a 30 °C promueven la formación de flores y ovarios más grandes.

La intensidad de brotación está condicionada por la carga de frutos de la cosecha previa (Agustí, 1986), pero también está relacionada con el genotipo. El limonero presenta dominancia apical, siendo sus flujos de brotación de menor intensidad que en mandarinas e híbridos, donde la baja dominancia apical favorece un mayor número de yemas brotadas en cada flujo (Gravina, 1999).

El número de frutos en crecimiento presentes durante las brotaciones de verano y otoño, se comportan como fuertes fosas de asimilados, determinando la intensidad de dichas brotaciones (Gravina, 1999).

Las diferentes etapas del desarrollo de la brotación y floración se describen en la escala BBCH propuesta por Agustí et al. (1995).

2.2.3. Cuajado y crecimiento de frutos

Los frutos cítricos presentan tres fases de crecimiento. La fase I se inicia con la antesis, finalizando conjuntamente con el fin de caída fisiológica. Durante esta fase los frutos crecen por división celular. En la fase II del crecimiento del fruto, estos crecen fundamentalmente por elongación de las células que se determinaron en la fase anterior. Esta fase finaliza en la maduración del fruto (fase III), donde el crecimiento se detiene y suceden cambios físicos y químicos que la desencadenan (Talón, 1997).

El cuajado de frutos puede definirse como el período de crecimiento durante el cual los frutos pueden sufrir abscisión. Incluye la transición de ovario a fruto que se inicia poco después de la floración, y el comienzo del crecimiento del fruto, concluyendo con el fin de la caída fisiológica. El final del cuajado marca la transición entre las fases I y II de división y alargamiento celular respectivamente (Talón, 1997). El cuajado de frutos está determinado por diferentes factores endógenos y exógenos que lo influyen, como características varietales, factores nutricionales y hormonales y el efecto de las condiciones ambientales como temperatura, radiación y estrés hídrico (Talón et al. 1999, Borges et al. 2009).

En variedades con semillas el cuajado y crecimiento del fruto es desencadenado por estímulos externos como la polinización y fecundación. En

variedades partenocárpicas en cambio, el inicio de estos programas está ligado al desarrollo, aunque en ambos casos la regulación parece estar mediada por señales hormonales que activan respuestas de desarrollo y crecimiento, las que serán sostenidas por el aporte de nutrientes y la disponibilidad hídrica. Por lo tanto el cuajado del fruto dependerá también de la competencia que se establezca entre diferentes órganos en desarrollo, y de la intensidad de floración que lo determina (Talón, 1997).

El número de flores formadas en los cítricos excede ampliamente el número de frutos que llegan a madurez, debido a una autorregulación provocada por la competencia entre los distintos órganos de la planta en las primeras etapas de crecimiento. En términos generales, sólo el 0.1-10% de las flores llegan a ser frutos, el resto cae (Gravina, 1999).

El porcentaje de cuajado, en términos generales, se relaciona inversamente con el número de flores formadas, descendiendo rápidamente al aumentar la floración. De acuerdo a Guardiola (1992), el número de frutos que alcanza la maduración permanece constante entre 20 y 70 flores cada 100 nudos.

En las mandarinas 'Ellendale' y 'Nova', cuando la densidad de floración aumenta hasta aproximadamente 80–90 flores cada 100 nudos, el porcentaje de cuajado disminuye; en floraciones superiores, de 150 flores cada 100 nudos o más, el cuajado tiende a mantenerse en porcentajes muy bajos, siendo prácticamente nulo (Gravina et al. 1996, Rivas et al. 2004).

Existe una relación muy estrecha entre la producción de fruta y el área foliar. La relación entre ambos es modulada por mecanismos fisiológicos de ajuste entre la actividad fotosintética y el contenido de carbohidratos en las hojas. Éstos regulan la actividad fotosintética y la producción de fotoasimilados, determinando tanto el desarrollo vegetativo como la productividad (Iglesias, 2003).

El crecimiento de frutos es afectado por la presencia de fitohormonas como las giberelinas (GAs), auxinas (AUX) y citoquininas (CKs), las que actúan como promotores del crecimiento reproductivo. Las GAs promueven la división y elongación celular y aumentan la fuerza de fosa de los frutos, atrayendo mayor cantidad de nutrientes. La concentración de GAs aumenta en los ovarios en desarrollo durante la antesis, promoviendo por lo tanto el cuajado de frutos. En variedades con bajo potencial de cuajado, los niveles de GAs son bajos, respondiendo a las aplicaciones exógenas para la mejora del cuajado. AUX y CKs, también participan estimulando el cuajado mediante la división y elongación celular (Talón, 1997).

La probabilidad de cuajado de los ovarios depende también del tipo de brote en el que se encuentran; en general cuanto mayor es la relación hoja/flor, más tarde se produce la brotación y mayor es la probabilidad de cuajado. Los ramilletes florales son los que brotan primero, constituyendo una floración muy intensa, luego se dan las brotaciones mixtas y terminales de menor intensidad y con mayor proporción de hojas. Adicionalmente la posición de la flor en la inflorescencia también condiciona la probabilidad de cuajado, siendo las flores apicales las que se forman primero y aumentan su probabilidad. Los contenidos de GAs también son mayores en los ovarios de inflorescencias con hojas, aumentando a medida que la relación hoja/flor se hace mayor. La concentración de GAs también cambia con la posición de la flor, siendo mayor en los ovarios apicales que en los laterales (Talón, 1997).

La transformación de flor a fruto se acompaña de una gran abscisión de ovarios cercano a la caída de pétalos, una a dos semanas post anthesis, seguida de una caída de frutos en desarrollo desde los 40 a 50 días después de la anthesis hasta el fin de caída fisiológica. Esta abscisión de frutos se relaciona con la capacidad de aporte de carbohidratos de la planta vía fotosíntesis y reservas. El mecanismo de abscisión es utilizado por las plantas como una autorregulación en función de los frutos que podrán alimentar y la floración que presentan (Talón 1997, Talón et al. 1999).

En Uruguay, la abscisión de estructuras reproductivas ocurre desde la aparición de botones florales hasta el mes de diciembre, donde queda definido el número final de frutos que alcanzaran la madurez (Gravina, 1999).

Las variaciones climáticas estacionales durante la caída fisiológica explican las mayores variaciones en la producción entre años. La temperatura aparece como uno de los factores determinantes; temperaturas entre 38 y 42 °C, han provocado abscisiones masivas de frutos en los días posteriores. Diferentes combinaciones de temperaturas día/noche también afectan el cuajado de frutos; temperaturas de 24/19 °C promueven el cuajado, mientras que las que se alejan de ese rango, lo reducen (Talón et al., 1999).

Fasiolo et al. (2010), modificando con mallas la intercepción de luz y la temperatura en plantas de tangor 'Ortanique' en Paysandú, reportan que la acumulación de temperaturas superiores a 30 °C durante la fase I de desarrollo de los frutos, es el principal factor exógeno que limita el cuajado de frutos en este híbrido.

El desarrollo del fruto depende del aporte de agua y la disponibilidad de carbohidratos. La reducción de la transpiración por la regulación estomática de

los frutos que se produce ante la falta de agua, afecta el desarrollo del mismo, particularmente durante la fase II del crecimiento (Agustí, 2003a).

Existe una asociación significativa entre la proporción de frutos cuajados y las variables indicadoras de estrés, bajo máxima demanda atmosférica. Altos valores de temperatura en hoja, y bajos potenciales hídricos foliares, xilemáticos y de conductancia estomática se asocian con menores porcentajes de cuajado. A su vez, existe un efecto positivo del sombreado de árboles sobre el cuajado, lo que se relaciona con un estrés por radiación y temperatura (Borges et al., 2009).

La restricción hídrica tiene efectos diferentes dependiendo de la fase de desarrollo en la que se produzca. González y Castel (2003), aplicaron diferentes dosis de riego deficitario (25% y 50% de la ET), en mandarina 'Clementina de Nules' injertada sobre Citrange 'Carrizo', durante tres períodos: I) floración-cuajado, II) crecimiento rápido del fruto y III) crecimiento final y maduración. Los resultados indican que para el primer período, se redujo significativamente la elongación de los brotes, aumentó la caída de frutos y se redujo el número final de frutos a cosecha.

Un estrés hídrico severo produce una gran caída de frutos; un estrés moderado afecta sobre todo a las variedades sin semillas. La falta de agua tiene su máximo efecto nocivo durante la caída fisiológica, incrementando la velocidad de abscisión y reduciendo el crecimiento y tamaño de frutos (Talón, 1997).

2.3. BIOLOGÍA REPRODUCTIVA

2.3.1. Polinización y fecundación

La polinización es el mecanismo por el cual los granos de polen llegan desde las anteras al estigma para fecundar el óvulo. En los cítricos el polen no puede ser transportado por el viento ya que es pesado y pegajoso; las flores producen néctar y un perfume característicos que atrae a las abejas (*Apis mellifera*), principales insectos encargados de realizar la polinización. Por tanto, la polinización de los cítricos es entomófila (Frost y Soost 1968, Guardiola 1997).

En cítricos no se conoce el efecto de las condiciones ambientales sobre el período de polinización efectiva (Borges et al., 2009). En otras especies como el cerezo, altas temperaturas reducen la capacidad germinativa del polen, acortan el período de receptividad del estigma, y bajas temperaturas lo alargan (Hedhly et al., 2003).

El período de vida de los óvulos luego que maduran es limitado, por lo tanto la fertilización por parte de los gametos masculinos tiene que efectivizarse en ese período para que la fecundación se realice. La velocidad de crecimiento del tubo polínico influye en este proceso, por lo tanto el período de polinización efectiva se calcula restando a los días de vida del óvulo, los que necesita el tubo polínico para crecer y llegar al saco embrionario (Agustí, 2000).

La polinización no se ve favorecida en condiciones de altas o bajas temperaturas, viento y lluvias, por el efecto sobre las abejas, las que cesan el vuelo y por efectos sobre el polen y estigma de las flores. La humedad relativa (HR) mayor a 90% afecta la dehiscencia de las anteras y reduce la fijación de polen en el estigma. En cambio la HR menor al 50% puede dificultar la retención del polen por el estigma (Agustí, 2000).

La polinización del pistilo con polen proveniente de anteras de la misma planta, o de diferentes plantas originadas de un mismo clon, se denomina autopolinización (Frost y Soost, 1968).

En variedades autocompatibles, la autopolinización puede producirse por contacto directo de las anteras con el estigma, cuando las anteras se rompen o alcanzan la dehiscencia antes de la anthesis (cleistogamia), o por medio de insectos polinizadores (Tadeo et al., 2003).

La polinización cruzada ocurre cuando hay transferencia de polen entre plantas de distinto origen genético (Frost y Soost, 1968). En variedades autoincompatibles, con polen estéril y con baja capacidad partenocárpica, la presencia de fuentes de polen y polinizadores, es esencial para la producción de frutas (Tadeo et al., 2003). Esto también puede determinar la presencia y número de semillas en los frutos cítricos (Frost y Soost, 1968).

La fecundación ocurre cuando el tubo polínico alcanza el saco embrionario y uno de los núcleos espermáticos haploides se fusiona con la ovocélula haploide, generando un cigoto diploide. El segundo núcleo espermático se fusiona con el núcleo secundario del saco embrionario, diploide, dando lugar al núcleo endospermico triploide. Una vez producida la fecundación, el ovario deja de ser propiamente ovario para convertirse en fruto. La transición de ovario a fruto en desarrollo se denomina cuajado (Esau 1982, Agustí et al. 2003b).

