

Partenocarpia, polinización cruzada y presencia de semillas en mandarina 'Afourer'

Gravina Alfredo¹, Fornero Cecilia, Galiger Sebastián, Inzaurrealde Cristian, Fasiolo Carolina, Gambetta Giuliana

¹Departamento de Producción Vegetal. Ecofisiología de Citrus, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Garzón 780, C P 12900. Correo electrónico: agravina@fagro.edu.uy

Recibido: 29/11/10 Aceptado: 16/9/11

Resumen

La mandarina 'Afourer', ha sido registrada como una variedad sin semillas. En las condiciones productivas de Uruguay, en todas las situaciones relevadas, la mayor parte de los frutos presenta semillas, lo que limita su precio y comercialización. Los objetivos de este trabajo fueron determinar la capacidad partenocárpica de la mandarina 'Afourer' y determinar la eficiencia polinizadora de cuatro variedades presentes en plantaciones comerciales. En condiciones de aislamiento de polinización mediante mallas, el 99% de los frutos en Paysandú y el 100% en San José no tuvieron semillas. En Paysandú, los componentes del rendimiento fueron similares en condiciones de libre polinización y bajo mallas, demostrando una alta capacidad partenocárpica. Los tratamientos de polinización artificial alcanzaron un porcentaje de cuajado superior a 40% en todos los casos y las flores embolsadas, emasculadas y embolsadas, y polinizadas con 'Afourer' y embolsadas, no presentaron semillas. El porcentaje de germinación de polen *in vitro* de 'Afourer' y 'Ortanique' alcanzó el 25% mientras que el de 'Valencia', limón tipo 'Lisbon' y 'Clementina de Nules', no superó el 8%. No se encontró una asociación clara entre estos porcentajes y el número de semillas por fruto. El porcentaje de frutos con semillas con polinización artificial fue variable, desde un mínimo de 18% con polen de limón tipo 'Lisbon', a un máximo de 88% con polen de naranja 'Valencia'. Estos resultados sirven de base para el diseño de nuevas plantaciones y medidas de manejo que permitan disminuir el número de semillas.

Palabras clave: emasculación, germinación de polen, polinización artificial

Summary

Parthenocarpy, Cross Pollination and Seed Presence in 'Afourer' Mandarin

'Afourer' mandarin has been registered as a seedless cultivar. Under Uruguayan productive conditions, in all the evaluated situations, most of the fruits have seeds, which limits its commercial value and marketing. The objectives of this work were to determine 'Afourer' parthenocarpy ability and pollination efficiency of four varieties in commercial plantations. Isolation of cross-pollination with nets in two experiments, resulted in 99% of seedless fruits in Paysandú and 100% in San José. In Paysandú, yield components were similar in open-pollination or isolation, demonstrating high parthenocarpic ability. Fruit-set in artificial pollination was 40% or more in all cases. Flowers isolated, emasculated and isolated, and pollinated with 'Afourer' and isolated resulted in seedless fruits. The *in vitro* pollen germination percentage of 'Afourer' mandarin and 'Ortanique' tangor reached 25%, while 'Valencia' orange, 'Lisbon' lemon and 'Nules Clementine' mandarin, did not exceed 8%. No clear association between these percentages and the number of seeds per fruit was found. The percentage of seeded fruit with artificial pollination was variable, from 18% with 'Lisbon' lemon pollen, to 88%

with 'Valencia' orange pollen. These results can be used for new plantations design and agronomical practices implementation to reduce fruit seed number.

