



2016 JORNADAS DE TRANSFERENCIA **de resultados de investigación**

Efecto de la compatibilidad y la temperatura en la germinación del polen de limonero

Marta Rabadán Mínguez
Ingeniero Técnico Agrícola.
CITRUSGEN-Equipo de Citricultura (IMIDA)



European Regional
Development Fund



Instituto Murciano de Investigación y
Desarrollo Agrario y Alimentario



INTRODUCCION

Estudios realizados en diferentes especies vegetales revelan:

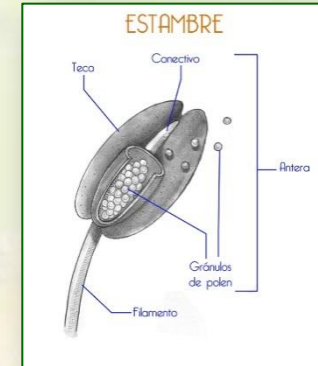
**FERTILIZACIÓN
DEL OVULO**

**CRECIMIENTO
DEL TUBO
POLÍNICO**

GENOTIPO DEL POLEN

GENOTIPO DEL PISTILO

**CONDICIONES AMBIENTALES DURANTE
FLORACIÓN Y POLINIZACIÓN**





INTRODUCCION

CITRICOS

**García Lidón et al. (1988);
Pardo et al. (2010);
Distefano et al. (2012).**

- Frutos de floración de primavera tienen menos semillas que los procedentes de flores de verano.
- $< T^a$ en formación flores $<$ poder germinativo polen $<$ nº de semillas
- El rendimiento del polen no sólo es una característica inherente del genotipo del polen, sino que depende en gran medida de las interacciones polen-pistilo y genotipo-temperatura.



OTRAS ESPECIES

**Issarakrisila y Considine (1994);
Demotes Mainard et al. (1996);
Mercado et al. (1997);
Srinivasan et al. (1999).**

- Influencia negativa de las bajas temperaturas sobre la fertilidad del polen en otros cultivos



INTRODUCCION

**IMPORTANCIA
ECONOMICA DEL
LIMONERO**



**ESCASOS ESTUDIOS DE
INVESTIGACION ACERCA
DE SU BIOLOGIA
REPRODUCTIVA**

**ESTUDIO DEL
COMPORTAMIENTO
DEL POLEN**



**FRUTOS
PARTENOCARPICOS,
AUSENCIA DE
SEMILLAS**



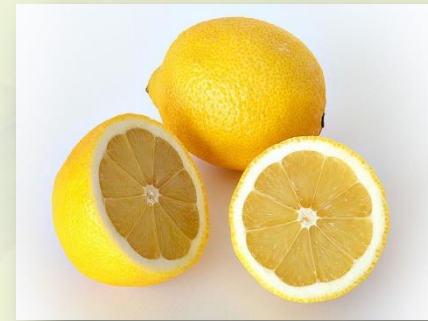
**MUY APRECIADOS EN
EL MERCADO**





INTRODUCCION

CUAJADO DEL FRUTO



**AUTO
POLINIZACION**



A



A

**POLINIZACION
CRUZADA**



A



B

PARTENOCARPIA



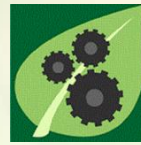
A



OBJETIVOS

EFECTO DE LA COMPATIBILIDAD Y LA TEMPERATURA EN LA GERMINACIÓN DEL POLEN DE LIMONERO

- ❖ Estudio de la viabilidad e influencia de la temperatura sobre la capacidad de germinación *in vitro* de granos de polen de diferentes variedades de limonero.
- ❖ Análisis de la auto-compatibilidad e inter-compatibilidad de diferentes variedades de limonero.
- ❖ Análisis de la relación entre el numero de semillas y la temperatura en el momento de la polinización en limonero.



