

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO DE LA MANDARINA  
'AFOURER' (*Citrus reticulata* Blanco)

por

Cecilia FORNERO PARODI  
Sebastián GALIGER RISTICH  
Cristian INZAURRALDE ROSANO

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

MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2012

Tesis aprobada por:

Director: -----

Ing. Agr. M Sc Alfredo Gravina

-----

Ing. Agr. Dra. Giuliana Gambetta

-----

Ing. Agr. Martín Lanfranco

Fecha: 24 de febrero de 2012

Autor: -----

Cecilia Fornero Parodi

-----

Sebastián Galiger Ristich

-----

Cristian Inzaurrealde Rosano

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a nuestras familias y amigos por el apoyo incondicional durante este largo camino. A Mariana, Paula, Diego, abuela Marta, Martus, tía Estela.

Al equipo de Ecofisiología de citrus, Caro, Xime, Virginia, Daniel, Marcelo, Giuli, Alfredo, por la dedicación y apoyo constante, y fundamentalmente por los momentos compartidos.

Al equipo del laboratorio de bioquímica, Pedro Díaz, y laboratorio de genética, por la colaboración en los preparados y en el uso del microscopio de fluorescencia.

Al personal de los establecimientos “El Repecho” y “Azucitrus”, en especial Rossana, Eduardo, Roberto y todo el personal que colaboró en la instalación y seguimiento de los experimentos.

A Martín Lanfranco, por ser parte del tribunal.

Al personal de biblioteca por la constante búsqueda de material bibliográfico y Sully Toledo, por la disposición en las correcciones.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PAGINA 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>BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE LOS CÍTRICOS</u> .....	3
2.1.1. <u>Morfología de la flor</u> .....	3
2.1.1.1. Cáliz, Corola y Disco nectarífero.....	3
2.1.1.2. Androceo.....	3
2.1.1.3. Gineceo.....	4
2.1.2. <u>Gametofitos y formación de gametos</u> .....	5
2.1.2.1. Macrosporogénesis.....	5
2.1.2.2. Microsporogénesis.....	6
2.2. <u>PROCESO REPRODUCTIVO DE LOS CÍTRICOS</u> .....	7
2.2.1. <u>Polinización</u> .....	7
2.2.1.1. Período de polinización efectiva.....	8
2.2.1.2. Autopolinización.....	8
2.2.1.3. Polinización cruzada.....	9
2.2.2. <u>Germinación del grano de polen y crecimiento del tubo polínico</u> .....	9
2.2.3. <u>Fecundación</u> .....	11
2.2.4. <u>Formación de semillas</u> .....	11
2.2.5. <u>Cuajado</u> .....	12
2.2.6. <u>Fruto</u> .....	13
2.2.6.1. Características del fruto.....	13
2.2.6.2. Crecimiento y tamaño del fruto.....	13
2.3. <u>PARTENOCARPIA</u> .....	15
2.3.1. <u>Definición</u> .....	15
2.3.2. <u>Tipos de partenocarpia</u> .....	15
2.4. <u>ESTERILIDAD E INCOMPATIBILIDAD</u> .....	16
2.4.1. <u>Incompatibilidad (esterilidad homogenética)</u> .....	16
2.4.1.1. Incompatibilidad gametofítica.....	18
2.4.1.2. Incompatibilidad esporofítica.....	18
2.4.2. <u>Esterilidad gamética</u> .....	19
2.4.2.1. Ginoesterilidad.....	19
2.4.2.2. Androesterilidad.....	20

2.5. COMPATIBILIDAD Y POLINIZACIÓN CRUZADA EN LA PRODUCCIÓN DE CÍTRICOS .....	21
2.6. EL CULTIVAR “AFOURER” .....	22
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	23
3.1. EXPERIMENTOS REALIZADOS.....	23
3.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	27
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u> .....	29
4.1. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PARTENOCÁRPICA.....	29
4.1.1. <u>Presencia de semillas</u> .....	29
4.1.2. <u>Componentes del rendimiento</u> .....	31
4.1.3. <u>Evolución del tamaño de los frutos en condiciones de libre polinización y bajo malla</u> .....	33
4.2. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DE GAMETOS FEMENINOS Y MASCULINOS .....	35
4.3. ESTUDIOS DE AUTOPOLINIZACIÓN, POLINIZACIÓN CRUZADA Y GERMINACIÓN DE POLEN IN VITRO .....	39
4.3.1. <u>Cuajado, presencia y número de semillas por fruto</u> .....	39
4.3.2. <u>Diámetro de frutos</u> .....	41
5. <u>CONCLUSIONES</u> .....	43
6. <u>RESUMEN</u> .....	44
7. <u>SUMMARY</u> .....	45
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	46

## LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Porcentaje de frutos sin semillas y número de semillas por fruto en mandarina ‘Afourer’ en condiciones de polinización libre y bajo malla. ....	29
2. Componentes del rendimiento en plantas de mandarinas ‘Afourer’ en condiciones de polinización libre y bajo malla. ....	31
3. Número de granos de polen germinados, crecimiento de tubos polínicos (en porcentaje del pistilo recorrido) y viabilidad de óvulos (en porcentaje), en flores de brotes terminales de plantas en polinización abierta y bajo malla, para cuatro fechas de muestreo.....	36
4. Cuajado final (%), frutos con semillas (%) y número de semillas por fruto en condiciones de autopolinización, polinización cruzada y polinización impedida.....	39
5. Diámetro ecuatorial de frutos en el momento de cosecha para los diferentes tratamientos de polinización. ....	42
Figura No.	
1. Partes de la flor de cítricos. ....	4
2. Esquema de un corte longitudinal de óvulo anátropo con saco embrionario.....	5
3. Corte transversal de una antera madura, previo a la dehiscencia. ....	7
4. Fotografías del experimento de plantas bajo mallas y en polinización abierta.....	23
5. Polinización artificial de flor emasculada de brote terminal de mandarina ‘Afourer’ con polen de ‘Valencia’.....	25
6. Fotografías del experimento de polinización en brotes individuales.....	26

7. Corte transversal de frutos cosechados de plantas en condiciones de polinización libre y bajo malla. ....	30
8. Mapa del cuadro de mandarina ‘Afourer’ y cuadros linderos en el establecimiento “El Repecho” .....	31
9. Producción de fruta de planta en condiciones de polinización libre y planta bajo malla .....	32
10. Evolución de temperaturas máximas y promedio bajo cobertura de mallas y al aire libre durante la floración. ....	32
11. Evolución de diámetro de frutos de mandarina ‘Afourer’ en condiciones de polinización libre y bajo malla.....	34
12. Porcentaje de frutos de mandarina ‘Afourer’ en tres rangos de diámetro según número de semillas por fruto, en plantas de polinización abierta. ....	35
13. Estigma de flor en estado fenológico de botón alargado (59 BBCH), observado en microscopio de fluorescencia. ....	36
14. Crecimiento de tubos polínicos en el estigma, observados con microscopio de fluorescencia. ....	37
15. Fotografía de fluorescencia de óvulo sin deposición de calosa de flor en polinización abierta muestreada 9 días post antesis.....	38
16. Evolución del diámetro ecuatorial de frutos (mm) según los días post floración para los diferentes tratamientos de polinización. ....	42

## 1. INTRODUCCIÓN

Los cítricos son plantas que pertenecen a la familia Rutaceae. Su cultivo se extiende en las regiones tropicales y subtropicales entre los paralelos 44° N y 41° S (Agustí 2003a, Vardi et al. 2008).

En Uruguay las especies cítricas cultivadas son las naranjas, mandarinas, limones y pomelos. La superficie efectiva ocupada por estas especies alcanza las 17.018 hectáreas. La principal especie cultivada es la naranja, que ocupa el 48 % de la superficie, las mandarinas ocupan el 39 % del área efectiva y los limones el 11.3 %. (URUGUAY. MGAP.DIEA, 2011). En el norte del país se encuentra el 83 % del área cultivada, donde se concentra la producción de naranjas, mandarinas y pomelos, mientras que en el sur se cultiva principalmente limones (74 % del área total de esta especie) (URUGUAY. MGAP.DIEA, 2011).

La producción total alcanzó en 2010 las 315.208 toneladas. El objetivo de esta producción es la exportación de fruta para consumo en fresco, destinándose el 48 % del total obtenido en la zafra 2010. La distribución dentro de lo exportado es mandarinas 35 % (52.000 t), naranjas el 55 % (83.000 t), en limón el porcentaje alcanzado fue 10 % (16.000 t) mientras que el pomelo no fue exportado (URUGUAY. MGAP.DIEA, 2011).

Actualmente la demanda de los mercados extranjeros, ha sufrido cambios en los factores que definen la calidad de la fruta. En mandarinas estos cambios están cada vez más dirigidos hacia la demanda de frutos de fácil pelado, sin semillas, ausencia de daños en la piel, altos contenidos de °Brix y apropiada relación sólidos solubles/acidez (Gravina 1998, Chao 2005b, Iglesias et al. 2007).

Los frutos cítricos sin semillas pueden derivarse de la esterilidad gamética, la autoincompatibilidad (en ausencia de polen compatible) o la esterilidad citológica. La obtención y desarrollo de cultivares con fruta sin semilla se ha vuelto el mayor objetivo para los mejoradores genéticos del mundo (Raza et al. 2003, Barry 2004, Mesejo et al. 2007, Ye et al. 2009).

Para la obtención de fruta sin semilla, en cultivares fértiles debe impedirse la polinización y fecundación de los óvulos, y luego el ovario debe tener la capacidad de reiniciar el crecimiento para cuajar en fruto (Agustí, 2004). La polinización y fecundación en las plantas están reguladas por un conjunto de factores de origen exógeno y endógeno. Los factores exógenos destacables por la mayor influencia son, los climáticos y los de manejo del cultivo. Entre los endógenos, se encuentran principalmente los genéticos, fisiológicos, hormonales y nutricionales (Mesejo et al., 2007).



En los últimos años se han desarrollado técnicas de cultivo tendientes a disminuir el número de semillas por fruto; entre éstas se encuentra la aplicación de sustancias inhibidoras de la germinación y/o del crecimiento del tubo polínico, y de la fecundación (Mesejo et al. 2008, Chouza et al. 2011) y el aislamiento de plantas con diferentes tipos de mallas (Chao et al., 2005a).

Barry (2004) propone que la definición de fruto sin semilla es subjetiva y depende de las expectativas de los consumidores y de la demanda del mercado en un determinado momento. Sin embargo plantea una posible clasificación:

- sin semillas: cada 100 frutos solo se encuentre una semilla,
- ocasionalmente con semilla: en 10 frutos una semilla,
- bajo en semillas: una semilla por fruto
- con semilla: si hay más de 3 semillas por fruto.

Se plantea como objetivo general de este trabajo, caracterizar el comportamiento reproductivo de la mandarina ‘Afourer’ en condiciones de producción comercial.

Como objetivos específicos, se plantea:

- Describir el mecanismo de autoincompatibilidad de ‘Afourer’ y evaluar la viabilidad de sus gametos.
- Evaluar la habilidad partenocárpica.
- Determinar la capacidad polinizadora de la mandarina ‘Clementina de Nules’ y la naranja ‘Valencia’ en ‘Afourer’ y cuantificar la presencia de semillas en cruzamientos artificiales

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE LOS CÍTRICOS

El proceso reproductivo de los árboles se inicia con la inducción de la yema vegetativa a reproductiva. Los factores de mayor relevancia en el proceso de inducción floral pueden presentar origen exógeno y endógeno. Entre los exógenos, el estrés hídrico y las bajas temperaturas son los de mayor peso. El factor endógeno más relevante en la inhibición de la inducción floral es la presencia de frutos, a través del contenido endógeno de giberelinas (Agustí, 2004). Luego se produce la diferenciación y maduración de cada uno de los verticilos florales (Tadeo et al., 2003). En los cítricos la anthesis de una flor tiene lugar en unos cinco-siete días, pero la floración completa del árbol puede incluso llevar más de 20 días (Mesejo et al., 2007).

#### 2.1.1. Morfología de la flor

##### 2.1.1.1. Cáliz, Corola y Disco nectarífero

El cáliz está constituido por 5 sépalos ovales de color verde, dispuestos en círculo sobre el receptáculo. En disposición alterna a los sépalos se encuentran los 5 pétalos blancos o rosados, ligeramente solapados, que mantienen sus bordes juntos, y que se curvan hacia el interior de la flor, formando una cavidad globosa que contiene en su interior al resto de los verticilos, formando la corola. Entre los carpelos y los estambres se encuentra el disco nectarífero sobre el que se apoya el ovario (Agustí, 2003a).

##### 2.1.1.2. Androceo

El androceo se compone de 20-40 estambres, formados por filamentos parcialmente unidos en la parte basal y por anteras tetralobulares. Estos estambres se encuentran rodeando al gineceo (Tadeo et al., 2003). Los estambres poseen anteras amarillas o blancas, mientras que los filamentos son siempre blancos. Antes de que se dé la elongación de los filamentos, las anteras y sus cuatro lóculos de microesporofitos completan su formación (Agustí, 2003a). Las anteras normales y maduras son de color amarillo brillante debido al polen que contienen. En el caso que las anteras no contengan polen o éste sea defectuoso, el color de las mismas es crema pálido o blanco y usualmente no abren. Cada mitad de la antera se abre por una hendidura longitudinal

entre los lóbulos, la epidermis se deshidrata, la pared de la antera se pliega hacia el filamento, exponiendo el polen como polvo amarillo y pegajoso (Frost y Soost, 1968).

### 2.1.1.3. Gineceo

El gineceo, está compuesto por el ovario (8-14 carpelos), el estilo y el estigma (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996). Las cavidades formadas por la fusión de los carpelos son llamadas lóculos. En cada lóculo del ovario hay entre 4 y 5 óvulos (anátropos), dispuestos en dos hileras verticales, que podrán transformarse o no en semillas (Jackson, 1997).

El estigma y el estilo son las estructuras de la flor específicamente preparadas para la polinización y germinación del grano de polen y la conducción del tubo polínico hasta los lóculos del ovario. El estilo se encuentra en la porción distal del ovario y posee estructura cilíndrica, hueca, y contiene tantos canales estilares como lóculos posee el ovario. Los cítricos poseen un estigma de tipo húmedo, debido al exudado que lo recubre durante el período receptivo. Este exudado es producido por las regiones glandulares del estigma y del estilo y está compuesto por azúcares, lípidos y proteínas. El grano de polen lo utiliza para hidratarse y germinar y para mantener el crecimiento longitudinal del tubo polínico. La secreción de exudado comienza, al menos en la variedad de naranjo dulce Navelate (*Citrus sinensis* L. Osbeck), antes que se produzca la apertura de la flor y se prolonga hasta que se produce la caída de pétalos. En el estadio de antesis se secreta el mayor volumen de exudado. El período receptivo dependerá de la variedad de cítricos, puede extenderse desde 3 días antes de la antesis hasta 8 días después (Tadeo et al., 2003).

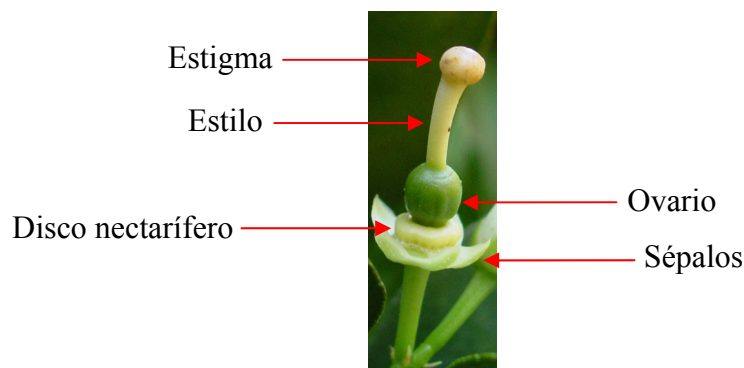


Figura 1: Partes de la flor de cítricos (adaptado de Agustí, 2003a).

## 2.1.2. Gametofitos y formación de gametos

### 2.1.2.1. Macrosporogénesis

El óvulo maduro consiste en el funículo (filamento que conecta el óvulo con la placenta), la nucela, el saco embrionario dentro de la nucela, dos tegumentos, la zona chalazal y la zona del micrópilo (Esau, 1982).

