

C.1

Universidad Autónoma Chapingo

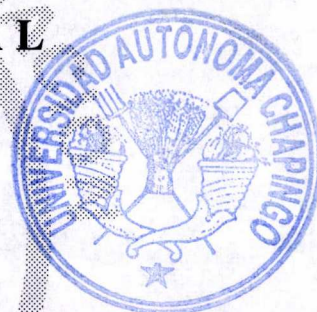
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

**POLINIZACIÓN Y AMARRE DE FRUTO EN
TANGERINA 'MÓNICA' (*Citrus* sp.) //**

TESIS PROFESIONAL

Que como Requisito Parcial
para obtener el Grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN
HORTICULTURA**



DIRECCION ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

PRESENTA

FITOTECNIA

NORMA LIDIA GÓMEZ ALVARADO

B.1693533



**HORTICULTURA
posgrado**
universidad autónoma chapingo

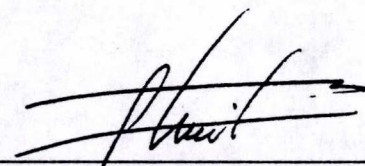
Chapingo, Méx., agosto del 2000

POLINIZACIÓN Y AMARRE DE FRUTO EN TANGERINA 'MÓNICA'
(*Citrus* sp.)

Tesis realizada por Norma Lidia Gómez Alvarado bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

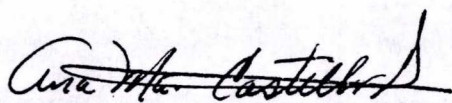
MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR:



DR. EDILBERTO AVITIA GARCÍA

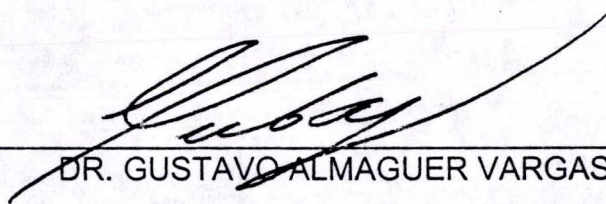
ASESOR:



A. 36832

DRA. ANA MARÍA CASTILLO GONZÁLEZ

ASESOR:



DR. GUSTAVO ALMAGUER VARGAS

Texcoco, Edo. de México, agosto del 2000

POLINIZACIÓN Y AMARRE DE FRUTO EN TANGERINA 'MÓNICA'
(*Citrus* sp.)

El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de Norma Lidia Gómez Alvarado autora de la presente tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura estuvo constituido por:

PRESIDENTE:



DR. EDILBERTO AVITIA GARCÍA

ASESOR:



DRA. ANA MARÍA CASTILLO GONZÁLEZ

ASESOR:



DR. GUSTAVO ALMAGUER VARGAS

Texcoco, Edo. de México, agosto del 2000

AGRADECIMIENTOS

A DIOS por su infinita grandeza, que permitió alcanzar mis objetivos, por la fortaleza que me ha proporcionado y ruego me siga ayudando para seguir adelante

A la Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria (DGETA), por haberme otorgado las facilidades para realizar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico, que me otorgó durante mis estudios de Maestría en Ciencias en Horticultura.

A la Universidad Autónoma de Chapingo, al Departamento de Fitotecnia, y a la Coordinación de Maestría en Ciencias en Horticultura por haberme otorgado la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría.

Al Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario No. 135 por haberme dado todas las facilidades para la culminación de mis estudios de posgrado.

Al Dr. Edilberto Avitia García, por la dirección de ésta tesis, orientación, comprensión y valiosos consejos, así como por la paciencia otorgada durante la realización de la misma.

A la Dra. Ana María Castillo González por todas sus aportaciones recibidas durante el desarrollo de la presente investigación, así como por la revisión y corrección del presente.

Al Dr. Gustavo Almaguer Vargas, por su orientación y colaboración, para el desarrollo de la presente investigación, así como por la revisión y corrección de la misma.

DEDICATORIA

Con todo mi cariño, a mis hijas Alejandra, Ariadna y Adirem Pérez Gómez, por la motivación que siempre me brindaron así como por su comprensión durante mis estudios de maestría.

Con cariño a mi esposo Gerardo, por su estímulo y apoyo decidido, que ayudaron a lograr mi superación profesional.

A mis queridos padres, Juan e Inés a quienes debo mi existencia, a mi madre quien de encontrarse entre nosotros estaría orgullosa de mis logros.

De manera muy especial dedico esta tesis a mi querida tía Magdalena quien tanto se preocupó por mi formación, y dejó en mí sus valiosas enseñanzas de la vida, esperando sus ilusiones se hayan cumplido.

DATOS BIOGRÁFICOS

La autora de la presente tesis es originaria del estado de Chihuahua, realizó sus estudios de Licenciatura en la Universidad Autónoma de Chihuahua en la generación 1978-1982, egresó con la especialidad de Fitotecnia, de la Facultad de Ciencias Agrícolas. Durante el período de 1983-1990 trabajó en Aseguradora Nacional Agrícola y Ganadera S. A. desempeñando el puesto de Inspector Ajustador y Dictaminador. Posteriormente ingresó a la Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria, durante el período de 1991 a 1996 desempeñó el puesto de profesor y apoyo al área educativa en el Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario No. 135 de Arroyo Hondo, Misantla, Veracruz. Realizó estudios de Maestría en Ciencias en Horticultura con orientación en Fruticultura en el Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo generación (1997-1998) y actualmente se encuentra laborando como docente en el CBTa No. 135 de Arroyo Hondo, Misantla, Veracruz.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	v
I INTRODUCCIÓN	1
1. 1 Objetivos	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Taxonomía.	3
2.2 Estructura Floral.....	5
2. 2. 1 Estructura floral en angiospermas.....	5
2. 2. 1. 1 Cáliz.	6
2. 2. 1. 2 Corola.....	7
2. 2. 1. 3. Androceo.....	7
2. 2. 1. 4. Gineceo.....	9
2. 2. 2. Estructura floral de cítricos.....	12
2. 3 Polinización.....	15
2. 3. 1. Agentes polinizantes.....	16
2. 3. 1. 1. Agentes abióticos.....	16
2. 3. 1. 2. Agentes bióticos.....	18
2. 4. Pruebas de Viabilidad del Polen.....	21
2. 4.1. Pruebas de germinación <i>in vitro</i>	22
2. 4.2. Pruebas de tinción.....	24
2. 4.3. Pruebas <i>in vivo</i>	25
2. 5 Fase Prográmica.....	28
2. 5. 1. Germinación del polen.....	29
2. 5. 2. Desarrollo del tubo polínico.....	31
2. 6 Doble Fecundación.....	35
2. 6. 1. Fusión celular.....	36
2. 7 Mecanismos que conducen a la fecundación cruzada.....	37
2. 7. 1. Incomatibilidad sexual.....	37

2. 7. 2. Esterilidad.....	44
2. 7. 3. Dicogamia.	45
2. 7. 4. Dioecismo.....	46
2. 8. Amarre de Fruto.	46
III. MATERIALES Y METODOS	53
3. 1 Localización.....	53
3. 2 Clima.	53
3. 3 Material Vegetal Utilizado.....	54
3. 4 Polinizaciones.	57
3. 4. 1. Polinización libre (P.L.).....	57
3. 4. 2 Autopolinización.	57
3. 4. 3. Polinización cruzada (P.C.).	58
3. 5 Procesamiento y observación de los tubos polínicos.....	59
3. 6 Germinación de polen en condiciones <i>in vitro</i>	60
3. 7 Pruebas de tinción para viabilidad de polen.....	61
3. 8 Cuantificación del amarre de fruto y semillas.....	61
3.9. Análisis Estadístico	62
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
4.1. Germinación del Polen y desarrollo del tubo polínico <i>in vivo</i>	63
4.1.1. Polinización libre	67
4. 1.2. Autofecundación.....	70
4.1. 3. Polinización cruzada.....	76
4. 1. 4. Germinación de polen en condiciones <i>in vitro</i>	81
4.1.5. Pruebas de tinción para viabilidad de polen.....	82
4. 1. 6. Influencia de la fuente de polen sobre amarre de fruto.	83
V. CONCLUSIONES	87
VI.-LITERATURA CITADA	89

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Número de granos de polen y desarrollo de tubos polínicos en cuatro cultivares de cítricos, bajo condiciones de polinización libre, 48 horas después de antesis.	68
Cuadro 2. Número de granos de polen y desarrollo de tubos polínicos en cuatro cultivares de cítricos, bajo condiciones de polinización libre, 96 horas después de antesis.	69
Cuadro 3. Número de tubos polínicos en el ovario en cuatro cultivares de cítricos, bajo condiciones de polinización libre, en diferentes tiempos después de antesis.	70
Cuadro 4. Número de granos de polen y desarrollo de tubos polínicos en autofecundación de cuatro cultivares de cítricos, 48 horas después de antesis.	71
Cuadro 5. Número de granos de polen y desarrollo de tubos polínicos en autofecundación de cuatro cultivares de cítricos, 96 horas después de antesis.	74
Cuadro 6. Número de tubos polínicos en el ovario en cuatro cultivares de cítricos, en autofecundación, a diferentes tiempos después de antesis.	75
Cuadro 7. Número de granos de polen y desarrollo de tubos polínicos en tangerina 'Mónica' usando diversas fuentes de polen, 48 horas después de la polinización.	78
Cuadro 8. Número de granos de polen y desarrollo de tubos polínicos en tangerina 'Mónica' usando diversas fuentes de polen, 96 horas después de la polinización.	80
Cuadro 9. Número de tubos polínicos en el ovario de tangerina 'Mónica' usando diferentes fuentes de polen, a diversos tiempos después de polinización.	81
Cuadro 10. Número y porcentaje de granos de polen viables (promedio de 16 campos de observación) de cuatro cultivares de cítricos, usando 2.5 diphenyl 3(α - naphthyl) tetrazolium, incubados a una temperatura de 40-45° C durante 4 horas.	83
Cuadro 11. Influencia de la fuente de polen sobre el amarre de frutos en tangerina 'Mónica'	84
Cuadro 12. Influencia de la fuente de polen sobre el tamaño de fruto en tangerina 'Mónica'	85

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Distribución de los tratamientos de polinización en la tangerina 'Mónica'. Dentro de cada árbol, los nombres de los cultivares en los cuadrantes corresponden a las fuentes de polen (progenitores masculinos); P. L. = polinización libre; $\otimes$ = autopolinización. Obsérvese la rotación en la distribución..... 56
- Figura 2. A; granos y tubos polínicos sobre el estigma (po=grano de polen; tp=tubo polínico; st=tejido estigmático). B. Tubos polínicos creciendo en el estilo (ts=tejido estilar; tp=tubo polínico). C; tubos polínicos creciendo a lo largo del haz vascular (hv=haz vascular; tp=tubo polínico; ts=tejido estilar). D; tapón de calosa en un tubo polínico (ts=tejido estilar; tp=tubo polínico)..... 65
- Figura 3. E; tubos polínicos creciendo en el estilo (tc=tapón de calosa). F; tubos polínicos penetrando los óvulos (nu=nucela; tp=tubo polínico; mi=micrópilo; te=tegumento externo; ti=tegumento interno). G; grano de polen germinando *in vitro* (po=grano de polen; tp=tubo polínico). H; tinción de granos de polen (pv=grano de polen viable; pn=grano de polen no viable)..... 66
- Figura 4. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la germinación de polen de tres cultivares de cítricos. 82
- Figura 5. Número de semillas y diámetro de los frutos en cruza de cítricos, usando diferentes fuentes de polen..... 86

RESUMEN

NORMA LIDIA GÓMEZ ALVARADO¹

POLINIZACIÓN Y AMARRE DE FRUTO EN TANGERINA 'MÓNICA' (*Citrus* sp.)

Bajo la dirección de: Edilberto Avitia García².

La tangerina 'Mónica' se introdujo al estado de Veracruz en los años 50's y se le han visto posibilidades para el mercado debido a que presenta buenas características del fruto; sin embargo, tiene el inconveniente de amarrar poco fruto, lo cual se cree que puede deberse a algún problema de incompatibilidad sexual. Con base en ello, se plantearon como objetivos conocer si la carga polínica recibida por el estigma es suficiente y viable, así como determinar si hay algún tipo de incompatibilidad que limite el amarre de frutos y semillas. Para tal propósito se desarrolló la investigación en el Ejido Agua Nacida, del municipio de Álamo, Veracruz. Se establecieron tratamientos de polinización libre y autopolinización en los cítricos 'Dancy', 'Reyna', 'Satsuma' y

¹ Resumen de la tesis que, presenta el autor como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Horticultura.

² Director de tesis: Profesor Investigador de tiempo completo del Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. 56230.

'Mónica', así como tratamientos de polinización cruzada, usando como progenitor femenino a 'Mónica' y como donadores de polen a 'Dancy', 'Reyna' y 'Satsuma'. Para conocer la calidad del polen se hicieron pruebas de tinción y germinación *in vitro*. Los resultados muestran que la carga polínica sobre el estigma no es una limitante para el bajo amarre de frutos. Tanto la tangerina 'Mónica' como la mandarina 'Satsuma' presentan autoincompatibilidad del tipo gametofítico, ya que en ninguno de los casos se encontraron tubos polínicos en el ovario. Aunque los tubos polínicos no manifestaron las características frecuentemente reportadas para otras especies con este tipo de autoincompatibilidad, los granos de polen germinaron y los tubos polínicos llegaron a la parte inferior del ovario. Con base en el desarrollo de los tubos polínicos, se encontró que 'Dancy' y 'Reyna' pueden ser buenos polinizadores para 'Mónica', siempre y cuando coincidan en su período de floración, ya que en tan sólo en 48 horas después de haber realizado la polinización los tubos alcanzaron al ovario. En las pruebas de tinción y germinación de polen *in vitro*, 'Mónica' presentó los más altos porcentajes, seguido por 'Reyna' y 'Satsuma', aunque las pruebas de tinción resultaron sobreestimadas (hasta el doble) con respecto a la germinación *in vitro*. No se obtuvo amarre de fruto en los tratamientos de autofecundación de 'Mónica', y en los tratamientos de polinización libre y cruzada tampoco se encontró correlación del número de semillas con el diámetro ecuatorial del fruto.

Palabras clave: Autofecundación, polinización cruzada, pruebas *in vitro*, tubo polínico, autoincompatibilidad.

SUMMARY

NORMA L. GÓMEZ ALVARADO

POLINIZACIÓN AND DE FRUIT-SET IN 'MÓNICA' TANGERINE (*Citrus* sp.)

Under the direction of: Edilberto Avitia García.

The 'Mónica' tangerine was introduced in Veracruz, México, in the 50's and it could have some possibilities for the market because it has good characteristic of fruit; however, it has low fruit set and some problems related to sexual incompatibility. Then objectives of this study were to know if the pollen grains have a good viability, as well as to determinate if there is incompatibility that limits the fruits-set and seeds. The research was carried out in Agua Nacida, Álamo, Veracruz. The treatments were open pollination and self-pollination using 'Dancy', 'Reyna', 'Satsuma' and 'Mónica' citrus, as well as treatments of cross-pollination, using 'Mónica' as female parent and the pollen donators were 'Dancy', 'Reyna' and 'Satsuma'. In order to know the pollen quality staining test were carried out as well as *in vitro* germination tests. Our results showed the pollen load on the stigma wasn't limitation to the fruits-set. So both, the 'Mónica' tangerine and 'Satsuma' mandarin had gametophytic self-

incompatibility, since they didn't show pollen tube in the ovary. Although the pollen tubes didn't manifest the typical characteristics in other species with this type of self-incompatibility, the pollen grains germinated and the pollen tubes reached to the inferior part of the ovary. Thus 'Dancy' and 'Reyna' citrus could be good 'Mónica' pollinizers, when they coincide in the flowering period, since in 48 hours after pollination the pollen tubes reached the ovary. The 'Mónica' tangerine had the highest percentages of the pollen viability, followed by 'Reyna' and 'Satsuma', although the stain test resulted higher than *in vitro* germination. The 'Mónica' self-fertilization didn't have any fruit set. The number of seeds didn't have any correlation with the fruits size derived from open pollination and cross- pollination.

Key words: Self-pollination, cross-pollination, *in vitro* tests, pollen tube, self-incompatibility.

I. INTRODUCCIÓN

México es un importante productor de cítricos a nivel mundial; junto con Estados Unidos, Brasil, Japón, España e Italia, aporta alrededor del 80% de la producción mundial (Ramírez, 1991).

Dentro de los cítricos el naranjo es la especie con mayor producción en nuestro país; el 95% de ésta especie corresponde al cultivar Valencia Tardía, siendo Veracruz el principal estado productor, quien tiene el 46 % de la superficie citrícola nacional; su área de producción se localiza en la parte Norte - Centro, principalmente en los municipios de: Álamo, Martínez de la Torre, Gutiérrez Zamora, Tihuatlán, Tuxpan, Tecolutla y Papantla, que en conjunto representan el 94% de la superficie citrícola estatal (Curti, 1991). El precio de la naranja está regido por la ley de la oferta y la demanda, por ello durante la época de mayor producción (diciembre a mayo) el precio es demasiado bajo y repercute en la economía de los productores. Buscando alternativas de solución, la tangerina 'Mónica' por sus características sobresalientes (fruto de mesa, innovadora, buen sabor, buena apariencia, maduración tardía), fue introducida durante los 50's para tratar de competir en

el mercado (Sr. Cuervo¹; comunicación personal). Sin embargo, el objetivo no fue alcanzado por el bajo amarre de fruto que esta especie presenta y cuya causa se aduce a la falta de polinizadores y posiblemente a la presencia de autoincompatibilidad gametofítica. La situación anterior motivó a la realización del presente estudio, cuyos objetivos son:

- Conocer si los granos de polen, depositados sobre el estigma, son suficientes para tener una fecundación aceptable.
- Determinar, a través del estudio de desarrollo del tubo polínico, si hay algún tipo de autoincompatibilidad que limite el amarre de fruto
- Seleccionar el mejor polinizador para 'Mónica'
- Determinar los porcentajes de viabilidad de polen en condiciones *in vitro* en los cítricos 'Mónica', 'Dancy', 'Reyna' y 'Satsuma'.

¹ Sr: Roberto Cuervo M. Productor sobresaliente y pionero del cultivo de la tangerina Mónica' del Municipio de Tihuatlán, Veracruz.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Taxonomía

La clasificación sistemática de los cítricos es un problema que los especialistas consideran como complejo. Lo cual se atribuye a su facultad de hibridación y de mutación (Praloran, 1977).

El género *Citrus* se ubica en la división Magnoliophyta; clase Magnoliopsida; orden Geraniales; familia Rutaceae; tribu *Citreae* y subtribu *Citrinae* (Soost y Roose, 1996).

Swingle y Reece (1967) incluyeron seis géneros dentro de la subtribu *Citrinae*. Dos de ellos (*Poncirus* y *Fortunella*) son notablemente tolerantes al frío y pueden cruzarse con *Citrus* para obtener híbridos. Otros dos géneros (*Eromocitrus* y *Microcitrus*) se encuentran en estado silvestre, casi exclusivamente en Australia, y se han podido cruzar con *Citrus* y *Poncirus*, respectivamente. El sexto género del grupo (*Clymenia*) se conoce sólo en

Nueva Irlanda, aunque se piensa que en Riverside, California, hay algunos híbridos de éste con *Citrus* (Soost y Roose, 1996).