Key words: artificial pollination, emasculation, pollen germination

Introducción

La citricultura uruguaya se encuentra enfrentada al desafío de un recambio varietal, de acuerdo a las demandas de los mercados destino de nuestra fruta. La tendencia actual en cuanto al desarrollo de variedades, indica que una de las principales características requeridas en la fruta para consumo en fresco, es la ausencia o bajo número de semillas. La definición de «frutos sin semillas» ha ido cambiando con el tiempo. En los años 80 se definía comercialmente como aquellos frutos que presentaban menos de cinco semillas. Se considera que este concepto es subjetivo y dependiente de las expectativas del consumidor y de la demanda del mercado en un momento determinado. Barry (2004), propone una clasificación muy estricta, considerando ese término exclusivamente para la ocurrencia de una semilla cada 100 frutos. A nivel comercial esa exigencia es en general menor, y para cultivares de fuerte demanda por su calidad organoléptica, se acepta hasta una semilla por fruto. Entre las variedades introducidas en la década del 90 al país, y con pocos años de producción comercial se destaca 'Afourer', variedad originada en Marruecos, también conocida como 'W.Murcott' y 'Nadorcott', (Nadori, 2004) y reportada como sin semillas en ausencia de polinización cruzada, o autopolinizada artificialmente (Bono *et al.*, 2000; Chao, 2005a). La mandarina 'Afourer' presenta características de alta calidad de fruto y altos rendimientos; sin embargo en la mayoría de las plantaciones, tanto en el sur como en el norte del país, la presencia de semillas es una constante, lo que limita y disminuye su valor comercial.

La partenocarpia, definida como la producción de frutos sin semillas, puede ser de dos tipos: obligada o autonómica y estimulativa. La primera se define como el cuajado de los frutos sin ningún estímulo externo, cuyos ejemplos más conocidos son la naranja 'Washington' navel y la mandarina 'Satsuma'.

La partenocarpia estimulativa, requiere de algún factor promotor para la producción de frutos. En este caso los estímulos pueden ser la polinización, la germinación del polen, o el crecimiento del tubo polínico sin que exista la fecundación (Frost y Soost, 1968).

Uno de los aspectos centrales a controlar en la producción de frutos sin semillas, es la polinización cruzada en aquellos cultivares autoincompatibles, pero que generan gametos viables. En la década del 60 se presentan ya los primeros estudios sobre autoincompatibilidad y polinización cruzada en mandarinos híbridos (Hearn *et al.*, 1969). Más recientemente, en las condiciones de España, Soler (1999) y Bono *et al.* (2000) realizaron cruzamientos manuales dirigidos entre las principales especies y variedades del género *Citrus* cultivadas, estableciendo la presencia y número medio de semillas por fruto de acuerdo a la fuente de polen utilizada.

En variedades de cítricos partenocárpicas, la polinización por otros cultivares es fundamentalmente entomófila, siendo las abejas los principales agentes polinizadores. La distancia a la que puede encontrarse polen de variedades donadoras transportado por abejas, fue determinada por Chao (2005b) en las condiciones de California, mediante el uso de marcadores moleculares, alcanzando a 500 y 960 metros para polen de 'Clementina de Nules' y 'Afourer' respectivamente. Esto plantea las dificultades para aislar a los cultivares partenocárpicos facultativos de la polinización cruzada, en condiciones de producción comercial. Polinizaciones artificiales en 'Afourer' con polen de Clementinas e híbridos como 'Fortune', 'Nova' y 'Ortanique' en las condiciones de España, demuestran una alta capacidad de formación de semillas con todas ellas (Bono *et al.*, 2000). No existen reportes en nuestro país sobre la capacidad partenocárpica de 'Afourer', ni sobre la capacidad polinizadora de algunas de las principales variedades comerciales presentes en nuestras plantaciones.

En este trabajo se plantearon como objetivos, determinar la capacidad partenocárpica de la mandarina 'Afourer' en nuestras condiciones agroclimáticas y evaluar la capacidad polinizadora de diferentes cultivares de *Citrus*, en la formación de semillas de esta mandarina.

Materiales y métodos

Estudios de partenocarpia. Se establecieron dos experimentos: (1) En el departamento de Paysandú (31° LS), en un cuadro de mandarina 'Afourer' injertada sobre *P.trifoliata* L.(Raf.), de dos años de edad, se marcaron veinte plantas homogéneas en altura y volumen de copa. A la mitad de ellas, seleccionadas al azar se les impidió la polinización cruzada, mediante el uso de malla tipo TNT, la cual se fijó en estructuras de madera colocadas sobre las copas, desde el inicio de la brotación hasta el final de la caída de pétalos. En cosecha, se determinó el rendimiento y se contaron todos los frutos de cada planta y en una muestra de 50 frutos por planta, se evaluó la presencia y el número de semillas por fruto. Se instaló durante el período de cuajado un sensor de temperatura y humedad relativa (Hygrochron), con registro horario de información en cada situación (2). En el departamento de San José (35° LS), se seleccionaron considerando vigor, volumen de copa y estado sanitario, 10 plantas de 'Afourer' de siete años de edad, injertadas también sobre *P.trifoliata*, y en condiciones de fertirriego. En cada una, se marcaron dos ramas secundarias y a una de ellas se la protegió de la polinización cruzada, mediante estructuras de alambre forradas de malla tipo tul, en un período similar al del experimento 1. En maduración, se colectaron todos los frutos de cada rama y se evaluó número y porcentaje de frutos sin semilla y número de semillas por fruto. En ambos experimentos, a partir del fin de la caída fisiológica (segunda quincena de diciembre y primera de enero respectivamente), se midió el diámetro ecuatorial de 10 frutos por planta o cinco por rama hasta la maduración.