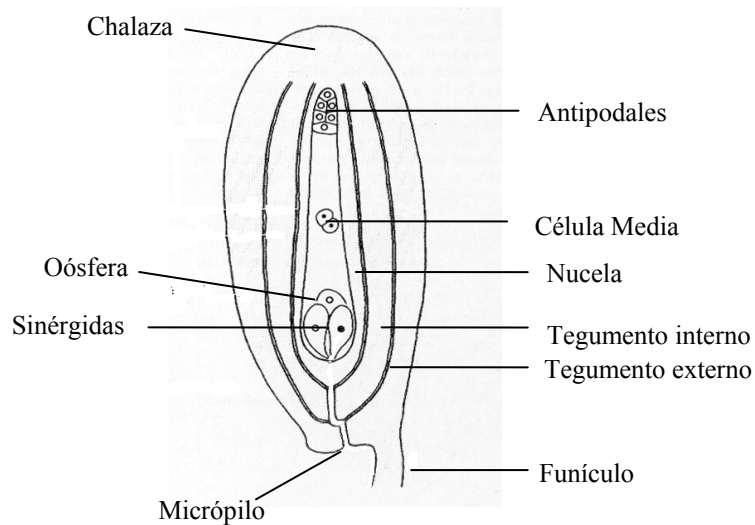


Figura 2: Esquema de un corte longitudinal de óvulo anátropo con saco embrionario (adaptado de Esau, 1982).

El gametofito femenino o saco embrionario se forma a partir de sucesivas divisiones meióticas. La célula arquespórica (distinguible por su gran tamaño y núcleo) se divide dando lugar a la célula madre del saco embrionario o megasporocito. El megasporocito mediante meiosis origina cuatro megásporas haploides de las cuales solo prospera una. La megáspora funcional sufre tres divisiones mitóticas para generar los ocho núcleos que constituyen el saco embrionario: tres células antipodales en la zona chalazal, en la región micropilar se encuentran la oósfera y las 2 células sinérgidas, y en el medio del saco embrionario los dos núcleos polares (Frost y Soost 1968, Esau 1982, Jackson 1997).

Ha sido reportado que la maduración del saco embrionario ocurre días previo a la antesis en pomelo 'Foster', en antesis en naranja dulce 'Pineapple' y días posteriores a la antesis en naranja 'W. Navel' y en mandarina 'Satsuma' (Jackson, 1997).

#### 2.1.2.2. Microsporogénesis

Cada uno de los cuatro lóbulos de la antera normalmente desarrolla un microsporangio o saco polínico, cuya función es producir las micrósporas que darán lugar a los granos de polen (gametofito masculino). Cuando se forman las anteras, el tejido arqueosporico por divisiones mitóticas da lugar a células parietales primarias hacia la periferia y células esporógenas primarias hacia el interior del saco polínico (Frost y Soost 1968, Esau 1982).

Las células parietales originan la pared del saco polínico constituida por el endotecio (debajo de la epidermis), capas intermedias (que degeneran tempranamente) y más internamente el tapete. Previamente a la antesis, el endotecio desarrolla espesamientos de lignina en la pared secundaria, lo que está involucrado al mecanismo de apertura del saco polínico. El tapete tiene una función nutricional transfiriendo materiales alimenticios a los granos de polen. Asimismo, el tapete tiene un importante rol en la pared del grano de polen, pues deposita sustancias responsables de reacciones de incompatibilidad una vez que llega al estigma (Esau 1982, Lersten 2004).

Las células esporógenas primarias se dividen o funcionan directamente como células madre de las micrósporas. Éstas se dividen por meiosis dando lugar a las micrósporas haploides. Previamente a la liberación del polen, una división mitótica que da el núcleo vegetativo y generativo, origina el gametofito bicelular (Esau, 1982). La segunda división mitótica en la cual la célula generativa origina los dos anterozoides, ocurre en el momento de la fecundación (Agustí et al., 2003b).

La pared del grano de polen comienza a formarse en etapas muy tempranas y consiste en la exina y la intina. Tiene áreas limitadas de pared delgada en la exina a través de las cuales el tubo polínico emerge durante la germinación. El componente químico más característico de la pared es la esporopolenina (proveniente del tapete) (Esau, 1982).

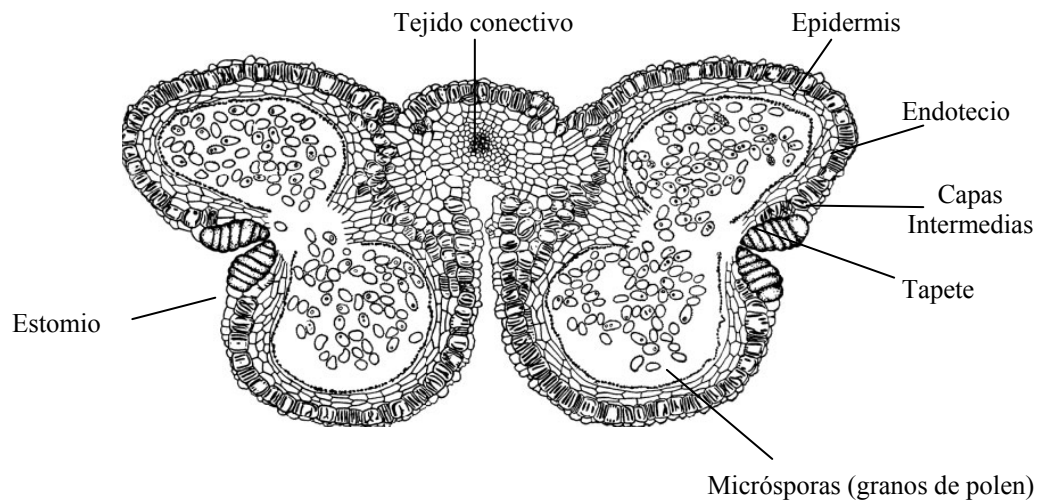


Figura 3: Corte transversal de una antera madura, previo a la dehiscencia (adaptado de Lersten, 2004).

## 2.2. PROCESO REPRODUCTIVO DE LOS CÍTRICOS

### 2.2.1. Polinización

La polinización consiste en la transferencia de polen desde las anteras hasta el estigma (Frost y Soost, 1968). La forma natural de transporte de los granos de polen tanto en especies monoicas como dioicas, es anemófila. No obstante las angiospermas han desarrollado diversas formas florales, colores y olores para atraer animales que se alimentan de su polen y/o néctar y a su vez se promueve el contacto del polen con el estigma; la viscosidad de los granos de polen facilita la adherencia tanto al estigma como al animal vector. En algunas flores hermafroditas, es posible la polinización con los granos de polen de la misma flor de manera autónoma, ya que ocurre la cesión y captación simultánea de los granos de polen en una misma flor (Agustí, 2004). En los cítricos el polen no puede ser transportado por el viento ya que es pesado y pegajoso. A su vez las flores presentan una corola conspicua, fuerte perfume, polen y néctar abundante, que resultan atractivas para los insectos, principalmente abejas melíferas (*Apis mellifera*) (Frost y Soost 1968, Guardiola 1997).

Los factores que pueden afectar la polinización, tienen origen abiótico y biótico. Los factores abióticos más importantes que afectan la polinización son las características ambientales, sobre todo la temperatura y la humedad relativa. Las abejas

son eficaces con una temperatura media de 20-22 °C y su actividad es casi nula a los 12 °C (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Asimismo, el viento y la lluvia obstaculizan notoriamente la eficacia de los insectos como polinizadores. La humedad relativa menor al 50 % se muestra como negativa para la polinización en algunas especies, al reducir la retención de los granos de polen por el estigma; humedades relativas mayores a 90 %, pueden dificultar la dehiscencia de las anteras o reducir la fijación del polen en el estigma como es el caso del maracuyá (Agustí, 2004). Los factores bióticos que afectan la formación de flores, están afectando la polinización de flores por ausencia de éstas. Por lo tanto, defoliaciones de las plantas y aplicación de giberelinas que tienen efectos comprobados en inhibir la floración, estarían indirectamente alterando la polinización (Agustí, 2003a).

#### 2.2.1.1. Período de polinización efectiva

El concepto de período de polinización efectiva (PPE) lo introdujo Williams en 1966 y en un principio se utilizó para cultivares de manzana y pera (Faust, 1989). Este concepto implica que para una polinización efectiva es necesario que el grano de polen sea trasladado al estigma, germine y llegue al óvulo maduro mientras éste sea aún fértil (Podestá, 2007). Por lo tanto el PPE es definido como el tiempo durante el cual la flor es capaz de cuajar a fruto, a condición de que la polinización no sea limitada. Este período se puede expresar como la longevidad del óvulo menos el tiempo transcurrido entre la polinización y la fertilización, asumiendo que el tiempo final calculado no excede el período de receptividad del estigma (Williams, 1965).

#### 2.2.1.2. Autopolinización

La polinización del pistilo con polen de anteras de la misma planta, es autopolinización. También se considera autopolinización a la polinización entre diferentes plantas originadas de un mismo clon (Frost y Soost, 1968). La existencia de flores hermafroditas, que a su vez presentan un desarrollo coordinado entre las distintas partes, ante las mismas condiciones ambientales, promueve en gran medida la autogamia, es decir la autopolinización (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

En las variedades de cítricos autocompatibles, la autopolinización puede producirse por contacto directo de las anteras con el estigma o por medio de insectos polinizadores. En el primer caso, las anteras se rompen o alcanzan la dehiscencia antes de la antesis. A este proceso de polinización previo a la apertura floral, se le denomina cleistogamia (Tadeo et al., 2003). Sin embargo la longitud relativa del pistilo y estambres puede afectar la autopolinización. En este sentido se ha demostrado que la escasa insolación puede dar lugar a un desarrollo excesivo del pistilo, sobre todo cuando

se combina con temperaturas elevadas y alta disponibilidad de nitrógeno, lo cual dificulta la llegada de los granos de polen al estigma (Agustí, 2004).

#### 2.2.1.3. Polinización cruzada

La polinización cruzada, involucra la transferencia de polen entre plantas de distinto origen genético es decir de un clon o variedad a otra (Frost y Soost 1968, Iglesias et al. 2007). En el caso de variedades autoincompatibles o con polen estéril y a su vez con baja capacidad partenocárpica, la presencia de otras fuentes de polen y abejas es esencial para la producción de frutas (Tadeo et al., 2003). De esa manera la polinización cruzada entre variedades puede influenciar fuertemente el número de semillas en los frutos cítricos (Frost y Soost, 1968). Según Vithanage (1991), es posible encontrar un polinizador que aumente el cuajado y el tamaño de los frutos, sin que se tenga un aumento en el número de semillas, incluso en diferentes condiciones de crecimiento y años. Los inconvenientes que presenta la polinización cruzada en las producciones frutícolas, radican en el aumento del número de semillas por fruto, lo cual disminuye su aceptación en los mercados para consumo en fresco. En términos de producción, las semillas no son una mala cualidad porque típicamente aumentan el tamaño de los frutos (Krezdorn 1967, Vithanage 1991).

En muchas de las plantaciones comerciales de mandarina, se incluyen árboles como polinizadores para mejorar el cuajado (Krezdorn 1967, Vithanage 1991). Al realizar test comparativos en ramas con polinización cruzada y autopolinización, se encuentra que la polinización cruzada mejora el cuajado. Sin embargo se reporta que la polinización cruzada no necesariamente mejora la productividad (Uphof, Wong, citados por Frost y Soost, 1968). Ensayos realizados por Vithanage (1991) en mandarina 'Ellendale' mostraron que utilizando mandarina 'Imperial' como polinizador se logró obtener un aumento en el cuajado, sin embargo, se redujo el número de semillas por fruto y no existió reducción en el peso de los frutos.

#### 2.2.2. Germinación del grano de polen y crecimiento del tubo polínico

Una vez que el grano de polen llega al estigma, éste es retenido por las secreciones estigmáticas, se rehidrata y comienza a liberar proteínas que reaccionan con moléculas de las células receptoras del estigma o con proteínas de las secreciones estigmáticas. El reconocimiento favorable entre el polen y estigma estimula la germinación. Si existe incompatibilidad, el grano de polen es inhibido por el estigma y no germina o puede ocurrir que el tubo polínico crezca pero se detenga el crecimiento en el estigma, en el estilo o bien, en el ovario. El grano de polen germina por la apertura de la exina, y la célula vegetativa del tubo polínico inicia la formación de éste alargando



progresivamente la intina. Esta primera etapa de la germinación es autótrofa y depende de las proteínas acumuladas en el grano de polen durante la microsporogénesis. En las siguientes fases de desarrollo del tubo polínico, los nutrientes son absorbidos desde el tejido carpelar (Lersten, 2004).

Cuando los tubos polínicos comienzan a crecer en el estigma, se movilizan hacia los óvulos por los canales estilares, que están rellenos de material mucilaginoso (Tadeo et al., 2003). Sin embargo se ha reportado que el tubo polínico puede crecer a través de los espacios entre los canales estilares (Banerji, 1954). El citoplasma del tubo polínico en crecimiento se acumula en el extremo. El núcleo vegetativo, los dos anterozoides y orgánulos citoplasmáticos se ubican en la región subapical. La porción más apical contiene vesículas que se relacionan a la síntesis de pared. Las partes más viejas del tubo polínico en alargamiento, van siendo sucesivamente selladas con tapones de calosa (Esau, 1982). La calosa ayuda a mantener la turgencia (necesaria para el crecimiento) en la porción terminal del tubo. La acumulación de calosa es mayor cuando existe incompatibilidad debido a la inhibición del crecimiento, mientras que en condiciones óptimas de desarrollo la deposición de calosa es menor pero de forma regular (Vasil, 1987).

El ovario y el óvulo envían señales que orientan y direccionan el crecimiento del tubo polínico en la dirección correcta. Existen tres tipos de evidencias que sostienen esta hipótesis. Una, relacionada a cambios en el desarrollo en los tejidos femeninos, que afectan el crecimiento del tubo polínico. La segunda se refiere a los óvulos mutantes, los cuales inducen un guiado defectuoso del tubo polínico (Herrero, 2001). En este sentido, Mesejo et al. (2007) realizaron ensayos de polinizaciones manuales en mandarina Satsuma 'Owari' y naranja 'Valencia', en las cuales observaron que solo un bajo porcentaje de tubos polínicos alcanzaron la micrópila del óvulo. Esto se asocia al guiado defectuoso del tubo polínico ocasionado por una degeneración temprana de los sacos embrionarios, explicando así, el reducido número de semillas en estas especies. La tercera hipótesis, está relacionada a posibles moléculas involucradas en la señalización. Varios autores reportan el efecto del calcio en el crecimiento del tubo polínico (Herrero, 2001).

La receptividad estigmática, la cinética del crecimiento del tubo polínico, el desarrollo del óvulo y agentes externos, son los factores que determinan el PPE (Mesejo et al., 2007). La receptividad estigmática se evalúa como la capacidad del estigma de proporcionar condiciones para la germinación del polen y para el crecimiento inicial del tubo polínico en el estilo (Sanzol, 2003). Según Mesejo et al. (2007), la receptividad estigmática es el factor que determina el PPE en la mandarina 'Clemenules' y naranja 'Valencia'. En estas especies la secreción en el estigma y canales estilares comienza antes de la antesis y culmina en la caída de pétalos, cuando comienzan los procesos de senescencia, cambiando los contenidos celulares (Tadeo y Primo-Millo, 1990). La cinética del crecimiento del tubo polínico no es determinante de la duración del PPE, al

menos en naranja 'Valencia' y mandarinas 'Clemenules' y Satsuma 'Owari'. La tasa de crecimiento de los tubos polínicos de 'Fortune' sobre los pistilos de Satsuma 'Owari' fue la más alta, y la longevidad del óvulo es el factor que determina que el PPE en esta mandarina sea el más corto (Mesejo et al., 2007). La degeneración del óvulo está relacionada a la aparición de calosa en el extremo chalazal. Ha sido reportado que esta sustancia inhibe el transporte de azúcar hacia los óvulos limitando su longevidad (Rodrigo y Herrero, 1998).

Entre los factores externos que afectan el PPE, la temperatura puede inducir la formación de polen estéril, afectar la germinación del polen, el crecimiento del tubo polínico y la longevidad del óvulo (Agustí 2004, Iglesias et al. 2007). La presencia de lluvias en el período de la polinización, puede lavar los estigmas impidiendo la retención y germinación de los granos de polen (Podestá, 2007). La insolación escasa en algunas especies, reduce el porcentaje de granos germinados así como el desarrollo del tubo polínico. En los cítricos, temperaturas elevadas (25-30 °C) favorecen la germinación y desarrollo del tubo y se ven reducidas o totalmente inhibidas cuando las temperaturas son menores a 20 °C (Agustí, 2004).

### 2.2.3. Fecundación

La fecundación es la etapa de la reproducción, en la cual uno de los núcleos espermáticos se fusiona con el núcleo de la oófera, dando lugar al cigoto. El tubo polínico ingresa al saco embrionario recorriendo el micrópilo, donde ocurren procesos bioquímicos y existen sistemas de enzimas que interactúan posibilitando su penetración en una de las células sinérgidas, donde descarga su contenido y luego el tubo polínico colapsa. El otro núcleo espermático se fusiona con la célula media formando la célula endospermogénica. Es así que ocurre la doble fecundación de los dos gametos y la triple fusión de los tres núcleos que originan el endospermo (Esau, 1982).