El género *Citrus* es el que comprende un mayor número de especies y variedades cultivadas (cultivares), dentro de las cuales se incluyen las mandarinas y las tangerinas.

Debido a la gran diversidad de formas, aún es controversial la nomenclatura de las mandarinas. El fundamento de reagrupación hecha por Swingle de todos los tipos de mandarinas en la especie *Citrus reticulata*, es puesto en duda por varios grupos de naturistas como Tanaka y Hodson (Praloran, 1977).

De acuerdo a la clasificación de Tanaka, actualmente se reconocen varios grupos naturales, los cuales son: a) Grupo Satsumas (*C. unshiu*), en el que se encuentran las mandarinas Satsumas 'Owari' y 'Clausellina'; b) Grupo Clementinas (*C. clementina*), en el los principales cultivares son 'Fino', 'Nules' y 'Orval'. Otras mandarinas, principalmente la mandarina común (*C. deliciosa*). Este grupo contiene algunas de las mandarinas más importantes como son: 'Dancy', 'Murcot', 'Ponkan' y 'Tankan' y los híbridos 'Nova', 'Fortune' y 'Robinson', entre otros (Amorós, 1995).

En lo que se refiere a sus características hortícolas, los cultivares de mandarina se distinguen también por su gran diversidad y pueden clasificarse

de acuerdo a: temporada de maduración, tamaño de fruto, color y adherencia de su epidermis, porcentajes de amarre de fruto, compatibilidad sexual y facultad para producir frutos partenocárpicos (Praloran, 1977).

2.2. Estructura Floral

2.2.1. Estructura floral en angiospermas

Las angiospermas o plantas con flores son las más complejas, así como las más comunes de todas las plantas, el nombre angiospermas se refiere al hecho de que las semillas se encuentran encerradas en una estructura especial, el ovario; incluyendo dentro de las angiospermas a casi todas las especies cultivadas, flores de jardín, arbustos comunes de hojas anchas, cereales y pastos (Cronquist, 1975).

Las plantas con semilla tienen un cuerpo muy evolucionado y con rastros de una especialización estructural y funcional. Expresándose en una diferenciación externa de órganos e internamente en varias categorías de células, tejidos y sistemas de tejidos. Se reconocen, generalmente, tres órganos vegetativos: raíz, tallo y hoja (Esau, 1982).

Desde el punto de vista estricto una flor, es un tipo particular de brote o vástago esporógeno determinado (Foster y Gifford, 1974). La flor es

considerada como un conjunto de órganos, algunos de los cuales son reproductores (estambres y carpelos) y otros estériles (sépalos y pétalos), dispuestos sobre un eje, el receptáculo (Esau, 1982).

2.2.1.1. Cáliz

A los sépalos colectivamente se les llama cáliz. A menudo los sépalos están unidos hacia la base por sus márgenes laterales formando un tubo. Los sépalos forman el grupo más externo de hojas florales, generalmente son de color verde y de textura más o menos foliácea, cubren y encierran las partes florales antes de que la flor abra, brindándole protección a las partes internas (Cronquist, 1975).

Esau (1982) indica que los sépalos se muestran poco modificados en su estructura interna, comparados con las hojas. Los cuales presentan un parénquima fundamental, sistema vascular más o menos ramificado y una epidermis.

Con frecuencia los sépalos son órganos fotosintéticos y es común que presenten estomas y tricomas en su superficie (Rudall, 1992).

2.2.1.2. Corola

Los pétalos colectivamente forman la corola (Cronquist, 1975). Es la parte más grande y vistosa de la flor, aunque en flores polinizadas por el viento el perianto es muy reducido y en ocasiones ausente (Rudall, 1992).

La pigmentación en los pétalos es la responsable del color y tiene una función específica en la atracción de los insectos polinizantes. Las células epidérmicas de los pétalos a menudo contienen aceites volátiles que confieren fragancia característica a las flores (Esau, 1982).

2.2.1.3. Androceo

En conjunto los estambres de una flor son llamados androceo, son los órganos masculinos de la flor. Cada estambre consiste de una antera dividida en sacos polínicos o microsporangios que son sustentados por un delgado filamento uninervado (Esau, 1982).

Mauseth (1988) mencionó que la función principal de los estambres es la producción de microsporas, pero en algunas especies parte de los estambres son convertidos a nectarios para atraer insectos polinizantes.

El filamento es relativamente simple en su estructura. El haz vascular está rodeado por parénquima y su epidermis cutinizada puede tener tricomas o

estomas (Rudall, 1992). El haz vascular atraviesa el filamento entero terminando en la base de la antera o en el tejido conectivo, ubicado entre las dos tecas de la antera (Esau, 1982).

Esau (1982) indicó que las anteras se localizan en la parte terminal del filamento y están divididas en sacos polínicos o microsporangios, donde se producen las microsporas. Generalmente la mayoría son tetrasporangiadas, del tipo de dos lóculos en cada uno de los lóbulos, variando en ocasiones . En las anteras por lo general se produce la dehiscencia; es decir, éstas se abren espontáneamente liberando el polen por una ranura normalmente pequeña (estomio), promovido por el encogimiento diferencial de la capa parietal subepidérmica (endotecio).

En las angiospermas el grano de polen actúa como un vínculo de transferencia de los gametofitos masculinos de la antera al estigma (Knox y Williams, 1986) y son cuerpos que tienen simetría radial o bilateral (Rudall, 1992).

Los granos de polen varían considerablemente en tamaño y forma; tienen dos paredes principales, una suave e interna llamada intina y otra dura externa llamada exina; la exina se subdivide en una capa esculturada llamada sexina y otra interna no esculturada llamada nexina (Huynh; citado por Rudall, 1982). La principal función de la pared del grano de polen de algunas plantas es absorber el agua del estigma (Elleman y Dickinson, 1994).

Los granos de polen dispersados por el viento se encuentran en alrededor del 30 % de familias de las angiospermas y se caracterizan por su forma esférica, variando en diámetro; con una superficie lisa, baja densidad y un contenido de almidón como fuente de energía (Baker y Baker; citados por Knox y Williams, 1986). En contraste, con los transportados por agentes bióticos, que son de una alta densidad y contienen lípidos de reserva y su tamaño varía ampliamente (Rudall, 1992).

2. 2. 1. 4. Gineceo.

Los carpelos son los órganos femeninos de la flor, en conjunto son llamados gineceo, los cuales se componen de: estigma, estilo y ovario (Cronquist, 1975).

El estigma es la estructura que recibe los granos de polen durante la polinización y hay dos tipos: secos y húmedos; los estigmas secos presentan una pequeña o ninguna superficie secretoria (Helsop-Harrison y Shivanna, 1977) y los húmedos se caracterizan por secretar un exudado que estimula o inhibe la germinación del grano de polen (Kapil y Bhatangar; citados por Pimienta, 1990).

El estilo es la superficie intermedia entre el estigma y el ovario, y a través de él ocurre el crecimiento intercelular del tubo polínico al ovario. El estilo es un

lugar fundamental de reacción de autoincompatibilidad gametofítica (Netancour; citado por Knox y Williams, 1986).

Knox (citado por Knox y Williams, 1986) menciona que hay tres tipos de estilos:

a) Estilo hueco. Donde el crecimiento del tubo polínico es a través de uno o varios canales que están cubiertos por una secreción musilaginosa y material coloidal líquido, que sirven para alimentar al tubo polínico durante su crecimiento (Yamada; citado por Pimienta, 1990). Son característicos de muchas monocotiledóneas (Williams *et al.*; citados por Knox y Williams, 1986). Los cítricos presentan este tipo de estilo, lo cual es indicado por Khan y De Mason (1986).

b) Estilos sólidos. Se presentan esencialmente en dicotiledóneas. El tubo polínico, después de penetrar el estigma crece a través de la matriz intercelular musilaginosa de un tejido de transmisión (Knox y Williams, 1986).

c) Estilos semisólidos. Tiene características intermedias y se presentan generalmente en cactáceas (Knox y Williams, 1986).

Esau (citada por Knox y Williams, 1986) indicó que el ovario a menudo es la parte mas grande del carpelo. Dentro de éste se encuentran de una a más cámaras, llamadas lóculos, que rodean a los óvulos. Foster y Gifford (1974)

mencionaron que los óvulos se encuentran unidos a la placenta del ovario por un tallo estrecho llamado funículo.

El óvulo consiste de una capa interna o nucela, rodeada por uno o más integumentos, que dejan una abertura pequeña llamada micrópilo y usualmente es la entrada del tubo polínico hacia el interior del óvulo durante el proceso de fecundación; la región donde se unen la nucela, los integumentos y el funículo es llamada cálaza, generalmente opuesta al micrópilo (Rudall, 1992).

El óvulo está encerrado en una cámara dentro del ovario, contiene el saco embrionario con sus gametos femeninos y células accesorias para la fecundación (Knox y Williams, 1986).

Dentro de los diferentes tipos de desarrollo del saco embrionario, el tipo *Polygonum* es el más común, el cual se desarrolla a partir de una simple megaspora, sufriendo una primera división meiótica en el plano transversal, dando origen a las diadas; seguido por una segunda división meiótica en cada una de las células diadas, resultando en una tétrada lineal; donde tres de las megasporas degeneran, mientras que la megaspora calazal se agranda y por medio de tres divisiones mitóticas sucesivas, da origen a un saco embrionario (haploide) con ocho núcleos (Foster y Gifford, 1974).

2.2.2. Estructura floral de cítricos

En regiones subtropicales con temperaturas frescas durante el invierno, la mayoría de los cítricos florecen una vez al año, al inicio de la primavera. En el trópico y áreas costeras subtropicales, la floración puede ocurrir varias veces al año o la época de floración puede ser más prolongada (Cameron y Soost, 1987).

En cítricos los brotes florales de primavera son producidos en madera del año anterior, de preferencia del flujo de primavera de un año de edad, pero también pueden originarse de brotes jóvenes (flujo de verano) o en madera de más de un año de edad. Existen diferencias entre cultivares, las cuales no han sido claramente definidas. Son reconocidos tres tipos principales de brotes: completamente vegetativos (solo con hojas); inflorescencias cortas únicamente con flores y una baja escala de inflorescencias mixtas, que llevan flores y hojas desarrolladas (Monselise, 1985).

Las inflorescencias en cítricos son parecidas a un racimo o pseudoumbela, pero contienen elementos de inflorescencia cimosa; con una diferencia considerable en tamaño y tiempo de apertura de las flores. La flor apical en un racimo es la más desarrollada, al igual que en una inflorescencia cimosa; sin embargo, las otras aumentan su tamaño en dirección basipétala como en los racimos (Monselise, 1985).

Monselise (1985) mencionó que las flores típicas del género *Citrus* presentan algunas diferencias entre especies; como son tamaño y color de los pétalos. Las flores, en general, son blancas y fragantes.

Las flores tienen entre cuatro y ocho pétalos lineales, generalmente gruesos y un cáliz con cuatro a cinco lóbulos. Los pétalos están imbricados en el botón pero se extienden e inclinan fuertemente hacia atrás durante la floración; normalmente existen cuatro veces más estambres que pétalos. Los estambres y los pétalos nacen en el receptáculo, inmediatamente abajo del disco anular corto, con aberturas grandes que secretan néctar; las anteras (de color amarillo brillante) rodean al pistilo al nivel o cerca del nivel del estigma; poseen dos lóculos y presentan dehiscencia longitudinal (Monselise, 1985). En algunos cultivares la dehiscencia puede ocurrir antes de la apertura de la flor (Cameron y Soost, 1987). En los pétalos los haces vasculares son generalmente paralelos; uno central usualmente más largo que los otros. Las glándulas de aceite están situados en los pétalos, justo debajo de la epidermis abaxial (Schneider, 1968)

El estilo es cilíndrico con muchos canales estilares, tantos como lóculos haya, y se expande hacia la superficie del estigma, el cual emerge del estilo como una corona. Algunas células epidérmicas modificadas en el estigma proporcionan un fluido viscoso y dulce desde dos o tres días antes de la antesis (Monselise, 1985) y ayuda a la retención y germinación de los granos de polen

(Soost y Roose, 1996). Los estigmas en algunos cultivares presentan papilas unicelulares alargadas (Kahn y DeMason, 1986).

Hassaneim y Ibrahim (citados por Free, 1970) reportaron que el porcentaje de concentración de azúcar del néctar en las diferentes especies de *Citrus* es: *C. aurantium*, 15%; *C. limon*, 15-18%; *C. paradisi*, 16%; *C. reticulata*, 22% y *C. sinensis*, 11-18%.

El gineceo en el género *Citrus* muestra un diseño radial (Monselise, 1985). El ovario comprende de 6-14 carpelos, unidos entre si a un eje central. En etapa muy temprana el pistilo es abierto y consiste de una pared celular o anillo, luego crece hacia arriba y sus márgenes se proyectan hacia el interior para encontrar la protuberancia central, la cual crece también hacia arriba produciendo el haz o el corazón de la fruta. En el ángulo más interno del lóculo de cada carpelo se desarrolla la placenta; región de tejidos engrosados que sostienen a los óvulos (Soost y Roose, 1996) que presentan una placentación axial (Schneider, 1968). Cada lóculo contiene varios pares de óvulos anátropos (Monselise, 1985).

Las especies de cítricos pueden tener dos tipos de flores, estaminadas y perfectas, aunque la mayoría son perfectas. En el caso de las estaminadas, el pistilo está subdesarrollado o ausente en las flores; en el caso de las perfectas el aborto del pistilo no es frecuente, pero puede ocurrir especialmente entre las flores de apertura más tardía (Cameron y Soost, 1987).

El desarrollo de los granos de polen sigue el curso habitual que se presenta en las angiospermas; el polen es del tipo pegajoso, adherente, característico de las plantas entomófilas. Los granos de polen germinan sobre la superficie estigmática y el núcleo generativo se divide produciendo los dos microgametos. El crecimiento del tubo polínico ocurre casi en su totalidad a través de los canales estilares. Bajo condiciones ambientales favorables la fecundación puede ocurrir entre dos y ocho días después de la polinización. El porcentaje de polen funcional varía mucho entre las especies y cultivares; aunque la mayoría de los cultivares de mandarina y pomelo producen grandes cantidades de polen funcional (Cameron y Soost, 1987).

2.3. Polinización

En las angiospermas, la polinización es un evento importante, prerequisite en la reproducción sexual (Roubik, 1995) y se define como la transferencia de granos de polen del centro de producción, situado en los microsporangios de las anteras a la superficie receptiva del carpelo (estigma), a través de agentes polinizantes (Kapil y Bhatnagar; citados por Pimienta, 1987).

La polinización es un factor importante en la mayoría de las especies cultivadas y principalmente, en aquellas cuya porción comestible es la semilla (Pimienta, 1987).

Existen dos sistemas de polinización natural: autopolinización y polinización cruzada (Welsh, 1981).

McGregor (1976) definió la autopolinización como la transferencia de polen de las anteras al estigma de la misma flor o entre flores de la misma planta. La autopolinización se da sólo si el polen y el estigma tienen la misma constitución genética (Weier *et al.*, 1980).

Weier *et al.* (1980) mencionaron que la polinización cruzada incluye siempre a dos plantas con constituciones genéticas diferentes. Las dos plantas progenitoras pueden ser de la misma variedad, o de la misma especie, de distintas especies o, inclusive de géneros distintos.

2.3.1. Agentes polinizantes

Pimienta (1987) mencionó que el proceso de polinización se realiza por dos tipos de agentes: abióticos y bióticos.

2.3.1.1. Agentes abióticos

Son fuerzas físicas inanimadas; la polinización realizada por este tipo de agentes generalmente es azarosa. Son reconocidos diferentes tipos de polinización abiótica.

a) Polinización por gravedad. Tipo de polinización conocida como geofílica; el polen es liberado y por gravedad el estigma lo recibe, es un tipo de polinización raro y poco confiable (Roubik, 1995).

b) Polinización por el agua. Tipo de polinización también llamada hidrofília; característica de plantas acuáticas (Roubik, 1995).

El agua sirve como medio de transporte del polen (Pimienta, 1987); el pistilo de las flores desarrolla y abre en la superficie del agua, generalmente las anteras chocan contra los estigmas receptivos, el polen es transferido y da lugar a la fecundación. La polinización bajo el agua es mucho menos frecuente y las gotas de lluvia también contribuyen a la transferencia del polen (McGregor, 1976).

c) Polinización por el viento.

Este tipo de polinización es también llamada anemofilia; es probablemente el agente polinizante mas importante en angiospermas. La flor polinizada por este agente es llamada anemófila (Pimienta, 1987).

McGregor (1976) indicó que las plantas con flores anemófilas son generalmente pequeñas y unisexuales. Las flores se presentan en amentos; por lo general producen grandes cantidades de granos de polen, ligeros, secos, comúnmente redondos y lisos. Las corolas son pequeñas y poco llamativas, los

pétalos algunas veces están ausentes, y el estigma es con frecuencia grande o plumoso (Weier *et al.*, 1980).

2. 3. 1. 2. Agentes bióticos.

Para este tipo de polinización se requiere de un organismo vector, ya sea vertebrado o invertebrado. Las plantas polinizadas por medio de estos agentes casi siempre tienen características comunes como son: periantos de colores vivos, producen un fluido de sabor dulce, denominado néctar; hay compuestos volátiles con olores especiales. Características útiles para atraer a los polinizantes (Weier *et al.*, 1980).

a) Polinización por insectos. Este tipo de polinización se denomina “entomofilia” y a las flores así polinizadas se les llama “entomófilas”. La mayoría de las especies frutales son polinizadas por insectos y las abejas son consideradas como los insectos polinizantes más importantes (McGregor, 1976).

Pimienta (1987) mencionó que la dispersión del polen por insectos es afectada por las condiciones climáticas desfavorables prevalecientes durante la floración, como son: viento, lluvia y temperatura.

McGregor (1976) indicó que en general los cítricos han sido considerados como un cultivo que requiere poca o nula necesidad de polinización por insectos; sin embargo, los requerimientos de polinización en

Citrus han cambiado, debido a que las condiciones económicas actuales requieren de una máxima producción y una mejor polinización del cultivo puede llegar a ser de gran significancia económica.

Los cultivares que requieren polinización han recibido una mayor atención, sobre todo aquellos que son total o parcialmente autoincompatibles (Free, 1970). Las mandarinas son dependientes y grandemente beneficiadas por la polinización cruzada (Roubik, 1995).

Ton y Krezdorn (1966) afirmaron que un número de cultivares de cítricos son conocidos como autoincompatibles; en algunas cruzas, tales cultivares necesitan de un apropiado suministro de polen y de agentes polinizantes.

Mata y Manjarrez (1976) cuantificaron el número de semillas en tangerina cv. Mónica para inferir sobre el proceso de polinización-fecundación, como una probable causa de poca fructificación; encontrando un mayor número de semillas cuando las huertas se encuentran intercaladas con mandarina 'Dancy' o naranjo 'Valencia tardía', comparada con plantaciones sólidas; infiriendo que el cv. Mónica necesita de polinizadores para fructificar satisfactoriamente.

Mchedishulli (citado por McGregor, 1976) mostró la importancia de la polinización por insectos, al variar distancias de un apiario con respecto a las

huertas de cítricos, encontró que las huertas más cercanas al apiario amarraron un mayor número de frutos.

