

## Viabilidad y longevidad del polen en genotipos de limón mexicano estimada mediante germinación *in vitro*

Marciano Manuel Robles-González<sup>§</sup>  
Alma Reyna Cortez-Arroyo  
Silvia Heréndira Carrillo-Medrano  
Víctor Manuel Medina Urrutia

Campo Experimental Tecomán-INIFAP. Carretera Colima-Manzanillo km 35, Tecomán, Colima, México. CP. 28930. Tel. 01(800) 0882222, ext. 84332, 84315 y 84310. (biorganics33@outlook.com; robles.manuel@inifap.gob.mx; orozco.mario@inifap.gob.mx).

<sup>§</sup>Autora para correspondencia: carrillo.silvia@inifap.gob.mx.

### Resumen

Los estudios de viabilidad y longevidad del polen en los genotipos seleccionados como progenitores son útiles para asegurar el éxito de las hibridaciones en un programa de mejoramiento genético. El presente estudio se llevó a cabo en el Campo Experimental Tecomán del INIFAP, en Tecomán Colima, México, durante los meses de enero y febrero de 2008 y 2009. Se estimó la viabilidad y longevidad del polen en tres variedades de limón mexicano [*Citrus aurantifolia*): ‘Colimex’, ‘Colimón’ y ‘Lise’, dos híbridos naturales de limón mexicano; CV 63-64 y CV 67-68 así como el ‘Citrange C-35’ (*C. sinensis* x *Poncirus trifoliata*) como testigo. Se evaluaron las formulaciones de Brewbaker y Kwack (1963); Lora *et al.* (2006); Leal (1969) modificado. Los tres medios de cultivo promovieron la germinación *in vitro* de granos de polen en proporciones muy similares, cercanas a 20%. Los genotipos, ‘Colimón’ y ‘Lise’ registraron porcentajes de germinación bajos 0.78% y 3.05% respectivamente. Por su parte, la variedad ‘Colimex’ y el híbrido natural CV 63 -64, tuvieron valores porcentuales intermedios, mientras que el ‘Citrange C-35’ y el híbrido natural CV 67-68 alcanzaron los porcentajes de viabilidad de polen más altos (43.3% y 39.69% respectivamente) y pueden funcionar como donadores de polen. El polen de todos los genotipos evaluados, conservado a temperatura ambiente, que fluctuó entre 21 °C y 30 °C, perdió casi 100% de su viabilidad a las 48 h posteriores a la antesis. Este es el primer estudio sobre viabilidad y longevidad de polen de limón mexicano usando pruebas de germinación *in vitro*.

**Palabras clave:** *Citrus aurantifolia*, germinación de polen, longevidad de polen, viabilidad de polen.

Recibido: febrero de 2019

Aceptado: abril de 2019

## Introducción

La hibridación sexual o convencional es uno de los métodos de mejoramiento genético de plantas que plantea la oportunidad de recombinar genomas y crear variabilidad genética en las nuevas combinaciones de genes aportados por los progenitores involucrados en las cruza. Los trabajos de hibridación generalmente se inician con la identificación de las características deseables de los progenitores dentro del germoplasma disponible, entre las que destacan la viabilidad y longevidad del polen en los progenitores es un requisito indispensable (González *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2013; Olatunji *et al.*, 2016).

La calidad del polen es un parámetro fundamental para los estudios relacionados con la biología de la polinización, ya que existen numerosos procesos esenciales para la mejora genética y la producción de los cultivos que dependen de este parámetro (Rejón *et al.*, 2010). Por lo tanto, para los fitomejoradores la calidad del polen es fundamental ya que les permite asegurar el éxito de las polinizaciones en sus programas de hibridación (Sulusoglu y Cavusoglu, 2014; Olatunji *et al.*, 2016). Otra razón de su valor reside en la eficiencia que aporta para la producción de fruta con buenas características para el consumidor, ya que afecta el volumen de cuajado de fruta (Sharafi, 2011) y al producir semillas incrementa la síntesis de giberelinas que resulta en mayor tamaño y calidad de la fruta (Zhang *et al.*, 2010).

La fisiología del polen, especialmente la germinación y la viabilidad, ha recibido una atención considerable para aplicarse, tanto en programas de mejoramiento de plantas, como en la conservación, adaptación y comprensión del comportamiento fisiológico de la fertilización de los granos de polen (Khan y Perveen, 2014). La caracterización y la viabilidad de los granos de polen son herramientas útiles para guiar los cruzamientos en programas de mejoramiento (Soares *et al.*, 2013), ya que permite discriminar y usar solo los mejores donadores de polen y hacer un buen manejo de este en los trabajos de polinización (Gaaliche *et al.*, 2013; Baswal *et al.*, 2015).