### 2.2.4. Formación de semillas

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

Dentro de la semilla hay uno o más embriones. En varios cultivares de cítricos la formación de múltiples embriones es bastante común debido principalmente a la

formación de embriones nucelares. El estímulo de la actividad del tubo polínico y de los reguladores del crecimiento es necesario para promover el desarrollo de embriones nucelares (Frost y Soost 1968, Jackson 1997). Tadeo et al. (2003) afirman que los embriones nucelares pueden formarse tanto en óvulos no fertilizados, contengan o no saco embrionario, como en los fertilizados. Los embriones en desarrollo reemplazan gradualmente al endospermo, quien es más tarde digerido por los cotiledones. Los cotiledones son de color blanco, crema o verdes y constituyen la mayor parte de la semilla madura (Jackson, 1997).

#### 2.2.5. Cuajado

En sentido amplio el cuajado comprende el período de crecimiento durante el cual el fruto puede sufrir abscisión. En sentido estricto, es el proceso que marca la transición del ovario de la flor a fruto en desarrollo y supone la iniciación de un rápido crecimiento de los tejidos del ovario. La dinámica de caída de estructuras reproductivas no es uniforme en el tiempo, sino que un primer período de abscisión ocurre entre pre-antesis y caída de pétalos, una segunda caída tras el cuajado de frutos que inician el desarrollo y una tercera al final de la fase de división celular, denominada caída fisiológica. Este cuajado de los frutos cítricos se encuentra regulado en forma simultánea, tanto por factores endógenos (hormonales y nutricionales) como exógenos (factores climáticos y de manejo), los cuales pueden incidir en forma positiva o negativa sobre el desarrollo del fruto (Agustí, 2003a).

El cuajado de los frutos cítricos responde en una primera instancia, al balance hormonal entre giberelinas y ácido abscísico. Las primeras, actúan aumentando la capacidad de fosa de los frutitos, mejorando así su nutrición mineral y de carbohidratos; el segundo actúa principalmente en condiciones de estrés hídrico, estimulando la abscisión de los frutos. En segunda instancia el cuajado y desarrollo de los frutos responde a la disponibilidad de carbohidratos en la planta. Es así que, aún en condiciones de altas concentraciones de giberelinas en los frutos y por tanto alta capacidad de fosa, si esta demanda de carbohidratos no es satisfecha, los frutitos abscisionan en un proceso de autorregulación de la carga por parte de la planta (Goldschmidt y Monselise 1977, Gravina 1999, Ruiz et al. 2001, Iglesias et al. 2007).

La presencia de giberelinas depende de factores genéticos; en aquellas variedades que presentan semillas el estímulo de iniciar el desarrollo del fruto seguramente necesita de la polinización y fertilización. Si la flor no es polinizada, el desarrollo del gineceo se detiene, toda la flor senesce y eventualmente abscisiona (Iglesias et al., 2007), pues las semillas son las responsables de sintetizar giberelinas. En el caso de variedades partenocárpicas las paredes del ovario, que se encuentran en activa división celular, son la principal fuente de esta hormona (Monselise, 1977).

Existen diferencias en las probabilidades de cuajado de los frutos, según el tipo de brote; los frutos que se desarrollan en brotes con hojas presentan una mayor capacidad de cuajado, que los solitarios o ubicados en inflorescencias sin hojas (Jahn, 1973). Por otro lado, las flores ubicadas en inflorescencias mixtas de brotación tardía durante la primavera, poseen un mayor porcentaje de cuajado, ya que tienen una menor competencia inicial y se desarrollan con temperaturas más altas (Lovatt et al., 1984). Según Erner y Shomer (1996), otro factor asociado al mayor cuajado de estas flores es la presencia de un área vascular mayor que las inflorescencias sin hojas. Esto estaría asociado a una mayor capacidad de transporte de agua en las inflorescencias con hojas.

## 2.2.6. Fruto

### 2.2.6.1. Características del fruto

El fruto de los cítricos es una baya típica llamada hesperidio, en la que se pueden distinguir las siguientes estructuras (Schneider, 1968):

- Exocarpo o flavedo, es la región más externa y visible de la cáscara, formada por células epidérmicas de color verde cuando el fruto se encuentra en fases inmaduras y naranja o amarillo según la especie, en la madurez.
- Mesocarpo o albedo, es la región situada debajo del exocarpo, formado por un tejido blanco esponjoso de células parenquimatosas; junto al exocarpo, constituyen la corteza del fruto propiamente dicha.
- Endocarpo o pulpa, es la región más interna y está constituida por los lóculos o gajos. Los lóculos contienen las vesículas de jugo, formadas por un cuerpo de células completamente vacuolizadas y un pedúnculo que las mantiene unidas a la epidermis dorsal de los carpelos y limitadas lateralmente por los septos. Dentro de éstos lóculos se encuentran las semillas.

### 2.2.6.2. Crecimiento y tamaño del fruto

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

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

El crecimiento y tamaño del fruto es el resultado de las propiedades genéticas y de su capacidad para acumular metabolitos (Agustí y Almela, 1991) y puede ser limitado por una baja fuerza de fosa o por la baja disponibilidad de carbohidratos. La fuerza de fosa está definida por factores exógenos, especialmente temperatura, nutrición mineral y disponibilidad de agua, y factores endógenos como el tipo de brote en que crece y la competencia con otros órganos, especialmente otros frutos y brotes en desarrollo. La disponibilidad de carbohidratos está estrechamente ligada a la proporción relativa de brotes con hojas desarrollados durante la primavera y la intensidad de floración. La principal importancia de los asimilados en la primera fase de crecimiento radica en que estos son utilizados para la división celular (Gravina, 1999).

El tamaño final que alcanza un fruto tiene una relación inversa con el número de frutos (Goldschmith y Monselise, 1977) y con el número de flores (Guardiola, 1997). Este autor sugiere que la floración afecta el tamaño de frutos debido a dos aspectos:

- 1) el tamaño del ovario en anthesis, por ende un incremento en el número de flores resulta en la formación de flores con ovarios pequeños;
- 2) una intensa competencia por metabolitos en etapas tempranas de desarrollo, afecta el posterior crecimiento del fruto.

Numerosos estudios afirman que existen correlaciones significativas entre el tamaño del fruto y el número de semillas, indicando que frutos con mayor número de semillas poseen un mayor tamaño (Frost y Soost 1968, Chao 2005b). Para las condiciones de Uruguay, Pardo et al. (2010) reportan que la correlación es significativa pero de baja magnitud.

## 2.3. PARTENOCARPIA

### 2.3.1. Definición

La partenocarpia es la producción de fruta sin que ocurra fecundación y formación de semillas (Vardi et al., 2008). Usualmente ocurre por falta de polinización, por polinización que no lleva a una fertilización (a causa de polen defectuoso o polen de especies incompatibles), o por fertilización adecuada que es seguida del aborto del embrión (Gillaspy et al., 1993). Para la producción estable de fruta sin semilla se requiere de una fuerte esterilidad y de una alta habilidad partenocárpica (Ollitrault et al., 2007).

Talón et al. (1992) sugieren que el contenido endógeno de giberelinas en ovarios en desarrollo, es el factor que controla el desarrollo de frutos partenocárpicos. En su estudio determinan mayor contenido de giberelinas endógenas en mandarina `Satsuma`, con alta habilidad partenocárpica, que en mandarina `Clementina` cuyo grado de partenocarpia es bajo. Asimismo, asocian la baja habilidad partenocárpica a una baja capacidad para conjugar ácido abscísico (ABA) y mayor habilidad para conjugar ácido indolacético (AIA). Los frutos partenocárpicos no cuentan con semillas que sintetizan los reguladores de crecimiento, entonces son las paredes del ovario quienes efectúan este rol (Monselise, 1977).

### 2.3.2. Tipos de partenocarpia

Varios tipos de partenocarpia han sido reconocidos. Se distingue entre partenocarpia obligada, cuando se producen únicamente frutos sin semillas y partenocarpia facultativa, en la cual se producen frutos sin semillas solo cuando la polinización es impedida (Iglesias et al. 2007, Vardi et al. 2008).

Frecuentemente también se realiza una distinción entre partenocarpia vegetativa, en la cual la formación del fruto se da sin que ocurra la polinización y la partenocarpia estimulativa, donde es necesaria la polinización para la formación del fruto, pero la fecundación no ocurre resultando de este modo en frutos sin semillas. La producción de frutos sin semillas puede ser lograda también a través de estenospermocarpia, en la cual la polinización y la fecundación tienen lugar y el aborto del embrión es la causa de la ausencia de semillas (Vardi et al., 2008). El cultivar "Mukaku kishu" es un ejemplo de este tipo de comportamiento en los cítricos, en el cual la inhibición del desarrollo del embrión se da en etapas tempranas (Yamasaki et al., 2007).

Ejemplos de comportamiento partenocárpico son las naranjas Navel, mandarinas Satsumas y algunas Clementinas. Navel y Satsuma tienen polen estéril y además la mayoría de los sacos embrionarios abortan; por eso producen frutos sin semillas a pesar de presentar polinización cruzada. Clementinas y algunas mandarinas híbridas son autoincompatibles pero tienen sacos embrionarios viables. Forman frutos con semilla en polinización cruzada, lo que debe ser evitado para obtener frutos partenocárpicos (Guardiola, 1997). La lima ‘Tahití’ también presenta hábito partenocárpico en la producción de sus frutos (Frost y Soost, 1968).

## 2.4. ESTERILIDAD E INCOMPATIBILIDAD

La existencia de flores hermafroditas es una ventaja reproductiva que presentan las angiospermas, ya que, aunque existen excepciones, es esperable una lógica coordinación en el desarrollo de las diferentes partes de una misma flor bajo las mismas condiciones ambientales. Este hermafroditismo asegura en gran medida la autogamia, con la consiguiente consanguinidad. Por esto las angiospermas han desarrollado variaciones florales tendientes a facilitar la alogamia, con el fin de asegurar la diversidad. Por lo tanto estigma y estilo desempeñan un papel muy importante, ya que es en estos, en muchos casos, donde se produce el impedimento de la germinación del polen del mismo individuo y hasta de la misma flor. Este fenómeno se lo conoce como esterilidad (Agustí, 2004).

Las condiciones ambientales también pueden provocar en algunos casos la esterilidad de las plantas, pero principalmente, ésta se debe a factores genéticos. Se han descrito tres tipos de esterilidad genética. La primera, esterilidad homocigótica, ocurre cuando el polen funcional no puede fecundar flores del mismo cultivar (autoincompatibilidad) o de otro cultivar (incompatibilidad de cruzamiento). En segundo lugar, la esterilidad gamética tiene lugar cuando existe desarrollo deficiente o ausencia de estambres (androesterilidad) o de ovarios (ginoesterilidad). Por último, la esterilidad citológica hace referencia a alteraciones de la meiosis durante la gametogénesis (Agustí, 2004).

### 2.4.1. Incompatibilidad (esterilidad homocigótica)

Frankel y Galun (1977) emplean el término incompatibilidad para describir el proceso por el cual, plantas que tienen gametos funcionales son incapaces de producir semillas. Por otra parte, de Nettancourt (1977) define a la autoincompatibilidad (AI) como la incapacidad de una planta con gametos fértiles de producir un cigoto después de la autopolinización. Cuando se presenta incompatibilidad, los granos de polen y los óvulos son fértiles, y mediante sistemas de reconocimiento genético polen-pistilo se

detiene el crecimiento del tubo polínico impidiendo la fecundación (Agustí et al., 2003b). El mecanismo de rechazo es activo y está basado en mensajes bioquímicos-genéticos, liberados desde el polen y del carpelo para que ocurra el reconocimiento y luego generar la respuesta (Lersten, 2004). Este reconocimiento le permite al pistilo de las flores distinguir entre su propio polen (genéticamente relacionado), del polen foráneo (genéticamente no relacionado), así su propio polen es rechazado, mientras que el polen foráneo es aceptado para la fertilización (Kao y McCubbin, 1996).

La autoincompatibilidad se puede dividir en homomórfica y heteromórfica. En el tipo homomórfico, una especie determinada presenta una única forma floral, mientras que en la heteromorfia una misma especie puede tener dos o tres flores morfológicamente distintas, y la polinización es compatible únicamente entre las formas florales diferentes. Existen dos tipos de incompatibilidad homomórfica, en base a si las reacciones de autoincompatibilidad están determinadas en el genotipo del propio polen (gametofítica) o en el genotipo de la planta de la cual proviene el polen (esporofítica). Mientras que la autoincompatibilidad esporofítica (AIE), generalmente implica una relación entre el estigma y el grano de polen germinando, la autoincompatibilidad gametofítica (AIG) genera una inhibición del crecimiento del tubo polínico en el estilo (de Nettancourt 1977, Newbigin et al. 1993).

La autoincompatibilidad se produce porque los tejidos femeninos están “pre-programados” para identificar y rechazar células (en este caso el grano de polen) producidas por el mismo individuo y que llevan una copia del mismo genoma. Para que se acepte un polen compatible, se da la transcripción de alelos específicos que no se tienen en común (Helsop-Harrison, 1975). La velocidad con que ocurre el reconocimiento de los tubos incompatibles es muy rápida, ya que basta que una pequeña parte del tubo entre en contacto con la superficie del estigma para que se dé la detención del crecimiento. Esto es debido a que en las secreciones estigmáticas se encuentran las proteínas de incompatibilidad que estarían inhibiendo el suministro de agua (de Nettancourt, 1997). Según este mismo autor, la deposición de calosa que se da inmediatamente por debajo de la punta del tubo polínico en Cruciferae es más una consecuencia que el motivo por el cual el tubo detiene el crecimiento.

Según Pandey (1958), la diferencia en el comportamiento entre el polen de una planta con AIG o AIE es debida al momento de acción del gen-S, el cual se expresa antes de la meiosis en la AIE mientras que en la AIG se activa después de la meiosis. Esta diferencia en el momento de expresión del gen, es una explicación del hecho de que el polen del sistema de AIE presenta su genotipo parental, mientras que el polen del sistema de AIG dispone de su propio genoma haploide.

Existe una relación entre el tipo de autoincompatibilidad homomórfica y el tipo de polen, tipo de estigma y sitio de inhibición del grano de polen en el pistilo. La autoincompatibilidad esporofítica en general se asocia con estigmas secos, mientras que



la mayoría de las especies con autoincompatibilidad gametofítica presentan estigma húmedo. A su vez plantas con estigma húmedo tienen polen bi-nucleado y la reacción de incompatibilidad mayoritariamente ocurre dentro del estilo o menos comúnmente en el ovario. En las plantas con incompatibilidad esporofítica, el sitio de detención del crecimiento del tubo polínico se restringe al estigma (de Nettancourt, 1997).

#### 2.4.1.1. Incompatibilidad gametofítica

Esta incompatibilidad se da a nivel del estilo. Es controlada por el genoma haploide de cada grano de polen y diploide de los tejidos del pistilo (Poehlman y Sleper, 2005). El reconocimiento del polen propio o foráneo es controlado por un único locus polimórfico, el locus S (o dos loci S y Z en las gramíneas). Si una planta presenta los alelos S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub>, el polen producido tendrá los alelos S<sub>1</sub> o S<sub>2</sub>. Cuando estos granos de polen llegan al estigma de la misma flor, germinarán y crecerán por el estilo; sin embargo su crecimiento es detenido ya que el pistilo reconoce los alelos de su propio polen. Generalmente estos tubos polínicos se hinchan y estallan, y no llegan al ovario para que ocurra la fecundación. Se ha constatado que proteínas S producidas por los alelos S controlan la habilidad del pistilo en reconocer y rechazar su propio polen (Kao y McCubbin, 1996).

Una de las hipótesis planteadas, es que los alelos que codifican la S-RNasa co-segregan con los alelos del locus S, y el momento de expresión de las S-RNasa es coincidente con el comienzo de la autoincompatibilidad del pistilo. Estas S-RNasa son glicoproteínas (S-glicoproteínas) y su función es degradar ARN, en este caso ARN de los tubos polínicos, lo cual conduce a la muerte de los mismos. Esta hipótesis presenta un problema ya que debería de prevenirse la degradación de ARN en los tubos compatibles, esto se podría dar por inhibidores, mientras que en los incompatibles existirían receptores que introducen las S-RNasa (McClure et al., 1990).

En *Papaver*, las S-proteínas identificadas no parecen participar directamente en el proceso de rechazo, sino como moléculas de señalización que interactúan con un receptor en los tubos polínicos incompatibles, para disparar el mecanismo de transducción mediado por Ca<sup>2+</sup>, lo cual conduce a que se produzcan alteraciones en el funcionamiento del polen (de Nettancourt, 1997).