Las flores de *Citrus* son visitadas por numerosos insectos, motivados tanto por el polen como por el néctar (Free, 1970). Investigaciones sobre insectos que visitan flores de cítricos, hechas por Hassanein *et al.* (citados por Free, 1970) y Kahn (1998) indican que la abeja común es el insecto más importante y abundante; comprende entre 80 y 90% de los insectos que visitan las flores de *Citrus*. Otros insectos son secundarios (McGregor, 1976).

Para lograr una polinización eficiente en *Citrus* las abejas deben ser distribuidas a una razón de 4-7.5 colonias por hectárea, a un intervalo de 160-400 m, aproximadamente; para lo cual se debe considerar el vigor de la colonia, las hectáreas de cítricos, otras plantas próximas y atractivas para las abejas, el tamaño de los árboles de cítricos y el número de racimos por árbol. Dependiendo del cultivar involucrado, el objetivo de la acción de los insectos polinizantes es: aumentar el número de frutos amarrados, aumentar el tamaño del fruto y aumentar el número de semillas por fruto (McGregor, 1976).

b) Polinización por invertebrados. Este tipo de polinización es también llamada malacofilia, y es realizada por invertebrados como caracoles y babosas (Roubik, 1995). Las plantas adaptadas a este tipo de polinización crecen en el agua o en lugares húmedos y son generalmente compactas y tupidas (McGregor, 1976).

c) Polinización por vertebrados. En este tipo de polinización se encuentra la realizada por pájaros también llamada ornitofilia, además se incluye la realizada por murciélagos también llamada quiropterofilia (Roubik, 1995).

2.4. Pruebas de Viabilidad del Polen

Son las formas de probar el polen, para determinar si es capaz de germinar, crecer y fecundar. Existen cuatro métodos generales para probar la viabilidad del polen: a) germinación *in vitro*; b) exámen microscópico de polen teñido sin germinar; c) evaluación *in vivo* del crecimiento del tubo polínico dentro de los estilos; d) la producción de semillas, una vez que se ha efectuado polinización normal de un progenitor femenino seleccionado. Los cuatro métodos se han utilizado para estudiar cultivos frutícolas y nueces (Galleta, 1988).

Stanley y Likens (citados por Galleta, 1988) indicaron que ningún método es completamente satisfactorio para determinar viabilidad, especialmente después de que el polen se ha almacenado por las razones siguientes: 1) para pruebas químicas se usan tintes que reaccionan con constituyentes o estructuras específicas, cuya ocurrencia podría no reflejar la capacidad de germinación del grano de polen; 2) las muestras de polen que germinan bien *in vitro* pueden no producir tubos polínicos lo suficientemente largos para efectuar fecundación después de hacer la polinización; 3) las muestras de polen que germinan pobremente cuando se germinan *in vitro*, pueden producir semilla

satisfactoriamente cuando se prueban *in vivo*; 4) el polen almacenado puede germinar en cantidades diferentes en el mismo o en distintos medios usados *in vitro*, al repetir los muestreos; 5) la germinación de polen almacenado es algunas veces mayor que cuando es fresco.

2.4.1. Pruebas de germinación *in vitro*

El porcentaje de germinación *in vitro* es considerado por muchos investigadores como la prueba más confiable del potencial de uso de una muestra de polen (Griggs *et al.*; citados por Galleta, 1988).

El método general consiste en poner a germinar una pequeña muestra de polen a probar en un medio apropiado y observar al microscopio el número de granos de polen, el procedimiento aplicado varía ampliamente y muy pocas técnicas se han estandarizado, de tal modo que puedan ser comparadas (Klungness *et al.*, 1983).

La calidad del polen es afectada por la etapa de maduración, las condiciones ambientales, el tiempo en que se colecta (Kungnes *et al.*, 1983); la especie de planta, el sistema de almacenamiento, la densidad del polen, el pH y la composición del medio de cultivo (Kwack *et al.*, citados por Galleta, 1988). Las temperaturas óptimas para la germinación del polen para especies frutícolas varían de 20°-30 °C. El polen de especies de angiospermas requiere generalmente de una fuente de azúcar (usualmente sacarosa entre 0.75 y

40%), normalmente boro y con frecuencia otros nutrimentos para germinar mejor (Galleta, 1988).

Los métodos de germinación de polen *in vitro* varían con la especie de planta, el grado de precisión requerido y el propósito con el cual se hace la determinación. A continuación se enlistan algunos de los métodos descritos por Stanley y Linskens (citados por Galleta, 1988).

a) La gota suspendida. Una gota de medio de cultivo conteniendo el polen, se inserta dentro de una cámara circular o área cerrada suspendida sobre agua, para su cuantificación se hacen observaciones directas al microscopio.

b) Prueba de sitios. En una serie de sitios, dentro de anillos de jalea de petróleo, que se encuentran en la base de una caja de petri se coloca el medio de germinación, se introduce el polen usualmente en las gotas mediante el sacudido y golpeteo de un pincel de pelo o una pequeña espátula.

c) Prueba de pozos. Se utiliza una depresión individual para cada gota conteniendo polen para germinar. El procedimiento más simple es utilizar portaobjetos con múltiples depresiones. Para su observación se coloca un cubreobjetos encima de cada depresión.

d) Agar o gelatina. Los medios para la germinación de muestras de polen, con frecuencia se utilizan sobre portaobjetos o cajas petri. La humedad se mantiene

constante mediante uso de agar y además se pueden agregar varios estimulantes de crecimiento al medio.

Burger (1985) al germinar *in vitro* polen de diferentes especies de *Citrus*, en soluciones de sacarosa a diferentes concentraciones, incubado durante 48 horas a 27°C, encontró que más del 5% del polen de 'Star Ruby' germinó en soluciones de sacarosa de 15-25%, y el polen de 'Valencia', 'Marrs' y 'Ruby Red' germinaron en soluciones de sacarosa de 6-21%.

Klungness *et al.* (1983) al evaluar la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico de almendro en diferentes etapas de floración, en un medio básico mineral, al cual se le adicionaron diferentes concentraciones de sacarosa e incubados durante seis horas a 35°C; encontraron que la germinación óptima del polen y crecimiento del tubo polínico se obtuvo en un medio mineral básico con 10% de sacarosa y 2% de agar.

2.4.2. Pruebas de tinción

Son indicadores de viabilidad que no implican germinación, tienen la ventaja de ser rápidos y sencillos; existen diferentes colorantes que reaccionan con constituyentes químicos o estructuras específicas de la célula en el polen maduro.

Stanley y Linskens (citados por Galleta, 1988) mencionaron que el azul de anilina en lactofenol colorea la calosa y el verde de floxin metilo tiñe la celulosa y el citoplasma. Adicionalmente, las enzimas que se encuentran actuando en los granos de polen viables (tales como las enzimas de oxidación-reducción, dehidrogenasas y peroxidasas) pueden detectarse con colorantes que cambian su estado incoloro a un coloreado una vez que se ha reducido. Los colorantes posibles son el 2, 3, 5,-cloruro de trifenil tetrazolio (TTC), rojo de trifenil tetrazolio, la reacción disódica y el diacetato de fluorescina.

Norton (1966) al evaluar 12 sales de sodio empleando polen de nueve cultivares de ciruelo, y al comparar el porcentaje de polen teñido con el porcentaje de germinación *in vitro*, la compuesta por 3(4, 5- dimetil tiazolil 1-2) 2, 5 difenil tetrazolio (MTT) fue la que mostró mejor resultado.

Werner y Chang (citados por Galleta, 1988) al probar varios colorantes indicadores de viabilidad en polen almacenado de duraznero. De los colorantes probados (yoduro de potasio y yodo, propiono carmín, anilina azul, nitro azul de tetrazolio y MTT), únicamente el MTT tuvo una alta correlación positiva y significativa, al comparar con el porcentaje de polen germinado *in vitro*.

2.4.3. Pruebas *in vivo*

Los estudios de viabilidad de polen *in vivo* son usualmente de dos tipos: primeramente los de compatibilidad y fructificación, que involucran la

germinación del polen sobre los estigmas de la planta y se sigue el avance del desarrollo del tubo polínico a través del estilo hasta que llegue al ovario; y los estudios de fertilidad, cuyo objetivo es producir semillas después de haber hecho polinización controlada, siendo los conteos de semilla y el porcentaje de germinación los datos que usualmente se registran. Los métodos *in vivo* son los que proporcionan las estimaciones mas valiosas de la calidad de un polen recién extraído o almacenado (Galleta, 1988).

Al observar la germinación y el crecimiento del tubo polínico en estilos cortados se dificulta distinguir los tubos del tejido estilar que los rodea. Esto se logra cortando en secciones o aplastando suavemente el estilo y coloreándolo con un tinte específico para el citoplasma o la calosa de los tubos polínicos. Existen en la actualidad muy variadas técnicas para detectar el desarrollo del tubo polínico (Galleta, 1988).

Jefferies y Belcher (1974) indicaron que una técnica útil para identificar tubos polínicos *in vivo* bajo iluminación ultravioleta, siguiendo el camino usual, es ablandar en autoclave en 50 gL⁻¹ de sulfito de sodio, posteriormente son teñidos con azul de anilina soluble en agua y finalmente sobre un portaobjetos son aplastados para examinarse en el microscopio de fluorescencia. Los tapones de calosa fluorescen bajo estas condiciones.

Ton y Krezdorn (1966) usaron la técnica de amarillo de lacmoide (Martius) para determinar el sitio de inhibición en el polen de los tangelos

autoincompatibles 'Minneola' y 'Orlando' (*C. reticulata* x *C. paradisi*) y la mandarina 'Clementina' (*C. reticulata*) después de realizar autopolinizaciones y polinizaciones cruzadas, usando el polen de toronja 'Duncan' que es compatible y de naranjo dulce 'Parson Brown'; encontrando que tanto en cruzas como en autopolinizaciones el polen germinó totalmente.

Franklin (1959) indicó que el tubo polínico en el tomate y otras plantas con flor puede ser observado usando la técnica siguiente. Los estilos son fijados en formalina, ácido acético y etanol al 80%, (1: 1: 8); se enjuagan y se ablandan en una solución de NaOH (± 8 N), la tinción se hace con azul de anilina al 0.1 N en K_2PO_4 . Los estilos son observados intactos o disectados bajo un microscopio de fluorescencia a una longitud de onda de 356 μm , bajo estas condiciones la calosa en el contorno del tubo y los tapones irregulares fluorescen de un color amarillo verdoso brillante, contrastando fuertemente con el color del tejido estilar.

Wijit *et al.* (1992) para determinar el tiempo de crecimiento del tubo polínico y compatibilidad entre grupos de anacardo, mediante polinizaciones manuales, usaron la técnica de azul de anilina y las observaciones las realizaron con microscopio de fluorescencia.

Cerovic y Ruzic (1992) al examinar bajo microscopio de fluorescencia el crecimiento de los tubos polínicos, para calcular el porcentaje de polen

germinado en el estigma y el número de tubos polínicos en la tercera parte superior del estilo, en autopolinizaciones y cruza de diferentes cultivares de cerezo agrio (*Prunus cereasus* L.); encontraron que la ocurrencia de incompatibilidad en la parte superior del estilo fue más pronunciada en autopolinización que en cruza.

2.5. Fase Prográmica

Incluye los procesos sexuales en angiospermas que inician con la llegada del polen a la superficie del estigma y terminan con la fecundación del gametofito femenino (Pimienta, 1990; Mascarenhas, 1993).

El exudado del estigma tiene una composición muy variable; contiene, lípidos, carbohidratos, fenoles y proteínas, en diversas proporciones (Helsop-Harrison y Shivanna, 1977; Shivanna, 1982). Los compuestos fenólicos tienen la función de protección contra microbios e insectos nocivos; estudios recientes indicaron que los fenoles intervienen en la nutrición del polen y en la regulación de su germinación (Martín *et al*; citados por Shivanna, 1982).

2.5.1. Germinación del polen

El primer cambio que ocurre en el polen al llegar a la superficie del estigma es la hidratación; al mismo tiempo se liberan proteínas de la exina y después de la intina (Shivanna, 1982).

Existe el reconocimiento del polen, activándose el metabolismo del crecimiento del gametofito masculino y la activación de las papilas del estigma. En los tubos polínicos se activan dictiosomas que llevan vesículas, que se distinguen en el ápice del tubo y contribuyen en la formación de sus paredes (Pimienta, 1990).

El tubo polínico emerge y entra en contacto con la cutícula de las papilas. La cutícula se degenera en el punto de contacto y el tubo de polen penetra (Shivanna, 1982).

La germinación inicia con la activación del metabolismo, indicada por incrementos respiratorios, cambio de patrones de síntesis de ARN y proteínas y un incremento en la actividad de diferentes enzimas hidrolíticas (Shivanna, 1982; Pimienta, 1990). La síntesis de proteínas es la primera en iniciar durante la germinación del polen (Mascarenhas, 1993). En estudios realizados por Shivanna *et al.* (citados por Mascarenhas, 1993) indican que los granos de polen maduros contienen casi todas las proteínas necesarias para su germinación y para el crecimiento inicial del tubo polínico, crecimientos

posteriores a la división de la célula generativa (en dos células espermáticas) son dependientes de nuevas síntesis de ARNm variando con las distintas especies.

Micke y Kester (citados por Mascarenhas, 1993) mencionaron que la temperatura es un factor importante para la germinación de los granos de polen, existiendo una temperatura óptima para que ocurra la germinación. La velocidad de germinación del polen es muy variable entre especies (Knox; citado por Owens, 1992).

Kahn (1998) mencionó que en *Citrus* la habilidad del polen para germinar es afectada por condiciones ambientales, como temperatura y humedad.

Fernández-Escobar *et al.* (1983) al probar el efecto de diferentes temperaturas en la germinación de polen y crecimiento del tubo polínico *in vitro* de seis cultivares de olivo, encontraron que la temperatura óptima para la germinación del polen de todos los cultivares probados fue entre 20 y 25 °C a temperaturas más altas la germinación del polen disminuyó, hasta alcanzar una completa inhibición de la actividad del polen a 35°C.

2.5.2. Desarrollo del tubo polínico

Los tubos polínicos al parecer contienen diversas zonas citológicas (Cresti *et al.*; citados por Mascarenhas, 1993). En *Prunus*, han sido identificadas cinco zonas: a) zona de crecimiento apical; b) zona de retículo endoplásmico liso; c) zona de retículo endoplásmico rugoso; d) zona de vacuolas y e) zona de deterioración (Uwate y Lin; citados por Mascarenhas, 1993). El citoplasma del tubo polínico en la región anterior a la zona de crecimiento contiene abundantes dictiosomas y mitocondrias, retículo endoplásmico y vesículas; la región apical de crecimiento contiene un gran número de vesículas y ausencia de organelos; las vesículas existentes en esta región son de dos tipos, unas de 300 nm y otras de 50 nm de diámetro, las vesículas grandes son derivadas de los cuerpos de Golgi y contienen materiales precursores de la pared; las vesículas al fusionarse con la membrana celular de la punta contribuyen al crecimiento de la pared del tubo polínico (Cresti y Tiezzi; citados por Mascarenhas, 1993)

En la compleja estructura de la pared del tubo polínico se encuentran componentes como celulosa, sustancias pécticas, hemicelulosa, y calosa (Hearth *et al.*; citados por Mascarenhas, 1993). Algunas proteínas también han sido identificadas en la pared del tubo, y existe una evidencia de que la calosa forma un complejo con proteínas (Reynolds y Dashek; citados por Mascarenhas, 1993).

El crecimiento del tubo polínico en el tejido estilar ocurre a través del canal estilar mucilaginoso o a través del tejido de transmisión (tejidos que establecen continuidad entre el estigma y la región placentar del ovario); es probable que el estilo no sea únicamente un conducto físico para el crecimiento del tubo polínico compatible, sino que también participe en la nutrición y en el control del crecimiento mediante la promoción de componentes moleculares que influyen en el crecimiento de la punta del tubo (Knox y Williams, 1986).

Fernández-Escobar *et al.* (1983) al realizar pruebas de germinación y crecimiento del tubo polínico *in vitro* en diferentes cultivares de olivo; adicionaron al medio de cultivo extractos de pistilo a distintas concentraciones de sí mismo y de diferentes cultivares. Sus resultados sugieren que el crecimiento de los tubos polínicos está influenciado por las diferentes concentraciones de promotores presentes en el estilo.

Mulcahy y Mulcahy (citados por Knox y Williams, 1986) indicaron que en el tipo de polen bicelular el crecimiento puede ocurrir en dos fases: un período lento, en el cual las reservas del polen son utilizadas (autotrófico), seguido por un período más rápido en el cual es probable que el tubo se nutra del estilo (heterotrófico). Mientras que el polen tricolular al parecer presenta solo un período de crecimiento rápido.

Kahn y DeMason (1986) mencionaron que es importante considerar factores como temperatura y número de granos de polen depositados sobre el

estigma que se sabe afectan la tasa de crecimiento del tubo polínico, y esto puede influenciar la longitud del tiempo de polinización a fecundación.

El tiempo que toman los tubos en alcanzar el ovario varía fuertemente entre especies; esta variación presumiblemente indica diferencias en la longitud del estilo (Helsop-Harrison; citado por Owens, 1992).

Kahn y DeMason (1986) al realizar cruzas compatibles con polen de tangelo 'Orlando' (*C. paradisi* Macf.) sobre gineceos de tangerina 'Dancy' (*C. reticulata* Blanco.) observaron que el tiempo que tardaron algunos tubos polínicos en penetrar los óvulos fue entre 9 y 12 días después de la polinización.

En la República de Georgia estudios realizados en la observación del desarrollo del tubo polínico de *C. ichangensis* sobre estilos de mandarina 'Satsuma', observaron que el tubo polínico alcanzó al ovario en 20 días y llegó a las cercanías del saco embrionario a los 30 días posteriores a la polinización (Bukiya y Goliadze, 1991).

Eti *et al.* (1992) indicaron que el desarrollo del tubo polínico en cruzas con mandarina 'Clementina' (*C. reticulata* Blanco) es normal y el tiempo que toma en alcanzar al óvulo después de la polinización vía micrópilo es de 5 a 12 días. Después de este tiempo se desarrolla una capa de absición en la base del estilo.

En Florida Ton y Krezdorn (1966) al estudiar el tiempo de desarrollo del tubo polínico en tres cultivares de *Citrus* ('Clementine', 'Minneola' y 'Orlando') en cruza compatibles, el tubo creció rápidamente y penetró los óvulos entre 6 y 8 días después de la polinización.

Una vez que los tubos polínicos pasan a través del tejido estilar llegan a la cavidad locular, que es el espacio hueco donde se encuentran los óvulos (Jensen, 1973). En el ovario los tubos polínicos generalmente crecen directamente hacia los óvulos, aunque en ciertos casos pueden vagar sobre la superficie de la placenta (Knox y Williams, 1986).

Knox y Williams (1986) sugirieron que hay respuestas quimiotrópicas involucradas en la atracción del tubo polínico hacia el micrópilo. Es probable que los mecanismos de atracción sean de naturaleza química, debido a que la mayoría de los cambios que se han reportado obedecen a modificaciones en la constitución química de la nucela; además estos ocurren en óvulos viables y con polinizaciones compatibles, donde existe una mayor posibilidad de fecundación (Pimienta, 1990)

Mascarenhas (1993) mencionó que aún es poco conocido el mecanismo que dirige el crecimiento del tubo polínico en el pistilo; investigaciones recientes han fundamentado la sugerencia de que la orientación del tubo polínico es por medio de actividad quimiotrópica, compuestos como iones de calcio, aminoácidos y mezclas de aminos han sido identificados por tener actividad

quimiotrópica en estudios hechos por Mascarenhas *et al.* (citados por Mascarenhas, 1993).