2.3.2. Partenocarpia y autoincompatibilidad

La partenocarpia se define como la producción de frutos en ausencia de fecundación; como consecuencia los frutos no presentan semillas. Se

distinguen varios tipos de partenocarpia: obligada, es la que siempre se traduce en frutos sin semillas, y facultativa, la que resulta en fruta sin semillas sólo cuando la polinización es impedida. También se distingue entre partenocarpia vegetativa, cuando existe fructificación sin polinización, y partenocarpia estimulativa, cuando es necesario el estímulo de la polinización para el cuajado del fruto, pero se impide la fertilización, resultando en la producción de frutos sin semillas. La ausencia de semillas también puede deberse al fenómeno de la estenospermocarpia, donde la polinización y la fertilización ocurren y el aborto de embriones es la causa de la ausencia de semillas. Esto es común en algunos cultivares de uva de mesa, donde por efecto de este fenómeno las semillas no se desarrollan, quedando solo pequeños vestigios comestibles (Vardi et al., 2008).

La capacidad partenocárpica se relaciona con diferentes tipos de esterilidad gamética. En variedades con partenocarpia obligada, ésta se relaciona a la esterilidad gamética absoluta masculina o femenina. Algunos ejemplos de esterilidad gamética masculina son el naranjo 'Washington' navel y la mandarina Satsuma. La esterilidad gamética absoluta femenina no es muy común en *Citrus*, aunque la producción de óvulos desprovistos de saco embrionario es frecuente en mandarina Satsuma, naranjas 'Washington' navel, 'Valencia' y limones 'Lisbon' y 'Eureka' (Tadeo et al., 2003).

La naranja 'Washington' navel y la mandarina Satsuma presentan esterilidad de sus granos de polen. La mayoría de sus sacos embrionarios también abortan, produciendo frutos sin semillas, a pesar de que exista polinización cruzada. Las Clementinas y otras mandarinas híbridas son autoincompatibles, pero sus sacos embrionarios son viables. En presencia de polinización cruzada forman frutos con semilla, lo que debe ser evitado para obtener frutos partenocárpicos (Guardiola, 1997).

El contenido endógeno de giberelinas en ovarios en desarrollo, es el factor que controla el desarrollo de frutos partenocárpicos. Existe mayor contenido de giberelinas endógenas en frutos de variedades con alta habilidad partenocárpica y cuajados normales, que en frutos de variedades con un grado de partenocarpia bajo y cuajado deficiente (Talón et al., 1992).

La autoincompatibilidad se define como la incapacidad de formar embriones por autopolinización, aunque los gametos sean perfectamente funcionales (De Nettancourt 1977, Talón 1997). Mediante sistemas de reconocimiento genético entre el polen y el pistilo, se detecta la procedencia del polen, deteniendo el crecimiento del tubo polínico e impidiendo la fecundación, si el polen es del mismo individuo. Este fenómeno de autoesterilidad recibe el nombre de esterilidad homomórfica u homogenética (Agustí, 2004).

El mecanismo de rechazo entre el polen y el pistilo se basa en mensajes bioquímicos, liberados por el polen y carpelos, para que ocurra el reconocimiento y se genere la respuesta (Lersten, 2004). Los tejidos femeninos están programados para identificar y rechazar granos de polen producidos por el mismo individuo, los que llevan una copia del mismo genoma (Helsop-Harrison, 1975).

La incompatibilidad genética entre el polen y el estigma está ligada a un gen de autoesterilidad con múltiples alelos. Solamente el grano de polen que no posea el mismo alelo de autoesterilidad que los tejidos del estigma y el estilo, podrá llegar hasta los primordios seminales. Si poseen el mismo alelo, diversos mecanismos de reconocimiento proteico e inhibidores del desarrollo del tubo polínico, actuarán para impedir la autogamia (Agustí, 2004).

Existen dos tipos de incompatibilidad homomórfica. Si las reacciones de autoincompatibilidad las determina el genotipo del propio polen, se denomina gametofítica; si el genotipo de la planta de la cual proviene el polen es el que las determina, se denomina esporofítica (De Nettancourt, 1977). El grano de polen y las células del pistilo, tienen alelos S idénticos, que interactúan de manera tal de inhibir el crecimiento del tubo polínico evitando la autofecundación. En el sistema esporofítico, el comportamiento del polen está determinado por el genoma diploide de la planta madre productora de polen. La inhibición es inmediata, de manera tal que el grano de polen, ni siquiera llega a hidratarse ni a germinar. En el sistema gametofítico, la autoincompatibilidad del polen está determinada por su genoma haploide. La fase inicial de la germinación y elongación del tubo polínico en la mayoría de los casos es normal, produciéndose una inhibición más tardía mientras el tubo polínico crece a través del pistilo (Takayama e Isogai, 2005).

La esterilidad citológica, es un tipo particular de esterilidad que afecta a los cultivares triploides. Estos sufren modificaciones en la recombinación de los cromosomas homólogos, adquiriendo dotaciones de cromosomas superiores a las de variedades diploides, lo que reduce la capacidad germinativa de su polen. Este tipo de esterilidad no impide el desarrollo del fruto, pero sus semillas no tienen embrión, siendo solo rudimentos seminales (Agustí, 2002).

Según Ollitrault et al. (2007), la esterilidad gamética es causada por factores genéticos tales como, presencia de genes de esterilidad, anormalidades cromosómicas y triploidía.

2.4. OBTENCION DE NUEVOS CULTIVARES

En todo el mundo se han desarrollado programas de mejora genética con el fin de mejorar la calidad y la producción de cítricos. Entre los métodos de mejora tradicional empleados en cítricos, se destacan la selección clonal de mutaciones naturales, la mutagénesis inducida y la hibridación sexual. La introducción de la biotecnología en la mejora genética vegetal permite resolver algunos de los problemas de la mejora clásica y alcanzar objetivos de una forma menos aleatoria y más precisa, ahorrando tiempo y recursos. Técnicas como el cultivo de tejidos *in vitro* pueden mejorar el rendimiento y aprovechar todo el potencial de la mejora clásica. Las técnicas biotecnológicas más aplicadas para la mejora genética de plantas, y en particular de los cítricos son la producción de triploides, variación somaclonal, selección asistida por marcadores moleculares y transformación genética (Pensabene, 2009).

2.4.1. Mutaciones

La selección clonal es el procedimiento que más resultados ha proporcionado en la obtención de nuevas variedades de cítricos. La aparición de mutaciones espontáneas en el campo es relativamente frecuente, lo que indica una cierta inestabilidad genética de los mismos. Gracias a esto se ha obtenido la gran mayoría de las variedades utilizadas comercialmente en el mundo (Pensabene, 2009). Las yemas mutantes encontradas se aíslan e injertan y se someten a un proceso de caracterización varietal. Si las características por las que se aisló se corroboran, el material es saneado y pasa a nuevas parcelas para ensayos de adaptación a condiciones climáticas y de cultivo. No todas las mutaciones detectadas tienen garantizado el convertirse en nuevas variedades, esto se debe generalmente a la alta frecuencia con la que aparecen mutaciones inestables y quimeras (Agustí, 2003a).

La inestabilidad genética de los cítricos se debe a la acción de elementos transponibles, que serían los responsables de la aparición de mutaciones espontáneas (Breto et al., 2001).

Los tratamientos con agentes mutantes, como las sustancias químicas o los rayos ionizados pueden inducir mutaciones artificiales. Por ejemplo, yemas tratadas con rayos gamma producen varios tipos de mutantes, entre otros, variedades sin semilla y que crecen en áreas donde otras tienen dificultades (Nicotra, 2001).

Mediante la mutagénesis inducida se pueden variar uno o unos pocos caracteres de una variedad, sin cambiar de forma significativa su fondo genético (Spiegel-Roy y Vardi, 1989).

En los tratamientos que utilizan la colchicina como agente mutagénico, se busca alterar el proceso de división somática. Se aplica a células en división, impidiendo que funcione el huso cromático, lo que da como resultado células con el número de cromosomas duplicado (León, 1968). En tratamientos mutagénicos con radiación, esta se aplica sobre semillas o yemas axilares. La irradiación con rayos Gamma ha sido el agente mutante más utilizado en los programas de mejora de cítricos (Roose y Williams, 2007).

A partir de programas de mejoramiento que utilizaron la mutagenesis inducida, se obtuvieron variedades como la 'Tango', mutante de 'Afourer' sin semillas, y la 'Mor', mutante de 'Murcott' con menor número de semillas (Roose y Williams, 2007).

2.4.2. Hibridación sexual

La hibridación sexual se ha utilizado tradicionalmente en los programas de mejora de cítricos. Sin embargo, el número de genotipos de interés obtenidos ha sido muy limitado. Los cítricos poseen características específicas que dificultan este tipo de mejora (Pensabene, 2009): la alta heterocigosis (Soost y Cameroon 1975, Ollitrault et al. 2003), la esterilidad gamética, la autoincompatibilidad gametofítica y la incompatibilidad cruzada (Frost y Soost 1968, Soost y Cameroon 1975).

La apomixis o embrionía nucelar, que es característica de la mayoría de los genotipos de cítricos, permite la obtención de plantas idénticas a la planta madre. Esta característica es una de las principales barreras a la obtención de nuevos cultivares, en la medida que solo es posible utilizar un número limitado de genotipos no apomícticos como parentales femeninos en las hibridaciones sexuales (Pensabene, 2009). La mandarina híbrida 'Nova' (*C. reticulata* Bl. × [*C. paradisi* Macf. × *C. tangerina* Ort. ex Tan.]) es uno de los pocos ejemplos de variedades obtenidas a través de hibridaciones dirigidas.

2.4.3. Producción de triploides

Triploides espontáneos ocurren naturalmente en los cítricos como consecuencia de la fusión de un gameto haploide y otro diploide no reducido. Los embriones rescatados tienden a mostrar disminución de la fertilidad femenina y la completa esterilidad masculina (Luro et al., 2004).

Las plantas triploides no producen semillas ni provocan la formación de semillas en otras por polinización cruzada, por lo que se ha adoptado esta estrategia para la obtención de nuevas variedades. El rescate *in vitro* de

embriones y la citometría de flujo se están usando para obtener híbridos triploides procedentes de varios cruzamientos (Navarro et al., 2005).

Se pueden obtener triploides sexuales de cítricos por medio de tres vías: polinizaciones $2n \times 4n$, $4n \times 2n$ y $2n \times 2n$. En las primeras, casi cualquier mandarino puede ser usado como parental femenino, aunque existen pocos padres donadores de polen tetraploide de calidad. En las segundas ($4n \times 2n$) existen poca disponibilidad de tetraploides monoembriónicos, mientras que en las $2n \times 2n$ no existen limitantes en cuanto a los parentales, pero se producen un número de semillas muy reducido con embriones triploides (Aleza et al., 2005). Los embriones inmaduros se puedan rescatar e incubar in vitro generando híbridos triploides que producen frutos sin semilla (Nicotra, 2001).

Otra técnica importante es la hibridación somática, que consiste en la fusión de dos protoplastos, mediante el uso de polietilenglicol (PEG) o de electrofusión. Por lo tanto, los híbridos somáticos son alotetraploides y poseen los cromosomas de dos genotipos completos. Su gran valor es proveer padres donadores de polen para el cruce con diploides monoembriónicos seleccionados, para la producción de triploides (Nicotra, 2001). La ventaja que presenta este método es la posibilidad del intercambio genético entre especies sexualmente incompatibles (Agustí, 2003a).

La diferencia principal entre la hibridación sexual y la hibridación somática es que en esta última se suman los genomas de dos células somáticas, que no han sufrido recombinación ni reducción previa. Si los parentales de partida son diploides y cada uno de sus núcleos presenta 18 cromosomas, la planta híbrida obtenida tras la fusión de protoplastos será tetraploide presentando un total de 36 cromosomas. Estos híbridos contienen el genoma de ambos parentales, pudiendo expresar los caracteres de ambos y por lo cual es posible combinar genotipos complementarios que resulten más adaptados a las condiciones de cultivo (Pensabene, 2009).

El programa nacional de producción cítrica de INIA lleva adelante un programa de rescate de embriones donde se han obtenido al momento 14 triploides y un posible haploide, los que aún restan por evaluarse productivamente (Bertalmio et al., 2010).

2.4.4. Estabilidad de las mutaciones

El tipo de mutaciones más frecuentes y de mayor importancia no solo en cítricos son las mutaciones somáticas. Éstas se presentan como cambios bruscos en la estructura de una célula o un grupo de ellas, llegando a comportarse como un tejido u órgano diferente a la planta en la que crecen.