#### 2.4.1.2. Incompatibilidad esporofítica

Si bien esta autoincompatibilidad, al igual que la gametofítica es controlada por un locus con múltiples alelos, en este caso el rechazo se da por la interacción entre el

genotipo del pistilo y el genotipo del padre del polen y no con el genotipo haploide del polen. Así cualquier grano de polen generado en plantas con autoincompatibilidad esporofítica presenta productos de los dos alelos S y el rechazo ocurre cuando uno de esos alelos coincide con los alelos del pistilo, en estos casos siempre ocurre dominancia o codominancia entre los alelos S. Este tipo de incompatibilidad es controlada o se da, por la acción de una S-locus glicoproteína (SLG) y de una S-locus receptor kinasa (SLK); los genes que codifican estas proteínas se expresan dentro de las estructuras reproductivas de las flores, siendo la SLG particularmente abundante dentro de las células de las papilas estigmáticas (Matton et al., 1994).

En esta AI, el crecimiento del tubo polínico se interrumpe en la superficie del estigma. Esta reacción involucra factores cargados por el polen, pero que se produjeron en los tejidos diploides donde se origina el polen (tapete) y por factores en el tejido del pistilo del esporofito. En este tipo de incompatibilidad para que un cruzamiento sea viable, los alelos deben ser diferentes (pistilo y esporofito parental), pero puede darse la excepción cuando uno de los padres solo posee un alelo en común y éste es dominado por el alelo que no es común (Newbiggin et al., 1993).

#### 2.4.2. Esterilidad gamética

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

Las variedades que producen polen y óvulos no funcionales presentarán frutos sin semillas sin importar su cercanía a otras variedades cítricas. Ejemplos de variedades que tienen polen estéril y ninguno o pocos óvulos funcionales incluyen al grupo de las naranjas Navel, mandarinas Satsumas y algunas naranjas Valencia ('Midknight' y 'Delta') (Kahn y Chao, 2004).

##### 2.4.2.1. Ginoesterilidad

La esterilidad femenina resulta del aborto o desarrollo defectuoso del saco embrionario. Muchos sacos embrionarios presentan retraso en el desarrollo, lo que indica que la oósfera no está madura y viable para la fecundación en el momento apropiado (Jackson, 1997).

Un ejemplo de esterilidad femenina en cítricos es la naranja 'Washington' navel, en la cual la célula madre de la megáspora frecuentemente aborta antes de dividirse (Jackson, 1997). 'Mukaku Yuzu' es otro cultivar con esterilidad femenina, siendo ésta de origen genético (asinapsis en la formación del gameto) (Iwamasa, 1966).

Yamamoto et al. (1995), proponen que el grado de fertilidad/esterilidad femenina puede ser evaluado por el número promedio de semillas por fruto obtenidos mediante polinización manual. Una correlación alta y positiva ( $r = 0.93$ ) fue encontrada entre el número de semillas obtenidas en frutos provenientes de polinización abierta y los frutos originados en polinizaciones manuales.

#### 2.4.2.2. Androesterilidad

La esterilidad masculina puede deberse a distintas causas, entre ellas condiciones ambientales desfavorables, enfermedades o mutaciones (Budar y Pelletier, 2000). La androesterilidad puede ser genética (EMG) o citoplasmática (EMC). Mientras que la EMG es de control esporofítico enteramente, en la EMC el control es gametofítico (Frankel y Galun, 1977). Cuando existe EMG, en las especies hermafroditas, la parte femenina de la flor funciona normalmente. La esterilidad masculina se manifiesta por la ausencia total de la parte masculina de la flor, por fallas en el desarrollo del tejido esporógeno, por aborto del desarrollo del polen en cualquier etapa o por ausencia de dehiscencia de las anteras (Budar y Pelletier, 2000). La EMG es controlada solo por un gen nuclear, siendo el homocigótico recesivo el que provoca la esterilidad (Frankel y Galun, 1977). La expresión puede variar con el ambiente (Poehlman y Sleper, 2005). La EMC se define como la deficiencia de producir polen, heredada maternalmente, y se origina por mutación del genoma mitocondrial, sin que esta mutación afecte la viabilidad de la planta (Budar y Pelletier, 2000).

En los cítricos, al cruzar mandarina Satsuma (cv. 'Suzuki Wase') y *Trifolia* (*P. trifoliata*), se obtienen plantas estériles en las que se producen anomalías en el comienzo del desarrollo de las anteras. En éstas, los tejidos esporógenos se generan normalmente y se forma regularmente el tapete y las células madre del polen. En etapas tempranas de la meiosis, las células madre del polen comienzan a degenerar, los núcleos y citoplasma desaparecen gradualmente (Iwamasa, 1966).

Otro de los fenómenos que causan esterilidad del polen son las aberraciones de los cromosomas. La asinapsis es inducida por las bajas temperaturas en limón 'Eureka' y lima 'Mexican', mientras que en el cultivar 'Mukaku Yuzu' ésta es de origen genético. En naranja 'Valencia' la translocación recíproca (intercambio mutuo de material genético entre dos cromosomas no homólogos) es la principal causa de esterilidad. En las naranjas del grupo Navel, la esterilidad masculina es debida a la degeneración de los

tejidos esporógenos, justo antes de que se dé la primera división meiótica, por lo que no se produce polen maduro. En el caso de las Satsumas, éstas producen comparativamente un menor número de células madre del polen, siendo este número muy variable, existiendo incluso microesporangios que no producen nada. Estas células madre del polen, algunas veces se desintegran en etapas tempranas del desarrollo. En las que continúan con desarrollo normal, los granos de polen degeneran en diferentes etapas de su desarrollo y por lo tanto al momento de la floración solo algunos granos de polen son viables (Iwamasa, 1966).

Otras causas de la androesterilidad son la degeneración de la antera y la desintegración de tejidos de conducción de las células del tapete y bajo suplemento de nutrientes durante el desarrollo del polen (Ye et al., 2009).

## 2.5. COMPATIBILIDAD Y POLINIZACIÓN CRUZADA EN LA PRODUCCIÓN DE CÍTRICOS

En los cítricos existen diferentes niveles de compatibilidad y algunas combinaciones pueden dar lugar a mejoras en el cuajado sin afectar el número de semillas. Vithanage (1991), encontró que la mandarina ‘Imperial’ podría ser plantada en cultivos de ‘Ellendale’ para incrementar el cuajado, sin registrar aumento en el número de semillas. Por otro lado el caso de la mandarina ‘Nova’ es diferente ya que Papadakis et al. (2009), al polinizar este cultivar con ‘SRA63’ y ‘Marisol’ obtuvieron un aumento en el número de semillas por fruto, de 0,72 en autopolinización a 2,1 y 1,76 en cada cruzamiento. Este mismo autor al realizar los cruzamientos recíprocos, ‘SRA63’ x ‘Nova’ y ‘Marisol’ x ‘Nova’ obtuvo 18,6 y 2,4 semillas por fruto, mientras que la autopolinización de estos cultivares produjo 1,4 y 0,9 respectivamente. Otros ensayos con ‘Nova’ dieron como resultado, que ésta presenta diferente compatibilidad con ‘Ellendale’, ‘Fortune’ y ‘Ortanique’ ya que produjo en promedio 22, 23 y 17 semillas por fruto respectivamente. Este mismo cultivar presenta gran compatibilidad con ‘Ellendale’ y una baja afinidad con pomelo ‘Star Ruby’, ya que produce 36 y 2 semillas por fruto cuando se polinizan éstos con ella (Soler, 1999).

Las mandarinas Clementinas y ‘Afourer’ pueden poseer gran cantidad de semillas cuando hay fuentes de polen compatible cerca e incluso son compatibles entre ellas (Chao, 2005b). Las mandarinas ‘Nova’ y ‘Fortune’ son muy buenos polinizadores de Clementinas tales como ‘Beatriz’, ‘Clementina de Nules’, ‘Hernandina’, ‘Loretina’, ‘Oronules’ (Soler, 1999).

En Uruguay, la mayoría de los cultivares utilizados poseen capacidad de producir semillas en condiciones de polinización cruzada (Rivas et al., 2010). En cruzamientos de mandarinas ‘Ortanique’ con ‘Nova’, se encontró un aumento de cuajado de frutos y del número de semillas por fruto (Borges et al., 2009).

## 2.6. EL CULTIVAR “AFOURER”

El cultivar de mandarina ‘Afourer’ fue descubierto en una estación experimental del INRA cercana al pueblo del mismo nombre en Marruecos. Se cree que el origen es un posible cruzamiento entre mandarina ‘Murcott’, como madre, y polen desconocido (US Patent 10,480, 1998). A este cultivar de mandarina también se lo conoce con el nombre de W. Murcott, Nadorcott<sup>®</sup> o Delite. Produce fruta de color rojo-anaranjado, forma algo irregular, fácil de pelar y sin semillas. Los frutos maduros son de gran calidad organoléptica, presentando un alto contenido de azúcar (Saunt, 2000). Presenta hojas de tamaño pequeño a mediano, lanceoladas, color verde oscuro, borde ligeramente aserrado y pecíolo apenas alado. Las ramas no presentan espinas, son vigorosas y de crecimiento vertical en las nuevas brotaciones (Agustí et al., 2005). Es una planta de rápida entrada en producción y muy productiva (Saunt 2000, Agustí et al. 2005).

Afourer se encuentra registrado como un cultivar que produce fruta sin semillas, cuando se encuentra aislado y la polinización cruzada es prevenida. En promedio solo presenta de 0,2 a 0,5 semillas por fruto (US Patent 10,480, 1998).

Chao (2005b), encontró que bajo condiciones de aislamiento, la mandarina “Afourer” produce casi todos los frutos sin semillas. Saunt (2000), Agustí et al. (2005), sostienen lo mismo en cuanto a que debe ser aislada de otras fuentes de polen para producir fruta sin semilla, ya que es muy sensible a la polinización cruzada.

En Uruguay este cultivar es uno de los principales entre los de reciente introducción. Dentro de las mandarinas, ‘Afourer’ representaba el 0.8 % del área en 2006 y para el año 2010 la superficie se incrementó hasta un 3,2 % (214 hás) (URUGUAY. MGAP.DIEA, 2011).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. EXPERIMENTOS REALIZADOS

El trabajo se llevó a cabo en los establecimientos Azucitrus y El Repecho, localizados en el departamento de Paysandú (31° LS), Uruguay. Se realizaron tres experimentos:

##### 1) Estudio de la capacidad partenocárpica

Se seleccionó un cuadro de mandarina ‘Afourer’ (*Citrus reticulata* Blanco), injertadas sobre trifolia (*Poncirus trifoliata* L.Raf.) plantadas en el año 2007, con riego localizado y un marco de plantación de 6 x 3 metros en el establecimiento El Repecho. En este cuadro se marcaron 22 plantas tomando como criterio de selección el buen estado sanitario de las mismas, sin deficiencias nutricionales evidentes, y con volumen de copa y altura homogéneo. A la mitad de estas plantas, elegidas al azar, se les impidió la polinización cruzada, mediante el uso de malla tipo TNT, la cual se fijó en estructuras de madera colocadas sobre las copas, desde el inicio de brotación hasta el final de caída de pétalos. Debajo de la copa de las plantas se colocaron mallas para cuantificar las estructuras reproductivas que cayeron durante la primera fase de crecimiento de frutos. Sin embargo no fue posible obtener el dato del porcentaje de cuajado ya que las mallas fueron retiradas por error al mes post-floración. A partir del fin de la caída fisiológica y hasta la cosecha, se midió quincenalmente el diámetro ecuatorial de los frutos con calibre digital. En cosecha se determinó el rendimiento en kilogramos por planta y se contaron todos los frutos. En una muestra de 20 frutos por planta se evaluó la presencia de semillas y el número de semillas por fruto.



Figura 4: Fotografías del experimento de plantas bajo mallas y en polinización abierta. A) Estado fenológico del cultivar “Afourer” en el momento de aislación. B) Distribución de plantas aisladas.

## 2) Estudio de la viabilidad de gametos femeninos y masculinos

Al momento de la cobertura de las plantas se marcaron 100 brotes de flor terminal, en botón alargado (estado 59 de la escala BBCH, Agustí et al., 1995), en cuatro árboles seleccionados en dicho cuadro (dos cubiertos y dos sin cobertura). Luego de la cobertura se recolectaron 10 flores por tratamiento en cuatro momentos: 0, 3, 6 y 9 días para observar en microscopio de fluorescencia el crecimiento del tubo polínico y la viabilidad de los óvulos, siendo el día 0 el momento de marcado de los brotes. Se utilizó un diseño completo al azar con 2 tratamientos y 10 repeticiones. Las flores recolectadas se fijaron en solución de FAA (5 % formaldehído, 5 % acético, 90 % etanol al 70 %) y se guardaron a 4 °C hasta que fueron analizadas. Previo al análisis las flores se procesaron de la siguiente forma: se eliminaron los pétalos, se lavaron con agua destilada y se mantuvieron en sulfito sódico al 5 %, durante la noche. Al día siguiente, utilizando una nueva solución de la misma concentración de sulfito sódico, los tejidos se reblandecieron durante 30 a 40 segundos a 100 watts, en microondas (JAMES-20NDG). Para observar la germinación de los granos de polen y el desarrollo del tubo polínico, se separó el estigma y estilo del ovario y se seccionó longitudinalmente bajo lupa binocular (OLYMPUS SZ40). Se colocaron los estigmas y estilos seccionados en solución de azul de anilina al 0.1 % en  $K_2HPO_4$  0.1 N (Kearns y Inouye, 1993) donde se mantuvieron por 20 a 30 minutos para teñir los tejidos. Las secciones de estilos se colocaron en portaobjetos con una gotita de glicerina líquida para evitar que se deshidrataran los preparados, se cubrieron con cubre objeto, evitando la formación de burbujas de aire y se realizó un *squash*. El azul de anilina tiñe la calosa que se deposita en las paredes del tubo polínico durante su crecimiento, en forma de tapones y a intervalos irregulares. La calosa teñida e iluminada con luz ultravioleta emite fluorescencia, lo que permite observar tanto la germinación de los granos de polen como el desarrollo del tubo polínico. La evaluación de la germinación de los granos de polen se realizó contando al azar en cuatro campos visuales, la cantidad de granos germinados, mientras que el desarrollo del tubo polínico en el estilo se determinó como el porcentaje de estilo recorrido por el tubo polínico más largo. Para observar la viabilidad de los óvulos, los ovarios reblandecidos se seccionaron ecuatorialmente bajo una lupa binocular (OLYMPUS SZ40). Se rescataron los óvulos y depositaron sobre un portaobjeto con una gota de solución de azul de anilina al 0.1 % en  $K_2HPO_4$  0.1 N durante 20-30 minutos para teñirse. Posteriormente se secó el preparado y se colocó una gota de glicerina líquida y se cubrieron con un cubre objeto, evitando la formación de burbujas de aire, y se realizó un *squash*. Se sellaron los preparados para facilitar su manipulación. Los óvulos que inician su proceso de degeneración sintetizan calosa en el extremo de la chalaza de la nucela, lo que permite su observación en microscopio de fluorescencia. Para realizar las observaciones con fluorescencia se utilizó un microscopio OLYMPUS AH3-RFCA. La viabilidad de óvulos se evaluó contabilizando los óvulos que estuvieran viables del total rescatados por ovario. Se consideraron viables aquellos que no presentaban depósitos de calosa en la zona de la chalaza, no emitiendo fluorescencia en esa zona.

3) Estudio de autopolinización, polinización cruzada y germinación de polen in vitro

En un cuadro ubicado en el establecimiento Azucitrus, injertado sobre *P.trifoliata* de siete años de edad, en condiciones de fertirriego se seleccionaron 28 plantas que se dividieron en 14 bloques de dos plantas cada uno. El diseño experimental fue de bloques completos al azar. En cada bloque se utilizaron 60 brotes de flor terminal que se dividieron en grupos de 10 para aplicarles alguno de los siguientes tratamientos; a) Control, b) Flores completas embolsadas, c) Flores emasculadas y embolsadas, d) Flores emasculadas, polinizadas con polen de ‘Afourer’ y embolsadas, e) Flores emasculadas, polinizadas con polen de mandarina ‘Clementina de Nules’ (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) y embolsadas, f) Flores emasculadas, polinizadas con polen de naranja ‘Valencia’ (*C. sinensis* (L) Osb.) y embolsadas. Se utilizaron 140 flores por tratamiento, totalizando 840 flores. Las variedades polinizadoras fueron seleccionadas de acuerdo a su cercanía al cuadro donde se realizó el experimento. Los tratamientos se aplicaron sobre brotes terminales en los cuales la flor se encontraba en el estado 59 de la escala BBCH (Agustí et al., 1995). En el tratamiento control los brotes se mantuvieron en condiciones de polinización abierta.