Una vez que el tubo polínico llega al ovario, puede penetrar al óvulo por varias rutas; el tipo más común de como penetra al óvulo es a través del micrópilo y empuja a través de la nucela hasta alcanzar al aparato huevo o saco embrionario; este tipo de penetración del óvulo es conocida como 'porogámica'. En algunas especies el tubo penetra por la calaza del óvulo, y continúa su crecimiento a lo largo de la superficie del saco embrionario antes de alcanzar el aparato huevo; este tipo de penetración se designa como 'calazogamia'. Una tercer forma de penetración, designada como 'mesogamia', consiste en que el ápice del tubo polínico penetra lateralmente por los integumentos del óvulo hasta alcanzar el aparato huevo (Foster y Gifford, 1974).

2.6. Doble Fecundación

La fecundación que tiene lugar en las angiospermas implica que una célula espermática se fusione con la célula huevo, contenida en el óvulo, para dar origen a un embrión (que origina la nueva planta). La otra célula espermática se fusiona con la célula central para formar el endospermo; a estas fusiones celulares se les conoce como doble fecundación (Dumas *et al.*, 1985; Dumas y Mogensen, 1993).

Jensen (1973) al hacer una descripción general de la entrada del tubo polínico en el megasporofito, basada en microscopía de luz, indica que el tubo entra al saco embrionario destruyendo una de las sinérgidas y descargando los dos espermatozoides (usualmente referidos como núcleos masculinos); o bien, puede penetrar al saco embrionario entre las dos sinérgidas y la célula huevo o entre la célula huevo, una sinérgida y la pared del saco embrionario.

Previo al arribo del tubo polínico, el gametofito femenino (saco embrionario) presenta cambios en su organización (Russell, 1993). Una de las dos sinérgidas del saco embrionario presenta cambios morfológicos y químicos, originando su degeneración; no se sabe si la degeneración total de la sinérgida ocurre antes o en el momento en que el tubo penetra (Jensen, 1973).

2.6.1. Fusión celular

Russell (1993) mencionó que una vez que las células espermáticas son liberadas dentro del saco embrionario, las membranas plasmáticas son las únicas barreras entre las células espermáticas y las células gaméticas femeninas (célula huevo y célula central). Se conoce que los iones de calcio, ayudan en el proceso de la fusión celular (White; citado por Russell, 1993).

Posterior a la fusión celular los núcleos espermáticos migran, colocándose con su respectivo núcleo femenino, comenzando la fusión nuclear; un núcleo espermático se fusiona con la ovocélula para formar el cigoto ($2n$) y

el otro se fusiona con dos núcleos polares para formar el núcleo primario del endospermo (Russell, 1993).

Jensen (1973) indicó que la membrana interna de los núcleos interactuantes forma una gran cantidad de pequeños puentes entre los dos núcleos, aumentando progresivamente hasta fusionarse. No se sabe si la fusión de los dos núcleos polares y un núcleo espermático inicia antes o después de la fusión del núcleo de la ovocélula con el otro núcleo esperma.

Se puede concluir que en la doble fecundación hay tres eventos importantes: (1) descarga de las células esperma dentro del saco embrionario; (2) fusiones celulares de la ovocélula y un esperma y de la célula central y el otro esperma, y (3) las fusiones nucleares inician la formación del embrión y el endospermo (Knox y Singh, 1987).

2.7. Mecanismos que conducen a la fecundación cruzada

2.7.1. Incompatibilidad sexual

El grano de polen después de su adherencia a la superficie del estigma, sufre una especie de examen de paso. Si es aceptado se hidrata y elabora un tubo polínico que penetra en el estilo hasta alcanzar el óvulo. Si es rechazado el tubo polínico, en caso de que se haya formado, no consigue alcanzar el óvulo.

En el primer caso, el polen se denomina compatible; en el segundo se denomina incompatible (Dumas *et al.*, 1985).

El mecanismo de incompatibilidad se presenta ampliamente en el reino vegetal, familias como: Fabaceae, Rosaceae, Sterculiaceae, Brassicaceae, Asteraceae y Poaceae, presentan esta característica (Enriquez, 1985). East (citado por Enriquez, 1985) estimó que este fenómeno se presenta en más de 3,000 especies, incluyendo 20 familias de angiospermas. Sutherland (citado por Sedgley, 1994) mencionó que tres cuartas partes de las especies de angiospermas que presentan autoincompatibilidad son plantas leñosas, y que la fuerza del mecanismo varía entre géneros y especies. Las especies frutales de hoja perenne en su mayoría son autoincompatibles (Chandler, 1962). Hay reportes que indican que varios cultivares de *Citrus* son autoincompatibles (Soost, 1965); sobre todo en pomelos, mandarinas e híbridos con mandarinas (Kahn, 1998).

La importancia de la autoincompatibilidad radica en que su funcionamiento impide la autogamia y facilita la alogamia (Enriquez, 1985). Asegurándose así la estabilidad de las especies y el mantenimiento de la heterocigosis, verdadera reserva de los potenciales adaptativos, o en otras palabras de posibilidades de evolución (Dumas *et al.*, 1985; Nasrallah y Nasrallah, 1993).

Existen varias definiciones de incompatibilidad, aunque todas mantienen similitud.

Nettancourt (citado por Elleman y Dickinson, 1994) describió la autoincompatibilidad como la inhabilidad de las plantas hermafroditas, fértiles, para producir cigotos después de autopolinización.

Helsop-Harrison (1975) se refiere a la autoincompatibilidad como la incapacidad parcial o total de un polen fértil de plantas hermafroditas o monóicas para amarrar semilla viable en autopolinización.

El rechazo puede ocurrir en cualquier nivel, desde la llegada del polen a la superficie del estigma hasta la fecundación (Helsop-Harrison, 1975). Cuando el polen es de especies genéticamente distintas, a la planta polinizada, la etapa de rechazo en general es muy precoz; el grano de polen no llega a hidratarse. Cuando el polen pertenece a especies no muy lejanas o a algunas variedades de la misma especie, o incluso en caso de autoincompatibilidad, el rechazo ocurre más tarde, posterior a la hidratación del grano de polen, este puede germinar y el tubo polínico crecer. La reacción de rechazo detendrá el crecimiento en cualquier nivel de penetración en dirección al óvulo (Dumas *et al.*, 1985). Además de la inhibición de los tubos polínicos incompatibles en el estilo, han sido registradas una serie de expresiones morfológicas de incompatibilidad durante el desarrollo del tubo polínico; como abultamiento del ápice de los tubos, acompañado por intensas deposiciones de calosa (1,3- β

glucan), también ramificaciones de los tubos y formación de tapones de calosa largos (Afify; citado por Pimienta, 1987). Otro sitio de detención del crecimiento del tubo polínico en cruza incompatibles interespecíficas es el ovario y óvulos; esto es confirmado por Williams y Knox (citados por Tammy *et al.*, 1994) al estudiar el desarrollo del tubo polínico en *Lycopersicon*. En ciertas cruza incompatibles entre especies de *Rhododendron*, los tubos polínicos pueden fallar al entrar al micrópilo del óvulo, o al liberar los espermatozoides, normalmente después de entrar al saco embrionario (Williams *et al.*; citado por Knox y Williams, 1986). Estas anomalías están asociadas con deposiciones de calosa. Knox y Williams (1986) indicaron que existe la posibilidad de que la última barrera precigótica de autoincompatibilidad sea la membrana plásmica de la célula huevo. Tammy *et al.* (1994) mencionaron que en *L. styraciflua* la incompatibilidad ocurre en la etapa inicial de desarrollo del embrión (postcigótica) y puede accionar en una amplia variedad de etapas.

Lewis (1994) mencionó que en base a las características morfológicas generalmente se distinguen dos sistemas de incompatibilidad: heteromórfica, caracterizado por diferencias en la morfología de las flores de diferentes plantas, tamaño del polen y células del estigma. Este sistema comúnmente está gobernado por un sólo gen en un locus simple (Enriquez, 1985). En el sistema homomórfico no hay diferencias entre las partes florales. Este sistema a su vez, dependiendo del mecanismo de reacción, puede ser: gametofítico y esporofítico.

El sistema de incompatibilidad esporofítico es característico de especies de las familias Brassicaceae y Asteraceae, y el comportamiento del esporofito es determinado por el genotipo de origen diploide. Este sistema de incompatibilidad es controlado por un locus simple (S) con alelos múltiples (Helsop-Harrison, 1975), en los cuales se ha identificado que existen relaciones de dominancia en el polen (Mehlenbacher y Thompson; citados por Sedgley, 1994). La reacción de incompatibilidad generalmente ocurre en el estigma, inhibiendo la germinación del grano de polen o impidiendo la penetración del tubo polínico en el tejido del estigma, cuando germina el grano de polen (Clarke *et al.*, 1985); otras características asociadas con este mecanismo de incompatibilidad es la producción de polen trinucleado, con capacidad de almacenamiento corto y una pobre germinación *in vitro* (Brewbaker; citado por Sedgley, 1994), y estigmas secos (Helsop-Harrison y Shivanna, 1977). Este sistema se caracteriza como esporofítico, monofactorial y homomórfico (Helsop-Harrison, 1975).

El sistema clásico de incompatibilidad gametofítica es el más frecuente en las especies hortícolas (Sedgley, 1994). El comportamiento del esporofito está determinado por un locus simple (S) con muchos alelos (Helsop-Harrison, 1975). Este sistema se caracteriza por la acción independiente, tanto en el estilo como en el polen, de los alelos pertenecientes al locus de incompatibilidad (S), presente en cualquier individuo diploide. La reacción de incompatibilidad ocurre invariablemente en el estilo, donde el crecimiento del tubo polínico cesa y tiene la característica de que el ápice del tubo se hincha y

es acompañado por deposiciones de calosa (Newbiggin *et al.*, 1993). El mecanismo gametofítico está asociado con la producción de polen binucleado, con una buena capacidad de almacenamiento, buena germinación *in vitro* (Brewbaker; citado por Sedgley, 1994) y estigmas húmedos (Helsop-Harrison y Shivanna, 1977). En *Citrus*, Soost (1965) reportó que el locus (S) determina la reacción de incompatibilidad y que el grano de polen es generalmente binucleado. Una o más de esas evidencias son usadas para comprobar el mecanismo de autoincompatibilidad gametofítica (Sedgley, 1994). En *Citrus*, Kahn y DeMason (citadas por Sedgley, 1994) indicaron que la división de la célula generativa ocurre durante los tres días posteriores a la polinización en tubos compatibles, y ocasionalmente en tubos incompatibles.

Sedgley (1994) mencionó que el lugar de inhibición del crecimiento del tubo polínico difiere en algunas especies. Algunos cultivares de manzano y peral mostraron inhibición en el estigma o en el ovario (Modlikowska; citado por Sedgley, 1994); la inhibición en el estigma también ha sido reportada en almendro (Pimienta *et al.*, 1983) y en *Citrus* (Kahn y DeMason, 1986).

Krezdorn (1981) mencionó que la incompatibilidad sexual en *Citrus* es del tipo gametofítica con una inhibición del crecimiento del tubo polínico en el estilo.

Kahn y DeMason (1986) al estudiar el desarrollo de los tubos polínicos en tangelo 'Orlando' (*C. paradisi* x *C. reticulata*) sobre estigmas compatibles de tangerina 'Dancy' y sobre estigmas autoincompatibles de 'Orlando'; encontraron

que en cruzas incompatibles el estigma fue la primera región de inhibición del crecimiento del tubo polínico, y sugirieron en base a sus resultados, que los factores bioquímicos o estructurales que conducen a la reacción de incompatibilidad se localizan en el estigma. En cruzas compatibles algunos tubos polínicos penetraron entre 9 y 12 días posteriores a la polinización; sin embargo, un número significativo de tubos no creció más allá del estigma a los 9 días después de la polinización. En lo que respecta a las características del tubo polínico en cruzas compatibles y autoincompatibles se observaron anomalías en tubos polínicos en ambos gineceos de 'Orlando' y 'Dancy', siendo menos común en situaciones compatibles. Algunas anomalías de tubos polínicos en gineceos autopolinizados después de la germinación incluyen: una fuerte deposición de calosa en el ápice del tubo, disminución del ápice del tubo, estallamiento del ápice del tubo, una deposición irregular en la pared del tubo polínico y tubos espiralados (Kahn y DeMason, 1986).

Ton y Krezdorn (1966) al estudiar el crecimiento del tubo polínico en tres cultivares incompatibles de *Citrus*, observaron que todos los granos de polen germinaron en la superficie estigmática; sin embargo, tanto en cruzas incompatibles como en autopolinizaciones el crecimiento fue inhibido en la parte superior del estilo; ellos sugirieron dos posibles explicaciones del fracaso de la entrada del tubo polínico al ovario, las cuales son: el desarrollo de una capa de abscisión en la base del estilo, anterior a la penetración del tubo y a una fuerte inhibición en el ovario.

Stott (1972) al estudiar las características de los tubos polínicos compatibles y no compatibles en 40 cultivares de manzano; determinó que los tubos polínicos compatibles crecieron mas rápidamente hacia abajo del estilo, fueron visibles tapones muy pequeños de calosa y tuvieron ausencia de tapón terminal. Los tubos polínicos incompatibles fueron lentos en su crecimiento; con frecuencia su crecimiento fue completamente inhibido y hubo fuertes deposiciones de calosa a lo largo del tejido de trasmisión y al final del tubo polínico.

2.7.2. Esterilidad

La esterilidad se aplica a cualquier falla parcial o total de un individuo para producir gametos funcionales o cigotos viables (Pimienta, 1987). Este mecanismo conduce a la fecundación cruzada, en algunos casos representa pérdidas económicas pero en otros no tiene mayor repercusión. La esterilidad puede ser completa o parcial, ya sea masculina, femenina o ambas (Avitia²; comunicación personal).

Este mecanismo sugiere que el amarre de fruto y la producción en naranjo “navel” es limitada, debido a que las plantas con frutos partenocárpicas son más sensibles a estrés ambiental que otros cultivares no partenocárpicas de naranjo dulce (Coit y Hodyson; citados por Sedgley, 1994).

² Edilberto Avitia García, Profesor Investigador de tiempo completo del Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. 56230, Chapingo, Estado de México

El grupo de naranjos 'Washington' navel tiene esterilidad masculina y sólo se producen algunos óvulos viables; por lo tanto, la germinación del polen y el crecimiento de los tubos polínicos son escasos. Las polinizaciones cruzadas con polen viable sólo han incrementado ligeramente el amarre de fruto y el número de semillas, no siendo una solución práctica (Kretdorn, 1981).

2.7.3. Dicogamia

La dicogamia consiste en la disparidad cronológica existente entre la liberación del polen de las anteras y la receptividad del estigma. Cuando hay protandria la liberación del polen ocurre antes de que el estigma sea receptivo, y protoginia consiste en que la dehiscencia de las anteras ocurre después de la receptividad del estigma (Percival, 1969). Por lo que este comportamiento conduce a la fecundación cruzada en diferentes especies frutícolas como aguacatero y nogales, entre otros (Pimienta, 1987).

El aguacatero muestra una dicogamia protogínica. Stout en 1932 (citado por Pimienta, 1987) clasificó a los aguacateros en dos grupos (A y B). Los del grupo 'A' se caracterizan porque las flores abren por primera vez en la mañana como femeninas; cerrando al medio día y abren de nuevo al día siguiente como masculinas. En los cultivares del grupo 'B' las flores abren por primera vez después de medio día como femeninas, cierran al terminar el día y al día siguiente abren por la mañana como masculinas.

2.7.4. Dioecismo

El dioecismo consiste en la ubicación de órganos sexuales en distintas flores y en diferentes plantas. Dentro de las especies dioicas se encuentran el pistacho y el papayo, entre otros (Pimienta, 1987).

2. 8. Amarre de Fruto

En términos generales el cuajado o amarre de fruto se define como el proceso que marca la transición del ovario de la flor a un fruto que se desarrollará hasta su maduración. Una falla en este proceso provoca la detención del crecimiento y normalmente la abscisión del ovario (Guardiola, 1997).

La proporción de flores que inician y maduran fruto varían entre especies. En algunas especies como en *Ceiba pentandra* se producen 1,000 flores por cada fruto maduro (Stephenson, 1981); en *Citrus sinensis* el porcentaje oscila entre 0.2 y 3%, a excepción de cultivares que forman un número muy bajo de flores o en los cultivares alternantes, donde el porcentaje es notablemente mayor, hasta del 90% (Guardiola, 1997). En una especie la relación de flores a frutos puede variar entre poblaciones, entre individuos de una población y de un año a otro dentro de los mismos individuos (Stephenson, 1981).

Ante tal situación la cuantía de la producción en la mayoría de las especies está determinada por el número de frutos cuajados y no por el número de flores formadas (Stephenson, 1981; Agusti y Almela, 1991; Guardiola, 1997).

El amarre de fruto depende del número de flores polinizadas, del número de óvulos fecundados, de la relación de semillas por fruto, de las condiciones hídricas y de la capacidad de la planta para proporcionar los recursos necesarios para su desarrollo (Stephenson, 1981).

El amarre del fruto precisa de un estímulo inicial que provoque el crecimiento del ovario y su capacidad de acumular metabolitos. Dicho estímulo puede tener su origen en la formación de semillas o ser independiente de éstas (Guardiola, 1997). En el primer caso, seguido de la fusión de los núcleos que dan origen al endospermo, el desarrollo de la semilla produce un estímulo a través de las hormonas, que son el punto de partida para el control del crecimiento y diferenciación de los frutos jóvenes. Las hormonas producidas por la semilla también tienen una importante intervención en la movilización de recursos para el desarrollo de los frutos (Biali; citado por Stephenson, 1981). En el segundo caso, donde no se da la formación de semilla, se postula que son las paredes del ovario las que asumen el papel de estimulador del crecimiento, como sintetizadores o receptores de los factores reguladores de éste (Agusti y Almela, 1991).

Como se señaló anteriormente, el amarre de fruto y no la floración es el factor que determina la cosecha. Sin embargo, en condiciones extremas, cuando el número de flores es muy bajo o muy elevado, la floración tiene una influencia en el cuajado final y, por lo tanto, en la cosecha (Guardiola, 1997).

En *Citrus sinensis*, la comparación entre árboles con distintos niveles de floración ha demostrado que para floraciones escasas la mayor parte de los órganos reproductores se desprenden en forma de frutos en desarrollo (caída de junio), pero a medida que aumenta la floración la caída de órganos se anticipa y es más intensa, llegando a ser la caída de botones la más importante porcentualmente (Agusti *et al.*, 1982); ante tal situación, el porcentaje de flores que amarran fruto disminuye con el aumento de la floración (Agusti *et al.*, 1982; Garcia-Luis *et al.*, 1988).

La floración en cítricos se distribuye en diferentes tipos de brotes, con hojas (brotes mixtos) o sin ellas (brotes reproductores), siendo éste un factor importante para el amarre (Agusti y Almela, 1991); en todos los cultivares estudiados el amarre es mayor para flores ubicadas en inflorescencias con hojas; la mayor calidad de las flores ubicadas en este tipo de inflorescencias se refleja en el amarre y el fruto que proviene de éstas flores es de mayor tamaño, comparado con el formado en inflorescencias sin hojas (Moss *et al.*, 1972).