Este tipo de mutaciones se inicia en yemas vegetativas, pudiendo afectarla en todos sus tejidos, o solo en los externos. En este último caso la capa externa presenta una constitución génica, y la interna otra idéntica a la planta original, como si se tratase de dos individuos diferentes en una misma estructura. Una vez establecida la mutación, puede ser propagada vegetativamente, presentando el clon resultante la característica mutante, aunque pueden presentarse posteriormente nuevos cambios somáticos (León, 1968).

Existe un tipo de mutación somática muy común en plantas cultivadas como solanáceas y cítricos que se conoce con el nombre de quimeras. Estas pueden ser de dos clases: cuándo la mutación solo afecta los tejidos externos en su totalidad, se llaman quimeras periclinales; cuándo afectan solo una sección externa del órgano reciben el nombre de mericlinales (figura 4). Dentro de estas últimas un caso particular son las quimeras sectoriales, donde el tejido es afectado más en profundidad, pudiendo llegar la mutación a las semillas si se tratase de un fruto (León, 1968).

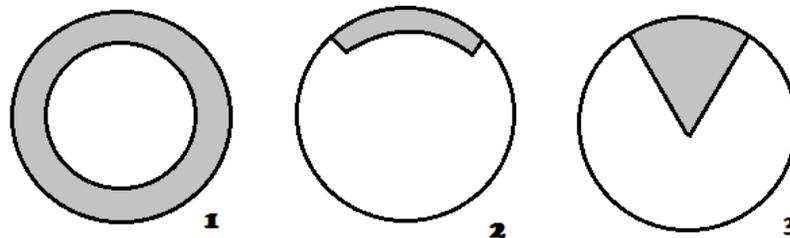


Figura 4. Tipos de quimeras: 1, periclinal, 2, mericlinal, 3, sectorial (adaptado de León, 1968).

En cítricos son muy comunes las mutaciones de rama, en las que aparecen frutos con características diferentes como es el caso de 'Washington' navel, encontrada como una rama mutante de un árbol normal, la cual producía frutos sin semillas, la que se propagó vegetativamente y dio origen a la variedad. Las quimeras más comunes son las que provocan cambios de color, aunque también se conocen otras que cambian la forma de los frutos, presencia o ausencia de semillas, rendimiento y otras características agronómicas de interés (León, 1968).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

Se seleccionó una parcela de limón 'INIA-Ana Claudia' (*Citrus limon* Burm.), injertada sobre *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., de 3 años de plantada, ubicada en el establecimiento 'El Espinillo' S.A., en la zona de Punta Espinillo, al oeste de Montevideo (coordenadas 34°48'38.90'S 56°23'04.40'O, según Google Earth). La parcela tenía en su proximidad limón 'Lisbon', tangor 'Ortanique' y naranja 'Washington' navel (figura 5).



Figura 5. Vista aérea de la plantación, ubicación de la parcela y las variedades próximas (adaptado de Google Earth). 1. limón 'INIA-Ana Claudia'; 2 y 3 tangor 'Ortanique'; 5, 6 y 8 limón 'Lisbon'; 9 naranja 'Washington' navel; 4 y 7 sin plantas cítricas.

Las plantas fueron producidas en el propio establecimiento a partir de una planta de limón 'INIA-Ana Claudia', perteneciente al INIA, identificada como 'Lxxx055', que se encuentra en una colección de dicha institución, dentro del predio.

3.2. DISEÑO DEL EXPERIMENTO

Se eligieron 12 plantas homogéneas de una fila de la parcela, de las cuales 6 fueron cubiertas con cajas de madera forradas con 'Agril' (material de uso agrícola similar al 'TNT') desde pre-antesis hasta fin de floración, para impedir el ingreso de insectos polinizadores (figura 6). Las otras 6 plantas fueron testigos en condiciones de libre polinización. El período de aislamiento

de las plantas abarcó desde el 6 de octubre hasta el 29 de noviembre de 2010, cuando se retiraron las cajas.



Figura 6. Vista del experimento.

Previo a la colocación de las cajas, las pocas flores que se encontraban abiertas se eliminaron, al igual que los frutos presentes.

Debajo de las plantas se instaló una malla para colectar y contabilizar las flores y frutos caídos durante el período de abscisión (figura 7). Estas mallas a su vez, cerraban las cajas por debajo evitando el posible ingreso de insectos polinizadores. Las mallas permanecieron desde el 23 de setiembre de 2010 hasta el 4 de mayo de 2011, cuando se cosechó la fruta.



Figura 7. Vista de las mallas colocadas para colecta de estructuras reproductivas abscionadas.

3.3. EVALUACIONES REALIZADAS

En tres plantas aisladas y tres testigos se marcaron dos ramas en las cuales se evaluó la intensidad de brotación y floración, la distribución por tipo de brote y se hizo el seguimiento fenológico, desde el inicio de la brotación hasta el fin de la floración e inicio de cuajado de frutos. Para ello se utilizó la escala BBCH propuesta por Agustí et al. (1995). Las ramas evaluadas tenían una longitud aproximada de 80 cm y un promedio de 57 nudos.

En lapsos semanales hasta fin de floración y quincenales hasta fin de la caída fisiológica de frutos, se cuantificaron las estructuras reproductivas abscionadas, colectadas en las mallas ubicadas bajo las plantas.

Desde el inicio del cuajado hasta la cosecha, se midió el diámetro ecuatorial de 10 frutos por planta seleccionados al azar.

Luego de retiradas las cajas, en ramas seleccionadas al azar, las flores desarrolladas al inicio de la brotación de verano se dividieron en dos grupos: a unas se las embolsó con tul en forma individual para evitar la polinización cruzada (figura 8), y a las otras se las dejó en condiciones de polinización libre. Todas las flores elegidas fueron de brotes terminales, buscando maximizar el cuajado. En ese momento a excepción del limón 'Lisbon', ninguna de las variedades próximas a la parcela tenía flores. El embolsado de flores se realizó el 14 de diciembre del 2010, retirándose las bolsas luego del cuajado de los frutos.



Figura 8. Flores de la brotación de verano embolsadas.

La cosecha se realizó el 4 de mayo del 2011, incluyendo solo los frutos provenientes de la brotación de primavera; se cuantificó el número de frutos por

planta, el diámetro ecuatorial de los mismos y el número de semillas por fruto. Considerando el número de frutos cosechados y número de frutos caídos, se determinó el porcentaje de cuajado final.

Durante todo el experimento se registró en forma horaria la temperatura y humedad relativa mediante el uso de sensores (I-button, Higrchron) ubicados en la copa de dos plantas testigo y dos aisladas (figura 9).



Figura 9. Sensor de temperatura y humedad relativa colocado en las plantas.

3.4. DISEÑO ESTADÍSTICO

El diseño experimental planteado fue completamente al azar (DCA), con 2 tratamientos: aislado y testigo, con 6 repeticiones y un árbol como unidad experimental.

Al momento de realizar el análisis estadístico se encontró que el número de frutos cosechados por planta representaba una fuente de variación que no era explicada por el modelo DCA, por lo que se planteó un análisis de covarianza. El modelo utilizado fue: $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta x_{ij} + \epsilon_{ij}$, siendo: Y_{ij} : porcentaje de frutos con semilla, asociado al i-ésimo tratamiento en la j-ésima repetición, μ : media poblacional, α_i : efecto del i-ésimo tratamiento, ϵ_{ij} : error experimental asociado al i-ésimo tratamiento en la j-ésima repetición, β : parámetro de regresión (pendiente), x : número de frutos por unidad experimental (variable regresora, covariable).

A todas las variables se les realizó un análisis de varianza y prueba de comparación de medias por Tukey, utilizando el software 'R', versión 2.15.0.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. BROTACIÓN Y FLORACIÓN

La evolución del desarrollo fenológico de los brotes florales se evaluó desde el 30 de setiembre hasta el 8 de noviembre del 2010. El 19 de octubre comenzaron a observarse flores abiertas, con porcentajes de 2,6 y 2,7% en plantas testigo y aisladas respectivamente, aunque presentando ya los testigos, un 2% en el estado de pétalo caído. Para el 26 de octubre, las flores abiertas alcanzaban un 13,5% en plantas testigo y un 18,8% en plantas aisladas, observándose un mayor número de estructuras florales en etapas más avanzadas en los testigos, determinando un pequeño adelanto de éstos en la floración (cuadro 1). Esta fecha se consideró como plena floración.

Cuadro 1. Distribución de los estados florales según la escala BBCH en plena floración (26/10/2010) en plantas de limón 'INIA-Ana Claudia' aisladas de polinización y en condiciones de polinización abierta (Testigos).

Estado escala BBCH	51	53	55	56	57	59	60	67	69
Aisladas	5,8	4,4	4,4	17,4	24,6	20,3	18,8	0,0	4,4
Testigos	1,8	3,6	9,0	10,8	11,7	29,7	13,5	0,9	18,9

Se presenta el porcentaje de estructuras reproductivas en los estados: 51 y 53, primordios florales; 55, botón verde; 56, botón blanco o amaratado; 57, apertura de sépalos; 59, alargamiento de pétalos (botón alargado); 60, flores abiertas (antesis); 67, marchitamiento de estambres y pétalos; 69, caída de pétalos.

La fecha de plena floración del limón 'INIA-Ana Claudia' coincide con los resultados obtenidos por Espino et al. (2005), quienes reportan el momento de plena floración en el limón 'Lisbon' en la segunda quincena de octubre en la zona sur del país.

La intensidad de floración y la distribución por tipo de brote por tratamiento se presentan en el cuadro 2. Las plantas aisladas presentaron una menor brotación y floración que las testigos, además de un mayor porcentaje de brotes vegetativos. Los brotes florales solitarios fueron en ambos casos los más numerosos.

Cuadro 2. Intensidad de brotación (brotes cada 100 nudos), floración (flores cada 100 nudos) y distribución por tipo de brote en plena floración, en plantas de limón 'INIA-Ana Claudia' aisladas de polinización y en condiciones de polinización abierta (Testigos).

Tratamiento	Fecha	Brotes/100 nudos	Flores/100 nudos	%VEGETATIVOS	%MIXTOS	%TERMINALES	%SOLITARIOS	%INFLORESCENCIAS
Aisladas	26/10/2010	34	23	46,8	6,5	4,0	40,3	2,4
Testigos	26/10/2010	43	42	20,2	5,0	1,7	59,7	13,4

La intensidad de brotación obtenida en ambos tratamientos fue mayor que la reportada por Espino et al. (2005), para 'Lisbon' (18 a 31 brotes cada 100 nudos en 4 años de estudio) y que la reportada por Chouza (2004), para 'Fino 49' (24 brotes cada 100 nudos).

La intensidad de floración se ubicó entre 23 y 42 flores cada 100 nudos, encontrándose entre el 40 y el 60% de las flores en brotes solitarios, para los tratamientos de aislación y testigos respectivamente. Espino et al. (2005), reportan para el limón 'Lisbon', intensidades de floración menores a 20 flores cada 100 nudos, con el 60% de las flores en brotes solitarios. Según Chouza (2004), el limón 'Fino' en nuestras condiciones presenta una intensidad de floración de 21 flores cada 100 nudos, con el 40% de flores en brotes solitarios. Arbiza et al. (2005), proponen que las intensidades de floración registradas tanto en 'Fino' como en 'Lisbon' son relativamente bajas, no superando las 25 flores cada 100 nudos, situación similar a la obtenida para las plantas aisladas.