La viabilidad del polen varía sustancialmente entre y dentro de especies y puede ser reducida por distintos factores (Yeaman *et al.*, 2014). De acuerdo con estos autores, el polen llega a ser inviable ya sea durante su desarrollo en los botones florales o después de su desarrollo completo. Por su parte, Davarynejad *et al.* (2008), señalan que la formación de polen fértil depende de factores ambientales como humedad y temperatura y de factores genéticos como morfología, capacidad para la germinación y crecimiento del tubo polínico. Factores ambientales como las altas y bajas temperaturas, la humedad relativa y el estrés hídrico ocasionan una reducción en el metabolismo y un ciclo de vida corto (Khan *et al.*, 2013; Khan y Perveen, 2014).

La viabilidad del polen y su poder germinativo en laboratorio se puede determinar mediante a): Pruebas de germinación *in vitro* (Moura *et al.*, 2015; Shekari *et al.*, 2016); b) medición de la actividad enzimática (Gozlekci *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2013; Demir *et al.*, 2015); y c) la tinción del citoplasma del grano de polen (Maiti y Rodríguez, 2015; Baswal *et al.*, 2015). Sin embargo, Soares *et al.* (2013); Kundu *et al.* (2014); Shekari *et al.* (2016), coinciden que la germinación *in vitro* es más confiable ya que los métodos de tinción pueden sobreestimar la viabilidad del polen. Por otra parte, la longevidad del polen, considerada como el período de tiempo durante el cual el polen mantiene su viabilidad, es decir, la capacidad de germinación y de fertilización, varía mucho con las especies de plantas y las condiciones de almacenamiento (Dafni y Firmage, 2000).

Se han realizado estudios para conocer la viabilidad y longevidad del polen de cítricos (Khan y Perveen, 2014; Kundu *et al.*, 2014; Baswal *et al.*, 2015; Demir *et al.*, 2015; Ahmed *et al.*, 2017); sin embargo, no se conocen estudios realizados en limón mexicano, por lo que hasta el momento se desconoce su comportamiento respecto a estas características del polen. Por lo anterior, se llevó a cabo esta investigación con la finalidad de determinar la viabilidad y longevidad del polen de tres variedades de limón mexicano, dos híbridos naturales y el ‘Citrange C-35’ como testigo, que forman parte del banco de germoplasma de cítricos del Campo Experimental Tecomán del INIFAP y que se utilizan en el programa de mejoramiento genético de limón mexicano.

## **Materiales y métodos**

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología del INIFAP Campo Experimental Tecomán en los meses de enero y febrero de 2008 y 2009. Se utilizaron árboles de seis a ocho años de edad. La colecta de las flores se llevó a cabo entre las 9:00 y 10:00 de la mañana, hora en que se presenta la mayor frecuencia de apertura de flores en limón mexicano y se inicia la dehiscencia de las anteras (Robles-González y Medina-Urrutia, 1984).

### **Medios de cultivo para la germinación *in vitro***

Los medios para la germinación *in vitro* se prepararon según las formulaciones de Brewbaker y Kwack (1963) (BBK):  $\text{CaNO}_3$  300 mg L<sup>-1</sup>,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  200 mg L<sup>-1</sup>,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  100 mg L<sup>-1</sup>,  $\text{KNO}_3$  100 mg L<sup>-1</sup>, Sacarosa 100 mg L<sup>-1</sup>. Lora *et al.* (2006):  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  200 mg L<sup>-1</sup>,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  250 mg L<sup>-1</sup>,  $\text{KNO}_3$  100 mg L<sup>-1</sup>,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  100 mg L<sup>-1</sup>, Sacarosa 80 g L<sup>-1</sup>. Leal, (1969) modificado: sacarosa 80 g L<sup>-1</sup>. A los tres medios se les ajustó el pH a 6.5, se gelificaron con 10 g L<sup>-1</sup> de agar y se esterilizaron en una autoclave vertical marca AESA, durante 20 min a 121 °C y a presión de 15 lb pulgada<sup>-2</sup>. Se usaron sales minerales de grado reactivo de la marca SIGMA.