La brotación, así como el amarre y desarrollo del fruto consumen metabolitos orgánicos y elementos minerales, y es bien conocido que una limitación en el suministro afecta el amarre de modo adverso (Guardiola, 1997).

Los recursos necesarios para el desarrollo del fruto y la semilla vienen de varias fuentes. Los nutrimentos y el agua son transportados al fruto vía xilema; mientras que los carbohidratos y nutrimentos reciclados desde órganos vegetativos entran al fruto vía floema (Bollard; citado por Stephenson, 1981). Las hojas proporcionan carbohidratos y nutrimentos a los frutos, y si bien éstos tienen la capacidad de atraer recursos de las hojas que se encuentran a una distancia de un metro o más (Haller y Magnnes, citados por Stephenson, 1981) existe una fuerte tendencia a que los tomen de las hojas más cercanas (Hansen, 1969). La importancia de las hojas en este proceso se basa en su capacidad para sintetizar y exportar metabolitos al fruto en desarrollo; cuando la hojas son maduras se convierten en órganos de exportación, representando una clara ventaja de los frutos situados en inflorescencias con hojas, contra los situados en inflorescencias sin hojas (Moss *et al.* 1972), lo cual explica la persistencia en el árbol de los frutos situados en mejor posición (Zucconi *et al.*, 1978).

En los cítricos el papel de las hojas no sólo se centra en su capacidad para proveer de carbohidratos a los frutos en desarrollo, sino que en las inflorescencias con hojas se ha detectado un mayor contenido de giberelinas endógenas, que en las que no poseen hojas (Goldschmidt y Monselise, citados

por Agusti y Almela, 1991) y es mayor el contenido de citocininas en los frutos procedentes de brotes mixtos (Saidha *et al.*, 1983). Esta influencia de las hojas sobre el amarre de frutos nos lleva a considerar a éstos como consumidores de carbohidratos y fitorreguladores, lo que nos hace relacionar aspectos nutritivos y hormonales en el proceso de amarre y pone de manifiesto la importancia de las hormonas (Agusti y Almela, 1991).

Existen numerosos estudios que demuestran la relación entre fertilización (por lo tanto la nutrición) y cosecha (Guardiola, 1997). La aplicación de macronutrientes (N P K) inmediatamente después del período de floración disminuyen significativamente la caída de frutos en distintas especies. Se sabe que el boro desempeña un papel esencial para la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico durante la fecundación, y partiendo de ello se han hecho aplicaciones a árboles deficientes en éste elemento, obteniendo incrementos importantes en el amarre de frutos de diversas especies caducifolias (Thompson y Batjer, 1950).

En cítricos la nutrición mineral es crítica y puede ser una limitante durante la floración; unas reservas suficientes en el árbol y una fertilización adecuadamente programada son factores que inciden de modo acentuado en el cuajado, situación muy marcada en el caso de cultivares partenocárpicos, en donde el cuajado del fruto es muy sensible a las deficiencias nutricionales (Guardiola, 1997).

No es sorpresa el papel que juegan las semillas de los frutos en la producción de hormonas, particularmente auxinas, giberelinas y citocininas. Existen algunos estudios que indican el papel que juegan las hormonas en el desarrollo del fruto y el control que ejercen sobre la abscisión del mismo (Stephenson, 1981). En muchos frutos existen correlaciones entre el número de semillas y el tamaño final del fruto y de igual manera, entre la distribución de las semillas y la forma del fruto (Crane; citado por Agusti y Almela, 1991). Aunque en cítricos no se puede concluir que el crecimiento del ovario este controlado exclusivamente por las semillas (Agusti y Almela, 1991), en algunos resultados con naranjo 'Valencia' si se encontró correlación positiva entre el número de semillas y el tamaño y la forma del fruto (Cameron *et al.*, 1960).

En base a lo anterior, se ha planteado el uso de reguladores del crecimiento para mejorar el amarre y desarrollo de los frutos. En cítricos su aplicación constituye una práctica común en muchos cultivares y su respuesta depende tanto del tipo de sustancia como del cultivar, siendo en general las mandarinas las que mejor responden y el ácido giberélico la sustancia más ampliamente difundida (Agusti y Almela, 1991).

Se ha encontrado una promoción significativa del amarre de fruto en cultivares con semilla y en partenocárpicos; especialmente con mandarinas cuando son tratadas con 20-25 mgL⁻¹ de ácido giberélico (AG₃) al tiempo de plena floración (Brosh y Monselise, 1977).

La proporción de brotes jóvenes y semillas que maduran son dependientes de factores externos; como son condiciones ambientales, daño a las semillas por factores bióticos y abióticos y la habilidad de la planta para proporcionar los recursos necesarios para su crecimiento y desarrollo. Muchas plantas presentan selectividad en la abscisión de frutos e inician más frutos de los que pueden ser desarrollados hasta maduración con su disponibilidad de recursos. Algunas evidencias demuestran que el aborto de flores se debe a una respuesta de limitación de recursos (Stephenson, 1981) y a su capacidad genética (Guardiola *et al.*, 1984).

En cítricos el anillado ha mejorado el amarre de frutos (Lewis y McCarty, 1973; Cohen, 1981), incrementando su tamaño (Hochberg *et al.*, 1977; Cohen, 1984a, b) y mejorado la floración (Erner, 1988; Furr y Armstrong, 1956).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Localización

El presente trabajo se llevó a cabo en una huerta comercial de cítricos, ubicada en el Ejido Agua Nacida, del municipio de Álamo, Veracruz; localizada hacia el norte de la entidad.

3.2. Clima

De acuerdo con la clasificación climática de Köppen, modificada por García (1973), la zona presenta un clima AW"(e), cuyo significado es el siguiente:

A: Clima cálido, donde la temperatura media anual está entre 22° y 26 °C y la del mes más frío es mayor de 18 °C.

W": Subhúmedo con lluvias en verano, con una temporada corta menos húmeda en el mismo, con época seca en invierno y un cociente de precipitación sobre temperatura entre 43.2 y 55.3.

(e): Oscilación anual de las temperaturas medias mensuales entre 7° y 14°C.

La temperatura media anual es de 24°C, con una precipitación total anual de 1,124 mm, de los cuales la mayor parte se distribuye de junio a octubre.

Durante el desarrollo del trabajo la temperatura prevaleciente fue aproximadamente de 30°C (por la mañana) aumentando gradualmente hasta 40°C de las 12:00 a la 15:00 horas; se tuvo una humedad relativa de aproximadamente 75%.

3.3. Material Vegetal Utilizado

Tangerina 'Mónica'. Los árboles del cv. Mónica son muy vigorosos y tienen un hábito de crecimiento vertical, follaje denso de color verde intenso; los frutos se producen en los brotes terminales, en producciones altas puede ocasionar la ruptura de ramas. Presenta dos floraciones, la primera a inicios de primavera y la segunda dos meses después; en plantaciones sólidas presenta un bajo amarre de fruto. Los frutos son algo aplanados de los polos, con un diámetro

aproximado de 8 - 12 cm, con un color del flavedo al madurar naranja intenso y algo rugosa; es grueso y poco adherido, lo que lo hace fácilmente desprendible con la mano. La pulpa es de color naranja intenso, con un sabor agradable y aromático. El fruto generalmente madura durante los meses de enero a marzo. Tiene una excelente calidad como fruta fresca.

Mandarina 'Dancy'. Árboles vigorosos y grandes, con un hábito de crecimiento erecto; aunque los árboles son resistentes al frío, su fruto es susceptible a las heladas; su época de recolección es durante los meses de diciembre y enero; su fruto es de forma aplanada, su flavedo tiene un color naranja rojizo y es fácil de remover (Saunt,1990).

Mandarina 'Satsuma'. Árboles de porte mediano, hojas de color verde claro, entrenudos cortos y follaje denso; fruto de color naranja, achatado, de buen tamaño y con pocas semillas; época de cosecha durante los meses de octubre a noviembre.

Tangerina 'Reyna'. Árboles de porte medio, hojas pequeñas, de color verde obscuro, sus ramas tienen un crecimiento abierto; fruto de tamaño grande ligeramente aplanado, de flavedo grueso muy rugoso y su fruto al madurar es verde con tonos ligeramente de color naranja; su época de cosecha es de enero a marzo.

Para realizar la polinización controlada, la autopolinización y la polinización libre (natural) se utilizaron 8 árboles de tangerina 'Mónica' de 12 años de edad, injertados sobre naranjo agrio (*C. aurantium* L.), establecidos en un sistema de plantación a tresbolillo y a una distancia de 7x7 m. Como fuentes de polen se usaron 4 árboles de cada uno de los cítricos siguientes: mandarina 'Dancy', tangerina 'Reyna', mandarina 'Satsuma' y tangerina 'Mónica'; establecidos bajo el mismo sistema de plantación (Figura 1).

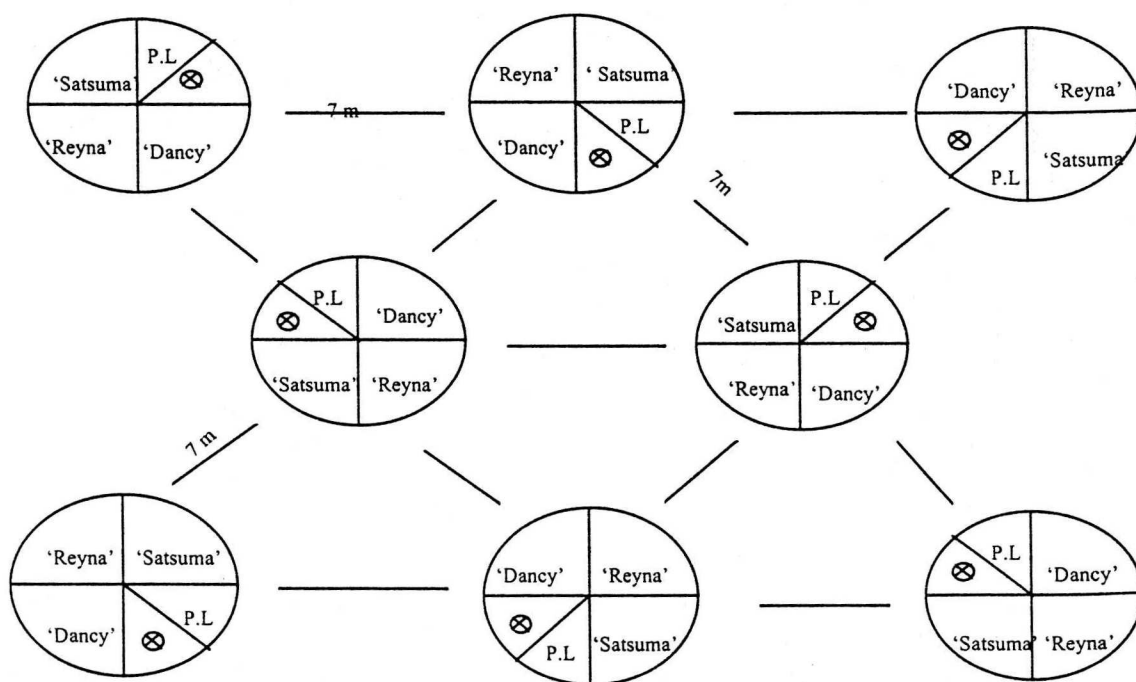


Figura 1. Distribución de los tratamientos de polinización en la tangerina 'Mónica'. Dentro de cada árbol, los nombres de los cultivares en los cuadrantes corresponden a las fuentes de polen (progenitores masculinos); P. L. = polinización libre; ⊗= autopolinización. Obsérvese la rotación en la distribución de los tratamientos.

3.4. Polinizaciones

3.4.1. Polinización libre (PL)

Para los cultivares Dancy, Reyna y Satsuma se usaron 4 árboles en cada caso; mientras que para 'Mónica' se usaron 8 (Figura 1). En todos los casos se marcaron 40 botones florales por árbol en etapa de balón; de los cuales 20 se conservaron para evaluar amarre de fruto y 20 se recolectaron para hacer las observaciones de cargas de polen y desarrollo del tubo polínico.

3.4.2. Autopolinización

Para los cultivares Dancy, Reyna y Satsuma se usaron 4 árboles en cada caso; se marcaron 40 botones por árbol. En tangerina 'Mónica' el trabajo se hizo en 8 árboles (Figura 1) y cada uno de ellos se consideró como una unidad experimental.

El procedimiento se hizo igual que para la polinización libre, excepto que al marcar los botones éstos se cubrieron con bolsas de tela (tul), las cuales se retiraron a los 15 días.

3.4.3. Polinización cruzada (PC)

Se recolectaron botones en etapa de balón de los cultivares usados como fuentes de polen (tangerina 'Reyna', mandarina 'Dancy' y mandarina 'Satsuma'), se colocaron en una hielera portátil que contenía una capa de hielo y sobre éste un material (oasis) que sirvió para su traslado del mismo al lugar donde se realizaron las polinizaciones; la dehiscencia de las anteras se presentó después de dos a tres horas de ser recolectadas.

Para este tratamiento se usó únicamente al cultivar 'Mónica' como progenitor femenino (Figura 1). Una vez que se presentó la dehiscencia de las anteras de las fuentes de polen, en el cultivar 'Mónica' (progenitor femenino) se hizo una selección de inflorescencias mixtas, dejando las flores más desarrolladas (máximo cuatro por inflorescencia) y eliminando las que no reunieron las características deseadas (como flores poco desarrolladas y flores abiertas); además, se procuró que las inflorescencias seleccionadas tuvieran una cantidad suficiente de hojas y que se ubicaran sobre ramas del año anterior. Bajo este criterio se emascularon 240 botones florales por árbol (8 árboles) en estado de balón, que consistió en eliminar estambres y pétalos, usando para ello las uñas de las manos. Las polinizaciones se iniciaron a las 9:00 A. M. y se terminaron a las 14: 00 horas (por un período de 22 días); para ello las flores de tangerina 'Reyna', mandarina 'Dancy' y mandarina 'Satsuma' fueron colocadas y frotadas sobre los estigmas receptivos de 'Mónica' (80 con cada una de las fuentes polinizadoras).

De los 80 pistilos polinizados en cada árbol (8 árboles) con cada fuente de polen 40 de ellos se conservaron para evaluar amarre de fruto y 40 se recolectaron (a las 48, 96, 144 y 192 horas, 10 pistilos en cada caso) para observar el desarrollo del tubo polínico.

3.5. Procesamiento de Pistilos y Observación de los Tubos Polínicos

En todos los casos las flores recolectadas se fijaron y conservaron en fijador 2:1 (2 partes de etanol al 100%, por una parte de ácido acético glacial), permaneciendo ahí por un período de 3 a 4 meses.

En los casos de polinización libre y autopolinización se recolectaron 5 pistilos por árbol, a las 48, 96, 144 y 192 horas a partir de la apertura floral o polinización. Para el caso de las polinizaciones cruzadas se recolectaron 10 pistilos cada dos días (48, 96, 144 y 192 horas), haciendo un total de 40 pistilos.

Para hacer las observaciones, a los pistilos se les eliminó el fijador (2:1), se enjuagaron con etanol al 50% (dejándolos reposar por dos minutos), seguido por otro enjuague en etanol al 70% (dos minutos) y finalmente se enjuagaron con agua destilada y se ablandaron durante 72 horas en una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 8N. Posteriormente se enjuagaron los especímenes en agua corriente hasta eliminar los excesos de NaOH y se dejaron reposar en agua destilada por 24 horas. Finalmente, se tomaron muestras de pistilos y se disectaron en 4 partes (estigma, parte superior del

estilo, parte inferior y ovario); el estigma se dividió en partes hasta llegar a octavos y se tomó uno de ellos el cual se colocó sobre un portaobjetos para cuantificar la carga de polen; a cada sección del estilo (parte superior e inferior) se le hizo un corte longitudinal y se abrió de tal manera que al colocarlo sobre el portaobjetos permitiera cuantificar el número de tubos polínicos; el ovario para su observación se dividió longitudinalmente en 4 o 5 secciones.

Para la tinción se agregó una gota de lacmoide (Sigma) al 0.5% disuelto en etanol al 30%; una gota de bicarbonato de sodio al 5% en etanol al 30% y una gota de agua destilada sobre los pistilos, se les colocó el cubreobjetos, se les presionó con el borrador de un lápiz y se procedió a su observación en un microscopio óptico de luz blanca. Se estimaron el total de granos de polen depositados sobre el estigma y el número de granos germinados para cada pistilo. Con estos datos se calculó el porcentaje de germinación para cada tiempo de recolección.

3.6. Germinación de Polen en Condiciones *in vitro*

Para hacer las pruebas de germinación del polen, se recolectaron flores en etapa de balón de los cultivares Mónica, Reyna, Satsuma y Dancy; después de que las anteras liberaron el polen, se tomó una muestra de cada uno de los diferentes materiales, se colocó en tubos de ensaye que contenían soluciones de sacarosa a diferentes concentraciones (10, 20 y 40%) con dos repeticiones

cada uno, incubándose durante 48 horas a una temperatura ambiente de 27 a 30°C; para realizar las observaciones al microscopio óptico se tomó una muestra con un gotero de la solución que contenía el polen de cada cultivar y se colocó sobre un portaobjetos (dos repeticiones), haciendo observaciones en seis campos de cada uno de los portaobjetos y cuantificando de esta manera el número de granos de polen germinados y no germinados.

3.7. Pruebas de Tinción para Viabilidad de Polen

Para determinar la viabilidad del polen, se preparó una solución de 2.5 diphenyl 3(α -naphthyl) tetrazolium al 0.1% y otra de sacarosa al 60%, haciendo una mezcla con ambas soluciones (1:10 respectivamente); de ésta mezcla se tomó una cantidad suficiente; de tal manera, que quedara una capa uniforme distribuída en una tercera parte del portaobjetos, sobre la cual con un pincel se depositó el polen y se colocó un cubreobjetos, para después almacenarlo durante 3-4 horas a una temperatura de 40°C. La observación para cuantificar la viabilidad del polen se hizo en seis campos ópticos de 4 portaobjetos. Los granos que se tornaron de color rosado se consideraron como viables.

3.8. Cuantificación del Amarre de Fruto y Semillas

Se realizó una primera evaluación a los dos o tres meses después de antesis (junio 98). En frutos bien desarrollados aproximadamente a los 11

meses después de antesis (marzo 99) se hizo una segunda evaluación; se recolectaron los frutos de las polinizaciones cruzadas y se cuantificó el número de semillas por fruto.

3.9. Análisis Estadístico

Los tratamientos (cruzas, polinización libre y autopolinización) fueron analizadas bajo un diseño experimental completamente al azar con 8 repeticiones para las cruzas, autopolinizaciones y polinización libre en el cv. Mónica. Para el caso de la autopolinización y polinización libre de los cvs. Dancy, Reyna y Satsuma, se hizo con 4 repeticiones. Para todos los casos cada árbol constituyó una repetición, la unidad experimental para las cruzas fue de grupos de 40 flores por árbol y para la polinización libre y autopolinización grupos de 20 flores.

Los datos de las variables evaluadas se analizaron en el paquete computacional: Statistics Analysis System, se realizaron análisis de varianza y comparaciones de medias de Tukey de las variables obtenidas en campo y laboratorio.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Germinación del Polen y desarrollo del tubo polínico *in vivo*

La cantidad de granos de polen y de tubos polínicos sobre el estigma fue tan abundante que imposibilitó su cuantificación; de ahí que fuera necesario hacer un muestreo, tal y como se indicó en materiales y métodos. El comportamiento y las tonalidades de los tejidos fueron similares en todos los tratamientos, independientemente de la especie y la fuente de polen.