La distribución por tipo de brote fue diferente en plantas aisladas y testigo, presentando las primeras más del doble de brotes vegetativos, mientras que la proporción de brotes florales del tipo solitarios e inflorescencias fue mayor en plantas testigos que en aisladas. Según lo reportado por Chouza (2004), Espino et al. (2005), los brotes predominantes en limón 'Lisbon' y 'Fino 49', son los vegetativos, seguidos por solitarios, inflorescencias, mixtos y terminales. En el limón 'INIA-Ana Claudia' más del 80 % de los brotes se distribuyó entre vegetativos y flores solitarias; sin embargo, se registraron diferencias en las dos situaciones estudiadas; en las plantas testigo los brotes predominantes fueron los de flor solitaria (60%) y en las aisladas, los vegetativos (47%) (Cuadro 2). En la figura 10 se presentan los cinco tipos de brotes presentes en el limón 'INIA-Ana Claudia'. Las condiciones de aislamiento no deberían explicar estas diferencias en la brotación y floración, por lo que se sugiere que las mismas podrían deberse a una diferencia en la carga de frutos en el ciclo anterior.



Figura 10. Imágenes de los diferentes tipos de brotes (05/10/10). I, Inflorescencias; S, Solitarios; T, Terminales; M, Mixtos; V, Vegetativos.

La evolución de la brotación muestra una disminución del número de brotes cada 100 nudos, lo que se puede explicar por la abscisión de estructuras durante el período de estudio (figura 11).

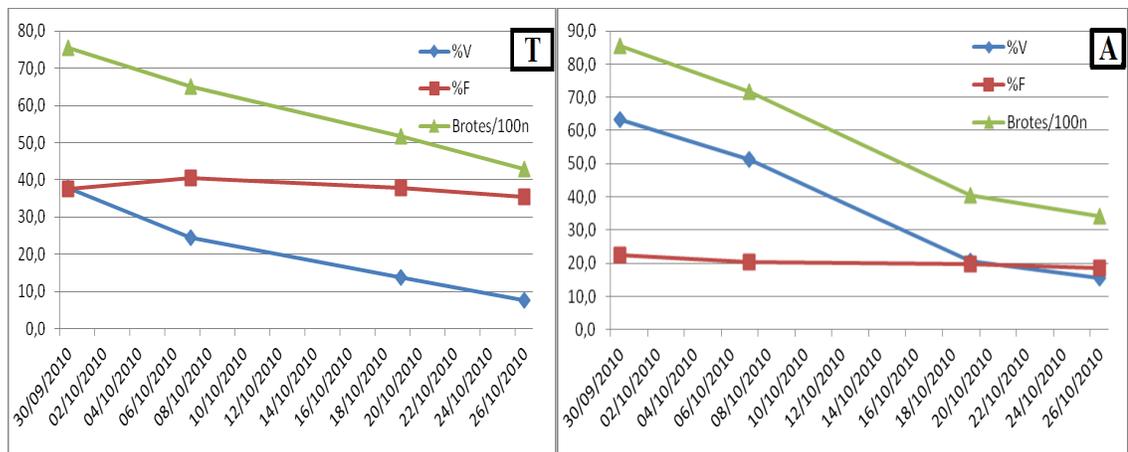


Figura 11. Evolución del número de brotes cada 100 nudos (Brotos/100n) y de la proporción de brotes vegetativos (%V) y florales (%F), en plantas de limón 'INIA-Ana Claudia' aisladas de polinización (A) y en condiciones de polinización abierta (T).

El comportamiento observado fue similar en ambos tratamientos, aunque partiendo de diferentes situaciones en cuanto a la proporción inicial de cada tipo de brote. A pesar de haber seleccionado las plantas por su homogeneidad para la instalación del experimento, al momento de la brotación

no se comportaron como tales. Las plantas testigo partieron de una condición de mayor floración que las aisladas, llegando también al final del periodo en el que se evaluó la fenología, con mayor número de flores, aunque esto no afectó el número final de frutos ni el porcentaje de cuajado en ningún caso (Cuadros 5 y 6). En los tratamientos de aislación por el contrario, la proporción de brotes vegetativos fue mucho mayor al comienzo.

En ambos tratamientos hubo una disminución de brotes vegetativos y florales. La reducción de brotes vegetativos puede explicarse parcialmente por la abscisión natural y además por haber sido identificados inicialmente como vegetativos y al avanzar el desarrollo, verificarse la presencia de flores, clasificándose entonces como brotes terminales o mixtos.

Las plantas aisladas mostraron una mayor abscisión de estructuras en comparación con los testigos, llegando a disminuir el número de brotes cada 100 nudos en un 52%, mientras que en los testigos esa disminución fue del 33%.

La evolución por tipo de brotes florales, muestra para el caso de los testigos, un mantenimiento de flores solitarias y disminución de las inflorescencias, lo que indica que la caída de estructuras florales se explica más por la caída de flores de inflorescencias que del resto de los brotes. En las plantas aisladas, caen casi exclusivamente flores solitarias, probablemente por ser la gran mayoría presente en las ramas evaluadas (cuadro 3).

Cuadro 3. Número promedio de brotes florales por rama en plantas de limón 'INIA-Ana Claudia' aisladas de polinización y en condiciones de polinización abierta (Testigos).

Tratamiento	Fecha	MIXTOS	TERMINALES	SOLITARIOS	INFLORESCENCIAS
Testigos	30/09/2010	2,0	0,0	69,0	23,0
Testigos	26/10/2010	6,0	2,0	71,0	16,0
Aisladas	30/09/2010	0,0	0,0	80,0	6,0
Aisladas	26/10/2010	8,0	5,0	50,0	3,0

Los sensores de temperatura (T) y humedad relativa (HR) ubicados en las diferentes plantas, tanto dentro de las cajas como en las plantas testigo, registraron valores similares, con leves diferencias aunque estadísticamente significativas. El aislamiento de las plantas provocó menor T mínima y mayor HR máxima en octubre y menor T y HR media en noviembre. Los mayores

valores de T y los menores valores de HR se registraron en los meses de noviembre a febrero (figura 12).

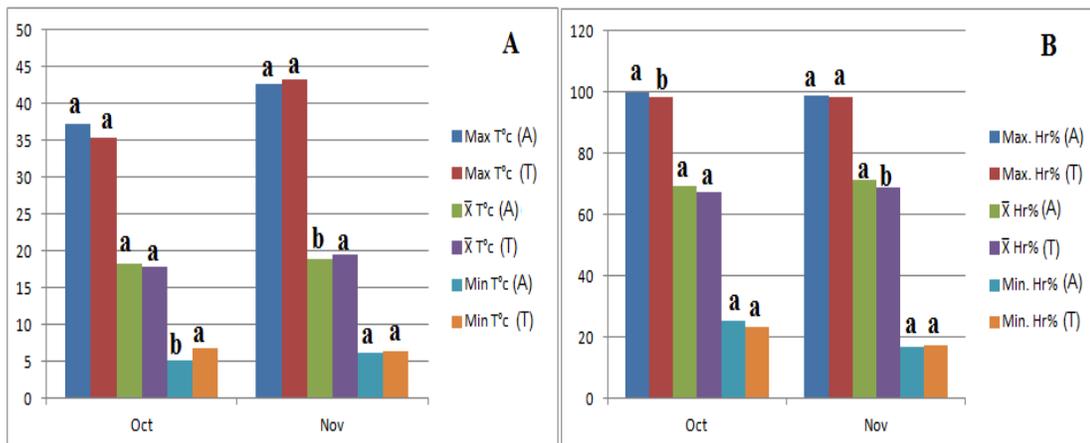


Figura 12. (A) Temperatura máxima (Max T°C), promedio (\bar{X} T°C), mínima (Min T°C) y (B) humedad relativa máxima (Max Hr%), promedio (\bar{X} Hr%) y mínima (Min Hr%) registrada durante el período de aislación en ambos tratamientos; aislado (A) y testigo (T). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Los datos de temperatura mostraron 56 días con temperaturas máximas superiores a 35°C en los meses de octubre a abril y 12 días con temperaturas mayores a los 40°C en los meses de noviembre a febrero. En el mes de octubre se registraron 3 días con temperaturas superiores a 35°C, alcanzando los días 19 y 20, los 37°C. En noviembre, las temperaturas siguieron en aumento registrándose 15 días con temperaturas superiores a 30°C, de los cuales 5 superaron los 35°C y dos los 40°C. Para el mes de diciembre el número de días con temperaturas máximas por encima de 30°C fue de 27, en 17 de los cuales las temperaturas superaron los 35°C y en 5 los 40°C. En la primera semana de enero, hasta donde se contabilizó caída de frutos, en todos los días se alcanzó un promedio de 32°C.

El número de horas con temperaturas mayores a 30°C se presenta en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Número de horas con temperaturas mayores a 30°C en los meses de octubre a enero.

MES	Horas >30 °C	Horas >35 °C	Horas >40 °C
Octubre	17	6	0
Noviembre	65	17	3
Diciembre	188	65	5
Enero	188	36	5

Según Fasiolo et al. (2010), la acumulación de temperaturas superiores a 30 °C durante la fase I de desarrollo de los frutos, limita el cuajado en el tangor 'Ortanique'. Estas temperaturas, según Borges et al. (2009) comprometen la fotosíntesis de los cítricos, provocando un estrés térmico y lumínico a la planta. Talón et al. (1999) reportan caídas masivas de frutos en los días posteriores a picos de temperatura entre 38 y 42 °C. Todo esto es coincidente con los períodos en los que se observó abscisión tanto de frutos como de brotes vegetativos en el limón 'INIA-Ana Claudia'. La abscisión de frutos fue contabilizada durante el experimento, no así la de brotes vegetativos, lo que se corroboró luego al analizar los datos. No existen pruebas ni antecedentes de que la temperatura provoque abscisión de estructuras vegetativas, pero tampoco otra explicación más allá de la temperatura y el déficit hídrico.

En cuanto a la humedad relativa, se registraron 141 días con HR por debajo de 50% y 44 días por debajo del 30%, e incluso algunos por debajo del 20% entre octubre y abril. En el mes de octubre se registraron 13 días con valores de HR menores al 50%, de los cuales en 7 días se registraron menos de 40% y en tres, menos de 30%. Para el mes de noviembre se registraron 22 días con menos de 50% de HR, de los cuales durante 17 días estuvo por debajo del 40%, 6 días del 30% e incluso un día del 20%. En diciembre se registraron 27 días por debajo del 50% y 26 por debajo del 40% de HR. En 15 de esos días se registraron valores menores al 30% y en 4, menores al 20% de HR. Para la primera semana de enero solo se registraron tres días con menos de 50% de HR.

Esta baja humedad relativa tiene relación con el registro pluviométrico de los mismos meses donde se observó una baja incidencia de lluvias, lo que también podría explicar en parte la gran abscisión de frutos y el bajo porcentaje de cuajado cuantificado.

Durante el período del experimento las precipitaciones fueron muy escasas, registrándose de octubre del 2010 a abril del 2011, 317 mm según la estación meteorológica de INIA Las Brujas. Por el contrario la demanda atmosférica expresada como evaporación del tanque 'A', estuvo en un promedio mensual de 197 mm en el mismo período (figura 13).

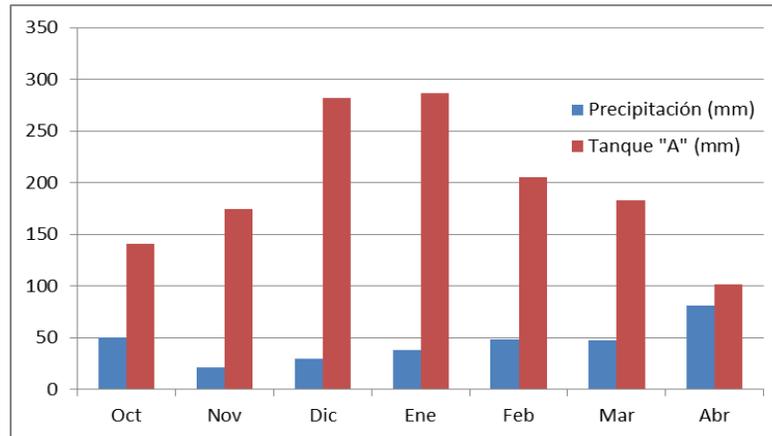


Figura 13. Precipitaciones mensuales y demanda atmosférica (evaporación del tanque A) durante el período de estudio (tomado de INIA. GRAS, s.f.).