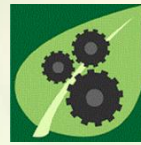
Ensayos



- Parcelas experimentales del **IMIDA**
- Laboratorios del Equipo de Citricultura del **IMIDA**

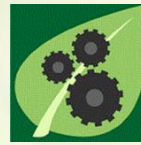
Material Vegetal

- Fino 49
- Fino 95
- Verna 51
- Eureka
- Lisbon



1. RECOLECCION DEL POLEN





2. ANALISIS DE VIABILIDAD

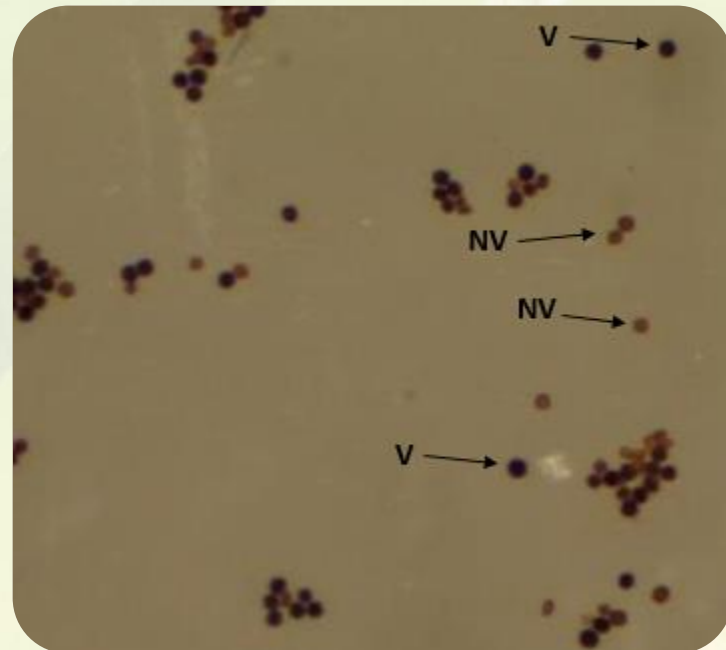
Espolvoreo de
polen en
portaobjetos



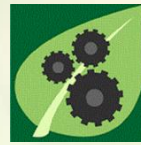
Tinción lugol
(almidón)



Viabilidad



**10 repeticiones por variedad,
100 granos de polen por
observación.**



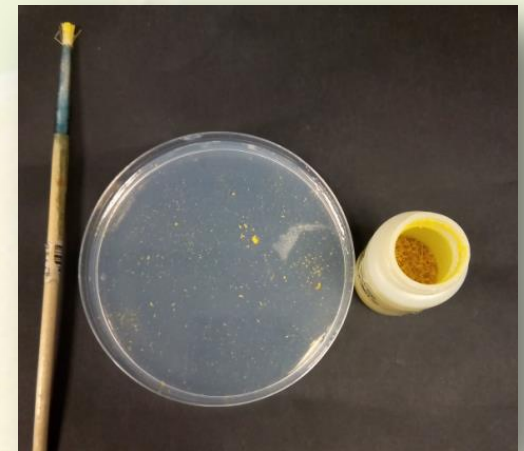
3.1. GERMINACION DE POLEN IN VITRO

MEDIO DE GERMINACIÓN
(sacarosa, H_3BO_3 ,
 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, KNO_3 y
agarosa)

Se espolvoreó con
pincel

Se incubaron en oscuridad
durante 1 día.

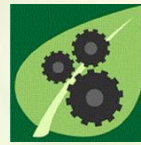
Temperaturas:
10, 15, 20, 25 y 30°C



6 repeticiones por
variedad y
tratamiento



Germinado = longitud
del tubo > diámetro
grano de polen



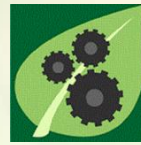
4.1. ANALISIS DE AUTOCOMPATIBILIDAD E INTERCOMPATIBILIDAD



Se emascularon las
flores

Se polinizaron con su
propio polen 160 flores
(Auto-polinización)

Con polen del parental
seleccionado 160 flores
(Polinización cruzada)

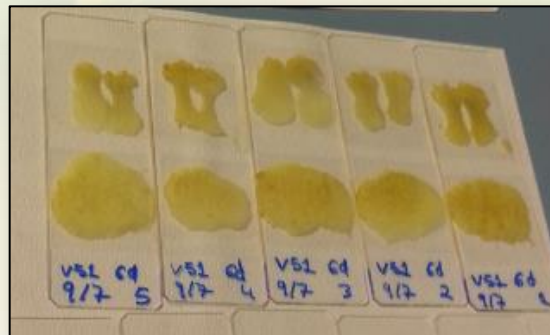


4.2. OBSERVACIONES EN MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA

En auto-polinización y polinización cruzada.