El tejido estigmático apareció de color café claro y no se distinguieron las células debido a que se trata de un tejido macerado. En los granos de polen sólo se distinguió la pared, la cual se tornó de un color anaranjado; mientras que el citoplasma apareció incoloro o de color grisáceo claro. Los tubos polínicos se traslaparon, convirtiéndose en una maraña, y dado que sólo se tiñeron los tapones de calosa se perdió la continuidad de cada tubo (Figura 2A).

Al penetrar los tubos polínicos en el estilo, los tapones de calosa se distinguieron como tiras largas de color azul brillante y la continuidad de cada tubo fue haciéndose cada vez más evidente, dado que la cantidad de tubos fue menor a medida que se acercaban al ovario. El tejido estilar fue de color azul más claro y granuloso, mientras que los haces vasculares fueron incoloros o algo grisáceos (Figuras 2B y 3E).

Aunque los tubos polínicos corren a todo lo largo de los canales estilares, al hacer el aplastado aparecen a lo largo de los haces vasculares principales de cada uno de los carpelos (aproximadamente 10) y se notan como pequeñas tiras de color azul brillante (Figura 2C). En la figura 2D se puede observar un tapón de calosa delimitando la pared del tubo.

Al llegar los tubos polínicos al ovario, algunos de ellos penetraron a los lóculos y otros se desviaron a través de la pared externa o del tejido central del ovario. Los tubos que penetraron sufrieron algunas espiralizaciones, traslapándose entre ellos, para finalmente llegar a los óvulos y penetrar a través del micrópilo. Los tegumentos de los óvulos aunque fueron distinguibles se mantuvieron casi incoloros, mientras que la nucela apareció de color café claro (Figura 3F).

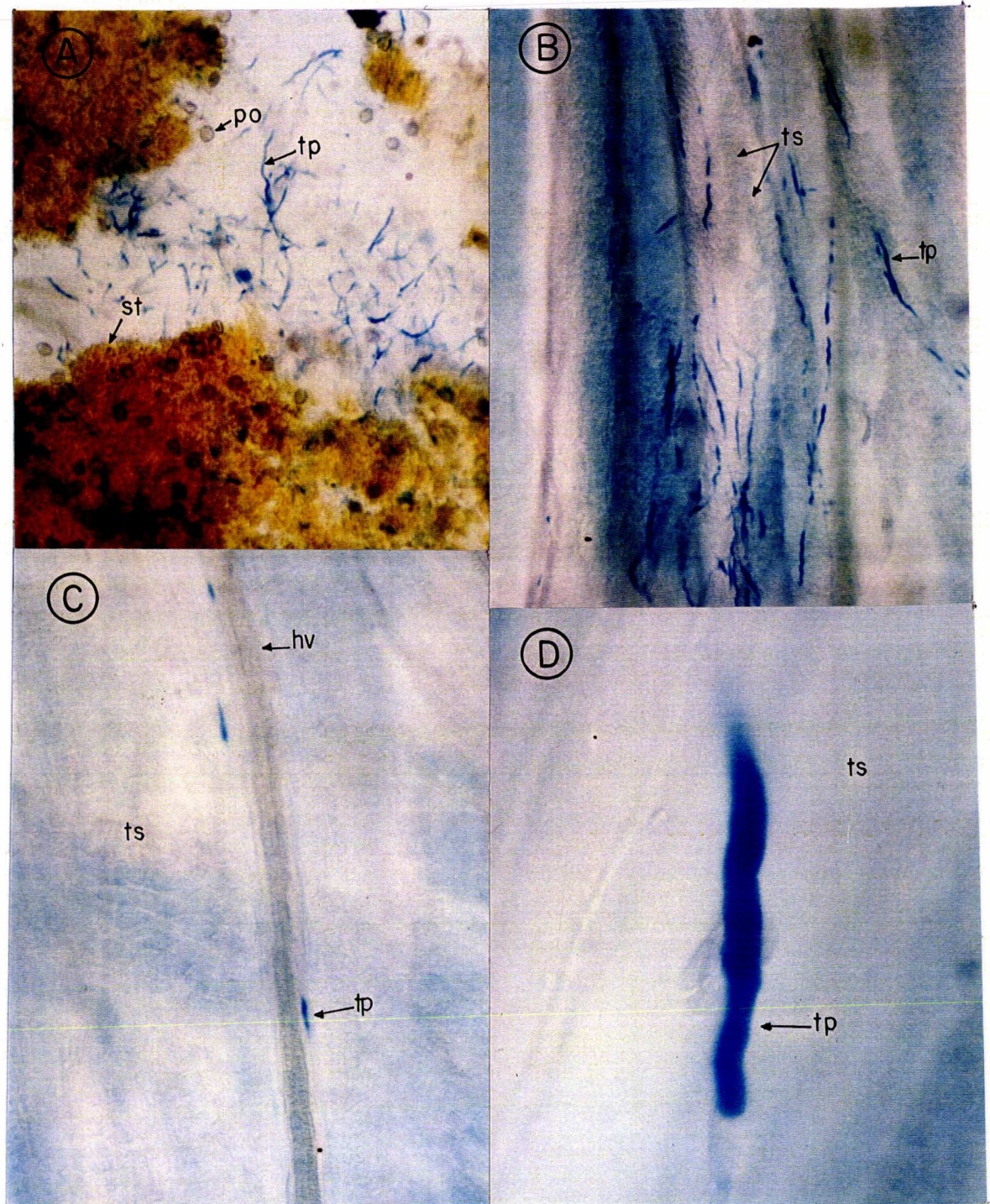


Figura 2. A; granos y tubos polínicos sobre el estigma (po=grano de polen; tp=tubo polínico; st=tejido estigmático). B. tubos polínicos creciendo en el estilo (ts=tejido estilar; tp=tubo polínico). C; tubos polínicos creciendo a lo largo del haz vascular (hv=haz vascular; tp=tubo polínico; ts=tejido estilar). D; tapón de calosa en un tubo polínico (ts=tejido estilar; tp=tubo polínico).

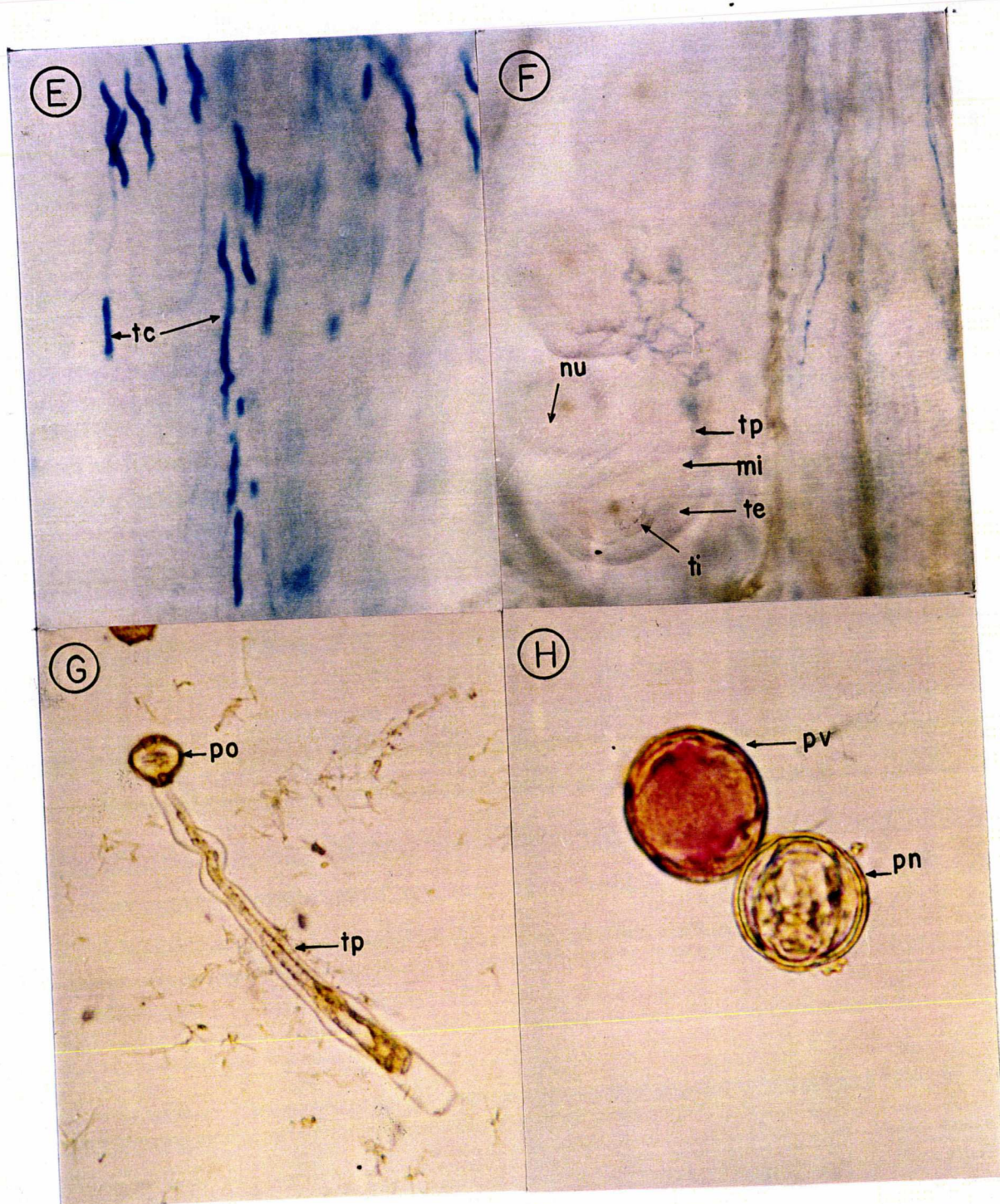


Figura 3. E; tubos polínicos creciendo en el estilo (tc=tapón de calosa). F; tubos polínicos penetrando los óvulos (nu=nucela; tp=tubo polínico; mi=micrópilo; te=tegumento externo; ti=tegumento interno). G; grano de polen germinando *in vitro* (po=grano de polen; tp=tubo polínico). H; tinción de granos de polen (pv=grano de polen viable; pn=grano de polen no viable)

4.1.1. Polinización libre

Al observar el número de granos de polen sobre el estigma a las 48 horas después de antesis (Cuadro 1), se puede inferir que la carga de polen no es una limitante para el amarre de frutos; sin embargo, lo más probable es que la mayor parte de los granos sean de la misma flor (autofecundación) y que ello conduzca a un reducido número de semillas. También puede verse que no hay diferencias estadísticas entre cultivares y que el número de granos en todos los casos es demasiado alto.

A pesar de que el número de granos de polen sobre el estigma es bastante alto, muy pocos de ellos germinan y penetran al estilo (1 a 4%), probablemente debido a la competencia, como lo estipula Sedgley (1976). En la mandarina 'Satsuma', a pesar de que en la parte superior del estilo se tuvieron más tubos polínicos, que en el resto de los cultivares, sólo un reducido número de tubos llegaron al ovario, en donde las diferencias desaparecieron (Cuadro 1).

Cuadro 1. Número de granos de polen y desarrollo de tubos polínicos en cuatro cultivares de cítricos, bajo condiciones de polinización libre, 48 horas después de antesis.

Especie y cultivar	No. granos de polen sobre estigma		No. de tubos polínicos en estilo				No. tubos polínicos en ovario	
			Parte superior		Parte inferior			
Tangerina 'Mónica'	2 328.6	a ²	54.31	b	28.81	a	15.90	a
Mandarina 'Dancy'	3 506.7	a	23.50	b	19.25	a	18.25	a
Tangerina 'Reyna'	3 380.0	a	37.54	b	23.93	a	11.60	a
Mandarina 'Satsuma'	2 200.0	a	92.42	a	32.80	a	10.05	a
DMS	2 572.4		36.91		15.00		17.04	

²Valores dentro de columnas seguidas por la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de medias de Tukey ($P \leq 0.05$)

En todos los casos el número de tubos polínicos va disminuyendo del estigma al ovario; de tal manera, que al ovario sólo llegan de 10 a 20 tubos.

A las 96 horas después de antesis (Cuadro 2) se observó un comportamiento similar, pues sólo hubo diferencias en el número de granos de polen sobre el estigma, desapareciendo éstas en el estilo y en el ovario.

Cuadro 2. Número de granos de polen y desarrollo de tubos polínicos en cuatro cultivares de cítricos, bajo condiciones de polinización libre, 96 horas después de antesis.

Especie y cultivar	No. granos de polen sobre estigma	No. de tubos polínicos en estilo		No. tubos polínicos en ovario
		Parte superior	Parte inferior	
Tangerina 'Mónica'	2 888.6 b ^z	37.12 a	24.89 a	18.02 a
Mandarina 'Dancy'	2 678.3 a	65.59 a	36.47 a	20.93 a
Tangerina 'Reyna'	2 960.0 a	47.45 a	29.10 a	12.06 a
Mandarina 'Satsuma'	1 889.0 a	69.51 a	20.86 a	14.80 a
DMS	1 526.0	53.63	20.31	11.30

^z Valores dentro de columnas seguidas por la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de medias de Tukey ($P \leq 0.05$)

Al comparar el número de tubos polínicos en el ovario, en los cuatro cultivares a diferentes tiempos después de antesis, sólo se tuvieron diferencias estadísticas a las 192 horas, encontrándose un mayor número de tubos en la mandarina 'Satsuma' y en la tangerina 'Reyna', y un menor número en tangerina 'Mónica'. La mandarina 'Dancy' resultó ser estadísticamente igual a 'Mónica'. (Cuadro 3).

Cuadro 3. Número de tubos polínicos en el ovario en cuatro cultivares de cítricos, bajo condiciones de polinización libre, en diferentes tiempos después de antesis.

Especie y cultivar	Horas después de antesis			
	48	96	144	192
Tangerina 'Mónica'	15.90 a ^z	18.02 a	19.80 a	14.38 b
Mandarina 'Dancy'	18.25 a	20.93 a	22.82 a	28.93 ab
Tangerina 'Reyna'	11.60 a	12.06 a	30.26 a	36.33 a
Mandarina 'Satsuma'	10.05 a	14.80 a	19.13 a	34.42 a
DMS	17.04	11.30	19.49	16.27

^zValores dentro de columnas seguidas por la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de medias de Tukey ($P \leq 0.05$)

4. 1. 2. Autofecundación

Al comparar el número de granos de polen sobre el estigma de flores autofecundadas (Cuadros 4 y 5) contra el de polinización libre (Cuadros 1 y 2) pueden observarse las diferencias en las cargas polínicas sobre los estigmas, lo cual era de esperarse, ya que en las flores autopolinizadas se limitó la entrada de agentes polinizantes (principalmente abejas). Las cantidades de granos de polen fueron hasta diez veces menores en las autofecundaciones.

A las 48 horas después de antesis en la tangerina 'Mónica' se observó la mayor cantidad de granos de polen sobre el estigma, aunque estadísticamente no se registraron diferencias con el resto de los cultivares. Al igual que para el caso de las polinizaciones libres, aquí también el número de tubos polínicos fue disminuyendo de la parte superior del estilo al ovario (Cuadro 4).

Cuadro 4. Número de granos de polen y desarrollo de tubos polínicos en autofecundación de cuatro cultivares de cítricos, 48 horas después de antesis.

Especie y cultivar	No. granos de polen sobre estigma		No. de tubos polínicos en estilo				No. tubos polínicos en ovario	
			Parte superior		Parte inferior			
Tangerina 'Mónica'	2 413	a ^z	22.72	a	15.66	b	0.00	b
Mandarina 'Dancy'	747	a	20.16	a	16.91	ab	16.91	a
Tangerina 'Reyna'	622	a	26.95	a	19.65	ab	18.20	a
Mandarina 'Satsuma'	264	a	30.30	a	28.05	a	0.00	b
DMS	3 825		14.11		11.13		4.23	

^zValores dentro de columnas seguidas por la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de medias de Tukey ($P \leq 0.05$)

El número de tubos polínicos manifestó diferencias estadísticas, tanto en la parte inferior del estilo como en el ovario. Aunque la tangerina 'Mónica' presentó el mayor número de granos de polen sobre el estigma no se encontró ningún tubo en el ovario, tal y como lo reportan Ton y Krezdorn (1966) para la

tangerina 'Clementina' y el tangelo 'Orlando'; quienes indican que pudo deberse al desarrollo de una capa de abscisión en la base del estilo antes de que los tubos pasaran por dicha zona, o bien a una fuerte inhibición en el ovario. Aunque la calosa puede formar una barrera, impidiendo que los tubos polínicos continúen avanzando. Se supone que al pasar los tubos cambian la permeabilidad de las células y se forma calosa en respuesta a las heridas (Currier, 1957).

Sedgley (1976) indica que muchos tubos detienen su crecimiento debido a la falta de reservas, pues en tubos creciendo en condiciones *in vitro* se ha observado que conforme disminuyen los sustratos se detiene el crecimiento. Una explicación alternativa es que los tubos polínicos secretan un inhibidor que actúa para detener el crecimiento del resto de los tubos. En los cítricos aunque pueden depositarse y germinar miles de granos sobre el estigma sólo llegan al ovario de 0-40 tubos, mientras que en aguacatero pueden germinar sobre el estigma hasta 60 granos y sólo llegan al ovario uno o dos tubos. En la mandarina 'Satsuma' aunque hubo un menor número de granos de polen sobre el estigma (pero se considera suficiente) tampoco se encontraron tales en el ovario. En 'Dancy' y 'Reyna' la mayor parte de los tubos polínicos observados en la parte superior del estilo lograron llegar al ovario (Cuadro 4).

Con base en las anteriores condiciones, se puede suponer que tanto la tangerina 'Mónica' como la mandarina 'Satsuma' tienen cierto grado de autoincompatibilidad. Sin embargo, no se encontraron anomalías como las

reportadas por Khan y DeMason (1986); dentro de las que se encuentran: tubos polínicos delgados, deposiciones de calosa en el ápice del tubo, estallamiento del ápice del tubo, deposición irregular de calosa en las paredes de los tubos y espiralización de los tubos polínicos.

Según Ton y Krezdorn (1966) el sistema de incompatibilidad en cítricos es del tipo gametofítico, correlacionado según Brewbaker (1957) con la producción de granos de polen binucleados, facilidad de conservación de los granos de polen e inhibición de los tubos polínicos en algún lugar entre el estigma y el ovario. Aunque con respecto al tipo de grano de polen aún hay controversias, pues según Bangeri (citado por Soost, 1965) es trinucleado y según Brewbaker (citado por Soost, 1965) es binucleado.

La presencia de autoincompatibilidad está bien documentada en varias especies de *Citrus* (Soost, 1965), entre las que se encuentran la mandarina 'Clementine', y los tangelos (*C. paradisi* x *C. reticulata*) 'Orlando' y 'Mineola' (Ton y Krezdorn, 1966). Reece y Register (citados por Soost, 1965) también reportaron autoincompatibilidad en la tangerina híbrida 'Robinson' [*C. reticulata* x (*C. paradisi* x *C. reticulata*)].

En términos generales, a las 96 horas después de la polinización, se encontró un mayor número de granos de polen sobre el estigma, lo cual se debió a un mayor tiempo de exposición de las flores; sin embargo, en el estilo y en el ovario se mantuvieron las tendencias (Cuadro 5).