El polen de las variedades donadoras, fue colectado el día previo a ser utilizado, de flores iniciando anthesis (estado 61 de la escala BBCH, Agustí et al., 1995), y mantenido en oscuridad a 20 °C, en placas de petri con silica gel, para forzar la apertura de las anteras. Luego se mantuvieron las anteras abiertas en heladera durante 2 horas para que se hidrataran los granos de polen. A cada flor, se le retiraban los pétalos y las anteras con ayuda de una pinza y en los tratamientos donde se realizaron polinizaciones artificiales, con un pincel fino, se llevó a cabo la transferencia del polen hacia el estigma (figura 5).



Figura 5: Polinización artificial de flor emasculada de brote terminal de mandarina ‘Afourer’ con polen de ‘Valencia’.



Una vez realizada la polinización, las flores se cubrieron con malla tipo tul, que abarcaba todo el brote (figura 6). Cuando el estigma dejó de ser receptivo (9 días), se retiraron las coberturas de los brotes. Quincenalmente y hasta fin de diciembre se evaluó el cuajado; a partir de este momento y hasta la maduración se midió el diámetro ecuatorial de cada fruto con calibre digital. Se cosecharon todos los frutos, se midió el diámetro y se cuantificó presencia y número de semillas por fruto.



Figura 6: Fotografías del experimento de polinización en brotes individuales. A) aislamiento de brote durante período receptivo del estigma. B) Planta con varias repeticiones de cada tratamiento.

Para evaluar la germinación de polen *in vitro*, se recolectaron en plena floración, 30-40 flores en estado 61 de la escala BBCH, de árboles de cada uno de los cultivares utilizados como polinizadores. Las flores se colocaron en una caja de petri abierta, que se colocó en una cámara con sílica gel durante 24-36 horas para que abrieran las anteras. Estas anteras abiertas se mantuvieron en heladera durante 2 horas para que se hidrataran los granos de polen. La germinación de los granos de polen se realizó en portaobjetos, colocando una base de 1500  $\mu$ l de medio sólido. El medio de cultivo utilizado fue Brewbaker y Kwack (1963) (10 % sucrosa, 100 ppm  $H_3BO_3$ , 300 ppm  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ , 200 ppm  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  y 100 ppm  $KNO_3$  con  $PH 5.4 \pm 0.1$ ) y se dividió en dos partes, una se utilizó como medio líquido y la otra como medio sólido con el agregado de 1 % Phytigel (polvo incoloro espesante) con el fin de que el medio fuera lo más transparente posible para facilitar la observación de los preparados en el microscopio. Para sembrar los granos de polen se trabajó en condiciones de asepsia en cámara de flujo laminar. De

las anteras se extrajeron los granos de polen frotando las mismas con pincel fino para recoger la mayor cantidad de granos sobre el medio sólido de cada portaobjeto. Posteriormente se cubrieron los granos con 30 µl de medio líquido. Se utilizó un diseño completo al azar con 3 tratamientos (variedades polinizadoras) y 5 repeticiones (portaobjetos). Los preparados se colocaron en cámara oscura a 25 °C y 70-80 % de humedad y se observaron en microscopio óptico (OLYMPUS ECE-Bi) cada 12 horas, hasta que el polen de *Afourer* germinó (44 horas). Una vez que germinaron los granos de polen se fijaron con solución de FAA (5 % formaldehído, 5 % acético, 90 % etanol al 70 %). Hasta el momento de conteo, los portaobjetos se conservaron en heladera a 4 °C.

Para evaluar la germinación de los granos de polen, se dividieron los portaobjetos en 8 campos y en estos se contaban 140 granos, contabilizando los germinados y los no germinados. El conteo se realizó con ayuda de un microscopio óptico (OLYMPUS ECE-Bi). Del total de granos contabilizados se determinó el número de granos de polen germinados para calcular el porcentaje de germinación. Se tomó como criterio que un grano de polen germinó cuando el largo del tubo polínico superaba el diámetro del mismo (Stanley y Linskens, 1974).

### 3.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables diámetro de fruta y rendimiento (continuas), se asume que presentan distribución normal; las variables discretas (número de frutos, número promedio de semillas) fueron transformadas por la raíz del valor. La proporción de frutos con y sin semillas, el porcentaje de cuajado y porcentaje de granos de polen germinados fueron transformados por el método ArcoSeno(Raíz(p)), para cumplir con el supuesto de Normalidad de los errores. El efecto de los tratamientos (plantas bajo malla, testigo, polinizaciones) fue estudiado ajustando modelos lineales generales (ANAVA). Las medias de los efectos significativos fueron comparadas usando la prueba Tukey, con una significancia de 0.05. Se realizaron correlaciones entre el número de semillas y el diámetro ecuatorial. Los datos fueron analizados utilizando el software estadístico: InfoStat-Statistical Software versión 2011 (Di Rienzo et al., 2011).

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

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

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

Donde,

$Y_{ij}$ : variable de respuesta (rendimiento, diámetro ecuatorial, proporción de frutos sin semillas, número de semillas por fruto)

$\mu$ : media general

$M_i$ : efecto del  $i$ -ésimo tratamiento ( $i$ : Bajo malla, polinización libre)

$\epsilon_{ij}$ : error experimental

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

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

Donde,

$Y_{ij}$ : variable de respuesta (diámetro ecuatorial, proporción de frutos sin semillas, número de semillas por fruto, cuajado)

$\mu$ : media general

$V_i$ : efecto del  $i$ -ésimo tratamiento ( $i$ : Control; flores embolsadas; flores emasculadas y embolsadas; flores emasculadas, polinizadas con polen de 'Afourer' y embolsadas; flores emasculadas, polinizadas con polen de 'Clementina de Nules' y embolsadas; flores emasculadas, polinizadas con polen de 'Valencia' y embolsadas).

$D_j$ : efecto del  $j$ -ésimo bloque ( $j$ : 1, 2,3...14)

$\epsilon_{ij}$ : error experimental

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PARTENOCÁRPICA

#### 4.1.1. Presencia de semillas

En el experimento realizado en “El Repecho”, los resultados confirman el comportamiento partenocárpico de ‘Afourer’, ya que el 99 % de los frutos en plantas a las que se les impidió la polinización cruzada, no presentaron semillas (Cuadro 1). Estos datos concuerdan con lo publicado por Agustí et al. (2005), Chao (2005b) en España y EEUU respectivamente. La presencia de frutos con semillas fue residual, dos frutos en 200 evaluados y el promedio de semillas por fruto fue de 0.04, este valor es coincidente con lo reportado en el registro del cultivar ‘Afourer’ (US Patent 10,480 1998). La ausencia de semillas en las plantas aisladas podría atribuirse a la exclusión de abejas que es el principal agente polinizador (Frost y Soost 1968, Guardiola 1997) y no necesariamente a un mecanismo de autocompatibilidad o falta de viabilidad de gametos.

Cuadro 1: Porcentaje de frutos sin semillas y número de semillas por fruto en mandarina ‘Afourer’ en condiciones de polinización libre y bajo malla.

Tratamiento	% de frutos sin semillas	No. semillas por fruto (total frutos)
Polinización libre	34 b <sup>z</sup>	4 a
Bajo malla	99 a	0,04 b

<sup>z</sup> Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

A pesar de encontrarse bajo condiciones de polinización libre y con una fuerte presión de agentes polinizadores, el 34 % de los frutos en las plantas testigo no presentaron semillas. Esto indica que los frutos partenocárpicos de ‘Afourer’ poseen alta habilidad de competencia frente a frutos que se desarrollan con semillas. Esta habilidad de competencia podría estar relacionada a elevados niveles endógenos de giberelinas sintetizadas en las paredes de los ovarios partenocárpicos (Talón et al., 1992). Experimentos realizados en condiciones de libre polinización en el norte del país por Otero y Rivas (2010) y en España por Agustí et al. (2005), presentan resultados similares en cuanto al porcentaje de frutos sin semillas y el número de semillas por fruto.

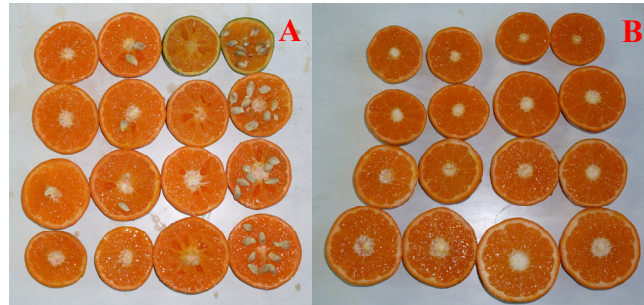


Figura 7: Corte transversal de frutos cosechados de plantas en condiciones de polinización libre y bajo malla. A) Frutos con semillas de plantas en polinización abierta. B) Frutos sin semillas de plantas bajo malla.

La presencia de semillas en polinización libre indica que para las condiciones de cultivo del noroeste de Uruguay, el cultivar ‘Afourer’ presenta compatibilidad con algunas de las variedades cultivadas próximas al experimento (Figura 8). Teniendo en cuenta el reporte de Chao et al. (2005a) quienes encontraron que en una plantación de cítricos el transporte de polen por las abejas puede alcanzar hasta 960 metros, y que para las condiciones de California se necesitarían 640 mts para que una variedad actuara como filtro entre otras dos compatibles, se considera que en este experimento, variedades como Ortanique, Valencia, Clemend’or, ‘Ellendale’ y limón Ana Claudia (próximas al cuadro del experimento), serían potenciales donadoras de polen, restando conocer la capacidad polinizadora y la viabilidad del polen de ellas.

El rango de semillas por fruto fue de cero a veinte; teniendo en cuenta la clasificación realizada por Barry (2004), comercialmente estos frutos pertenecen a la categoría “con semillas”.

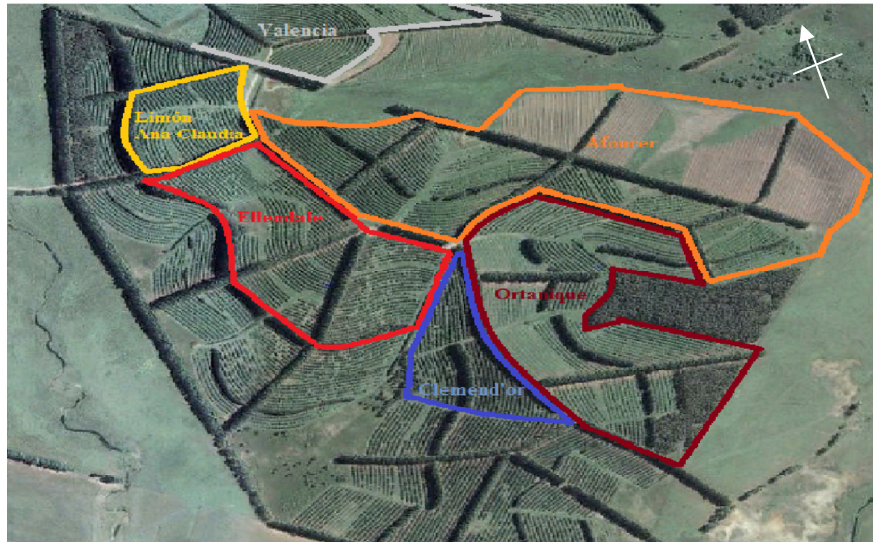


Figura 8: Mapa del cuadro de mandarina ‘Afourer’ y cuadros linderos en el establecimiento “El Repecho”

#### 4.1.2. Componentes del rendimiento

Para evaluar cómo incidió el aislamiento de las plantas a nivel productivo se colectaron todos los frutos y se midió el número y peso de frutos por planta al momento de madurez (Cuadro 2).

Cuadro 2: Componentes del rendimiento en plantas de mandarinas ‘Afourer’ en condiciones de polinización libre y bajo malla.

Tratamiento	Rendimiento (Kg/pl)	No. frutos por planta	Peso/Fruto (g)
Polinización libre	10,5	117	88,3
Bajo malla	10,1	115	87,6

El número y peso de frutos por planta fue igual en ambas situaciones comprobando la alta capacidad partenocárpica de ‘Afourer’. Para las condiciones del experimento fue posible mejorar la calidad de los frutos por ausencia de semillas sin afectar el rendimiento (figura 9).



Figura 9: Producción de fruta de planta en condiciones de polinización libre (derecha) y planta bajo malla (izquierda).

La similitud en el número de frutos por planta entre tratamientos, es contrastante con los datos presentados por Otero y Rivas (2010) ya que aislando plantas de este mismo cultivar obtuvieron una reducción significativa en el número de frutos por planta, como consecuencia de las mayores temperaturas registradas bajo las mallas. Las condiciones de secano en las cuales fue realizado ese experimento, es otro factor que podría haber afectado el cuajado. En nuestras condiciones si bien se constatan diferencias de temperatura entre los tratamientos (Figura 10), no fueron relevantes para afectar la productividad.

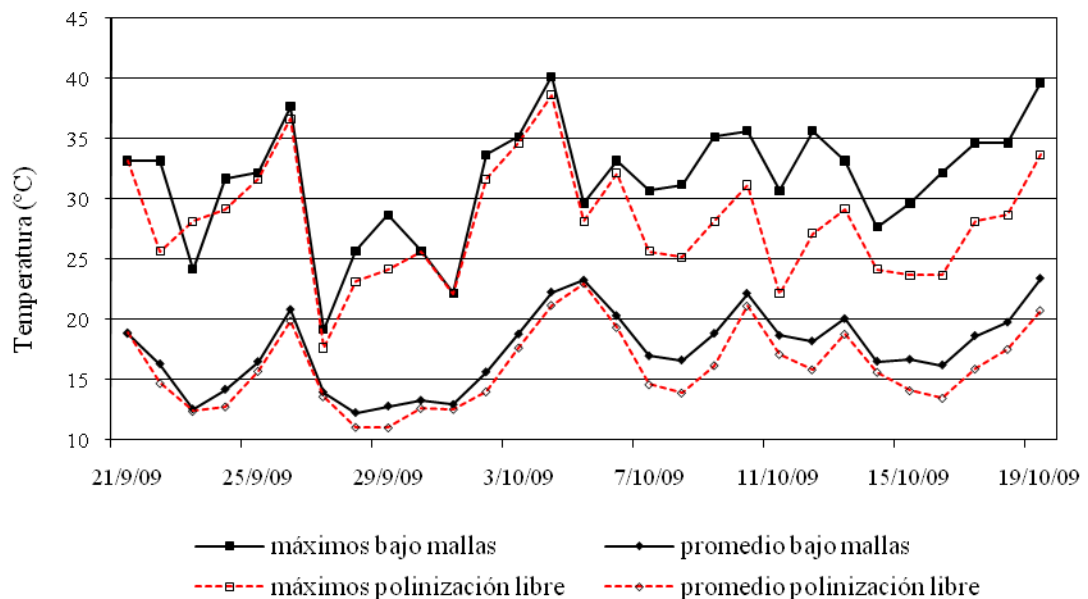


Figura 10: Evolución de temperaturas máximas y promedio bajo cobertura de mallas y al aire libre durante la floración.

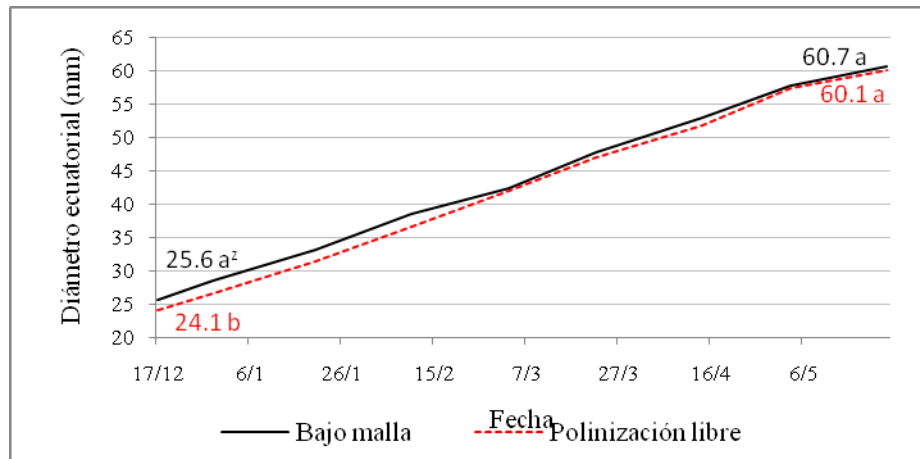
En este sentido Fasiolo et al. (2010) reportan que en el tanger 'Ortanique' la acumulación de temperaturas mayores a 30 °C durante toda la fase I de crecimiento, es el principal factor exógeno que afecta el porcentaje de cuajado final. En nuestro experimento la existencia de picos de más de 35 °C durante el mes post anthesis en las plantas bajo malla, no parece ser causa suficiente para afectar el cuajado final. No obstante, se observó un adelantamiento del ciclo de desarrollo de los frutos, de aproximadamente 7 días con respecto al testigo en condiciones de polinización abierta. Observaciones en el campo permitieron determinar que las plantas bajo malla alcanzaron plena floración antes que las plantas en polinización libre. Asimismo una mayor abscisión inicial de estructuras reproductivas (651 estructuras por planta bajo malla y 150 por planta en polinización libre) confirman el adelantamiento del ciclo en condiciones bajo malla.