60 flores

0, 3, 6, 9 y 12 días



FAA (Fijación)

3 lavados de agua destilada

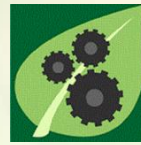
Microondas 45s

Sulfito sódico (1 día)

2 lavados de agua destilada

Corte (2 secciones)

Tinción con azul de anilina (1 día)



5. ANALISIS DE LA INFLUENCIA DE LA Tª EN EL N° DE SEMILLAS

VERNA 51: Se emascularon las flores



Se polinizaron con polen de **FINO 49**



Se contabilizó:

- N° de frutos cuajados
- N° de semillas



Se tomaron los registros de Tª durante el proceso de polinización.





RESULTADOS Y DISCUSION

1. Viabilidad del polen

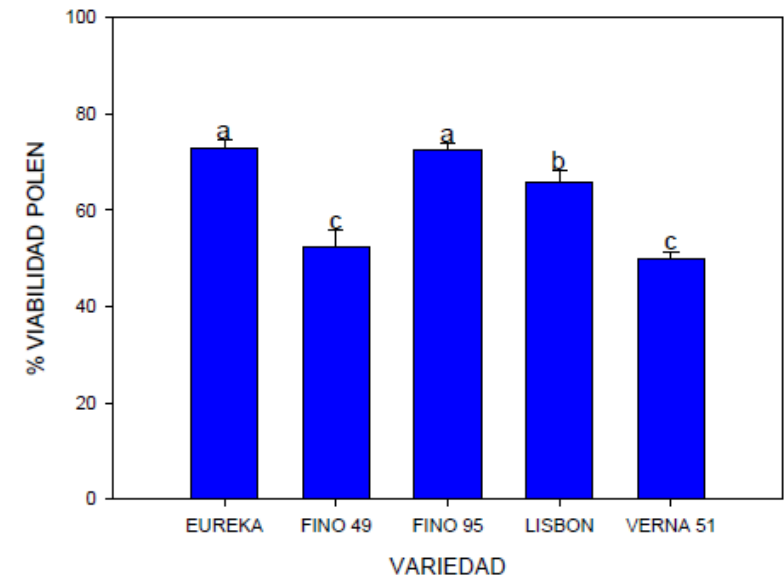
Diferencias muy significativas entre variedades ($P < 0,001$).

Viabilidad superior al 50%

Superior en «Eureka» y «F95»

Baja en «F49» y «V51»

Resultados similares a Zhang et al. (2012) y Demir et al. (2015) (40-70%). Ye et al. (2009) (84-92% en mandarino).





RESULTADOS Y DISCUSION

2. Efecto de la temperatura sobre la germinación in vitro del polen de limonero

Se incrementa desde 10°C hasta 25°C

Más baja a 10°C

Desciende a partir de 30°C

Valores máximos siempre a 25°C

Resultados similares a Ramos et al. (2008) y Distefano et al. (2012)

Tabla 2. Efecto de la temperatura sobre el porcentaje de germinación de granos de polen de 5 variedades de limonero

Temperatura(°C)	Eureka	Fino 49	Fino 95	Lisbon	V51
10	4,09±0,11c	5,67±0,72d	6,79±0,17d	2,68±0,93e	5,84±1,45e
15	14,93±0,43d	8,95±0,25c	7,96±0,27d	8,12±0,24d	9,40±0,44d
20	17,79±0,61c	19,32±0,29b	18,63±0,44c	12,79±0,48c	19,44±1,13b
25	27,40±0,96a	25,55±0,49a	23,31±0,43a	23,25±0,66a	24,48±0,40a
30	22,52±0,66b	19,35±0,65b	11,76±0,90b	17,45±0,35b	15,60±1,38c



RESULTADOS Y DISCUSION

3. Análisis microscópico del desarrollo de los granos de polen en el pistilo

ESTIGMA

ESTILO

OVARIO





RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Análisis microscópico del desarrollo de los granos de polen en el estigma