Polinización cruzada: cuajado y presencia de semillas. Experimento 1. En Paysandú (31° LS), en un cuadro de 'Afourer' injertado sobre *P.trifoliata* de siete años de edad, se seleccionaron quince plantas y en cada una se marcaron 60 brotes de flor terminal,

totalizando 900 brotes. Se aplicaron seis tratamientos con 150 flores en cada uno: a) Polinización abierta (testigo) b) Flores embolsadas c) Flores emasculadas y embolsadas d) Flores emasculadas, polinizadas con polen de 'Afourer' y embolsadas e) Flores emasculadas, polinizadas con polen de mandarina 'Clementina de Nules' y embolsadas f) Flores emasculadas, polinizadas con polen de naranja 'Valencia' y embolsadas.

Experimento 2. En el cuadro de San José, durante la brotación y antes de la antesis, se marcaron en 10 árboles un total de 450 brotes de flor terminal, en los que se aplicaron tres tratamientos: testigo, emasculación y polinización artificial con polen de tangor 'Ortanique' y con polen de limón tipo 'Lisbon', totalizando 150 flores por tratamiento. Los dos últimos se embolsaron con mallas tipo tul durante los 15 días posteriores a las polinizaciones. La selección de las variedades polinizadoras en cada zona se realizó en función de la cercanía de cada una al cuadro de 'Afourer'.

En ambos experimentos, los tratamientos se aplicaron con flores en el estado 59 de la escala BBCH (Agustí *et al.*, 1997). Las anteras de las variedades donadoras fueron colectadas el día previo a la polinización y mantenidas en oscuridad a 20 °C. A los quince días de los tratamientos se retiraron las bolsas; cada 15 días y hasta el fin de caída fisiológica se cuantificó el porcentaje de cuajado (frutos presentes/flores iniciales x 100) y hasta la maduración el diámetro de los frutos. En cosecha se contabilizaron todos los frutos, se determinó el porcentaje de cuajado final y se cuantificó presencia y número de semillas por fruto.

Germinación de polen *in vitro*

En todos los casos, se realizó una prueba de germinación *in vitro* de las diferentes fuentes de polen utilizadas. Las flores se colectaron de plantas de 'Clementina de Nules', 'Valencia' y 'Afourer' en Paysandú y limón tipo 'Lisbon' y 'Ortanique' en San José. Se colocaron en una caja de Petri abierta, en una cámara con sílica gel durante 24-36 horas para que abrieran las anteras y se mantuvieron abiertas en heladera durante dos horas, para que se hidrataran los granos de polen. La germinación de los gra-

nos de polen se realizó en portaobjetos, colocando una base de 750 μ l de medio sólido (Brewbaker y Kwack, 1963). De las anteras se extrajeron los granos de polen frotando las mismas con pincel fino para recoger la mayor cantidad posible, los cuales se depositaron sobre el medio sólido de cada portaobjeto. Posteriormente se cubrieron los granos de polen con 30 μ l del mismo medio de cultivo líquido. Se colocaron los preparados en cámara oscura a 25 °C y 70-80% de humedad durante 72 horas hasta que el tratamiento control germinó. Una vez que germinaron, los granos de polen se fijaron con solución de FAA (formaldehído, acético, etanol al 70%; 5:5:90). La germinación de polen, se evaluó contabilizando un promedio de 300-400 granos de polen por repetición, con microscopio óptico (OLYMPUS ECE-Bi). Del total de granos contabilizados, se determinó el número de granos de polen germinados y se calculó el porcentaje de germinación, tomando como criterio que un grano de polen germinó, cuando el largo del tubo polínico superaba el diámetro del mismo (Stanley y Linskens, 1974).