### **Estimación de la viabilidad del polen recién liberado de las anteras**

Para este estudio se utilizó polen fresco de las variedades ‘Colimex’, ‘Lise’, ‘Colimón’, los híbridos naturales de limón mexicano CV 63-64 y CV 67-68 y el ‘Citrange C-35’ como testigo, extraído dos horas después de anthesis. Se colectaron 25 a 30 flores recién abiertas y con anteras en proceso de liberación del polen. Las flores se depositaron en cajas Petri de plástico estériles de 10 x 100 mm y dos horas después se friccionaron entre ellas para propiciar que el polen se desprendiera de las anteras abiertas. Para la siembra de polen, se utilizó el método de la gota sobre el portaobjetos. Con la ayuda de una micropipeta se depositaron cinco gotas del medio de cultivo en los portaobjetos. Se prepararon cinco portaobjetos por cada medio de cultivo.

Una vez gelificadas y frías las gotas, se dejaron caer los granos de polen sobre estas con un pincel de pelo de camello. Los portaobjetos se etiquetaron y se colocaron en una cámara húmeda para evitar la deshidratación del medio de cultivo. La cámara húmeda se llevó al cuarto de incubación por un periodo de 24 h con una temperatura que fluctuó entre 25 y 28 °C. Después de ese tiempo las muestras se observaron con el objetivo 40 x de un microscopio compuesto Motic BA200. En cada gota se observaron cinco campos y en cada uno se cuantificó el total de granos visualizados, así como el número de granos que emitieron y desarrollaron su tubo polínico, como lo señala (Kalinganire *et al.*, 2000). Con esos datos, se determinaron los porcentajes de germinación.

## Determinación de la longevidad del polen conservado a temperatura ambiente

Para este experimento se utilizó polen de los genotipos diploides ‘Colimex’, ‘Colimón’ y ‘Lise’, así como del ‘Citrange C-35’ como testigo. Se colectaron 25 a 30 flores recién abiertas y con anteras liberando el polen. Las flores se depositaron en cajas Petri y se friccionaron entre ellas para propiciar que el polen se desprendiera de las anteras abiertas. Después de obtener el polen, se conservó en las cajas de Petri y se mantuvo a temperatura ambiente del laboratorio, que fluctuó entre 21 y 30 °C, hasta su utilización para las pruebas de viabilidad, misma que se llevaron a cabo 2, 24 y 48 h después de la antesis. Para la siembra, observación y registro de variables se utilizó la metodología descrita anteriormente.

### Análisis de datos

En ambos experimentos se utilizó un diseño experimental en bloques al azar con arreglo factorial y cinco repeticiones. Para la estimación de la viabilidad de polen fresco, se probaron tres medios de cultivo y seis genotipos. Para estimar la longevidad del polen se utilizaron tres medios de cultivo y cuatro genotipos. El análisis se realizó con los promedios de dos años de estudio. Los valores en porcentaje se transformaron a valores de arcoseno mediante la ecuación: Bliss [ $y = \arcsin(\sqrt{x/100})$ ]. Andres *et al.* (1999). Los análisis estadísticos se realizaron con ayuda de los programas estadísticos Statistix 9 de Analytical Software, (2010).

## Resultados y discusión

### Estimación de la viabilidad del polen recién liberado de las anteras

Los tres medios de cultivo permitieron la germinación de granos de polen de los distintos genotipos estudiados (Figura 1). Después de 24 h, se pudo observar crecimiento del tubo polínico a partir de los granos de polen, los que se cuantificaron como viables. Los resultados registrados en 2008 fueron coincidentes con los obtenidos en 2009 tanto para medios de cultivo como para genotipos.



Figura 1. Germinación de granos de polen de limón mexicano ‘Colimex’ en tres medios de cultivo a) Brewbaker y Kwack (1963); b) Lora *et al.* (2007) modificado; y c) Leal (1969).

Para el análisis estadístico se utilizaron los promedios de los dos años de estudio, de cada una de las variables registradas. El Anova no reportó diferencias significativas para el factor medios de cultivo. Sin embargo, se detectaron diferencias altamente significativas ( $p= 0.01$ ) para el factor genotipos, así como para la interacción entre medios de cultivo\*genotipos.

De acuerdo con los resultados que se muestran en el Cuadro 1, se puede apreciar que los tres medios de cultivo evaluados promovieron la germinación de granos de polen en proporciones muy similares y resultaron estadísticamente iguales entre sí. Los porcentajes de germinación en los tres medios de cultivo fluctuaron entre 20.4% a 21.6%.