Según datos proporcionados por el encargado de la plantación, el cuadro de limón en estudio recibió en el período 2010-2011, aproximadamente 1100 m³ de agua de riego, desde el 25/10/2010 al 19/04/2011. El importante déficit hídrico provocado por la escasez de lluvias, no fue cubierto con la aplicación de riego, lo que podría explicar junto con el estrés térmico, la alta abscisión de frutos y de brotes vegetativos.

4.2. ABSCISIÓN Y CUAJADO FINAL DE FRUTOS

4.2.1. Abscisión

La abscisión de estructuras reproductivas aumentó en el período inicial del 19 al 26 de octubre, y fue mayor en plantas aisladas que en los testigos (figura 14). Esta diferencia podría deberse a la falta del estímulo inicial de la polinización, que según Talón (1997), promueve el cuajado y crecimiento de frutos en variedades con semillas.

En la etapa de abscisión final, se establecería una competencia nutricional, invirtiéndose el comportamiento inicial de los tratamientos. Las plantas en aislación, que tuvieron una mayor brotación vegetativa posterior (datos no presentados), tenían una mejor relación fuente-fosa para retener los frutos que los testigos, en los cuales la brotación vegetativa fue menor.

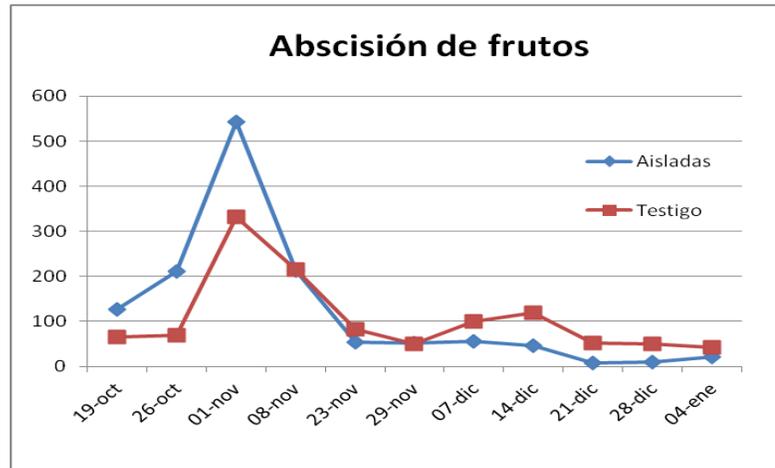


Figura 14. Abscisión de frutos en plantas de limón 'INIA-Ana Claudia' aisladas de polinización y en condiciones de polinización abierta (Testigos) en el período de estudio.

En ambas situaciones se observa un mayor flujo de abscisión entre la última semana de octubre y la primera de noviembre, seguido de otro menor en la primera quincena de diciembre. Sin embargo, la dinámica de abscisión fue diferente, ya que las plantas aisladas presentaron mayor caída de frutos que los controles en la primera onda de abscisión, mientras que las plantas testigo lo presentaron en la segunda, terminando con cuajado similar.

Entre el 26 de octubre y el 8 de noviembre, la abscisión se vio acentuada por un evento de viento fuerte ocurrido entre los días 30 y 31 de octubre, que alcanzó velocidades de 28 y 31 m s⁻¹ respectivamente (INIA. GRAS, s.f.), provocando una gran caída de estructuras reproductivas.

El segundo pico de abscisión, registrado el 15 de diciembre, más marcado en los tratamientos testigo, coincidiría con lo reportado por Chouza (2004), para la variedad 'Fino', ya que estaría dentro de los 45 días post floración. La concentración del período de abscisión reportada por Espino et al. (2005), ocurrió a los 30 días post floración, para limón 'Lisbon'.

La acumulación de horas con temperaturas superiores a 30°C, registradas en diciembre (188 horas), también podrían explicar el pico de abscisión cuantificado en diciembre.

4.2.2. Cuajado final de frutos

El número de estructuras reproductivas formadas fue muy variable entre árboles, con un promedio de 1227 y 1376 estructuras por planta en testigos y aislados respectivamente (Cuadro 5).

Los resultados indican que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, en el número de flores formadas y el porcentaje de cuajado. Este último fue de 1,75 y 1,80% para testigos y aisladas respectivamente, el que puede considerarse muy bajo para limón en las condiciones de producción nacionales. Espino et al. (2005), reportan para 'Lisbon', un cuajado final elevado, de entre un 15 y un 27%. Chouza (2004), por su parte, determinó un porcentaje de cuajado del 16% para la variedad 'Fino', mientras que Arbiza et al. (2005), reportan un porcentaje de cuajado de 19,5% para 'Lisbon' y de 17% para 'Fino', concluyendo que los altos porcentajes de cuajado, compensan las bajas intensidades de floración registradas en ambos cultivares.

Cuadro 5. Número promedio de flores por planta y porcentaje de cuajado en plantas de limón 'INIA-Ana Claudia' aisladas de polinización y en condiciones de polinización abierta (Testigos).

TRATAMIENTO	No. FLORES FORMADAS	% CUAJADO
Testigos	1227 a	1,75 a
Aisladas	1376,2 a	1,8 a
CV%	44,51	64,78

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). CV: coeficiente de variación.

4.3. CRECIMIENTO DE FRUTOS

El crecimiento de los frutos no mostró diferencias significativas en el diámetro ecuatorial en plantas aisladas en comparación con los testigos, lo que concuerda con el similar porcentaje de cuajado final y número de frutos formados por planta (figura 15).

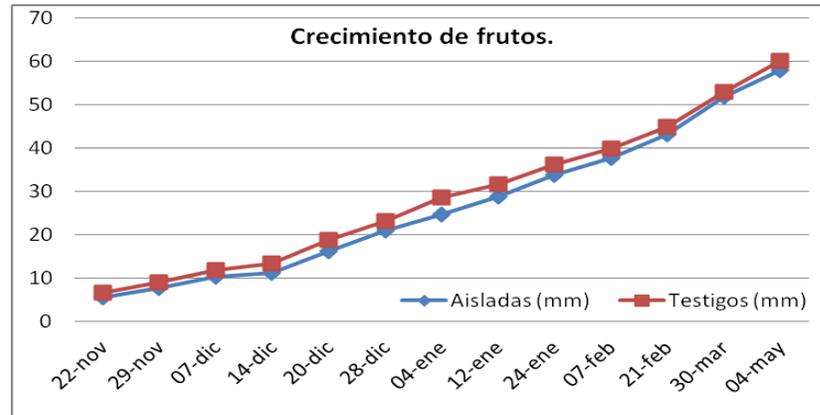


Figura 15. Evolución del diámetro ecuatorial de frutos en plantas de limón 'INIA-Ana Claudia' aisladas de polinización y en condiciones de polinización abierta (Testigos).

4.4. NUMERO DE FRUTOS Y PRESENCIA DE SEMILLAS

4.4.1. Datos de cosecha

El número promedio de frutos cosechados fue muy bajo, resultado consistente con el porcentaje de cuajado en ambas situaciones. Dada la alta variabilidad entre plantas, en el número de frutos cosechados, se realizó un análisis de covarianza que lo contemplara (cuadro 6).

Cuadro 6. Número de frutos por planta, porcentaje de frutos con semillas y número promedio de semillas por fruto en plantas de limón 'INIA-Ana Claudia' aisladas de polinización y en condiciones de polinización abierta (Testigos).

TRATAMIENTO	No. de frutos por planta	Frutos con semilla (%)	No. de semillas/frutos totales	No. semillas/frutos con semillas
AISLADAS	28 a	25 a	0,6a	2,1a
TESTIGOS	24 a	28 a	0,4a	1,6a
CV %	92	60	86	59

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). CV: coeficiente de variación.

En las condiciones nacionales, Chouza (2004) reporta para la variedad 'Fino' (en plantas de 4 años) datos de cosecha, con un promedio de 735 frutos por árbol. Arbiza et al. (2005) reportan para 'Lisbon', (en plantas de 4 y 5 años), un total de 819 y 744 frutos por planta en promedio.

Según los datos de cosecha del propio establecimiento, el rendimiento promedio de plantas de 3 años de la variedad 'Lisbon' ubicadas contiguas al cuadro en estudio (figura 5) fue, en el mismo año, de 38 kg por planta, lo que

representaría unos 300 frutos. La productividad de 'INIA-Ana Claudia' fue mucho menor que la de la variedad 'Lisbon' para las mismas condiciones ambientales y de manejo, lo que podría sugerir diferencias entre ambos genotipos, o en la edad del material utilizado para realizar las plantas.

4.4.2. Presencia de semillas, autoincompatibilidad y partenocarpia

El porcentaje de frutos con semilla en ambas situaciones fue similar, encontrándose frutos con y sin semillas en ambos tratamientos y en todas las plantas, no existiendo diferencias significativas (Cuadro 6, figura 16). Por lo tanto, los resultados indican que el limón 'INIA-Ana Claudia' no es autoincompatible, en la medida que en condiciones de aislamiento presentó un 25% de frutos con semilla. Sin embargo, de los frutos con semilla, el 74 y 57% en los tratamientos de aislamiento y libre polinización respectivamente, presentó solo una, lo que indica una baja capacidad de formación de semillas.

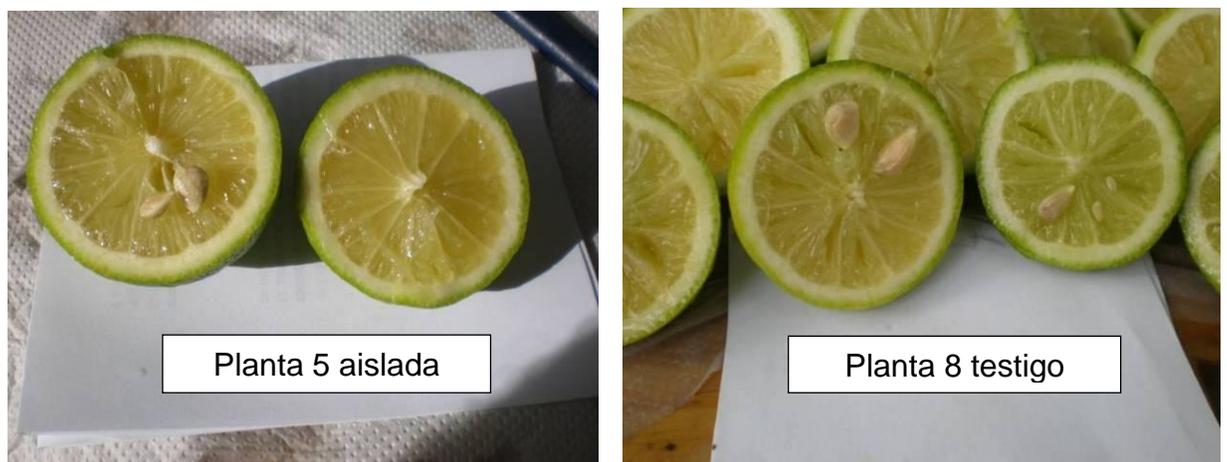


Figura 16. Presencia de semillas en frutos de plantas de limón 'INIA-Ana Claudia' aisladas de polinización y en condiciones de polinización abierta (Testigos).

En el cuadro 7, donde se presenta el porcentaje de frutos sin semillas y el porcentaje de éstos clasificados según número de semillas por fruto, se comprueba que la mayoría de los frutos en ambas situaciones, presentó entre 0 y 1 semilla.

Cuadro 7. Presencia de semillas en frutos de limón INIA-Ana Claudia aislados de polinización y en condiciones de polinización libre (testigos), provenientes de la floración de primavera.

Tratamiento	Porcentaje de frutos				
	Sin semillas	1 semilla	2 a 5 semillas	5 a 10 semillas	Mas de 10 semillas
Aisladas	78,0	16,3	5,0	0,0	0,7
Testigos	76,9	12,4	7,7	0,0	1,8

El bajo porcentaje de frutos con semillas, puede deberse a algún mecanismo por el cual los embriones aborten o no terminen de desarrollarse, como por ejemplo la estenospermocarpia. Durante la evaluación, se observó en todos los frutos un importante número de rudimentos seminales de aproximadamente 1-2 mm de longitud (figura 17).