Papadakis et al. (2009) proponen que en plantaciones puras de cultivares autoincompatibles, el resultado es una tendencia a baja carga de frutos y de tamaño pequeño. En este caso 'Afourer' presentó un comportamiento diferente y quizá explicado por la alta habilidad partenocárpica. Esto indicaría que la aislación de plantas mediante mallas en plantaciones comerciales podría ser una práctica de manejo que permita obtener fruta sin semillas con buenos rendimientos.

#### 4.1.3. Evolución del tamaño de los frutos en condiciones de libre polinización y bajo malla

El diámetro ecuatorial presenta una evolución lineal típica de la fase II de crecimiento de los frutos cítricos y al final la tasa de crecimiento decrece coincidiendo con el inicio de la maduración (Figura 11). Los frutos de las plantas aisladas, desde el inicio de las mediciones presentan diámetros significativamente mayores en comparación con los testigos. El mayor tamaño inicial se explica porque en el momento de realizar las mediciones, estos frutos se encontraban en etapas de desarrollo más avanzadas que los testigos y además crecieron en condiciones de menor competencia inicial. Según Agustí (2003a) temperaturas entre 20 y 22 °C son óptimas para el desarrollo de los frutos cítricos, en este sentido las temperaturas promedio registradas bajo mallas son las que más se aproximan a este rango.





<sup>z</sup> Letras diferentes en cada fecha indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Figura 11: Evolución de diámetro de frutos de mandarina ‘Afourer’ en condiciones de polinización libre y bajo malla.

Al retirar las mallas, las condiciones de crecimiento de los frutos entre los tratamientos fueron las mismas (igual número de frutos por planta y temperatura ambiental), la diferencia entre el tamaño de los frutos en plantas en polinización libre y bajo malla fueron disminuyendo, y finalmente los frutos de las plantas en polinización libre alcanzaron el mismo tamaño que los frutos de las plantas bajo malla. A partir de este experimento se deduce que el cultivar ‘Afourer’ no necesita del estímulo de la formación de semillas para alcanzar tamaños comercialmente aceptables cuando los frutos se desarrollan “en condiciones de igual competencia” (todos sin semillas). Estos resultados son contradictorios con los obtenidos por Otero y Rivas (2010), quienes al aislar plantas encontraron tamaños de fruto significativamente menores.

En condiciones de polinización libre, los frutos que presentaron diámetro pequeño (<55 mm) tuvieron bajo número de semillas y excepcionalmente se pudo encontrar algún fruto con alto contenido de semillas (Figura 12), al igual que altos valores de diámetro ecuatorial se correlacionaron con alto número de semillas ( $r=0,61$ ).

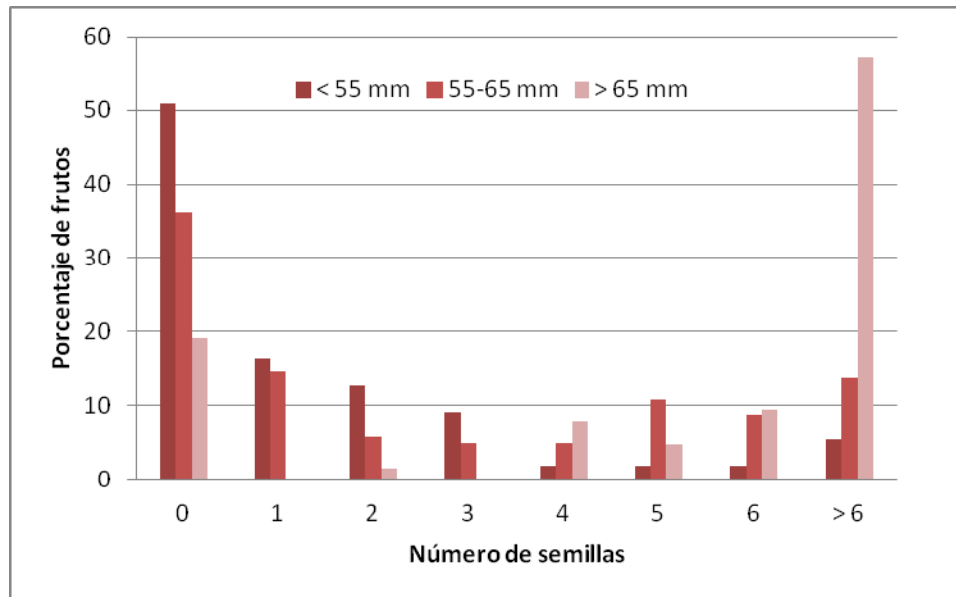


Figura 12: Porcentaje de frutos de mandarina ‘Afourer’ en tres rangos de diámetro según número de semillas por fruto, en plantas de polinización abierta.

Esto se puede atribuir a que las semillas son sitio de síntesis de hormonas que fortalecen la capacidad sumidero de los frutos (Frost y Soost 1968, Agustí y Almela 1991, Chao 2005b, Iglesias et al. 2007). Por lo tanto las semillas adquieren importancia en el crecimiento de frutos, cuando estos se desarrollan en condiciones de competencia con frutos sin semillas. Para este mismo cultivar Pardo et al. (2010) encontraron una correlación de 0.44 entre el tamaño de frutos y el número de semillas por fruto y Chouza et al. (2011) en ‘Montenegrina’ obtuvieron un  $r$  de 0.53. Estos resultados indican que solo una parte del tamaño final del fruto puede explicarse por el contenido de semillas, existiendo otros factores que intervienen como el tipo de brote e intensidad de floración (Gravina, 1999).

#### 4.2. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DE GAMETOS FEMENINOS Y MASCULINOS

Previo a la antesis, en flores en estado de botón alargado (59 BBCH), se constató la ausencia de granos de polen sobre los estigmas, lo cual permite establecer que esta variedad no presenta cleistogamia (Figura 13).

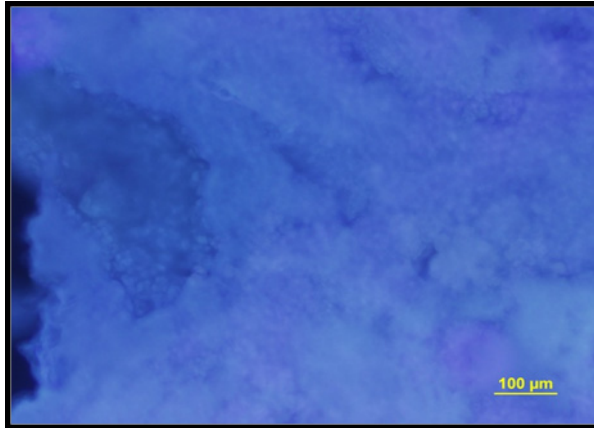


Figura 13: Estigma de flor en estado fenológico de botón alargado (59 BBCH), observado en microscopio de fluorescencia.

En el tratamiento de plantas bajo malla, la exclusión de los agentes polinizadores no impidió la llegada de polen al estigma, sin embargo el número de granos de polen sobre el estigma fue sensiblemente menor que en las plantas testigo (Cuadro 3).

Cuadro 3: Número de granos de polen germinados, crecimiento de tubos polínicos (en porcentaje del pistilo recorrido) y viabilidad de óvulos (en porcentaje), en flores de brotes terminales de plantas en polinización abierta y bajo malla, para cuatro fechas de muestreo.

Día	Tratamiento	No. granos germinados	Crecimiento tubo polínico en % recorrido	Viabilidad óvulos (%)
0	Polinización libre	0	-	100
	Bajo malla	0	-	100
3	Polinización libre	159	19	100
	Bajo malla	1	20	100
6	Polinización libre	604	37	100
	Bajo malla	70	42	100
9	Polinización libre	727	95	100
	Bajo malla	65	40	100

Hasta el día seis post anthesis la distancia recorrida por los tubos polínicos dentro de los pistilos fue similar en las dos situaciones, confirmando que el polen de ‘Afourer’ no solo es viable sino que es capaz de germinar en el estigma de sus flores (Figura 14A y 14B).

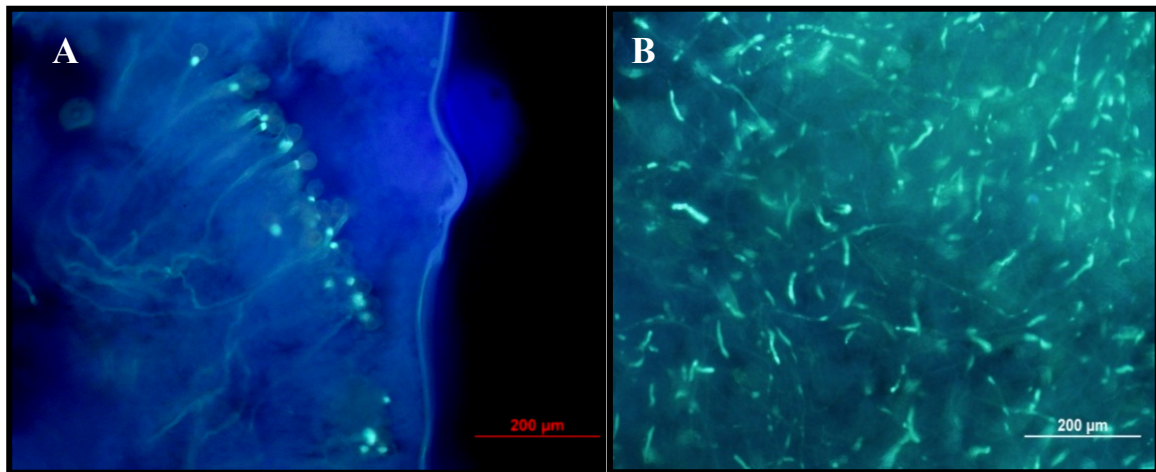


Figura 14: Crecimiento de tubos polínicos en el estigma, observados con microscopio de fluorescencia. A) Estigma de flor con baja densidad de granos de polen en planta bajo malla. B) Estigma de flor con alta densidad de tubos polínicos en polinización abierta.

A partir de los 6 días post antesis se apreció una detención del crecimiento de los tubos polínicos de las flores en las plantas aisladas, alcanzando el 40 % del largo del pistilo. Esto estaría mostrando que está ocurriendo una reacción de incompatibilidad a nivel de la porción superior del estilo, al igual que sucede en mandarinas ‘Fortune’ y ‘Nova’ (Distefano et al., 2009), lo cual indica que están operando mecanismos de autoincompatibilidad de tipo gametofítico, como lo reporta Ollitrault et al. (2007) para cítricos. Según de Nettancourt (1977), Newbiggin et al. (1993) los tubos polínicos no avanzan más allá de la mitad del pistilo cuando ocurre este tipo de incompatibilidad. No obstante, Gómez et al. (2004) proponen que en mandarinas, el sitio de inhibición puede ocurrir en la base del estilo, en el ovario o en los óvulos. Existen controversias entre diversos autores en cuanto al modo en que se determina el sitio donde ocurre la reacción de incompatibilidad. En este sentido Khan y DeMason (1986) sostienen que en el tangelo ‘Orlando’, el estigma es el sitio donde los tubos polínicos detienen su crecimiento, aun cuando un número pequeño de tubos polínicos llegaron al estilo. Esta propuesta se basa en medidas cuantitativas, donde la mayoría de los tubos son inhibidos a lo largo del pistilo. Sin embargo cuando se realizan polinizaciones compatibles, a nivel del estilo también se da una reducción significativa del número de tubos polínicos en crecimiento, y no es causado por la acción de un mecanismo de incompatibilidad a nivel del estigma (Gómez et al. 2004, Distefano et al. 2009). Además, según Distefano et al. (2009) al comparar cruzamientos de variedades incompatibles y compatibles, no encontraron diferencias a nivel del estigma, y sí una reducción significativa de tubos polínicos en el estilo cuando operaban mecanismos de incompatibilidad. Por otro lado, es importante considerar el momento en que ocurre la reacción de incompatibilidad.

Cuando se autopolinizan flores de 'Fortune' y 'Nova' un día previo a la antesis, los tubos polínicos no detuvieron su crecimiento y llegaron directo al ovario (Distefano et al., 2009). Este hecho, junto a temperaturas cálidas próximas a floración que podrían ocasionar la apertura floral con pistilos inmaduros como sucede en *Prunus armeniaca* (Rodrigo y Herrero, 2002), podría resultar en la fecundación con polen autoincompatible.

En las flores de las plantas en polinización abierta, los tubos polínicos alcanzaron la base de los pistilos a los 9 días post antesis. Para otros cultivares de cítricos se han reportado diversas tasas de crecimiento de tubos polínicos a lo largo del pistilo. Gómez et al. (2004) en polinizaciones con cultivares de cítricos inter-compatibles encontraron que los tubos polínicos alcanzaron el ovario en solamente dos días luego de la polinización. Esta elevada tasa de crecimiento de los tubos, es atribuida a las condiciones ambientales, principalmente temperatura.

Los óvulos no mostraron síntoma de degeneración ocasionado por la deposición de calosa (Rodrigo y Herrero, 1998), al menos hasta los 9 días para las dos situaciones (Figura 15). En condiciones de polinización abierta la llegada de tubos polínicos a la base del pistilo, la viabilidad de óvulos y la presencia de semillas en los frutos cosechados, confirman que la fecundación se da con normalidad. Por lo tanto se descarta la existencia de anomalías en el guiado de los tubos polínicos por parte de los óvulos como existe en mandarina Satsuma 'Owari' y naranja 'Valencia' (Mesejo et al., 2007).

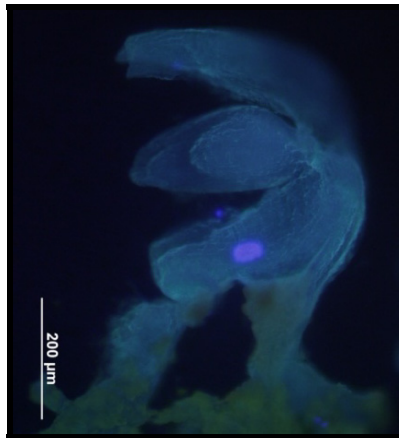


Figura 15: Fotografía de fluorescencia de óvulo sin deposición de calosa de flor en polinización abierta muestreada 9 días post antesis.

Nuestros resultados sugieren que ni la capacidad de crecimiento del polen ni la viabilidad de óvulos estarían condicionando el PPE en 'Afourer'. Al no haberse establecido el período de receptividad estigmática en nuestro experimento, no se pudo

determinar la duración del PPE para las condiciones del noroeste del Uruguay. En las condiciones de España ‘Satsuma Owari’, que es un cultivar de mandarina altamente partenocárpico, el PPE está condicionado por la viabilidad de los óvulos, y apenas alcanza dos días. En ‘Clemenules’ y ‘Valencia’ el PPE es de ocho días y está limitado por el período de receptividad estigmática (Mesejo et al., 2007).

#### 4.3. ESTUDIOS DE AUTOPOLINIZACIÓN, POLINIZACIÓN CRUZADA Y GERMINACIÓN DE POLEN IN VITRO

##### 4.3.1. Cuajado, presencia y número de semillas por fruto

En general el cuajado de frutos en las polinizaciones artificiales fue alto ubicándose en el rango de 40 a 73 %. Se verificó un efecto significativo de la fuente de polen en el cuajado de frutos de ‘Afourer’, siendo los de polinización libre y los polinizados con ‘Valencia’, los tratamientos que indujeron mayor cuajado (Cuadro 4). En los experimentos realizados por Chao (2005b) en las condiciones de California, ‘Afourer’ presentó un comportamiento diferente ya que el tratamiento de polinización libre solamente cuajó el 12.2 %. Esta diferencia puede ser explicada porque los brotes terminales escapan a la competencia inicial entre flores donde se da gran abscisión de estructuras reproductivas y se desarrollan en condiciones ambientales más favorables para el cuajado (Lovatt et al. 1984, Da Cunha Barros et al. 2006). En nuestro trabajo, las flores utilizadas fueron todas de flor terminal y las polinizaciones se realizaron en la fase final del período de floración.

Cuadro 4: Cuajado final (%), frutos con semillas (%) y número de semillas por fruto en condiciones de autopolinización, polinización cruzada y polinización impedida.