**Cuadro 1. Porcentaje de granos de polen germinados en cinco genotipos de limón mexicano y el ‘Citrange C-35’ en tres medios de cultivo.**

Genotipos	Medio de cultivo			Promedios por genotipos
	Brewbaker and Kwack (1963)	Lora <i>et al.</i> (2007)	Leal (1969)	
‘Colimón’	1.04 fg	0.18 g	1.11 fg	0.78 e
‘Lise’	4.33 fg	3.37 f	1.46 fg	3.05 d
‘Colimex’	13.94 de	16.9 de	10.4 e	13.74 c
CV 63-64 <sup>1</sup>	22.23 cd	21.45 cd	30.02 bc	24.57 b
CV 67-68 <sup>1</sup>	45.12 a	40.45 ab	33.49 abcs	39.69 a
‘Citrange C-35’	42.95 ab	41.17 ab	45.95 a	43.35 a
Prom. medio	21.6 a	20.59 a	20.4 a	

CV= 14.71. Promedios con letra distinta dentro de grupos son estadísticamente diferentes (Tukey  $p < 0.05$ ). <sup>1</sup>híbridos naturales de limón mexicano.

Según Soares *et al.* (2008) la germinación *in vitro* es uno de los métodos comúnmente utilizados para estimar la calidad de granos de polen, en estudios de biología reproductiva y selección de progenitores masculinos en programas de mejoramiento genético. Es el principal indicador de la viabilidad funcional del polen (Cerovic *et al.*, 2014). Para ello se han desarrollado medios de cultivo simples y algunos más complejos para reproducir las condiciones que brinda el estigma de la flor para que el polen germine y el tubo polínico crezca por el estilo, hasta alcanzar el saco embrionario.

En nuestro estudio, no se encontraron diferencias en los porcentajes de germinación de granos de polen germinados entre los tres medios de cultivo evaluados. Desde la formulación más simple (Leal, 1969) modificado, que solo incluyó 80 g L<sup>-1</sup> de sacarosa + 10 g L<sup>-1</sup> de agar, en el que se alcanzó un promedio de 20.4% de granos de polen germinados, hasta el medio más complejo (Lora *et al.*, 2006), que además de llevar 80 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 10 g L<sup>-1</sup> de agar, se adicionaron algunas sales minerales y que promedió 21.6% de granos germinados.

Esto significa que el polen recién liberado de las anteras en los seis genotipos estudiados, no requieren un medio de cultivo complejo y como lo señalan Patel y Mankad (2014); Ahmed *et al.* (2017) una germinación satisfactoria del polen puede alcanzarse en una solución de agua y azúcar. Por lo tanto, cualquiera de las tres formulaciones evaluadas resulta adecuada para estimar la viabilidad del polen de limón mexicano en laboratorio. Si tomamos la composición de los tres medios, el descrito por Leal (1969) y modificado, resulta adecuado por lo simple y barato de la preparación.

El estudio también permitió detectar diferencias entre los seis genotipos evaluados respecto a la capacidad del polen para germinar *in vitro*. Con base a los resultados, las tres variedades de limón mexicano presentaron bajos porcentajes de germinación respecto a los otros genotipos evaluados. Particularmente las variedades ‘Colimón’ y ‘Lise’ registraron porcentajes de germinación de 0.78% y 3.05% respectivamente, por lo que se considera que estos genotipos no son deseables como donadores de polen en trabajos de mejoramiento genético.

Por su parte, la variedad ‘Colimex’ alcanzó 13.74% de granos germinados, aunque sigue siendo un porcentaje bajo de polen viable comparado con lo informado por Khan y Perveen (2014); Ahmed *et al.* (2017) para otros cítricos, puede utilizarse como progenitor masculino con mejores expectativas de fecundar el ovulo y generar híbridos.

El resultado obtenido para ‘Colimex’ tiene coincidencia con lo informado por Vilorio y Grosser (2005) que registraron 7.5% de polen viable, aunque estos autores hicieron sus estimaciones usando el método tinción con acetocarmín al 1%. Por otro lado, el ‘Citrange C-35’ alcanzó los porcentajes de viabilidad de polen más altos y por lo tanto puede ser considerado como un buen candidato para usarse como donador de polen (Cuadro 1). De acuerdo a estos resultados, la capacidad de germinación *in vitro* del polen fue diferente entre variedades de limón mexicano y especies cítricas. (Dominguez *et al.*, 1999; Kundu *et al.*, 2014; Khan y Perveen 2014; Ahmed *et al.*, 2017) también reportaron diferencias en los porcentajes de germinación del polen entre distintas especies cítricas.