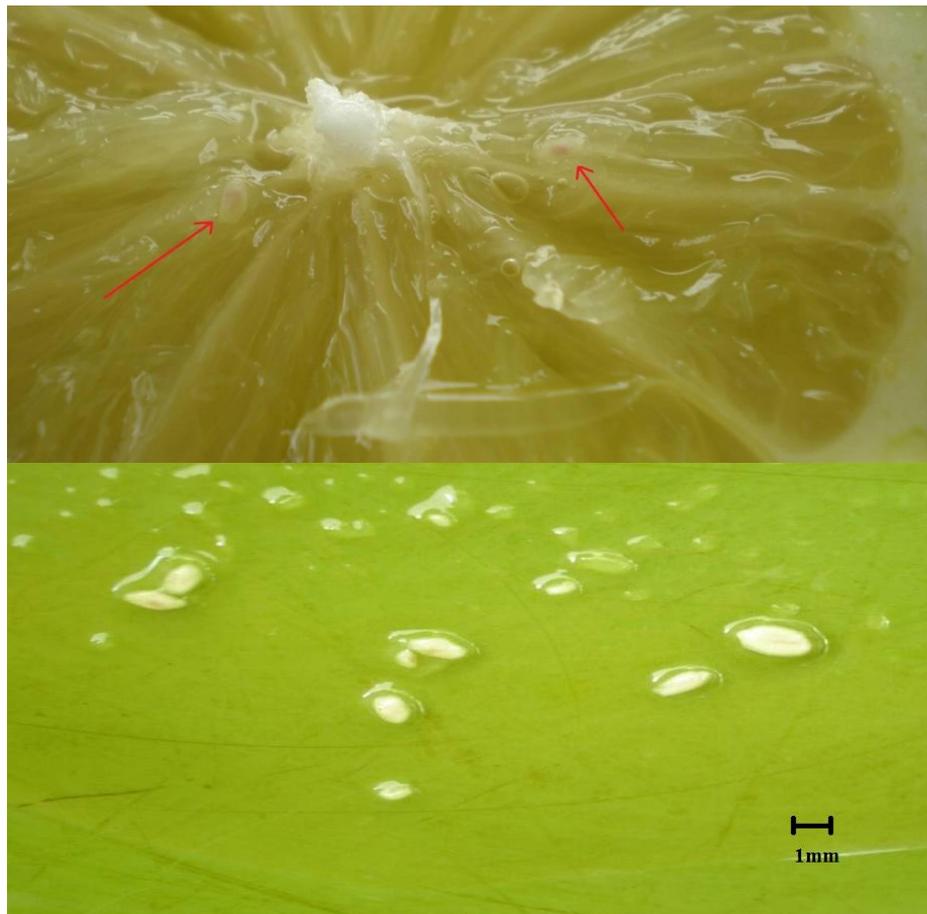


Figura 17. Rudimentos seminales presentes en frutos de limón 'INIA-Ana Claudia'.

Estudios de la viabilidad del polen del limón 'INIA-Ana Claudia' realizados por Rivas et al. (2008), revelaron que comparado con las variedades 'Lisbon' y 'Fino 95', su polen presenta baja capacidad germinativa.

Según Guardiola (1997), la naranja 'Washington' navel y la mandarina Satsuma presentan esterilidad de sus granos de polen. La mayoría de sus sacos embrionarios también abortan, produciendo frutos sin semillas, a pesar de que exista polinización cruzada. Esto podría explicar también el alto porcentaje de frutos sin semillas de la variedad 'INIA-Ana Claudia'.

Tadeo et al. (2003), plantean que la capacidad partenocárpica se relaciona con el tipo de esterilidad gamética. Variedades con partenocarpia obligada, presentan esterilidad gamética absoluta masculina o femenina. El naranjo 'Washington' navel y la mandarina Satsuma son ejemplos de esterilidad gamética masculina. La esterilidad gamética absoluta femenina no es muy común en Citrus, aunque la producción de óvulos desprovistos de saco embrionario es frecuente en mandarina Satsuma, naranjas 'Washington' navel, 'Valencia' y limones 'Lisbon' y 'Eureka'.

La capacidad partenocárpica encontrada en el limón 'INIA-Ana Claudia' no responde a un tipo de partenocarpia obligada, ya que es posible la producción de frutos con semillas, pero está asociada a algún tipo o mecanismo de esterilidad gamética debido a la presencia de rudimentos seminales en los frutos.

Por otro lado, en una planta testigo y otra aislada, se encontraron uno y tres frutos, respectivamente, que presentaron alto número de semillas (14 - 23), mientras que el resto de los frutos presentó muy pocas o ninguna semilla (figura 18). Este comportamiento tan diferente, con respecto al resto de los frutos de la planta, y de estas plantas con relación a las demás del experimento pueden explicar el alto coeficiente de variación encontrado en la variable número de semillas por fruto.



Figura 18. Frutos con y sin semillas cosechados en las mismas plantas de limón 'INIA-Ana Claudia' aisladas de polinización y en condiciones de polinización abierta (Testigos).

Esto podría estar indicando que el material a partir del cual se produjeron las plantas no presentaría la mutación en todas sus yemas, consecuentemente aparecen unos pocos frutos con muchas semillas, que se comportan como un limón 'común', ya que no presentarían la mutación, y el resto de sus frutos sin semillas o con muy pocas semillas.

Ensayos realizados en el INIA, han obtenido resultados similares dentro de sus colecciones, en cuanto a frutos que presentan semillas. Actualmente están trabajando para comprobar si efectivamente las plantas madres del limón 'INIA-Ana Claudia', presentan la mutación en todas sus yemas, o existen diferencias dependiendo donde se ubican las yemas, o entre las diferentes plantas de este limón de las colecciones.¹

Los frutos provenientes de flores generadas en la brotación siguiente y aisladas mediante bolsas individuales, también presentaron semillas, confirmando la autocompatibilidad del limón 'INIA-Ana Claudia' (cuadro 8, figura 19). El 66% de los frutos testigos presentaron semillas, mientras que la presencia en los frutos aislados fue del 47%, con un promedio de 1 y 0,7

semillas por fruto respectivamente, cuando la presencia de polen foráneo es casi nula.

Cuadro 8. Porcentaje de frutos con semillas y número promedio de semillas por fruto provenientes de flores de la brotación de verano, aisladas de polinización y en condiciones de polinización abierta (Testigos), limón 'INIA-Ana Claudia'. Datos de cosecha sobre un total de 19 y 12 frutos, provenientes de flores aisladas y testigos respectivamente.

TRATAMIENTO	Frutos con semilla (%)	No. semillas/frutos totales	No. semillas/frutos con semillas
AISLADAS	47,4	0,7 a	1,4 a
TESTIGOS	66,7	1,0 a	1,5 a
CV%	-	86	50

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). CV: coeficiente de variación.

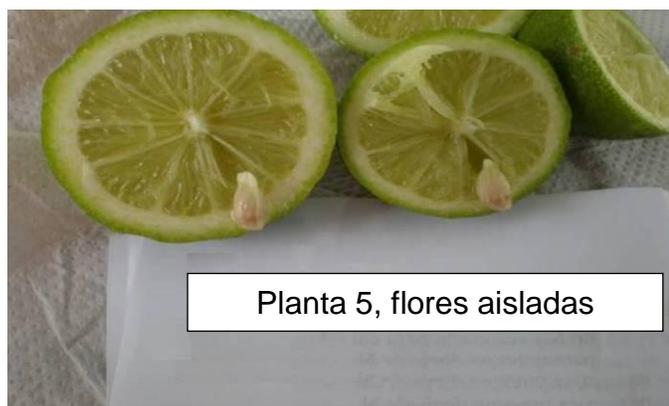


Figura 19. Frutos provenientes de flores de la brotación de verano aisladas individualmente.

En ninguna de las situaciones los frutos presentaron más de 3 semillas, siendo nuevamente lo más frecuente, la presencia de frutos sin semillas o solo con una (Cuadro 9).

Cuadro 9. Presencia de semillas en frutos de limón INIA-Ana Claudia aislados de polinización y en condiciones de polinización libre (testigos), provenientes de la floración de verano.

Tratamiento	Porcentaje de frutos			
	Sin semillas	1 semilla	2 semillas	3 semillas
Aisladas	52,6	31,6	10,5	5,3
Testigos	33,3	41,7	16,7	8,3

5. CONCLUSIONES

- En condiciones de polinización abierta y de aislamiento, la intensidad de floración del limón 'INIA-Ana Claudia' fue alta y el porcentaje de cuajado y número de frutos por planta fue muy bajo, por lo que deberá continuarse estudiando su comportamiento productivo.
- El 26 % de los frutos provenientes de la floración de primavera y el 47 % de los de la floración de verano, presentaron semillas en condiciones de aislamiento de polinización cruzada, por lo que no puede clasificarse como autoincompatible.
- De los frutos con semilla, el 74 y 57% en los tratamientos de aislamiento y libre polinización respectivamente, presentó solo una, lo que indica una baja capacidad de formación de semillas.
- Tanto en frutos provenientes de autopolinización como de libre polinización, se encontraron rudimentos seminales, lo que sugiere un mecanismo de estenospermocarpia.

6. RESUMEN

La citricultura es el principal rubro hortifrutícola del país, llegando a exportar en el año 2010, unas 150000 t, lo que representó 85,7 millones de dólares. La producción de limón, alcanzó el mismo año el 10% de las exportaciones. Recientemente, la ausencia de semillas en los frutos cítricos se ha convertido en uno de los requisitos de mayor relevancia en la producción de frutas para consumo en fresco. En Uruguay, el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) liberó en el año 2008 una variedad de limón sin semillas denominada 'INIA-Ana Claudia'. Esta variedad es de uso libre, aunque no existen reportes sobre su comportamiento reproductivo. El objetivo del presente trabajo fue determinar si en condiciones de aislamiento de polinización cruzada, los frutos del cultivar de limón 'INIA-Ana Claudia' presentan semillas, y estudiar el ciclo fenológico-reproductivo en las condiciones del sur del país. El experimento consistió en aislar 6 plantas desde pre-antesis hasta fin de floración, para impedir el ingreso de insectos polinizadores, y dejar en condiciones de libre polinización otras 6 plantas como testigo. En ambas situaciones la intensidad de floración del limón 'INIA-Ana Claudia' fue alta, y el porcentaje de cuajado y número de frutos por planta fue muy bajo. En condiciones de aislamiento de polinización cruzada, el limón 'INIA-Ana Claudia' presentó semillas, en frutos provenientes de las floraciones de primavera y verano, por lo que se descarta su autoincompatibilidad. Se encontraron rudimentos seminales, tanto en frutos provenientes de autopolinización como de libre polinización, lo que sugiere la capacidad de estenospermocarpia como mecanismo de esterilidad gamética.

Palabras clave: Autoincompatibilidad; *Citrus*; Partenocarpia; Semillas.

7. SUMMARY

The citriculture is the main hortifruitculture item of the country, the exportation reaches in 2010, 150000t, which represents 85.7 millions of dollars. The lemon production, reaches this year the 10% of this exportations. Recently, the lack of seeds in the citrus become on of the most relevant requirement in the prodction for the fresh consumption. In Uruguay, the National Institute of Agricultural Research (INIA) launches in 2008 a variety of lemon without seeds named "INIA-Ana Claudia". This is a free access variety, although there are no reports about its reproductive performance. The objective of this work is determine if when there are in conditions of cross pollinization isolation, the lemon "INIA-Ana Claudia" fruits growed have seeds and study the phenological-reproductive cycle in the south of the country. The experiment consist in isolate six plants from the pre-anthesis stage to the end of the floration, in order to prevent the presence of insects pollinator, and put as witness six plants in free pollination conditions. In both conditions the lemon "INIA-Ana Claudia" present a high floration intensity and the percentage of curdled and the number of fruits per plant is very low. In cross pollinization isolation conditions, the lemon "INIA-Ana Claudia" has seeds, in the fruits of spring and summer floration, then the autoincompatibility is discarded. There are seminal rudiments, as in fruit from the autopollinization as in free pollinization, it suggest the capacity of stenospermocarpy as mechanism of gametic sterility.