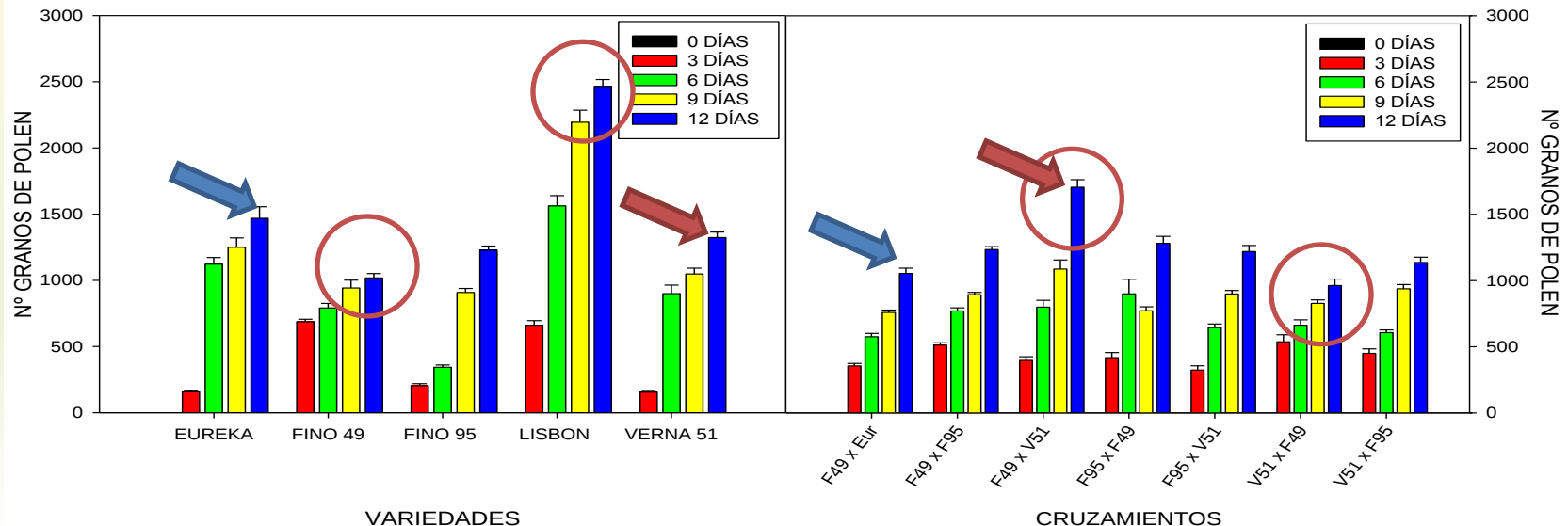
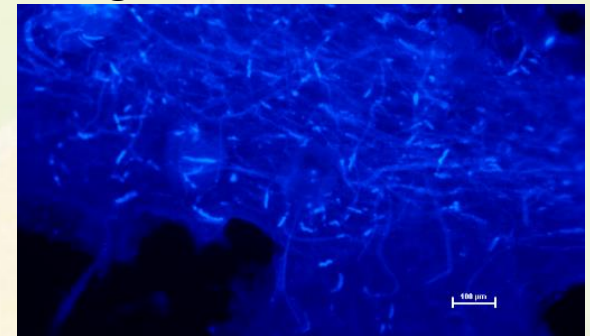
Influenciado significativamente por la variedad, cruzamiento , tiempo e interacción

AP: 2500 «Lisbon»; 1000 «F49»

Cruzamientos: 1700 «F49xV51»; < de 1000 «V51xF49»

Superior en AP que en polinización cruzada

Estigma de «F49» a los 6d





RESULTADOS Y DISCUSION

A los 3 días los tubos polínicos ocupan toda la parte superior del estilo en casi el 100% de las flores.

A los 6 días → Zona media y casi toda la zona inferior

A los 9 días → Todo el estilo

Comportamiento similar en AP y Pol. Cruz. Mayor avance en polinización cruzada.

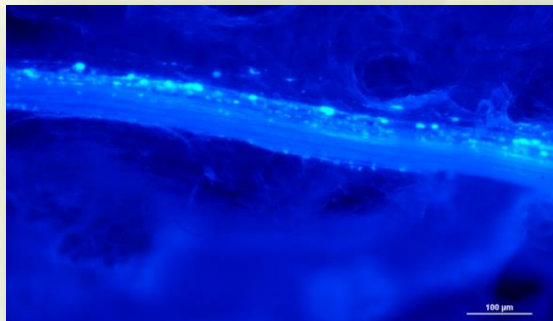
3.2. Análisis microscópico del desarrollo de los tubos polínicos en el estilo