Tratamiento	Cuajado final (%)	Frutos con semillas (%)	Número de semillas/fruto (de frutos con semilla)		Número de semillas/fruto (del total de frutos)
			Promedio	Rango	
Testigo	73 a <sup>z</sup>	27 b	1,7 b	1-6	0,5 b
‘Valencia’	67 a	88 a	3 ab	1-9	2,6 a
‘Afourer’	41 b	5 cd	4 a	2-8	0,2 b
‘Clemenules’	40 b	21 bc	1,8 b	1-5	0,4 b
Embolsado	49 b	0	---	---	---
Emasculado	42 b	0	---	---	---

<sup>z</sup> Medias seguidas por distinta letra dentro de cada columna difieren estadísticamente (p<0,05)

Con los resultados obtenidos se puede afirmar que el porcentaje de cuajado de 'Afourer' en condiciones de polinización artificial es alto en comparación con otras variedades como 'Nova' (12,8 % polinizado con 'Orlando', Hearn et al., 1969), 'Ellendale' (15,7 % polinizado con 'Imperial', Vithanage, 1991), 'Oroval' (15 %, polinizado con 'Murcott' e 'Imperial', Wallace, 2004). En nuestro experimento la polinización con polen de 'Clemenules' no tuvo efecto en el cuajado de frutos. Esto se debe a que esta variedad presentó anteras defectuosas, de color blanquecino y con poco contenido de polen. Esta característica se confirmó en etapas de laboratorio, donde no fue posible alcanzar la dehiscencia de las anteras y obtener polen para su siembra. De acuerdo a Frost y Soost (1968), las anteras normales y maduras son de color amarillo brillante debido al polen que contienen. En el caso que las anteras no contengan polen o éste sea defectuoso, el color de las mismas es crema pálido o blanco y usualmente no abren.

El alto cuajado de las flores emasculadas confirma la alta habilidad partenocárpica de 'Afourer' en las condiciones del noroeste de Uruguay, lo cual es diferente a lo obtenido por Chao (2005b), que solo obtuvo un cuajado del 1 % al emasculas sus flores. El cuajado de las flores emasculadas también permite afirmar que la partenocarpia en 'Afourer' es facultativa y vegetativa, ya que produce frutos sin semillas cuando se impide la polinización y no necesita del estímulo de la polinización para producir frutos. En los cítricos los cultivares de alto índice de partenocarpia producen las giberelinas promotoras del crecimiento celular en las paredes del ovario (Monselise 1977, Talón et al. 1992).

Si se compara este comportamiento partenocárpico con otras variedades que se cultivan en Uruguay, se observa un muy buen desempeño en cuanto al cuajado de frutos con respecto a 'Nova' y 'Ortanique', mientras que en relación a mandarinas 'Satsumas' y naranjas 'Navel' estas diferencias no serían relevantes (Gravina y Gambetta, 2009).

El elevado porcentaje de frutos sin semillas en polinización libre (73 %), puede explicarse porque las flores fueron seleccionadas y marcadas en etapas avanzadas de la floración; por lo tanto la disponibilidad de polen foráneo y actividad polinizadora de las abejas se vio disminuida. A su vez el cuadro donde se realizó el experimento se encuentra rodeado de 'Afourer', y el polinizador más cercano es naranja 'Valencia'. Este porcentaje de frutos partenocárpicos difiere notoriamente del encontrado en el experimento con plantas enteras (34 % de frutos aspermos), donde la floración coincidió con el resto de las variedades cultivadas y hubo más posibilidades que ocurriera polinización cruzada.

'Afourer' presentó buena afinidad con el cultivar 'Valencia', de acuerdo a la baja proporción de frutos sin semilla y el número de semillas por fruto (entre 1 y 9) (Cuadro 4). Bono et al. (2000) al utilizar 'Fortune', 'Nova' y 'Ortanique' como polinizadores de 'Afourer' encontraron que el número promedio de semillas fue de 9, 10

y 7, respectivamente y los proponen como cultivares afines. Si bien en nuestro experimento el polen de ‘Valencia’ alcanzó solo un 2% de germinación in vitro, el 88 % de los frutos tuvieron semillas. En este caso el porcentaje de germinación del polen no presentó relación con la presencia de semillas.

En las polinizaciones con ‘Clemenules’, si bien el 20 % de frutos tuvieron semillas, el promedio de semillas por fruto fue bajo en comparación con ‘Valencia’ (Cuadro 4). Pardo et al. (2007) obtuvieron alto porcentaje de germinación de polen de mandarina ‘Clemenules’ demostrando su viabilidad, y además reportan una alta afinidad con ‘Afourer’ (21 semillas por fruto). Para este cruzamiento, Chao (2005b) obtuvo un número promedio de 11 semillas por fruto, con un mínimo de uno y un máximo de 24 semillas. A partir de nuestro experimento, no es posible confirmar el grado de afinidad entre estos cultivares, debido a la baja densidad de polen con la que se contó para realizar la polinización dirigida.

El polen de ‘Afourer’ alcanzó un 25 % de germinación in vitro lo que representa un valor elevado. Considerando que en el tratamiento de flores embolsadas no se encontraron semillas, se confirma nuevamente la autoincompatibilidad. En las flores polinizadas con ‘Afourer’ y embolsadas, tres frutos presentaron semillas, lo que podría deberse a la alta presión de polen sobre el estigma cuando la polinización se realiza artificialmente.

#### 4.3.2. Diámetro de frutos

Se realizó el seguimiento del tamaño de los frutos desde 65 días post anthesis hasta cosecha, para evaluar el efecto del estímulo de la polinización y formación de semillas (Figura 16). Los frutos originados de flores emasculadas fueron significativamente más pequeños al momento de cosecha que el resto de los tratamientos (Cuadro 5). Posiblemente exista una relación entre la polinización y el tamaño final del fruto, independientemente de si se forman semillas o no. Esto resulta a partir de los datos obtenidos para los frutos provenientes de las flores embolsadas y autopolinizadas, que no tuvieron semillas, pero sí el estímulo de la polinización que promueve la división celular en el ovario durante la fase I de desarrollo del fruto, incrementando el tamaño potencial de los mismos.



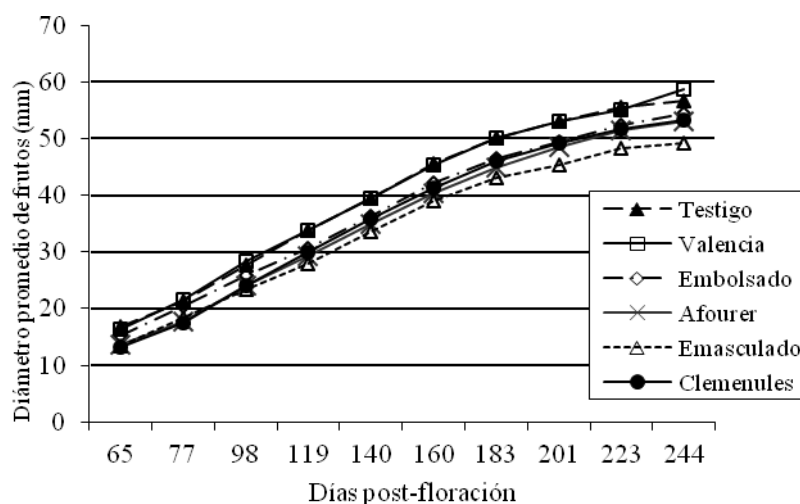


Figura 16: Evolución del diámetro ecuatorial de frutos (mm) según los días post floración para los diferentes tratamientos de polinización.

Cuadro 5: Diámetro ecuatorial de frutos en el momento de cosecha para los diferentes tratamientos de polinización.

Tratamiento	14-jun
‘Valencia’	58.7 a <sup>z</sup>
Testigo	56.5 ab
Embolsado	54.7 bc
‘Afourer’	53.7 c
‘Clemenules’	52.5 c
Emasculado	49.7 d

<sup>z</sup> Medias seguidas por distinta letra dentro de cada columna difieren estadísticamente ( $p < 0,05$ )

Los frutos producidos por la polinización con ‘Valencia’ son los que obtuvieron significativamente el mayor tamaño final, en comparación a todos los tratamientos a excepción del testigo. De los frutos testigo apenas un 30 % tuvieron semillas, mientras que en el caso de los polinizados con ‘Valencia’ el 88 % de los frutos poseían semillas, por lo que en estas condiciones el efecto de las semillas en el crecimiento del fruto fue poco consistente.

## 5. CONCLUSIONES

- El cultivar 'Afourer' presenta autoincompatibilidad ya que sus gametos son viables pero la autopolinización natural no es capaz de producir semillas.
- El tipo de autoincompatibilidad es gametofítica, pues los granos de polen germinan en su propio estigma pero el crecimiento de los tubos polínicos se detiene en la primera parte del estilo.
- El cultivar 'Afourer' presenta alta habilidad partenocárpica, de acuerdo al similar porcentaje de cuajado y número de frutos en condiciones de aislamiento, autopolinización y de libre polinización.
- Esta mandarina produce frutos sin semillas únicamente cuando la polinización cruzada es impedida, por lo que la partenocarpia es facultativa. A su vez, la partenocarpia es de tipo vegetativa ya que flores emasculadas y embolsadas lograron cuajar sin estímulo de polen.
- La ausencia de semillas en plantas aisladas de polinización cruzada, no afectó el rendimiento ni el tamaño de los frutos.
- El origen genético del polen afectó en forma significativa el cuajado y el tamaño de los frutos en 'Afourer'; el polen de 'Valencia' presentó alta afinidad con 'Afourer'.

## 6. RESUMEN

El mercado internacional de mandarinas para consumo en fresco exige cada vez más fruta sin semillas. Es en este contexto que en Uruguay se ha apostado al cultivo de variedades sin semillas, entre ellas el cultivar 'Afourer' es una de las más importantes de reciente introducción, ocupando el 3.2 % de la superficie total dedicada a mandarinas en el Uruguay. Desde la industria cítrica ha surgido la preocupación por la presencia de un número variable de semillas en frutos de esta variedad, que reducen su valor comercial. Con el objetivo de estudiar el comportamiento reproductivo de 'Afourer', caracterizar su comportamiento productivo cuando la polinización es impedida y determinar su compatibilidad con distintos cultivares presentes en el país, se plantearon tres experimentos en el departamento de Paysandú. En el primero se aislaron plantas para impedir la polinización cruzada y se dejaron testigos en condiciones de polinización libre. El rendimiento fue igual en ambas condiciones y el 99 % de los frutos en plantas aisladas no presentaron semillas, lo que confirmó la muy buena habilidad partenocárpica del cultivar. En el segundo, se realizó el seguimiento de flores en microscopio de fluorescencia desde anthesis a 9 días posteriores, lo que permitió deducir que los gametos femenino y masculino son viables por lo menos hasta el noveno día. El impedimento del crecimiento del tubo polínico luego del sexto día de anthesis demuestra que el cultivar 'Afourer' presenta autoincompatibilidad de tipo gametofítica. En el tercer experimento se realizaron seis tratamientos: flores polinizadas con naranja 'Valencia', mandarinas 'Clemenules', 'Afourer' y polinización libre, flores embolsados y flores emasculados y embolsados. Se midió el cuajado final, porcentaje de frutos con semilla, número de semillas por fruto y evolución del diámetro de frutos. 'Valencia' fue la variedad con mayor afinidad con 'Afourer', ya que los frutos de este cruzamiento fueron los que presentaron mayor cuajado, mayor proporción de frutos con semilla y mayor número de semillas por fruto. A su vez, junto con los frutos obtenidos por polinización libre, fueron los que presentaron el mayor diámetro final. Por el contrario, la polinización con 'Clemenules' no permitió obtener conclusiones fiables ya que las anteras fueron defectuosas impidiendo una polinización normal. La ausencia de semillas en frutos producto de la polinización con 'Afourer' reafirma la existencia de autoincompatibilidad en este cultivar. Por último, se constató un efecto de la polinización sobre el tamaño final de los frutos, ya que los frutos de flores emasculadas fueron significativamente más pequeños comparados a los del resto de los tratamientos.

Palabras clave: 'Afourer'; Autoincompatibilidad; Partenocarpia; Polinización; Semillas.

## 7. SUMMARY

Seedless fruits are increasingly demanded in the fresh consumption international market. Considering this aspect, in Uruguay, *Citrus* producers are selecting seedless varieties. Indeed, 'Afourer' mandarin, which is one of the most important recently introduced variety, occupies the 3.2 % of the total mandarin cultivated area. Citrus industry has worried about the presence of seeds in this cultivar fruits, which depreciate its commercial value. The objectives of this work were to study 'Afourer' reproductive behavior, its parthenocarpic ability and the pollination efficiency of two commercial varieties cultivated in Uruguay. Three experiments were carried out in Paysandú location. In the first one, plants were isolated with nets avoiding cross-pollination, and control plants remained under open pollination conditions. Both treatments resulted in the same yield, and 99 % of the isolated fruits were seedless, which confirms the high parthenocarpic ability of this cultivar. In the second experiment, flowers from each treatment were observed from anthesis to 9 days after by fluorescence microscope, indicating that female and male gametes were viable at least until the ninth day after anthesis. Pollen tube growth arrest in the style from the sixth day after anthesis in self-pollination, exposes that 'Afourer' mandarin has gametophytic type self-incompatibility. In the third experiment six treatments were performed: flowers pollinated with 'Valencia' orange, 'Clemenules' and 'Afourer' mandarin, open pollinated flowers, isolated flowers, and emasculated and isolated flowers. Fruit set, seeded fruit percentage, number of seeds per fruit and fruits size, were measured. 'Valencia' orange was the most compatible variety with 'Afourer', due to the highest fruit set, seeded fruits proportion and number of seeds per fruit. Besides, this fruits, together with those obtained from open pollination, resulted in the largest size. On the other hand, no reliable results were obtained from the pollination with 'Clemenules' mandarin, due to defective anthers. The absence of seeds in fruits from the artificial self-pollination, reaffirms the existence of self-incompatibility in 'Afourer' mandarin. Finally, a pollination effect on fruit size was observed, since fruits obtained from emasculated flowers were smaller than the others.

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

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. AGUSTÍ, M.; ALMELA, V. 1991. Aplicación de fitorreguladores en citricultura. Barcelona, Aedos. 261 p.
2. \_\_\_\_\_; ZARAGOZA, S.; BLEIHOLDER, H.; BUHR, L.; HACK, H.; KLOSE, R.; STAUB, R. 1995. Escala BBCH para la descripción de estadios fenológicos del desarrollo de los agrios (Gén. Citrus). Levante Agrícola. 332: 189-199.
3. \_\_\_\_\_. 2003a. Citricultura. 2ª. ed. Madrid, Mundi-Prensa. 422 p.
4. \_\_\_\_\_.; MARTÍNEZ-FUENTES, A.; MESEJO, C.; JUAN, M.; ALMELA, V. 2003b. Cuajado y desarrollo de los frutos cítricos. Valencia, Generalitat Valenciana. 80 p. (Serie de Divulgación Técnica no. 55).
5. \_\_\_\_\_. 2004. Fruticultura. Madrid, Mundi-Prensa. 493 p.
6. \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; REIG, C.; MESEJO, C. 2005. Comportamiento agronómico del tangor "Afourer". Levante Agrícola. 375: 124-128.
7. ALLEN, A.M.; HISCOCK, S.J. 2008. Evolution and phylogeny of self-incompatibility systems in angiosperms. In: Franklin-Tong, V.E. ed. Self-incompatibility in flowering plants- evolution, diversity, and mechanisms. Berlin, Springer-Verlag. pp. 73-101.
8. AZCÓN-BIETO, J.; TALÓN, M. 2008. Fundamentos de fisiología vegetal. 2a.ed. Madrid, McGraw-Hill. 651 p.
9. BAIN, J.M. 1958. Morfological, anatomical and physiological changes in the development fruit of the Valencia orange, (*Citrus sinensis* (L.) OBSECK). Australian Journal of Botany. 6: 1-24.
10. BANERJI, I. 1954. Morfological and cytological studies on *Citrus grandis* Obseck. Phytomorphology. 4: 390-396.
11. BARRY, G.H. 2004. The quest for seedless citrus fruit. In: International Citrus Congress (10º, 2004, Agadir, Marruecos). Proceedings. s.l., International Society of Citriculture. p. 346.
12. BONO, R.; SOLER, J.; BUJ, A. 2000. Parámetros de calidad de los cítricos. El problema de las semillas. Revista Comunidad Valenciana Agraria. 16: 7-15.