Las variables continuas se analizaron por el Modelo Lineal Generalizado y las proporciones por razón de verosimilitud.

Resultados y discusión

Capacidad partenocárpica

En condiciones de aislamiento de polinización, el 99% de los frutos en Paysandú y el 100% en San José no tuvieron semillas (Cuadro 1). Adicionalmente, el porcentaje de frutos sin semillas en el trata-

miento de autopolinización (embolsado) realizado en flores individuales en Paysandú, alcanzó el 100%.

Estos resultados confirman los reportes de Bono *et al.* (2000) y Chao (2005a) en las condiciones de España y California respectivamente, por lo que la presencia de semillas en frutos de 'Afourer' en nuestras plantaciones, debe explicarse casi exclusivamente por la polinización cruzada de otras variedades. A su vez, en condiciones de polinización abierta, solamente un 34% de los frutos fueron partenocárpicos en Paysandú, y un 29% en San José (Cuadro 1).

Los resultados de la cosecha del experimento de Paysandú, indican que los componentes del rendimiento fueron prácticamente iguales en las plantas de polinización abierta y las aisladas de la polinización cruzada. Las temperaturas máximas y medias registradas bajo las mallas, fueron superiores a las plantas testigo (Figura 1); estas diferencias, aunque adelantaron el desarrollo de las flores en aproximadamente una semana, no tuvieron incidencia en el número final de frutos. En las condiciones experimentales de este trabajo, la capacidad partenocárpica de 'Afourer' fue muy alta, logrando cuajar y desarrollar un número igual de frutos, que en condiciones de polinización abierta. (Cuadro 2). Se destaca que el tamaño de frutos fue igual para ambas condiciones, sin diferencias en función de la presencia de semillas. Por el contrario, en el experimento de San José, el número de frutos por rama en condiciones de polinización abierta, fue significativamente superior al de las ramas cubiertas con malla (27 y 13 respectivamente). Esta diferencia puede explicarse por las condiciones de competencia de frutos sin

Cuadro 1. Porcentaje de frutos sin semilla y número promedio de semillas por fruto en plantas de mandarina 'Afourer' en condiciones de polinización abierta y bajo malla, Paysandú y San José. Paysandú, n=50 frutos por planta; San José, todos los frutos de cada rama.

Situación	Porcentaje de frutos sin semillas		Nº medio de semillas por fruto	
	Paysandú	San José	Paysandú	San José
Polinización abierta	34 b ^z	29 b	4 a	2,3
Aislamiento con malla	99 a	100 a	0,04 b	0

^zLetras diferentes en columnas indican diferencias significativas (Tukey, p \leq 0,05).

semilla y frutos con semilla en la misma planta en los árboles de San José. 'Afourer' ha sido reportada como una mandarina de alta productividad en las condiciones de España, en condiciones de polinización abierta y con presencia de semillas (Agustí *et al.*, 2005). Sin embargo, no se cuenta con información sobre su capacidad productiva en condiciones de aislamiento, el cual puede conseguirse mediante la separación espacial de posibles cultivares polinizadores, la plantación de cultivares que no generan polen viable (por ejemplo naranjas navel) en sus proximidades o la cobertura con mallas que impidan el acceso de abejas durante el período de la floración (Nadori, 2004).

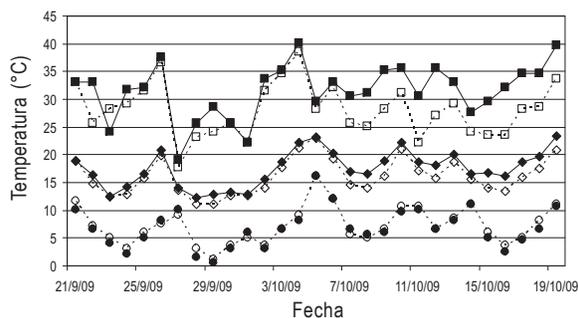


Figura 1. Temperaturas máximas (■ bajo malla y □ testigo), medias (◆ bajo malla y ◇ testigo) y mínimas (● bajo malla y ○ testigo) en mandarina 'Afourer', experimento de Paysandú.