Cuadro 5. Número de granos de polen y desarrollo de tubos polínicos en autofecundación de cuatro cultivares de cítricos, 96 horas después de antesis.

Especie y cultivar	No. granos de polen sobre estigma	No. de tubos polínicos en estilo		No. tubos polínicos en ovario
		Parte superior	Parte inferior	
Tangerina 'Mónica'	1 786 a ^z	16.80 a	13.90 a	0.0 b
Mandarina 'Dancy'	1 170 a	40.66 a	25.62 a	25.62 a
Tangerina 'Reyna'	973 a	27.13 a	19.60 a	14.93 a
Mandarina 'Satsuma'	398 a	21.66 a	18.20 a	0.0 b
DMS	4210. 2	25.18	19.19	8.03

^z Valores dentro de columnas seguidas por la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de medias de Tukey ($P \leq 0.05\%$)

Nuevamente en la tangerina 'Mónica' y en la mandarina 'Satsuma' no se observaron tubos polínicos en el ovario; mientras que en mandarina 'Dancy' y tangerina 'Reyna' se encontraron 25.6 y 14.9 tubos polínicos, respectivamente en el ovario, no manifestando diferencias estadísticas entre ambas.

Al analizar el número de tubos polínicos en el ovario, a las 48, 96, 144 y 192 horas después de antesis la situación fue muy parecida; resultando por un lado iguales la tangerina 'Mónica' y la mandarina 'Satsuma' y por el otro, la mandarina 'Dancy' y la tangerina 'Reyna'. En el primer caso no se encontraron tubos polínicos en el ovario; mientras que en el segundo, se encontraron de 14

a 28 tubos en el ovario, resultando ligeramente superior la mandarina 'Dancy' (Cuadro 6).

Cuadro 6. Número de tubos polínicos en el ovario en cuatro cultivares de cítricos, en autofecundación, a diferentes tiempos después de antesis.

Especie y cultivar	Horas después de antesis			
	48	96	144	192
Tangerina 'Mónica'	0.00 b ^z	0.00 b	0.00 b	0.00 b
Mandarina 'Dancy'	16.91 a	25.62 a	28.71 a	25.80 a
Tangerina 'Reyna'	18.20 a	14.93 a	22.70 a	23.33 a
Mandarina 'Satsuma'	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b
DMS	4.23	8.03	3.95	6.74

^z Valores dentro de columnas seguidas por la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de medias de Tukey ($P \leq 0.05$)

Cabe indicar que en ningún caso se manifiestan las anormalidades reportadas por Kahn y DeMason (1986), excepto las deposiciones de calosa sobre las paredes de los tubos. Esto probablemente se deba a que el sitio de inhibición de los tubos polínicos se encuentra en la base del estilo o en el ovario, como lo indica Hensz (citado por Kahn y DeMason, 1986) o en los óvulos, puesto que en muchos casos los tubos llegaron a la base del estilo y en lugar de entrar al lóculo se continuaron junto a los haces vasculares de las

paredes del ovario hasta llegar al receptáculo (Figura 3F), indicando esto que probablemente los óvulos no ejercen algún tipo de atracción sobre las puntas de los tubos.

1.1. 3. Polinización cruzada.

Está experimentalmente demostrado que la velocidad de crecimiento de los tubos polínicos está influenciada por las condiciones ambientales, principalmente temperatura (Papademetriou, 1974-1975; Sedgley y Annells, 1981; Socias i Company *et al.*, 1976; Vasilakakis y Porlingis, 1985). Sedgley (1977) encontró que en aguacatero la tasa de crecimiento de los tubos polínicos se incrementó con el aumento de la temperatura, aunque a la temperatura de 33°C durante el día, 28°C durante la noche 33/28°C se observó crecimiento anormal de algunos tubos; por el contrario, a 17/12°C los tubos fracasaron para alcanzar el óvulo. En peral los tubos polínicos crecen hasta la base del estilo dentro de 24 horas a 21°C, dentro de 72 horas a 15.5°C y dentro de 120 horas a 10°C (Papademetriou, 1974-1975). En palma datilera a temperaturas de 25 a 28°C la mayoría de los tubos alcanzaron la base del estilo dentro de seis horas, y a 15 °C los tubos no alcanzaron la base del estilo dentro de 8 horas de evaluación (Reuveni *et al.*, 1986). Griggs e Iwakari (1975) observaron el desarrollo normal de los tubos en almendro, cuando la temperatura del día estaba entre 15.6 y 26.2°C; la germinación ocurrió entre 4.4 y 10°C, pero no abajo de 4°C. En nogal de castilla (*Juglans regia*) los tubos requirieron de 2.5 a 4 días para

crecer del estigma a la nucela a temperaturas de 32 a 33°C. En cerezo dulce los tubos polínicos crecieron del estigma al óvulo en 6 a 8 días (Stösser y Anvari, 1983). En marañón algunos tubos polínicos alcanzaron el ovario en 3 horas después de la polinización y la penetración de los óvulos se observó a las 24 horas (Wannachit *et al.*, 1992). En aguacatero el tubo polínico alcanzó al ovario en 18 horas a 25°C durante el día y 20°C durante la noche (Sedgley, 1977).

En el presente trabajo en tan solo 2 días después de la polinización los tubos polínicos alcanzaron el ovario, en condiciones de Álamo, Veracruz (Cuadro 7). Esto resultó ser totalmente diferente a lo reportado por otros investigadores, como Kahn y DeMason (1986) quienes indican que algunos tubos polínicos de 'Orlando' penetraron los óvulos de 'Dancy' en 9 a 12 días después de la polinización. En cruza compatibles de cítricos Ton y Krezdorn (1966) encontraron penetración de los óvulos por los tubos polínicos dentro de los 6 a 8 días, e indican que aunque se pudieran haber fecundado los óvulos en un tiempo mayor, esto no habría sido posible debido a que a los 8 días comenzó la abscisión de los estilos.

Cuadro 7. Número de granos de polen y desarrollo de tubos polínicos en tangerina 'Mónica' usando diversas fuentes de polen, 48 horas después de la polinización.

Progenitor masculino	No. granos de polen sobre estigma	No. de tubos polínicos en estilo		No. tubos Polínicos en ovario
		Parte superior	Parte inferior	
'Dancy'	2 165 b ^z	26.89 a	22.52 a	22.27 a
'Reyna'	3 439 b	33.14 a	27.97 a	27.88 a
'Satsuma'	7 351 a	9.17 b	7.65 b	6.53 b
DMS	3 879	14.61	12.79	12.14

^z Valores dentro de columnas seguidas por la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de medias de Tukey ($P \leq 0.05$)

En general, las cargas polínicas a las 48 horas después de la polinización no difirieron mucho con los tratamientos de polinización libre (Cuadro 1 y 2); excepto cuando se usó 'Satsuma', en donde se contaron más de 7 000 granos de polen sobre el estigma (Cuadro 7). A pesar de que en éste caso el polen fue abundante, muy pocos granos germinaron y penetraron a la parte superior del estilo, resultando superiores 'Dancy' y 'Reyna', y tal superioridad se mantuvo en la parte superior del estilo y en el ovario, ya que cuando se usó polen de 'Dancy' y 'Reyna' se observaron más de 20 tubos polínicos en el ovario, mientras que cuando se usó 'Satsuma' sólo se tuvieron 6.5 en promedio (Cuadro 7). Esto nos indica que 'Dancy' y 'Reyna' podrían ser buenos polinizadores para 'Mónica', aunque para seleccionar el mejor será

necesario registrar los períodos de floración para un lugar determinado. Con respecto al número de tubos polínicos en el ovario, en general se puede considerar como bajo, ya que un gineceo contiene de 10 a 11 carpelos y tomando en cuenta que cada carpelo contiene de 2 a 4 óvulos sería deseable que entraran al ovario de 30 a 50 tubos. Comparando el número de granos de polen de éste trabajo (2 210 a 7 321) con los registrados por Kahn y DeMason (1986), resultaron ser muy superiores los de nuestra investigación, pero son más reales, al compararlos con lo que sucede bajo condiciones de polinización libre. Dichas diferencias se deben a que los autores antes mencionados mezclaron el polen con harina para su aplicación.

A las 96 horas después de la polinización no hubo diferencias estadísticas en el número de granos de polen sobre el estigma entre los diversos cultivares donadores. En la parte superior del estilo resultó superior 'Reyna' con respecto a 'Satsuma'; sin embargo, en la base del estilo y en el ovario no hubo diferencias estadísticas entre los diversos donadores (Cuadro 8). A pesar de que el polen de 'Satsuma' presentó bajos porcentajes de germinación, la mayor cantidad de los tubos polínicos lograron llegar al ovario, cosa que no sucedió con los otros dos cultivares.

Cuadro 8. Número de granos de polen y desarrollo de tubos polínicos en tangerina 'Mónica' usando diversas fuentes de polen, 96 horas después de la polinización.

Progenitor masculino	No. granos de polen sobre estigma	No. de tubos polínicos en estilo				No. tubos polínicos en ovario
		Parte superior		Parte inferior		
'Dancy'	3 706 a ^z	42.21	ab	32.02	a	19.81 a
'Reyna'	2 210 a	57.51	a	38.51	a	28.42 a
'Satsuma'	2 943 a	35.48	b	28.75	a	25.79 a
DMS	2 716	21.41		12.17		11.63

^z Valores dentro de columnas seguidas por la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de medias de Tukey ($P \leq 0.05$).

Al observar el número de tubos polínicos a diferentes tiempos (48, 96, 144 y 192 horas), no se manifestaron tendencias claras, ya que a los 2 días después de la polinización resultó ser inferior 'Satsuma'; a los 4 días no hubo diferencias y a los 6 y 8 días resultó superior 'Reyna', aunque a los 8 días éste cultivar resultó estadísticamente igual que 'Satsuma' (Cuadro 9). Bajo éstas consideraciones parece ser que éste último cultivar también resultase ser un buen polinizador para 'Mónica'; sin embargo, hay que considerar sus bajos porcentajes de germinación del polen y que es un cultivar poco común en las zonas productoras, lo que ya representa ciertas limitaciones (Cuadro 9).

Cuadro 9. Número de tubos polínicos en el ovario de tangerina 'Mónica' usando diferentes fuentes de polen, a diversos tiempos después de polinización.

Progenitor masculino	Horas después de polinización							
	48		96		144		192	
'Dancy'	22.27	a ^z	19.81	a	23.38	b	21.76	b
'Reyna'	27.88	a	28.42	a	41.65	a	35.01	a
'Satsuma'	6.53	b	25.79	a	27.86	b	24.58	ab
DMS	12.14		11.63		12.29		10.82	

^z Valores dentro de columnas seguidas por la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de medias de Tukey ($P \leq 0.05$)

4. 1. 4. Germinación de polen en condiciones *in vitro*

En condiciones *in vitro* los granos de polen empezaron a germinar a las 48 horas, tornándose el citoplasma de color café claro mientras que la pared fue casi incolora (Figura 3G)

Los porcentajes de germinación de polen variaron de acuerdo con el cultivar y con la concentración de sacarosa. La tangerina 'Mónica' presentó los más altos porcentajes de germinación (14 a 27), seguido por 'Reyna' (1.9 - 8.6) y 'Satsuma' (1.4 - 9.7). Para 'Mónica' la concentración de sacarosa más adecuada fue al 20% mientras que para 'Reyna' y 'Satsuma' fue la de 40% (Figura 4).

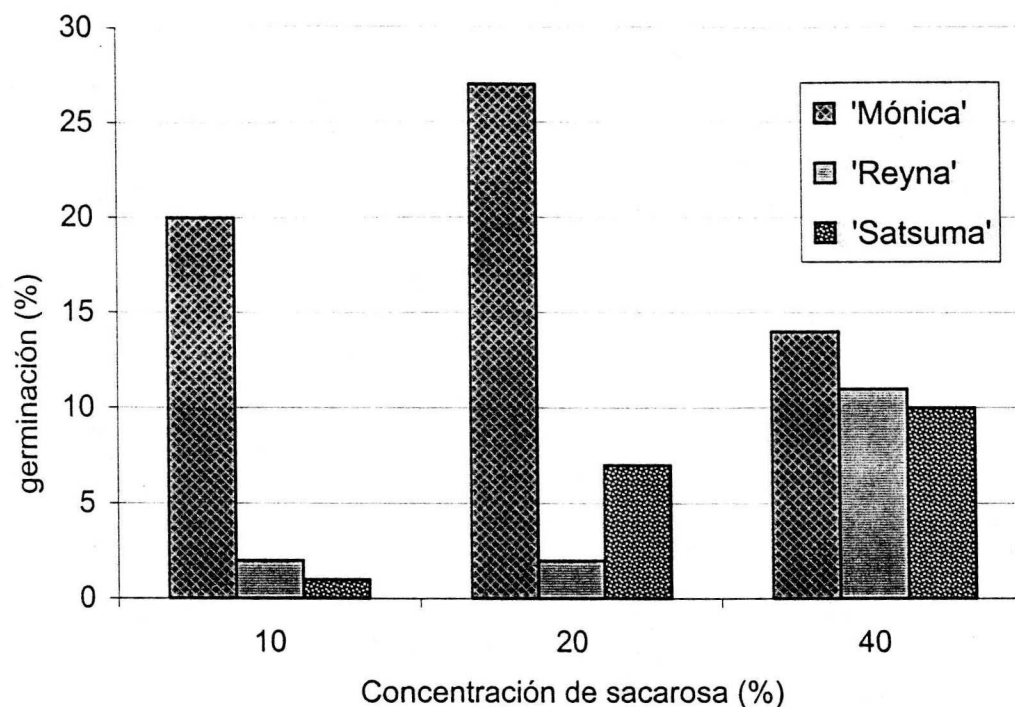


Figura 4. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la germinación de polen de tres cultivares de cítricos.

4.1.5. Pruebas de tinción para viabilidad de polen

En las pruebas de tinción los granos viables se tornaron de un color rosa intenso, mientras que los no viables aparecieron incoloros o ligeramente rosados (Figura 3H).

Los porcentajes obtenidos a través de este medio (Cuadro 10) resultaron un tanto diferentes, con respecto a la germinación en condiciones *in vitro*. En las pruebas con el colorante se obtuvieron valores más altos, lo cual probablemente se debe a una sobreestimación, ya que el color rosado de los

granos considerados como viables no fue muy claro y tal vez sería conveniente haber probado otros colorantes. Los mayores porcentajes se obtuvieron en éste caso para 'Mónica' y 'Satsuma' .

Cuadro 10. Número y porcentaje de granos de polen viables (promedio de 16 campos de observación) de cuatro cultivares de cítricos, usando 2.5 diphenyl 3(α - naphthyl) tetrazolium, incubados a una temperatura de 40-45° C durante 4 horas.

Especie y cultivar	No. total de granos observados	Promedio del No. de granos viables	% de granos viables
Tangerina 'Mónica'	172.18	92.94 ab ^z	54
Mandarina 'Dancy'	231.25	113.75 ab	49
Mandarina 'Reyna'	213.81	88.25 b	41
Tangerina 'Satsuma'	264.94	134.94 a	51
DMS		42.25	

^zValores dentro de columnas seguidas por la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de medias de Tukey ($P \leq 0.05$)

4. 1. 6. Influencia de la fuente de polen sobre amarre de fruto.

Es claro que la fuente de polen tuvo influencia sobre el porcentaje de amarre de fruto. En el Cuadro 11 se puede observar que el mayor porcentaje se

obtuvo cuando se usó 'Reyna' como polinizador, y aunque 'Dancy' y 'Satsuma' resultaron iguales estadísticamente, la primera fue mayor numéricamente. Esto concuerda con el número de tubos polínicos encontrados en los ovarios a los diversos intervalos de tiempo después de polinización (Cuadros 7, 8 y 9). En el caso de las autopolinizaciones de 'Mónica' no hubo amarre de fruto, demostrando nuevamente que es un cultivar autoincompatible (Cuadro 11).

Cuadro 11. Influencia de la fuente de polen sobre el amarre de frutos en tangerina 'Mónica'

Progenitor masculino	Frutos amarrados		
	Promedio (junio 98)	junio 98 (%)	marzo99 (%)
'Dancy'	16 b ^z	39	10
'Reyna'	24 a	61	16
'Satsuma'	11 b	28	14
'Mónica'(Autopolinización)	0 c		
DMS	7.64		

^z Valores dentro de columnas seguidas por la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de medias de Tukey ($P \leq 0.05$).

Con respecto al efecto del polen sobre el tamaño del fruto, cuando se usó a 'Satsuma' como polinizador se obtuvieron los frutos de mayor tamaño, aunque en la primera fecha de evaluación (junio del 98) los frutos de 'Satsuma' y 'Dancy' resultaron ser iguales estadísticamente y en la segunda fecha (marzo 99) resultaron ser iguales los frutos de 'Dancy' y 'Reyna' (Cuadro 12).

Cuadro 12. Influencia de la fuente de polen sobre el tamaño de fruto en tangerina 'Mónica'.

Progenitor masculino	Diámetro ecuatorial (cm)	
	Junio 98	Marzo 99
'Dancy'	1.88 ab ^z	7.84 cb
'Reyna'	1.40 b	7.67 c
'Satsuma'	2.12 a	8.56 a
Polinización libre		8.12 b
DMS	3.57	0.36

^zValores dentro de columnas seguidas por la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de medias de Tukey ($P \leq 0.05$)

El tamaño del fruto no presentó correlación con el número de semillas (Figura 5), lo que indica que en etapas avanzadas del desarrollo éstas no tienen ningún efecto sobre el fruto. Sin embargo, es claro que en las primeras etapas por lo menos algunos óvulos deberán ser fecundados para que los frutos puedan iniciar su desarrollo, puesto que en condiciones de autofecundación el amarre fue nulo.

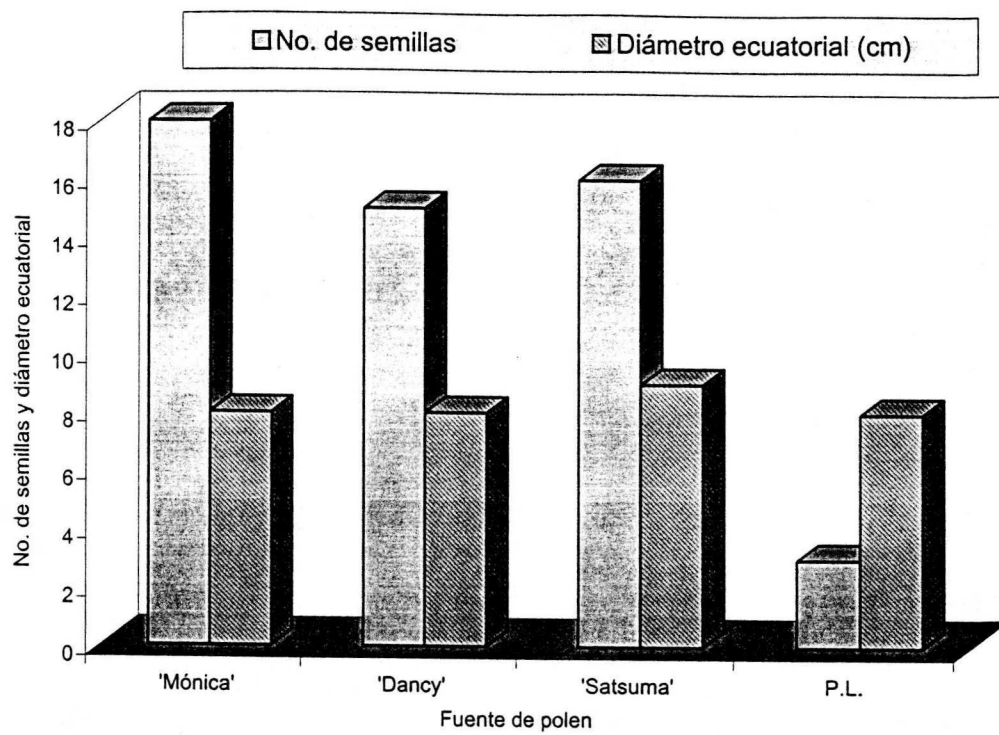


Figura 5. Número de semillas y diámetro de los frutos en cruza de cítricos, usando diferentes fuentes de polen.

V. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir lo siguiente:

En condiciones de polinización libre, la cantidad de polen depositado sobre el estigma no es una limitante para el amarre de frutos en tangerina 'Mónica'.

La tangerina 'Mónica' y la mandarina 'Satsuma' presentan autoincompatibilidad del tipo gametofítico, ya que ningún tubo polínico logró penetrar al ovario en condiciones de autopolinización.

La mandarina 'Dancy' y la tangerina 'Reyna' pueden ser buenos polinizadores para la tangerina 'Mónica', siempre y cuando coincidan en sus períodos de floración.

Los porcentajes de germinación de polen *in vitro* variaron de acuerdo con el cultivar y la concentración de sacarosa.

Los porcentajes de viabilidad estimados con la prueba de tinción no concordaron con la germinación *in vitro*, lo cual probablemente se deba a que el colorante no fue el adecuado.

No se encontró correlación del diámetro ecuatorial de los frutos con el número de semillas contenidas en ellos.

LITERATURA CITADA

- Agusti, M. y V. Almela. 1991. Aplicación de Fitorreguladores en Citricultura. Editorial Aedos S. A. Barcelona, España. 261 p.
- Agusti, M.; F. García-Martí, and J. L. Guardiola. 1982. The influence of flowering intensity on the shedding of reproductive structures in sweet orange. *Scientia Hort.* 17: 257-264.
- Amorós, C. M. 1995. Producción de Agrios. Editorial Mundi- Prensa, S. A. Barcelona, España. 285 p.
- Brewbaker, J. L. 1957. Pollen cytology and incompatibility systems in plants. *J. Hered.* 48:271-277.
- Brosh, P. and, S. P. Monselise. 1977. Increasing yields of 'Topez' mandarin by gibberellin and girdling in the presence of 'Minneola' pollinizers. *Scientia Hort.* 7: 369-372.
- Burger, W. D. 1985. Pollination effects on fruit production of 'Star Ruby' grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.). *Scientia Hort.* 25: 71-76.
- Bukiya, Z. M., and Sh. K. Goliadze. 1991. Features of the growth of pollen tubes in *Citrus ichangensis* and their passage into the style of the early mandarin Nankan 20. *Subtropicheskie-Kul'tury* 4(5): 120-128. (CAB Abstracts 1993-1994).
- Cameron, J. W.; D. Cole, and E. M. Nauer. 1960. Fruit size relation to seed number in the Valencia orange and some other citrus varieties. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 76: 170-180.
- Cameron, J. W., and R. K. Soost. 1987. Cítricos pp. 156-191. En: Genotecnia de cultivos tropicales perennes: Ferwerda, F. P. y F. Wit (Eds.). Traducido del inglés por: R. Mósqueda, V. AGT Editor.
- Cerovic, R., and D. Ruzic. 1992. Pollen tube growth in sour cherry (*Prunus cereasus* L.) at different temperatures. *J. Hort. Sci.* 67(3): 333-340.

- Clarke, A. D.; M. A. Anderson; T. Bacic, P. J. Harris, and S. L. Mau. 1985. Molecular basis of cell recognition during fertilization in higher plants. *J. Cell Sci. Suppl.* 2: 261-285.
- Cohen, A. 1981. Recent developments in girdling of citrus trees. *Proc. Int. Soc. Citriculture.* 196-199.
- Cohen, A. 1984a. Citrus fruit enlargement by means of summer girdling. *J. Hort. Sci.* 59(1) 119-125.
- Cohen, A. 1984b. Effect of girdling date on fruit size of Marsh seedless grapefruit. *J. Sci. Sci.* 59(4) 567-573.
- Cronquist, A. 1975. *Introducción a la Botánica*. Sexta impresión. Traducido del inglés por R. Riva y Nava. Compañía Editorial Continental, S. A. México D. F. 800 p.
- Curti, D. S. 1991. *Sistemas de producción de cítricos en la zona norte de Veracruz. Memorias Sobre Sistemas de Producción en cítricos.* Universidad Autónoma de Chapingo. PIISI.
- Currier, H. B. 1957. Callose substance in plant cells. *Amer. J. Bot.* 44:478-488.
- Chandler, W. H. 1962. *Frutales de hoja perenne*. Trad. del inglés por J. L. de la Loma. Edit. UTEHA. México, D. F. 666 p.
- Dumas, C.; A. E. Clarke, and R. B. Knox. 1985. La fecundación de las flores. *Mundo Científico* 44(5): 188-197.
- Dumas, C. A., and R. B. Knox. 1983. Callosa and determination of pistil viability and incompatibility. *Theor Appl. Genet.* 67: 1-10.
- Dumas, C., and H. L. Mogensen. 1993. Gametes and fertilization: Maize as model system for experimental embryogenesis in flowering plants. *Plant Cell.* 5: 1337-1348.
- Elleman, C. J., and H. G. Dickinson. 1994. Pollen-stigma interaction during sporophytic self-incompatibility in *Brassica oleracea*. pp. 67-101. *In: Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants.* Williams E. G.; A. Clarke, and B. Knox (Eds.). Kluwer Academic Publisheers. Netherlands. 540 p.
- Enriquez, A. G. 1985. *Curso sobre el cultivo del cacao. Serie Materiales de Enseñanza No. 22.* Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica . pp. 31- 44.

- Erner, I. 1988. Effects of girdling on the differentiation of inflorescence types and fruit set in Shamouti orange trees. *Israel J. Bot.* 37: 173-180.
- Esau, K. 1982. Anatomía de las Plantas con Semilla. Traducido del Inglés por: P. Izaguirre, de A. y A. M. Laguardia. Editorial Hemisferio Sur, S. A. Buenos Aires, Argentina. 512 p.
- Eti, S.; R. Stösser, and S. Subhadrabandhu. 1992. Pollen tube growth and development of ovules in relation to fruit set in mandarines, cv. Clementine (*Citrus reticulata* Blanco). *Acta Horticulturae* 321(10): 621-625. (CAB Abstracts 1993-1994).
- Fernández-Escobar, R., G. Gómez-Valledor and L. Rallo. 1983. Influence of pistil extract and temperature on *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of olive cultivars. *J. Hort. Sci.* 58(2): 219-227.
- Foster, A. S., and Jr. Gifford. 1974. Comparative morphology of vascular plants. Second edition. W. H. Freeman and Company. San Francisco, CA. 751 p.
- Franklin, W. M. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technol.* 34: 125-128.
- Free, J. B. 1970. Insect pollination of crops. Academic Press London. p. 183-188.
- Furr, J. R., and W. W. Armstrong. 1956. Flower introduction in grapefruit in the Coachella Valley, California. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 67: 176-182.
- Galleta, G. J. 1988. Manejo de polen y semillas. pp. 27-61. En: "Metodos Genotécnicos en Frutales" J. Janick, and N. Moore (Eds.) Trad. del Inglés por R. Mosqueda, V. AGT Editor, S. A. México, D. F. 504 p.
- García, M. E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Tercera edición. UNAM: México. 252 p.
- García-Luis; A., F. Fornes, and J. L. Guardiola. 1988a. Competition and fruitlet abscission in Satsuma mandarin. *Proc. 6th. Int. Citrus Congr.* 1: 485-496.
- Griggs, W. H., and B. T. Iwakari. 1975. Pollen tube growth in almond flowers. *Calif. Agric.* 29:4-7.
- Guardiola, J. L. 1997. Primer curso nacional de avances citrícolas y celebración del día del citricultor '97. *Memorias.* p. 30-53.
- Guardiola, J. L.; F. García-Martí, and M. Agustí. 1984. Competition and fruit set in the Washington navel orange. *Physiol. Plant.* 62: 297-302.

- Hansen, P. 1969. ^{14}C -Studies on apple trees. IV. Photosynthate consumption in fruits in relation to the leaf-fruit ratio and to the leaf-fruit position. *Physiol. Plant* 22: 186-198.
- Helsop-Harrison, J. 1975. Incompatibility and the pollen-stigma interaction. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26: 403-425.
- Helsop-Harrison, Y., and K. R. Shivanna, 1977. The receptive surface of the angiosperm stigma. *Ann. Bot.* 41: 1233-1258.
- Helleman, C. J., and H. G. Dickinson. 1994. Pollen-stigma interaction during sporophytic self-incompatibility in *Brassica oleracea*. p. 67-87. *In: Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants*. E. Williams G.; A. Clarke, and B. Knox. (Eds.) Kluwer Academic Publisehers. Netherlands. 540 p.
- Hochberg, R.; S. P. Monselise, and J. Costo. 1977. Summer girdling and 2, 4-D effects on grape fruit sizes. *HortScience*: 12(3):228.
- Jefferies, G. J., and A. R. Belcher. 1974. A fluorescent brightener used for pollen tube identification in vivo. *Stain Technology* 49 (4): 199-201.
- Jensen, W. A. 1973. Fertilization in flowering plants. *BioScience* 23(1): 21-27.
- Johansen, D. A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill, New York. 503 p.
- Kahn, T. L. 1998. Factors influencing seedlessness in *Citrus*. *Subtropical Fruit News*. 6(1): 28-31.
- Kahn, T. L., and D. A. DeMason. 1986. A quantitative and structural comparison of *Citrus* pollen tube development in cross-compatible and self-incompatible gynoecia. *Can. J. Bot.* 64:2548-2555.
- Klungness, M., R. Thorp, and D. Briggs. 1983. Field testing the germinability of almond pollen (*Prunus dulcis*). *J. Hort. Sci.* 58 (2): 229-235.
- Knox, R. B., and M. B. Singh, 1987. New perspectives in pollen biology and fertilization. *Ann. Bot. (Supl)*, 60(4): 15-37.
- Knox, R. B., and E. G. Williams. 1986. Pollen, pistil, and reproductive function in crop plants. *Plant Breeding Rev.* p.p. 469-479.
- Krezdorn, A. H. 1981. Fruit setting of *Citrus*. *Proc. Int. Soc. Citriculture*. 1: 249-253.

- Lewis, D. 1994. Gametophytic-sporophytic incompatibility. p. 88-101. *In*: Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants. E. Williams G.; A. Clarke, and B. Knox. (Eds.) Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 504 p.
- Lewis, L. N., and C. D. McCarty. 1973. Pruning and girdling of Citrus. *The Citrus*: 211-229.
- Mata, B. I. y P. M. Manjarrez. 1976. Problemas de fructificación en mandarino cv. Santa Mónica en un área citrícola de Veracruz. Centro de Enseñanza, Experimentación e Investigación Frutícola de la CONAFRUT. Jalapa, Veracruz. 18p.
- Mascarenhas, J. P. 1993. Molecular mechanisms of pollen tube growth and differentiation. *Plant Cell*. 5: 1303-1314.
- Mauseth, J. D. 1988. *Plant Anatomy*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. U. S. A. p 390-413.
- McGregor, S. E. 1976. Insect pollination of cultivated crop plants. *Agricultural Handboock No. 436*. United States Department of Agriculture Washington, D. C. U. S. A. 411 p.
- Monselise, S. P. 1978. Understanding of plants processes as a basis for successful growth regulation in *Citrus*. *Proc. Int. Soc. Citriculture*. 250-255.
- Monselise, S. P. 1985. *Citrus* and related genera. p. 275-294. *In*: A. H. Halevy (Ed.) *Handbook of flowering*, Vol IV. CRC Press, Inc. Boca Raton, FL.
- Moss, G. I., B. T. Steer and P. E. Kriedemann. 1972. The regulatory role of inflorescence leaves in fruit setting by sweet orange (*Citrus sinensis*). *Physiol. Plant*. 27: 432-438.
- Nasrallah, J. B., and M. E. Nasrallah. 1993. Pollen-stigma signaling in the sporophytic self-incompatibility response. *Plan Cell*. 5: 1325-1335.
- Newbigin, E.; M. A. Anderson , A. E. and Clarke 1993. Gametophytic self-incompatibility systems. *Plant Cell*. 5: 1315-1324.
- Norton, J. D. 1966. Testing of plum pollen viability with tetrazolium salts. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci*. 89: 132-134
- Owens, S. J. 1992. Pollination and fertilization in higher plants. pp. 33-55. *In*: *Fruit and seed production: aspects of development, enviromental physiology and ecology*. (edt.) Cambridge University Press. U. K.

- Papademetriou, M. K. 1974-1975. Pollen tube growth in avocados (*Persea Americana* Mill). Calif. Avo. Soc. YB. Pp. 99-102.
- Percival, S. M. 1969. Floral biology. 2ª Ed. Pergamon Press. London. U. K.
- Pimienta, B. E. 1987. Polinización y fecundación en frutales perennes. Tema didáctico No. 4. CIFAP, INIFAP, SARH. 27p.
- Pimienta, B. E. 1990. Fase programática en angiospermas. Ciencia 41:319-332.
- Pimienta, E.; V. S. Polito, and D. E. Kester. 1983. Pollen tube growth in cross- and self- pollinated 'Nonpareil' almond. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 108:643-647.
- Praloran J. C. 1977. Los Agrios. Primera edición. Editorial Blume. Barcelona, España. pp. 17- 99.
- Ramírez, D. J. M. 1991. Producción de cítricos en México. Memorias Sobre Sistemas de Producción en Cítricos. U. A. CH. -PICI. Febrero 1991.
- Reuveni, O.; S. Abu, and S. Golobovitz. 1986. Date palm pollen germination and tube elongation on pistillate flowers cultured at different temperatures. Acta Hort. 175:91-95.
- Roubik, D. W. 1995. Pollination of cultivated plants in the tropics. FAO. Agricultural Services Bulletin 118. Rome, Italia. 196 p.
- Rudall, P. 1992. Anatomy of flowering plants: an introduction to structure and development. 2ª ed. University Press. Cambridge, U. K. 110 p.
- Russell, S. D. 1993. The egg cell: Development and role in fertilization and early embryogenesis. Plant Cell. 5: 1349-1359.
- Saidha, T.; E. E. Goldschmidt, and S. P. Monselise. 1983. Endogenous growth regulators in tracheal sap of *Citrus*. HortScience. 18: 231-232.
- Saunt, J. 1990. Citrus varieties of the world. Sinclair International Limited, Norwich, England. pp. 5-7.
- Shivanna, K. R. 1982. Pollen-pistil interaction and control of fertilization. p. 131-174. In: Experimental embryology of vascular plants. Johri B. M. (Ed.). Springer-Verlag. Berlín, Heidelberg. 273 p.
- Schneider, H. 1968. The anatomy of *Citrus*. in *The Citrus Industry*, Vol. 2. Reuther . W. Batchelor. L. D. and Webber. H. J. (Eds). University of California. Davis.

- Sedgley, M. 1976. Control by the embryosac over pollen tube growth in the style of the avocado (*Persea americana* Mill). *New Phytol.* 77:149-152.
- Sedgley, M. 1977. The effect of temperature on floral behaviour, pollen tube growth and set in avocado. *J. Hort. Sci.* 52:135-141.
- Sedgley, M., and C. M. Annells. 1981. Flowering and fruit-set response to temperature in the avocado cultivar 'Hass', *Scientia Hort.* 14:27-33.
- Sedgley, M. 1994. Self-Incompatibility in woody horticultural species. p. 141-163. *In*. Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants. E. Williams G.; A. Clarke y B. Knox. (Eds.) Kluwer Academic Publisehers. Netherlands. 504 p.
- Sedgley, M. 1994. Self-Incompatibility in woody horticultural species. p. 141-163. *In*. Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants. Williams E. G.; A. Clarke y B. Knox. (Eds.) Kluwer Academic Publisehers. Netherlands. 504 p.
- Socias i Company, R.; D. E. Kester, and M. B. Bradley. 1976. Effects of temperature and genotype on pollen tube growth in some self-incompatible almond cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 101(5): 490-193.
- Soost, R. K. 1965. Incompatibility alleles in the genus *Citrus*. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 87: 176-180.
- Soost, R. K., and M. L. Roose, 1996. *Citrus* pp. 257-323. *In*. Fruit breeding. Vol. 1 J. Janick and J. N. Moore (Eds.). John Wiley & Sons, Inc. U. S. A.
- Stephenson, A. G. 1981. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Ann. Rev.* 12: 253-279.
- Stösser, R., and S. F. Anvari. 1983. Pollen tube growth and fruit set as influenced by senescence of stigma, style and ovules. *Acta Hort.* 139:13-19.
- Stott, K. G. 1972. Pollen-tube characteristics in a range of apple cultivars. *J. Hort. Sci.* 47; 191-198.
- Swingle, W. T., and Reece, P. C. 1967. The Botany of *Citrus* and its wild relatives. *In*: *Citrus Industry*, vol. I. W. Reuther, L. D. Batchelor y H. J. Webber (eds.). Univ. Calif., Div. Agr. Sci., California.

- Tammy, L. S.; R. I. Bertin, and E. G. Williams. 1994. Ovarian and other late-acting self-incompatibility systems. pp. 116-140. *In*: Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants. Ed. Williams E. G.; A. Clarke and B. Knox. (Eds.) Kluwer Academic Publisehers. Netherlands. 504 p.
- Thompson, M. H., and L. P. Batjer. 1950. The effect of born in the germination medium on pollen germination and pollen tube growth of several decidous tree fruits. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 55: 227-229.
- Ton, L. D., and A. H. Krezdorn, 1966. Growth of pollen tubes in three incompatible varieties of *Citrus*. *Proc. Amer. Soc. Hort.* 89: 211-215.
- Vasilakakis, M. d., and I. C. Porlingis. 1984. Self-compatibility in 'Truuito' almond in the effect of temperature on selfed and crossed pollen tube growth. *HortScience* 19:659-661.
- Weier, T. E., C. R. Stocking y M. G. Barbour. 1980. *Botánica*. 5ª edición. John Wiley & Sons, Inc. U. S. A. 741 p.
- Welsh, J. R. 1981. *Fundamentals of plant genetics and breeding*. John Wiley & Sons, Inc. U. S. A. pp. 69-99.
- Wijit, W., S. J. Pattison, L. Giles and A. J. Millington. 1992. Pollen tube growth and genotype compatibility in cashew in relation to yield. *J. Hort. Sci.* 67 (1): 67-75.
- Wunnachit, W.; S. J. Pattison; L. Giles; A. J. Millington, and M. Sedgley. 1992. Pollen tube growth and genotype compatibility in cashew in relation to yield. *J. Hort. Sci.* 67(1):67-75.
- Zucconi, S. P. Monselise, and R. Goren. 1978. Growth abscission relationships in developing orange fruit. *Scientia Horticulture*. 9: 137-146.