13. 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.
14. BREWBAKER, J.L. 1957. Pollen cytology and self-incompatibility systems in plants. *Journal of Heredity*. 48: 271-277.
15. \_\_\_\_\_; KWACK, B.H. 1963. The essential role of calcium ion in the pollen tube growth. *American Journal of Botany*. 50 (9): 859-865.
16. BUDAR, F.; PELLETIER, G. 2001. Male sterility in plants; occurrence, determinism, significance and use. *Life Sciences*. 324: 543-550.
17. CHAO, C.T.; FANG, J; DEVANAND, P.S. 2005a. Long distance pollen flow in mandarin orchards determined by AFLP markers-implications for seedless mandarin production. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 130 (3): 374-380.
18. \_\_\_\_\_. 2005b. Pollination study of mandarins and the effect on seediness and fruit size; implications for seedless mandarin production. *HortScience*. 40 (2): 362-365.
19. CHOUZA, X.; GRAVINA, A.; BORGES, A. 2011. Control de la autopolinización, germinación del polen y crecimiento del tubo polínico en mandarina "Montenegrina". *Agrociencia*. 15 (1): 27-36.
20. DA CUNHA BARROS, M.; GRAVINA, A. 2006. Influencia del tipo de brote en el cuajado y crecimiento del fruto del tangor 'Ortanique'. *Agrociencia*. 10 (1): 37-46.
21. DE NETTANCOURT, D. 1977. *Incompatibility in angiosperms*. Berlin, Springer. 230 p.
22. DI RIENZO, J.A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C.W. 2011. Grupo InfoStat. (en línea). Córdoba, Argentina, Universidad Nacional de Córdoba. FCA. Consultado 18 nov. 2011. Disponible en <http://www.infostat.com.ar>
23. DISTEFANO, G.; LAS CASAS, G.; LA MALFA, S.; GENTILE, A.; TRIBULATO, E. 2009. Pollen tube behavior in different mandarin hybrids. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 134 (6): 583-588.

24. ERNER, Y.; SHOMER, I. 1996. Morphology and anatomy of stems and pedicels of spring flush shoots associated with citrus fruit set. *Annals of Botany*. 77: 537-545.
25. ESAU, K. 1982. Anatomía de las plantas con semilla. (en línea). Buenos Aires, Hemisferio Sur. s.p. Consultado set. 2011. Disponible en [http://www.fagro.edu.uy/~botanica/www\\_botanica/recursos/curso\\_botanica/botanica\\_recursos\\_bibliograficos.html](http://www.fagro.edu.uy/~botanica/www_botanica/recursos/curso_botanica/botanica_recursos_bibliograficos.html)
26. 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). Trabajos presentados*. Montevideo, Facultad de Agronomía. pp. 68-71.
27. FAUST, M. 1989. *Physiology of temperate zone fruit trees*. Maryland, Wiley. 338 p.
28. FRANKEL, R.; GALUM, E. 1977. *Pollination mechanisms, reproduction and plant breeding*. Berlin, Springer. 281 p.
29. FROST, H.B.; SOOST, R.K. 1968. Seed reproduction: development of gametes and embryos. *In: Reuther, W.; Batchelor, L.; Webber, H. eds. The citrus industry*. Berkeley, University of California. v. 2, cap. 4, pp. 290 – 319.
30. GILLASPY, G.; BEN-DAVID, H.; GRUISSEM, W. 1993. Fruits; a developmental perspective. *The Plant Cell*. 5: 1439-1451.
31. GOLDSCHMIDT, E.E.; MONSELISE, S.P. 1977. Physiological assumptions toward the development of a citrus fruiting model. *In: International Citrus Congress (1977, Orlando). Proceedings*. Proceedings of International Society of Citriculture. Florida. 2: 668-672.
32. GOMEZ, N.L.; GARCÍA, E.A.; CASTILLO, A.M.; CORONA, T.; ALMAGUER, G. 2004. Pollen tube growth in mandarin. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 27: 177-182.
33. GRAVINA, A. 1998. Producao de cítricos para exportacao no Uruguai. *In: Seminario Internacional de Citros-tratos Culturais (5°, 1998, Bebedouro). Anais*. Bebedouro, Luis Carlos Donadio y Ody Rodriguez. pp. 273-288.
34. \_\_\_\_\_. 1999. Ciclo fenológico-reproductivo en citrus; bases fisiológicas y manejo. Montevideo, Facultad de Agronomía. 55 p.

35. \_\_\_\_\_.; GAMBETTA, G. 2009. Comportamiento productivo y manejo diferencial en cultivares de citrus. Montevideo, Facultad de Agronomía. 17 p.
36. GUARDIOLA, J.L. 1997. Overview of flower bud induction, flowering and fruit set. (en línea). Florida, s.e. Consultado ago. 2011. Disponible en [http://irrec.ifas.ufl.edu/flcitrus/pdfs/short\\_course\\_and\\_workshop/citrus\\_flowering\\_97/Guardiola-Overview\\_of\\_Flower\\_Bud\\_Induction.pdf](http://irrec.ifas.ufl.edu/flcitrus/pdfs/short_course_and_workshop/citrus_flowering_97/Guardiola-Overview_of_Flower_Bud_Induction.pdf)
37. HEARN, C.J.; REECE, P.C.; FENTON, R. 1969. Self-incompatibility and the effects of different pollen sources upon fruit characteristics of four *Citrus* hybrids. In: International Citrus Symposium (1<sup>st</sup>, 1969, Riverside). Proceedings. Riverside, California, Riverside Color Press. pp. 183-187.
38. HERREO, M. 2001. Ovary signals for directional pollen tube growth. *Sex Plant Reproduction*. 14: 3-7.
39. HESLOP-HARRISON, J. 1975. Incompatibility and the pollen-stigma interaction. *Annual Review of Plant Physiology*. 26: 403-425.
40. IGLESIAS, D.J.; CERCÓS, M.; COLMENERO-FLORES, J.M.; NARANJO, M.A.; RIOS, G.; CARRERA, E.; RUIZ-RIVERO, O.; LISO, I.; MORILLON, R.; TADEO, F.R.; TALON, M. 2007. Physiology of citrus fruiting. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 19 (4): 333-362.
41. IWAMASA, M. 1966. Studies on the sterility in genus citrus with special reference to the seedlessness. *Bulletin of the Horticulture Research Station*. B6: 1-81.
42. JACKSON, L.K. 1997. Seed development in citrus. (en línea). Riverside, s.e. Consultado ago. 2011. Disponible en [http://irrec.ifas.ufl.edu/flcitrus/pdfs/short\\_course\\_and\\_workshop/citrus\\_flowering\\_97/Jackson-Seed\\_Development.pdf](http://irrec.ifas.ufl.edu/flcitrus/pdfs/short_course_and_workshop/citrus_flowering_97/Jackson-Seed_Development.pdf)
43. JAHN, O.L. 1973. Inflorescences type and fruiting patterns in Hamlin and Valencia oranges and Marsh grapefruit. *American Journal of Botany*. 60 (7): 663-670.
44. KHAN, T.L.; DEMASON, D.A. 1986. A quantitative and structural comparison of *Citrus* pollen tube development in cross-compatible and self-incompatible gynoecia. *Canadian Journal of Botany*. 64: 2548-2555.
45. \_\_\_\_\_.; CHAO, C.T. 2004. Mysteries of mandarins; sex, seedlessness and new varieties. (en línea). San Diego, CA, University of California. 9 p. (Citrus Varieties Collection no. 662). Consultado ago. 2011. Disponible en <http://cesandiego.ucdavis.edu/files/54349.pdf>



46. KAO, T.; MCCUBBIN, A.G. 1996. How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. In: *Frontiers in Plant Biology: How Plants Communicate* (133, 1996, s.l.). Proceedings. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. s.n.t. pp. 12059-12065
47. KEARNS, C.A.; INOUE, D.W. 1993. *Techniques for pollination biologists*. s. l., University of Colorado. 538 p.
48. KREZDORN, A.H. 1967. The influence of seeds and pollen source on the size of fruit. *Florida Agricultural Experiment Stations Journal Series no. 2868*: 37-43.
49. LERSTEN, N.R. 2004. *Flowering plant embryology with emphasis on economic species*. (en línea). Ames, Iowa, Blackwell. Consultado set. 2011. Disponible en [http://www.fagro.edu.uy/~botanica/www\\_botanica/recursos/curso\\_botanica/botanica\\_recursos\\_bibliograficos.html](http://www.fagro.edu.uy/~botanica/www_botanica/recursos/curso_botanica/botanica_recursos_bibliograficos.html)
50. LOVATT, C.J.; STREETER, S.M.; MINTER TC; O'CONNELN NV.; FLAHERTY, DL.; FREEMAN, MW.; GOODELL, PB. 1984. Phenology of flowering in *Citrus sinensis* [L.] Osbeck, cv. 'Washington' Navel orange. In: *International Citrus Congress (5°. 1984, Sao Paulo, Brazil)*. Proceedings. s.n.t. pp. 186-190.
51. MATILLA, A.J. 2008. Desarrollo y germinación de semillas. In: Azcón-Bieto J.; Talón, M. ed. *Fundamentos de fisiología vegetal*. Madrid, McGraw-Hill Interamericana. pp. 537-558.
52. MATTON, D.P.; NASS, N.; CLARKE, A.E.; NEWBING, E. 1994. Self-incompatibility: how plants avoid illegitimate offspring. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91: 1992-1997.
53. MCCLURE, B.A.; GRAY, J.E.; ANDERSON, M.A.; CLARKE, A.E. 1990. Self-Incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA. *Nature*. 347: 757-760.
54. MESEJO, C.; MARTINEZ-FUENTES, A.; REIG, C.; AGUSTÍ, M. 2007. The effective pollination period in "Clemenules" mandarin, "Owari" Satsuma mandarin and "Valencia" sweet orange. *Plant Science*. 173: 223-230.

55. \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 2008. Gibberellic acid impairs fertilization in Clementine mandarin under cross-pollination conditions. *Plant Science*. 175 (3): 267-271.
56. MONSELISE, S.P. 1977. Citrus fruit development; endogenous system and external regulation. In: International Citrus Congress (1977, Orlando). Proceedings. Proceedings of International Society of Citriculture. Florida. 2: 664-668.
57. NEWBIGIN, E.; ANDERSON, M.A.; CLARKE, E. 1993. Gametophytic self-incompatibility systems. *The Plant Cell*. 5: 1315-1324.
58. OLIITRAULT, P.; 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.
59. OTERO, A.; RIVAS, F. 2010. Producción de semillas y métodos de control en el tangor 'Afourer' en el litoral norte de Uruguay. In: Simposio de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Citrus (3°, 2010, Salto). Trabajos presentados. Montevideo, Facultad de Agronomía. pp. 96-99.
60. PARDO, J.; BERMEJO, A.; CANO, A.; ZARAGOZA, S. 2007. La germinación del polen y la formación de las semillas en los cítricos. *Levante Agrícola*. 384: 16-20.
61. PARDO, E.; BORGES, A.; GRAVINA, A. 2010. Relación entre tamaño de fruto y número de semillas en mandarina 'Afourer'. In: Simposio de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Citrus (3°, 2010, Salto). Trabajos presentados. Montevideo, Facultad de Agronomía. pp. 104-107.
62. PANDEY, K.K. 1958. Time of S-allele action. *Nature*. 181 (4617): 1220-1221.
63. PAPADAKIS, L.E.; PROTOPAPADAKIS, E.E.; THERIOS, L.N. 2009. Yield and fruit quality of "Nova" hybrid (Citrus clementina hotr. Ex Tanaka x (C. reticulata Blanco x C. paradisi Macfad) and two clementine varieties (C. clementina hotr. Ex Tanaka) as affected by self- and cross-pollination. *Scientia Horticulturae*. 121 (1): 38-41.
64. PODESTÁ, L. 2007. Floración, polinización y cuaje. In: Sozzi, G.O. ed. Árboles frutales ecofisiología, cultivo y aprovechamiento. Buenos Aires, Facultad de Agronomía. pp. 285-305.

65. POEHLMAN, J.M.; SLEPER, D.A. 2005. Mejoramiento genético de las cosechas. 2ª. ed. México, Limusa. 511 p.
66. RAZA, H.; MUMTAZKHAN, M.; ALIKHAN, A. 2003. Seedlessness in Citrus. *International Journal of Agriculture and Biology*. 5 (3): 388-391.
67. RIVAS, F.; BERTALMIÓ, A.; MANZI, M. 2010. La reconversión varietal en la citricultura uruguaya: un enfoque holístico en tiempos de cambio. *Revista INIA*. no. 21: 41-44.
68. RODRIGO, J; HERRERO, M. 1998. Influence of intraovular reserves on ovule fate in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Sexual Plant Reproduction*. 11: 86-93.
69. \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 2002. Effects of pre-blossom temperatures on flower development and fruit set in apricot. *Scientia Horticulturae*. 92 (2): 125-135.
70. RUIZ, R.; GARCÍA-LUIS, A.; MONERRI, C.; GUARDIOLA, J.L. 2001. Carbohydrate availability in relation of fruitlet abscission in Citrus. *Annals of Botany*. 87: 805-812.
71. SANZOL, J.; RALLO, P.; HERRERO, M. 2003. Stigmatic receptivity limits the effective pollination period in 'Agua de Aranjuez' Pear. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 128 (4): 458-462.
72. SAUNT, J. 2000. Citrus varieties of the world, an illustrated guide. 2nd. ed. Norwich, Sinclair. 156 p.
73. SCHNEIDER, H. 1968. The anatomy of Citrus. In: Reuther, W.; Batchelor, L.; Webber, H. eds. *The Citrus Industry*. Berkeley, University of California. v. 2, cap. 1, pp. 1-85.
74. SIJACIC, P.; WANG, X.; SKIRPAN, A.L.; WANG, Y.; DOWD, P.E.; MCCUBBIN, A.G.; HUANG, S.; KAO, T. Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature*. 429: 302-305
75. SILVA, N.F.; GORING, D.R. 2001. Mechanisms of self-incompatibility in flowering plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 58: 1988-2007.
76. SOLER, J. 1999. Reconocimiento de variedades de cítricos en campo. Valencia, Generalitat Valenciana. 188 p. (Serie de Divulgación Técnica no. 43).

77. SPIEGEL-ROY, P.; GOLDSCHMIDT, E.E. 1996. Biology of citrus. Cambridge, Cambridge University. 230 p.
78. STANLEY, R.G.; LINKESKENS, H.F. 1974. Pollen; biology, chemistry, management. New York, Springer. 307 p.
79. TADEO, F.R.; PRIMO-MILLO, E. 1990. Peroxidase activity changes and lignin deposition during the senescence process in *Citrus* stigmas and styles. Plant Science. 68: 47-56.
80. \_\_\_\_\_; 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)
81. TALON, M.; ZACARIAS, L.; PRIMO-MILLO, E. 1992. Gibberellins and parthenocarpic ability in developing ovaries of seedless mandarin. Plant Physiology. 99: 1575-1581.
82. UNITED STATES PATENT. s.f. Mandarin tangerine called Nadorvott. (en línea). Washington, D. C. s.p. Consultado nov. 2011. Disponible en <http://www.google.com.uy/patents?hl=es&lr=&vid=USPATPP10480&id=R8EZAAAEBAJ&oi=fnd&dq=united+states+patent+nadori&printsec=abstract#v=onepage&q=united%20states%20patent%20nadori&f=false>
83. URUGUAY. MINISTERIO DE GANADERÍA, AGRICULTURA Y PESCA. DIRECCIÓN DE ESTADÍSTICAS AGROPECUARIAS. 2011. Encuesta cítrica primavera 2010. Montevideo. 25 p.
84. VARDI, A.; LEVIN, I.; CARMI, N. 2008. Induction of seedlessness in citrus; from classical techniques to emerging biotechnological approaches. Journal of the American Society of Horticultural Science. 133(1): 117-126.
85. VASIL, I.K. 1987. Physiology and culture of pollen. International Review of Cytology. 107: 127-174.
86. VITHANAGE, V. 1991. Effect of different pollen parents on seediness and quality of 'Ellendale' tangor. Scientia Horticulturae. 48: 253-260.
87. WALLACE, H.M. 2004. Pollination effects on quality in 'Oroval Clementine' mandarin in Australia. Acta Horticulturae. no. 632: 99-102.

88. WILLIAMS, R.R. 1965. The effect of summer nitrogen applications on the quality of apple blossom. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 40: 31-41.
89. YAMAMOTO, M.; MATSUMOTO, R.; YAMADA, Y. 1995. Relationship between sterility and seedlessness in Citrus. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 64 (1): 23-29.
90. YAMASAKI, A.; KITAJIMA, A.; OHARA, N.; TANAKA, M.; HASEGAWA, K. 2007. Histological study of expression of seedlessness in Citrus kinokuni 'Mukaku Kishu' and its progenies. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 132 (6): 869-875.
91. YE, W., QIN, Y.; YE, Y.; TEIXEIRA DA SILVA, J.A.; ZHANG, L.; WU, X.; LIN, S.; HU, G. 2009. Seedless mechanism of a new mandarin cultivar "Wuzishatangju" (*Citrus reticulata* Blanco). *Plant Science*. 177 (1): 19-27.