Key words: Autocompatibiliy; *Citrus*; Parthenocarpy; Seeds.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. AGUSTÍ, M. 1986. Estimulo del desarrollo vegetativo en los agrios. *Agrícola Vergel*. 60: 642-644.
2. _____.; ZARAGOZA, S.; BLEIHOLDER, H.; BUHR, L.; HACK, H.; KLOSE, R.; STAUB, R. 1995. Escala BBCH para la descripción de los estadios fenológicos del desarrollo de los agrios. *Levante Agrícola*. 332: 189-199.
3. _____. 2000. Crecimiento y maduración del fruto. *In*: Azcón-Bieto, J.; Talón, M. eds. *Fundamentos de fisiología vegetal*. Madrid, McGraw–Hill Interamericana. pp. 419-433.
4. _____. 2003a. *Citricultura*. 2ª. ed. Madrid, Mundi-Prensa. 422 p.
5. _____.; MARTÍNEZ FUENTES, A.; MESEJO, C.; JUAN, M.; ALMELA, V. 2003b. Cuajado y desarrollo de los frutos cítricos. Valencia, Generalitat Valenciana. 80 p. (Serie de Divulgación Técnica no. 55).
6. _____. 2004. *Fruticultura*. Madrid, Mundi-Prensa. 493 p.
7. ALEZA, P.; JUAREZ, J.; ABERMATHY, J.W.; ARIAS, C.L.; OLIVARES-FUSTER, O.; NAVARRO, L. 2005. Producción y análisis genético de híbridos triploides de cítricos obtenidos tras polinizaciones 2nx2n. (en línea). *In*: Reunión de la Sociedad Española de Cultivo In Vitro de Tejidos Vegetales (6º., 2005, Córdoba España). Libro de resúmenes. Córdoba, s.e. p. 29. Consultado may. 2012. Disponible en <http://www.ivia.es/secivtv/documentos/VI%20Reunion%20Nacional-Cordoba.pdf>
8. ARBIZA, H.; ESPINO, M.; CHOUZA, X.; DA CUNHA BARROS, M. 2005. Comportamiento fenológico de limoneros 'Lisbon' y 'Fino 49'. *In*: Simposio Investigación y desarrollo tecnológico en Citrus (2º., 2005, Montevideo Uruguay). Trabajos presentados. Montevideo, Facultad de Agronomía. 1 disco compacto.
9. BERTALMIÓ, A.; ROLÓN, R.; CASTILLO, A.; FOLLE, G.; LÓPEZ, B.; SANTIÑAQUE, F.; RIVAS, F. 2010. Rescate de Embriones y Citometría de Flujo; Técnicas Aplicadas a la Obtención de

Triploides. In: Simposio de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Citrus (3º., 2010, Salto Uruguay). Trabajos presentados. Salto, Facultad de Agronomía. pp. 13-16.

10. BORGES, A.; DA CUNHA 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 ambiental. *Agrociencia*. 13(1): 7-18.
11. BRETO, M. P.; RUIZ, C.; PINA, J. A.; ASINS, M. J. 2001. The diversification of Citrus clementina hort. ex tan.; a vegetatively propagated crop species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 21(2): 285-293.
12. CARRAU, F. 2004. Variedades de citrus en Uruguay. Salto, INIA. 4 p. (Hoja de divulgación no. 91).
13. _____. 2005. Avances en evaluación de cultivares cítricos; variedades de maduración intermedia. Salto, INIA. 22 p. (Actividades de Difusión no. 409).
14. CASTAÑO, J. P.; GIMÉNEZ, A.; CERONI, M.; FUREST, J.; AUNCHAYNA, R. 2011. Caracterización agroclimática del Uruguay 1980-2009. Montevideo, INIA. 40 p. (Serie Técnica no. 193).
15. CATALDO, J.; DURAÑONA, V.; PIENIKA, R.; GRAVINA, A. 2011. Dinámicas del viento en quintas de cítricos y daño en los frutos. *Agrociencia*. 15(2): 29-39.
16. CHOUZA, X. 2004. Estudio del comportamiento fenológico-reproductivo de la variedad de limón Fino 49. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 80 p.
17. DAVENPORT, T.L. 1990. Citrus flowering. *Horticultural Reviews*. 12: 349-408.
18. DE NETTANCOURT, D. 1977. Incompatibility in angiosperms. Berlin, Springer. 230 p.
19. ESAU, K. 1982. Anatomía de las plantas con semilla. (en línea). Buenos Aires, Hemisferio Sur. s.p. Consultado may. 2012. Disponible en http://www.fagro.edu.uy/~botanica/www_botanica/recursos/curso_botanica/botanica_recursos_bibliograficos.html

20. ESPINO, M.; DA CUNHA BARROS, M.; ARBIZA, H. 2005. Estudio del comportamiento fenológico-reproductivo del limón tipo 'Lisbon'. *In*: Congreso Argentino de Citricultura (5°. 2005, Concordia Argentina). Trabajos presentados. Concordia, INTA EEA Concordia. s.p.
21. FASIOLO, C.; INZAURRALDE, C.; CAKIC, V.; GRAVINA, A. 2010. Cuajado de frutos en tangor 'Ortanique': su relación con factores exógenos. *In*: Simposio de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Citrus (3°. 2010, Salto Uruguay). Trabajos presentados. Salto, Facultad de Agronomía. pp. 68-71.
22. FERRERAS FERNÁNDEZ, C.; GARCÍA LIDÓN, A.; PORRAS CASTILLO, I. 2003. Las heladas en la zona citrícola de la huerta Murciana. Murcia, Comunidad Autónoma de la Región de Murcia. 96 p. (Serie Técnica y de Estudios no. 26).
23. FROST, H.B.; SOOST, R.K. 1968. Seed reproduction: development of gametes and embryos. *In*: Reuther, W.; Batchelor, L.; Webber, H. eds. The citrus industry. Berkeley, University of California. pp. 290-319.
24. GARCÍA PETILLO, M. 2002. Respuesta a diferentes manejos del riego y balance hídrico de un huerto de cítricos. Tesis Doctoral. Valencia, España. Universidad Politécnica de Valencia. 194 p.
25. GONZALEZ-ALTOZANO, P.; CASTEL, J. R. 2003. Riego deficitario controlado en 'Clementina de Nules'; efectos sobre el crecimiento vegetativo. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 1(2): 93-101.
26. GOOGLE. 2012. Google Earth (en línea). s.l. Consultado may. 2012. Disponible en <http://www.google.es/intl/es/earth/index.html>
27. GRAVINA, A.; ARBIZA, H.; JUAN, M.; ALMELA, V.; AGUSTÍ, M. 1996. Flowering-fruiting interrelationships in 'Ellendale' tangor under the growing conditions of Spain and Uruguay. *Proceedings International Society of Citriculture*. 2: 1081-1085.
28. _____; _____; ARIAS, M.; RONCA, F. 1997. Estudio de la floración en el tangor 'Ellendale' (*Citrus sinensis* L.Osb. x *C. reticulata* Bl.) y su relación con el cuajado de frutos y productividad. *Agrociencia*. 1: 55-59.

29. _____. 1999. Ciclo fenológico-reproductivo en citrus; bases fisiológicas y manejo. Montevideo, Facultad de Agronomía. 55 p.
30. _____.; PARDO, E.; SORIA, L.; GALIGER, S.; FORNERO, C.; FASIOLO, C.; INZAURRALDE, C.; GAMBETTA, G.; CATALDO, J.; DURAÑONA, V.; PIENIKA, R.; PAIS, P. 2011. El rameado en frutos cítricos; estudio de sus causas y desarrollo de tecnologías de control. Montevideo, INIA. 24 p. (FPTA no. 27).
31. GUARDIOLA, J. L. 1992. Competition and fruit set in the Washington navel orange. *Physiologia Plantarum*. 62: 297-302.
32. _____. 1997. Overview of flower bud induction; flowering and fruit set. In: Futch, S. H.; Kender, W. J. eds. The citrus flowering and fruiting short course. Lake Alfred, University of Florida. Institute of Food and Agricultural Sciences. pp. 5-24.
33. HALL, A. E.; KHAIRI, M. M. A.; ASBELL, C. W. 1977. Air and soil temperature effects on flowering of Citrus. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 102(3): 261-263.
34. HEDHLY, A.; HORMAZA, J. I.; HERRERO, M. 2003. The effect of temperature on stigmatic receptivity in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Plant Cell and Environment*. 26(10): 1673-1680.
35. HESLOP-HARRISON, J. 1975. Incompatibility and the pollen-stigma interaction. *Annual Review of Plant Physiology*. 26: 403-425.
36. IGLESIAS, D. J.; TADEO, F. R.; TALON, M. 2003. Relación entre productividad superficie foliar y fotosíntesis en cítricos. *Levante Agrícola*. 364: 30-37.
37. INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA (INIA). GRUPO AGRO-CLIMA Y SISTEMAS DE INFORMACIÓN (GRAS). s.f. Banco de datos agroclimático. (en línea). Las Brujas. s.p. Consultado may. 2012. Disponible en <http://www.inia.org.uy/online/site/gras.php>
38. LEÓN, J. 1968. Fundamentos Botánicos de los cultivos tropicales. Lima, IICA. 477 p.
39. LERSTEN, N.R. 2004. Flowering plant embryology with emphasis on economic species. (en línea). Ames, Iowa, Blackwell. Consultado

may. 2012. Disponible en
http://www.fagro.edu.uy/~botanica/www_botanica/recursos/curso_botanica/botanica_recursos_bibliograficos.html

40. LORD, E. M., ECKARD, K. J. 1985. Shoot development in citrus sinensis L. (Washington Navel Orange); floral and inflorescence ontogeny. Botanical Gazette. 146 (3): 320-326.
41. _____.; _____. 1987. Shoot development in citrus sinensis L. (Washington Navel Orange); alteration of developmental. Fate of flowering shoots after GA3 treatment. Botanical Gazette. 148(1): 17-22.
42. LOVATT, C. J.; STREETER, S. M.; MINTER, T. C.; O'CONNELL, N. V.; FLAHERTY, D. L.; FREEMAN, M. W.; GOODELL, P. B. 1984. Phenology of flowering in *Citrus sinensis* [L.] Osbeck, c.v. 'Washington' navel orange. Proceedings International Society of Citriculture. 1: 186-190.
43. _____.; ZHENG, Y.; HAKE, K. 1988. A new look at the Kraus-Kraybill hypothesis and flowering in Citrus. Proceedings International Society of Citriculture. 1: 475-483.
44. LURO, F.; MADDY, F.; JACQUEMOND, C.; FROELICHER, Y.; MORILLON, R.; RIST, D.; OLLITRAULT, P. 2004. Identification and evaluation of diplogyny in clementine (*Citrus clementina*) for use in breeding. Acta Horticulturae. no. 663: 841-848
45. MANZI, F. 2011. Respuesta metabólica y reproductiva de dos variedades de cítricos bajo estrés hídrico. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 107 p.
46. MARTÍNEZ-FUENTES, A.; MESEJO, C.; REIG, C.; AGUSTÍ, M. 2010. Timing of the inhibitory effect of fruit on return bloom of 'Valencia' sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). Journal of the Science of Food and Agriculture. 90(11): 1936-1943.
47. MONERRI, C.; FORTUNATO-ALMEIDA, A.; MOLINA, R.V.; NEBAUER, S.G.; GARCÍA-LUIS, A.; GUARDIOLA, J.L. 2011. Relation of carbohydrate reserves with the forthcoming crop, flower formation and photosynthetic rate, in the alternate bearing 'Salustiana' sweet orange (*Citrus sinensis* L.). Scientia Horticulturae. 129: 71-78