Autopolinización

Días	Zona del estilo	Eureka	Fino 49	F95	Lisbon	V51
3	Superior	100	90	100	100	100
	Media	20	0	0	0	0
	Inferior	0	0	0	0	0
6	Superior	100	100	100	100	100
	Media	100	100	100	100	100
	Inferior	100	70	70	70	80
9	Superior	100	100	100	100	100
	Media	100	100	100	100	100
	Inferior	100	100	80	100	100
12	Superior	100	100	100	100	100
	Media	100	100	100	100	100
	Inferior	100	100	100	100	100

Polinización cruzada

Días	Zona del estilo	F49xEur	F49XF95	F49XV51	V51XF49	V51XF95	F95XF49	F95XV51
3	Superior	100	100	100	100	100	100	100
	Media	0	0	50	20	20	90	0
	Inferior	0	0	0	0	0	10	0
6	Superior	100	100	100	100	100	100	100
	Media	100	100	100	100	100	100	100
	Inferior	60	80	80	80	90	90	90
9	Superior	100	100	100	100	100	100	100
	Media	100	100	100	100	100	100	100
	Inferior	100	100	100	100	100	100	100
12	Superior	100	100	100	100	100	100	100
	Media	100	100	100	100	100	100	100
	Inferior	100	100	100	100	100	100	100



Parte media del estilo de «F49xV51» de 6 d



RESULTADOS Y DISCUSION

3.3. Análisis microscópico de la llegada de los tubos polínicos al ovario

Comenzó
a los 6
días

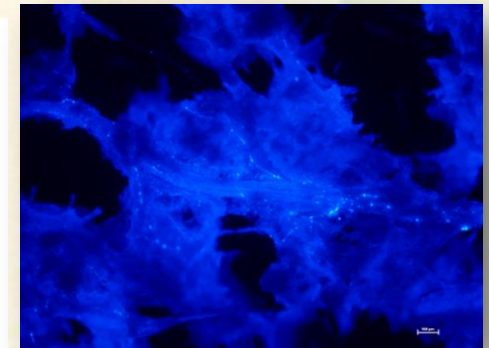
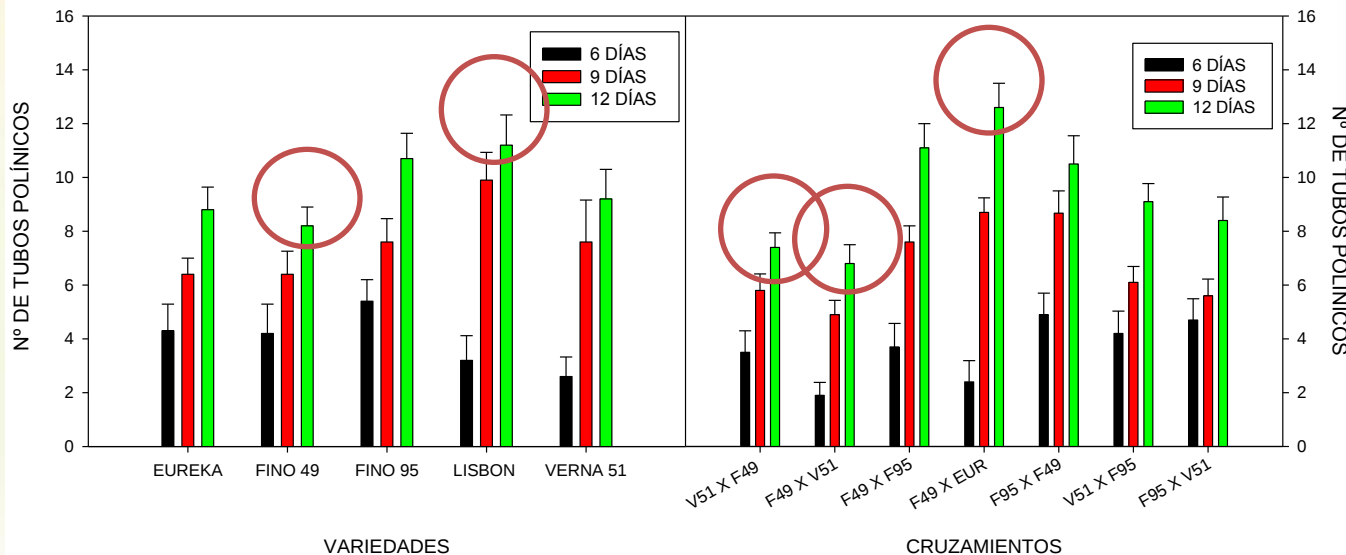
En AP hubo
diferencias
significativas
($P < 0,05$) en
cuanto al
tiempo