Germinación de polen *in vitro*

El comportamiento *in vitro* del polen de las variedades utilizadas y de 'Afourer', fue diferente, siendo esta última junto con 'Ortanique' las que alcanzaron el mayor porcentaje de germinación (25%) mientras que 'Clementina de Nules', limón tipo 'Lisbon' y 'Valencia', no superaron el 8% de germinación *in vitro*. Existe un alta variabilidad en distintas especies

y variedades de cítricos y entre años, en esta característica, determinándose valores entre 0,6% y 86,3%, (Pardo *et al.*, 2007). No se encontró ninguna asociación entre el porcentaje de germinación *in vitro* y la presencia de semillas en los frutos provenientes de esas polinizaciones.

Autopolinización y polinización cruzada: cuajado y presencia de semillas

El porcentaje de cuajado en todos los tratamientos fue muy alto en ambos experimentos, con un mínimo en Paysandú de 40% en el tratamiento de polinización con 'Clementina de Nules' y un máximo de 72% en el testigo de polinización abierta. En los dos tratamientos donde se impidió la polinización cruzada (flores embolsadas, y emasculadas y embolsadas), el cuajado superó el 40% y todos los frutos obtenidos fueron sin semillas, indicando también en este caso una alta capacidad partenocárpica de 'Afourer'. La autopolinización artificial, alcanzó los mismos porcentajes de cuajado lo que permite postular que la partenocarpia de 'Afourer' es autónoma, no dependiendo del estímulo de la polinización (Cuadro 3).

En San José, el mínimo cuajado lo presentó el tratamiento de polinización con limón (67%) y el máximo las flores polinizadas con 'Ortanique' (78%), aunque sin alcanzar diferencias significativas (Cuadro 4).

Este elevado porcentaje de cuajado en todos los tratamientos, puede atribuirse además de la alta capacidad partenocárpica de 'Afourer', a que los brotes utilizados eran de flor terminal los cuales presentan mayor porcentaje de cuajado (daCunha Barros y Gravina, 2006), y a que las polinizaciones se realizaron al final del período de floración con temperaturas más favorables para el cuajado.

Cuadro 2. Componentes del rendimiento en plantas de mandarina 'Afourer' de dos años, en condiciones de polinización abierta y bajo malla, Paysandú. Datos correspondiente a 10 plantas por situación.

Tratamiento	Nº de frutos/planta	kg/planta	Peso medio de fruto (g)
Polinización abierta	117 ns ²	10,5 ns	88,3 ns
Bajo malla	115	10,1	87,6

²No significativo (Tukey, p<0,05).

Cuadro 3. Porcentaje de cuajado, porcentaje de frutos sin semilla y número medio de semillas por fruto en mandarina 'Afourer', de acuerdo a tratamientos de polinización artificial, experimento de Paysandú. Número de flores polinizadas y embolsadas por tratamiento: 150. El número medio de semillas por fruto corresponde a todos los frutos cosechados.

Tratamiento	Porcentaje de cuajado	Porcentaje de frutos sin semillas	Nº medio de semillas por fruto
Polinización abierta	72 a ^z	73 c	0,47 b
Embolsado	50 b	100 a	0,00 b
Emasculado y embolsado	43 b	100 a	0,00 b
Polinizado con 'Clementina de Nules'	40 b	79 bc	0,40 b
Polinizado con 'Afourer'	41 b	95 ab	0,20 b
Polinizado con 'Valencia'	66 a	12 d	2,63 a

^zLetras diferentes en columnas indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0,05$).

Cuadro 4. Porcentaje de cuajado, porcentaje de frutos sin semilla y número medio de semillas por fruto en mandarina 'Afourer', de acuerdo a tratamientos de polinización artificial, experimento de San José. Número de flores polinizadas y embolsadas por tratamiento: 140. El número medio de semillas por fruto corresponde a todos los frutos cosechados.

Tratamientos	Porcentaje de cuajado	Porcentaje de frutos sin semillas	Nº medio de semillas por fruto
Polinización abierta	70 ns ^z	73 ab	0,34 ns
Polinizado con limón tipo 'Lisbon'	67	82 a	0,41
Polinizado con 'Ortanique'	78	68 b	0,41

^zns sin diferencias; letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0,05$).