48. MUÑOZ-FAMBUENA, N.; MESEJO, C.; GONZÁLEZ-MAS, M.C.; PRIMOMILLO, E.; AGUSTÍ, M.; IGLESIAS, D.I. 2011. Fruit regulates seasonal expression of flowering genes in alternate-bearing 'Moncada' mandarin. *Annals of Botany*. 108: 511-519.
49. MOSS, G. I. 1969. Influence of temperature and photoperiod on flower induction and inflorescence development in sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 44: 311-20.
50. MULLER, I.; CARNELLI, J. 1993. Bioclimatología de los Citrus en Uruguay. Montevideo, INIA. 20 p.
51. NADORI, E. 2004. Nadorcott mandarin; a promising new variety. *Proceedings International Society of Citriculture*. 1: 356-359.
52. NAVARRO, L.; JUÁREZ, J.; PINA, J.A.; ALEZA, P.; CUENCA, J.; JULVE, J.M.; HERNÁNDEZ, M.; OLIVARES-FUSTER, O.; PENSABENE, G.; ROMERO, J.; CERVERA, M.; FAGOAGA, C.; PEÑA, L. 2005. Aproximación biotecnológica a la mejora sanitaria y genética de cítricos. *In*: Reunión de la Sociedad Española de Cultivo In Vitro de Tejidos Vegetales. (6º., 2005, Córdoba España). Libro de resúmenes. Córdoba, s.e. pp. 15-16. Consultado may. 2012. Disponible en <http://www.ivia.es/secivtv/documentos/VI%20Reunion%20Nacional-Cordoba.pdf>
53. NICOTRA, A. 2001. Híbridos de mandarina de reciente interés para el consumo como fruta fresca; Problemas y formas de control. (en línea). *In*: Simposio sobre Cítricos China/FAO (2001, Beijing, China). Actas. Rome, FAO. pp.13-24. Consultado may. 2012. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/006/x6732s/x6732s00.htm>
54. OLLITRAULT, P.; JACQUEMOND, C.; DUBOIS, C.; LURO, F. 2003. Citrus. *In*: Hamon, P.; Seguin, M.; Perrier, X.; Glaszmann, J.; eds. Genetic diversity of cultivated tropical plants. Montpellier, CIRAD. pp. 193-217.
55. _____; FROELICHER, Y.; DAMBIER, D.; LURO, F.; YAMAMOTO, M. 2007. Seedlessness and ploidy manipulation. *In*: Khan, I. ed. Citrus; genetics, breeding and biotechnology. London, CAB International. pp. 197-218.

56. PENSABENE BELLAVIA, G. 2009. Aplicación de la hibridación somática a la mejora de la citricultura española. Tesis Doctoral. España, Universidad Politécnica de Valencia. 233 p.
57. PLUMMER, J.A.; MULLINS, M.G.; VINE, J.H.; PHARIS, R.P. 1989. The role of endogenous hormones in shoot emergence and abscission in alternate bearing 'Valencia' orange trees. *Acta Horticulturae*. no. 239: 341-344.
58. POERWANTO, R.; INOUE, H. 1990a. Effects of air and soil temperatures in autumn on flower induction and some physiological responses of Satsuma mandarin. *Japan Journal of Horticultural Science*. 59(2): 207-214.
59. _____.; _____. 1990b. Effects of air and soil temperatures on flower development and morphology of satsuma mandarin. *Japan Journal of Horticultural Science*. 65(6): 739-745.
60. RIVAS, F.; ARBIZA, H.; GRAVINA, A. 2004. Caracterización del comportamiento reproductivo de la mandarina 'Nova' en el sur del Uruguay. *Agrociencia*. 8(2): 79-88.
61. _____.; SILVA G.; MENÉS, R.; SUÁREZ, D.; SPINA, M. 2008. Limón 'INIA-Ana Claudia'; primera variedad de cítricos registrada por INIA. *Revista INIA*. no.16: 25.
62. ROOSE, M.L.; WILLIAMS, T.E. 2007. Mutation breeding. *In*: Ahmad Khan, I. ed. *Citrus genetics, breeding and biotechnology*. London, CAB International. pp. 345-352.
63. SOOST, R.K.; CAMEROON, J.W. 1975. Citrus. *In*: Janick, J.; Moore, J.N. eds. *Advances in fruit breeding*. West Lafayette, Indiana, Purdue University Press. pp. 507-540.
64. SOUTHWICK, S. M.; DAVENPORT, T.L. 1987. Modification of water stress induced floral response in Tahiti lime. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 112(2): 231-236.
65. SPIEGEL-ROY, P.; VARDI, A. 1989. Induced mutation in Citrus. *In*: International Congress SABRAO (6°. , 1989, Tokio, Japan). *Proceedings*. s.n.t. pp. 773-776.

66. _____.; GOLDSCHMIDT, E. 1996. Biology of Citrus. Cambridge, Cambridge University Press. 230 p.
67. TADEO, F.R.; MOYA, J.L.; IGLESIAS, D.J.; TALÓN, M.; PRIMO-MILLO, E. 2003. Histología y citología de cítricos. Valencia, Generalitat Valenciana. 99 p. (Serie de Divulgación Técnica no. 54).
68. TAKAYAMA, S.; ISOGAI, A. 2005. Self-incompatibility in plants. Annual Review of Plant Biology. 56: 467-89.
69. TALON, M.; ZACARIAS, L.; PRIMO-MILLO, E. 1992. Giberellins and parthenocarpic ability in developing ovaries of seedless mandarin. Plant Physiology. 99: 1575-1581.
70. _____. 1997. Regulación del cuajado del fruto en cítricos: evidencias y conceptos. Levante Agrícola. 338: 27-37.
71. _____.; MEHOUACHI, J.; MONTALVAN, J.; TUDELA, E.; VILLALBA, D. 1999. Factores que afectan a la abscisión y cuajado de los cítricos. Levante Agrícola. 364: 5-13.
72. URUGUAY. MINISTERIO DE DEFENSA NACIONAL. DIRECCIÓN NACIONAL DE METEOROLOGÍA. s.f. Características climáticas 1961-1990. (en línea). Montevideo. s.p. Consultado may. 2012. Disponible en <http://www.meteorologia.gub.uy/index.php/caracteristicas-climaticas>
73. _____. MINISTERIO DE GANADERÍA, AGRICULTURA Y PESCA. DIRECCIÓN DE ESTADÍSTICAS AGROPECUARIAS. 2011. Encuesta cítrica primavera 2010. Montevideo. 25 p.
74. VALIENTE, J. I.; ALBRIGO, G.L. 2004. Flower bud induction of sweet orange trees (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck); effect of low temperatures, crop load, and bud age. Journal of the American Society of Horticultural Science. 129(2): 158-164.
75. VARDI, A.; LEVIN, I.; CARMÍ, N. 2008. Induction of seedlessness in citrus; from classical techniques to emerging biotechnological approaches. Journal of the American Society of Horticultural Science. 133(1): 117-126.

9. ANEXOS

Cuadro I. Temperaturas máximas según localidad y época del año, período 1980-2009 (elaborado por INIA. GRAS, s.f.).

LOCALIDAD	ENE	FEB	MAR	APR	MAY	JUN	JUL	AUG	SEP	OCT	NOV	DIC	ANUAL
SALTO	32.8	31.0	29.3	24.9	21.1	18.2	18.1	20.5	22.0	25.3	28.2	31.1	25.2
PAYSANDU	32.0	30.1	28.5	24.1	20.2	17.1	17.0	19.2	20.7	24.1	27.0	30.0	24.2
LAS BRUJAS	29.3	28.0	26.5	22.1	18.7	15.7	15.0	17.5	18.5	22.1	25.1	27.4	22.2
PRADO	27.7	26.8	25.3	21.7	18.2	15.2	14.5	16.3	17.5	20.8	23.3	26.0	21.1
CARRASCO	27.3	26.5	25.1	21.7	17.9	15.2	14.5	15.7	17.3	20.2	22.5	25.0	20.7

Cuadro II. Temperaturas mínimas según localidad y época del año, período 1980-2009 (elaborado por INIA. GRAS, s.f.).

LOCALIDAD	ENE	FEB	MAR	APR	MAY	JUN	JUL	AUG	SEP	OCT	NOV	DIC	ANUAL
SALTO	19.7	18.9	17.4	14.0	10.6	8.4	7.6	8.7	10.0	13.4	15.5	17.9	13.5
PAYSANDU	18.4	17.8	16.6	13.4	10.1	7.6	6.9	8.1	9.3	12.3	14.5	16.8	12.6
LAS BRUJAS	17.0	16.9	15.6	12.3	9.0	6.5	5.7	6.7	8.0	10.5	13.0	15.1	11.4
PRADO	18.8	18.7	17.3	14.1	10.9	8.3	7.6	8.5	9.9	12.5	14.7	17.0	13.2
CARRASCO	17.9	17.9	16.6	13.5	10.2	7.5	6.7	7.8	9.0	11.7	13.9	16.2	12.4

Cuadro III. Días promedio de ocurrencia de heladas según localidad y época del año, período 1980-2009 (elaborado por INIA. GRAS, s.f.).

LOCALIDAD	MAY	JUN	JUL	AGO	SET	OCT
Salto	2.0	6.0	7.5	6.0	2.0	0.0
Paysandú	1.5	6.5	9.0	4.5	2.0	0.0
Carrasco	1.0	5.0	7.0	4.5	2.0	0.0

Cuadro IV. Pluviometría media acumulada según localidad y época del año, período 1980-2009 (elaborado por INIA. GRAS, s.f.).

LOCALIDAD	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SET	OCT	NOV	DIC	ANUAL
SALTO	118.2	129.6	157.7	162.2	95.8	76.0	53.1	58.7	86.6	134.2	141.8	125.3	1339.2
PAYSANDU	106.1	125.5	137.8	158.8	102.0	68.3	56.1	55.3	71.5	121.3	123.1	112.9	1238.6
LIBERTAD	92.4	95.0	132.6	105.6	84.5	83.3	72.6	75.7	83.5	109.3	105.6	78.0	1118.0
CARRASCO	91.4	85.3	130.6	112.9	94.9	99.5	81.1	86.5	87.9	116.5	104.8	79.0	1170.5

Cuadro V. Análisis de covariable para % de frutos con semilla.

ANCOVA	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
Num	1	332,85	332,85	1,2398	0,2847
Trat	1	7,17	7,17	0,0279	0,8711
Res	9	2315,29	257,25		



Figura I. Construcción e instalación de las cajas.

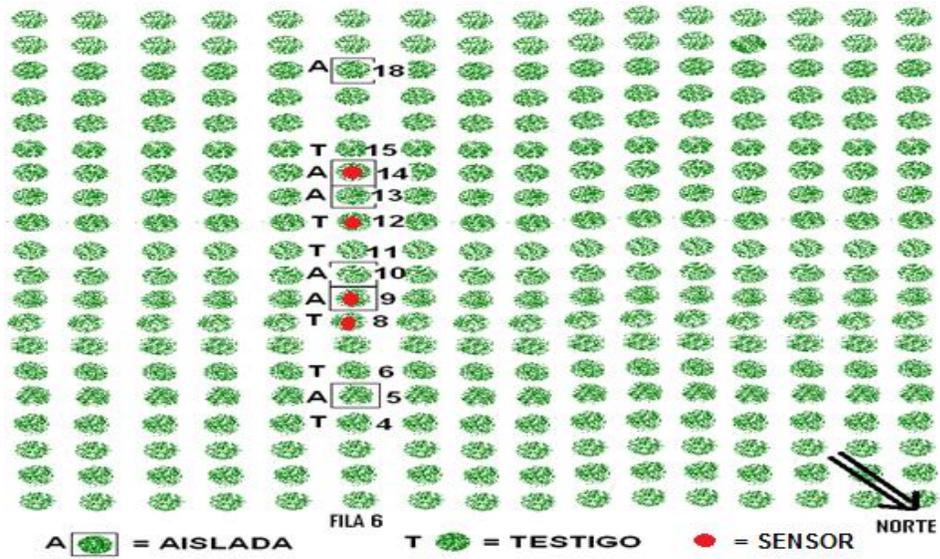


Figura II. Croquis de la ubicación de las plantas en la parcela experimental.