En los cruzamientos
todas las variables
afectaron de manera
muy significativa
($P < 0,001$) al número
de tubos polínicos en
el ovario

Relación entre el
nº de granos de
polen germinados
en el estigma y los
tubos polínicos
que entran al
ovario («Lisb»)

Baja inter-
compatibilidad
entre «V51» y
«F49»

Otros
estudios:
Distefano
et al.
(2009)



Ovario de «Eur»
a los 6d



RESULTADOS Y DISCUSION

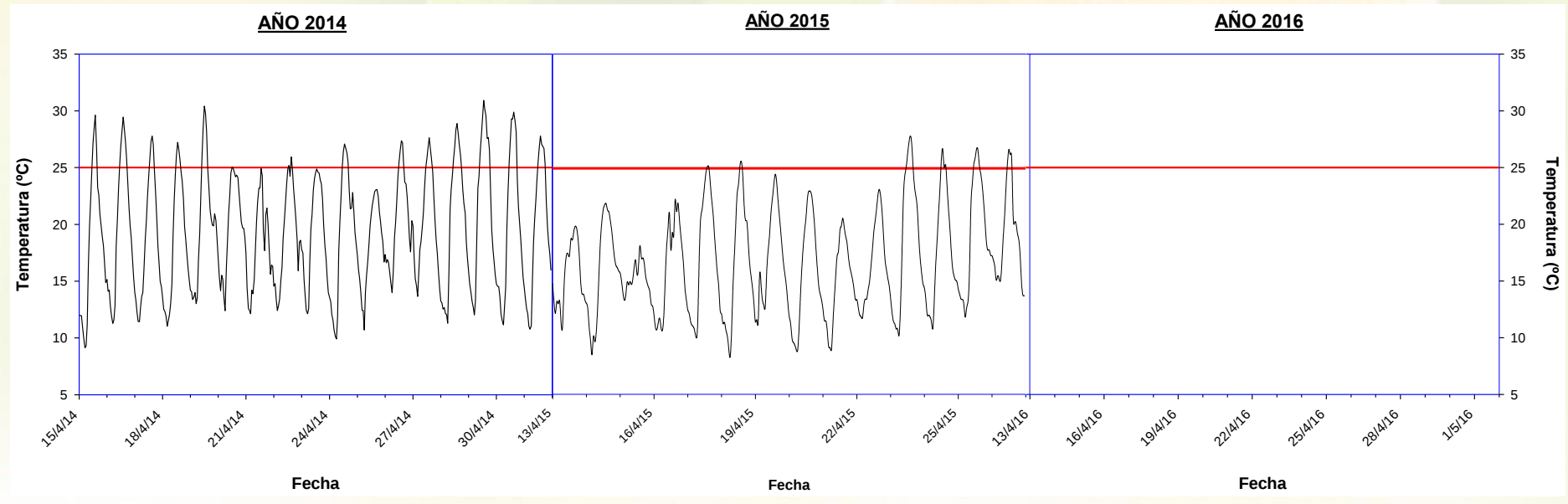
4. Efecto de la Tª sobre el N° de semillas V51xF49

AÑO	% FRUTOS SIN SEMILLAS	Nº SEMILLAS / FRUTOS TOTALES	% CUAJADO	Tª MEDIA	Tª MAXIMA	Tª MINIMA
2014	0,8	4,41	13,22	19,41	30,92	9,13
2015	60,2	1,07	21,47	16,91	27,84	8,45
2016	48,24	1,47	34,72	17,4	27,18	8,75

Nº de días en los que se alcanzó los 25ºC:

- 13 días en 2014
- 6 días en 2015
- 7 días en 2016

García Lidón et al, 1988
 7 genotipos de limonero: frutos de floración de primavera tienen menos semillas que los procedentes de flores de verano.





2016 JORNADAS DE TRANSFERENCIA **de resultados de investigación**



Efecto de la compatibilidad y la temperatura en la germinación del polen de limonero

Marta Rabadán Mínguez
Ingeniero Técnico Agrícola.
CITRUSGEN-Equipo de Citricultura (IMIDA)

GRACIAS POR SU ATENCION



European Regional
Development Fund



Instituto Murciano de Investigación y
Desarrollo Agrario y Alimentario