El polen de naranja 'Valencia' fue el más eficiente polinizador, ya que produjo el menor número de frutos sin semilla y el mayor número de semillas por fruto, mientras que 'Clementina de Nules' fue muy poco eficiente como polinizadora, registrándose un 79% de frutos sin semilla y un muy bajo número de semillas por fruto (Cuadro 3). Los frutos provenientes de flores polinizadas con limón tipo 'Lisbon' y 'Ortanique', también presentaron un alto porcentaje sin semillas y un número bajo de semillas, lo que indica una baja capacidad de fecundación de flores de 'Afourer' (Cuadro 4). Existe importante variabilidad en los resultados disponibles sobre polinización artificial en 'Afourer', tanto en el porcentaje de cuajado, como en la presencia de semillas. Fang *et al.* (2008) reportan 0% de cuajado cuando las flores fueron polinizadas artificialmente con 'Valencia Midnight' y 'Delta', lo que contrasta con el alto cuaja-

do verificado en nuestros resultados con el clon CV 64 de 'Valencia'. En polinizaciones naturales, Agustí *et al.* (2005), indican también una baja eficiencia del polen de naranja 'Valencia' en promover la presencia de semillas en 'Afourer'. Inesperadamente, en San José, el porcentaje de frutos sin semillas y número de semillas por fruto provenientes de flores de polinización abierta fue similar al de flores polinizadas artificialmente, en donde la cantidad de polen aplicada es muy superior y concentrada en el momento de mayor receptividad del estigma (Cuadro 4).

El número promedio de semillas por fruto, en condiciones de polinización abierta en los experimentos de aislamiento de plantas en Paysandú y en San José (Cuadro 1), fue muy superior al registrado en los experimentos realizados en flores individuales (Cuadros 3 y 4). Esta diferencia puede explicarse porque en el primer caso los frutos provenían de to-

das las flores de la estación, mientras que en el segundo caso los frutos provenían de brotes desarrollados al final de la estación, con mucho menor disponibilidad de flores donadoras de polen en las variedades cercanas.

Crecimiento y tamaño final de frutos

La evolución del diámetro ecuatorial de los frutos por tratamiento de polinización en Paysandú, se presenta en la Figura 2. A partir de los 55 días de haberse realizado los tratamientos, los frutos provenientes de polinización abierta (testigo) y polinizados con 'Valencia' presentaron los mayores tamaños, manteniéndose este comportamiento durante la mayor parte del desarrollo de los mismos.

En cosecha, si bien la tendencia fue similar, las diferencias estadísticas en el diámetro de frutos se confirmaron entre los provenientes de flores polinizadas con 'Valencia' y los correspondientes a 'Afourer', 'Clementina de Nules' y emasculadas sin polinización, quedando en un nivel intermedio los testigos y los embolsados. El mayor número de semillas en los frutos polinizados con naranja 'Valencia'

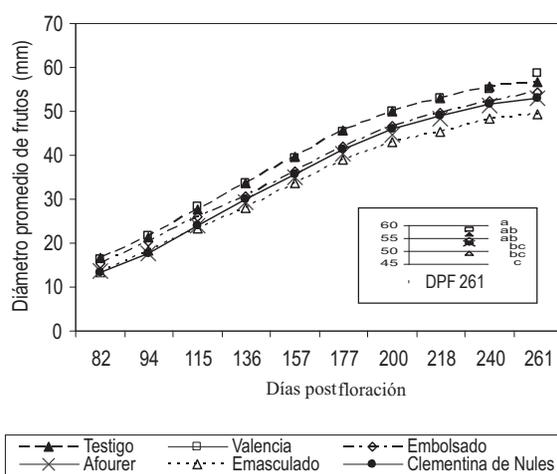


Figura 2. Evolución del diámetro ecuatorial de frutos de mandarina 'Afourer', por tratamientos de polinización abierta, embolsado, emasculado y embolsado, emasculado y polinización artificial con mandarina 'Afourer', mandarina 'Clementina de Nules' y naranja 'Valencia'. Experimento de Paysandú. Datos correspondientes al promedio de todos los frutos de cada tratamiento (n=40 a n=72).

cia' en relación a los de polinización abierta, no se tradujo en este estudio en diferencias significativas en el tamaño de los mismos.

Conclusiones

En condiciones de aislamiento de polinización cruzada, los frutos de 'Afourer' no presentaron semillas. Su capacidad partenocárpica fue muy elevada en el caso de flores individuales y a nivel de planta en Paysandú; en San José, el cuajado de frutos bajo malla fue inferior al de polinización abierta, cuando ambas situaciones competían en el mismo árbol. De todos los cultivares donadores utilizados en nuestro trabajo, el polen de naranja 'Valencia' resultó el más eficiente, con altos porcentajes de fruta con semilla y el mayor número de semillas por fruto. 'Clementina de Nules', limón tipo 'Lisbon' y 'Ortanique', no resultaron buenos polinizadores. Al no verificarse diferencias en el porcentaje de cuajado de frutos entre las flores de 'Afourer' autopolinizadas artificialmente y las emasculadas y embolsadas, se postula que la partenocarpia en este cultivar es de tipo autonómica. Esta información se considera relevante para la planificación del diseño de las plantaciones de mandarina 'Afourer' y la implementación de medidas de manejo que permitan disminuir el número de semillas.

Agradecimientos

Al personal técnico y de campo de los establecimientos 'El Repecho', 'Azucitrus' y 'Browni S.A.' por el apoyo para la realización del trabajo. A la Ing. Agr. (M.Sc.) Ximena Chouza por el adiestramiento en las técnicas de laboratorio. A la Ing. Agr. (M.Sc.) Alejandra Borges por la colaboración en los análisis estadísticos.

Bibliografía

- Agusti M, Martínez-Fuentes A, Reig C, Mesejo C. 2005. Comportamiento agronómico del tangor 'Afourer'. *Levante Agrícola*, 375: 124 - 128.
- Agusti M, Zaragoza S, Bleiholder H, Buhr L, Hack H, Klose R, Staub R. 1997. Adaptation de l'échelle BBCH à la description des stades phénologiques des agrumes du genre Citrus. *Fruits*, 52: 287 - 295.
- Barry GH. 2004. The Quest for Seedless Citrus Fruit. *Proceedings International Society of Citriculture*, 1: 346.

- Bono R, Soler J, Buj A. 2000. Problemática de la presencia de semillas en los cítricos. IV Congreso Citricola de l'Horta Sud: 29-46. Valencia, España.
- Brewbaker JL, Kwack BH. 1963. The essential role of calcium ion in the pollen tube growth. *American Journal of Botany*, 50: 859 - 865.
- Chao Ch. 2005a. Pollination study of mandarins and the effect on seediness and fruit size: implications for seedless mandarin production. *HortScience*, 40(2): 362 - 365.
- Chao Ch. 2005b. Long distance pollen flow in mandarin orchards determined by AFLP markers-Implications for seedless mandarin production. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 130(3): 374 - 380.
- da Cunha Barros M, Gravina A. 2006. Influencia del tipo de brote en el cuajado y crecimiento de frutos del tangor Ortanique. *Agrociencia*, X (1): 37- 46
- Fang JG, Wu CJ, Zheng YS, Chao CT. 2008. Cross pollination, seediness, and stimulated parthenocarpic of 'Nules' Clementine, 'Fina Sodea' Clementine, and 'W.Murcott' mandarin. *Proceedings International Society of Citriculture*, 2010, 1: 825-826
- Hearn CJ, Reece PC, Fenton R. 1969. Self-incompatibility and the effects of different pollen sources upon fruit characteristics of four Citrus hybrids. *Proc. First. Int. Citrus Symposium*, 1: 183-187.
- Nadori E. 2004. Nadorcott mandarin: a promising new variety. *Proceedings International Society of Citriculture*, 1: 356-359.
- Pardo J, Bermejo A, Cano A, Zaragoza S. 2007. La Germinación del polen y la formación de las semillas en los cítricos. *Levante Agrícola*, 384: 16 - 20.
- Soler J. 1999. Reconocimiento de variedades de cítricos en campo. Valencia : Generalitat Valenciana. 187p. (Serie de divulgación técnica; 43).
- Stanley RG, Linskens HF. 1974 *Pollen: biology, chemistry, management*. New York: Springer. 307p.