### Determinación de la longevidad del polen conservado a temperatura ambiente

En este experimento el Anova reportó diferencias altamente significativas para el factor tiempo de almacenamiento después de la antesis (TDA), para el factor genotipos y la interacción TDA\*genotipos. Con los resultados que se muestran en el Cuadro 2, es claro que los tratamientos con polen conservado a temperatura ambiente por 2 y 24 h a partir de la antesis presentaron valores entre 10.03 y 13.92% de granos de polen con capacidad de germinar y resultaron estadísticamente iguales entre sí. Para el caso del polen conservado por 48 horas en ambiente natural antes de la siembra, prácticamente perdió su viabilidad. Por su parte, los genotipos presentaron un comportamiento diferente para esta variable y registraron distintos porcentajes de granos de polen germinado, que los hizo estadísticamente diferentes entre sí. El ‘Citrange C-35’, alcanzó el mayor porcentaje de polen germinado *in vitro*, seguido por el ‘Colimex’, ‘Lise’ y ‘Colimón’.

**Cuadro 2. Porcentaje de granos de polen germinados en tres genotipos de limón mexicano y el ‘Citrange C-35’ y tres tiempos de almacenamiento.**

Horas después de antesis	Genotipo				Promedio por horas
	‘Colimón’	‘Lise’	‘Colimex’	‘Citrange C-35’	
2	0.63 f	3.78 e	12.71 c	38.57 a	13.92 a
24	2.17 e	8.53 cd	7.64 d	21.77 b	10.03 a
48	0.16 f	0.46 f	0.17 f	0.34 f	0.28 b
Prom. genotipo	0.98 d	4.25 c	6.84 b	20.23 a	

CV= 29.94. Promedios con letras distintas dentro de grupos son estadísticamente diferentes (Tukey  $p < 0.05$ ).

Se puede apreciar que los genotipos muestran interacción sólo con los tratamientos de 2 y 24 h de almacenamiento. Con el polen sembrado dos horas después de la antesis, los genotipos alcanzaron diferentes porcentajes de germinación, resultando estadísticamente diferentes entre sí. El 'Citrange C-35' presenta el mayor porcentaje de germinación, seguido de la variedad 'Colimex', 'Lise' y 'Colimón'. Con polen sembrado después de 24 h desde la antesis, los genotipos mostraron un comportamiento similar al descrito para el tratamiento de dos horas después de la antesis. Para el tratamiento con polen almacenado por 48 h, los porcentajes de germinación de los granos de polen se redujeron significativamente en todos los genotipos.

La longevidad de los granos de polen es una característica importante para un programa de mejoramiento genético mediante hibridación convencional. La duración de la viabilidad, monitoreada a través del tiempo y mediante el registro de la capacidad del polen para germinar *in vitro*, puede ayudar a estimar su longevidad. En muchas especies vegetales este período de tiempo generalmente es corto si el polen se mantiene a temperatura ambiente, aunque de acuerdo con Dafni y Firmage (2000), esto puede variar fuertemente entre especies y condiciones de almacenamiento.

Al respecto, Wang *et al.* (2012) determinaron que bajo condiciones de días nublados el polen de pasto forrajero (*Festuca arundinacea* Schreb.) transgénico y no transgénico, permaneció viable hasta 240 min, con 5% de viabilidad después de 150 min de almacenamiento. Sin embargo, bajo un ambiente soleado, la viabilidad del polen se reduce al 5% en solo 30 min, con una pérdida completa de viabilidad en 90 min.

Es escasa la información detectada respecto a la longevidad del polen de cítricos. Sin embargo, Khan y Perveen (2014), señalan que en almacenamiento bajo condiciones de refrigeración (4 °C), el polen de *C. limon*, *C. aurantium*, *C. reticulata* y *C. sinensis* perdió cerca de 50% de su capacidad para germinar *in vitro* en comparación con lo observado en polen fresco, después de 48 semanas, mientras que *C. paradisi* perdió cerca de 95% de su viabilidad en ese mismo período de tiempo. Estos autores no evaluaron la viabilidad con polen almacenado a temperatura ambiente.

Por su parte, Ahmed *et al.* (2017), en un trabajo similar, determinaron que el polen de tres variedades de toronja (*C. paradisi*), en promedio perdieron 80% de capacidad para germinar *in vitro*, en comparación con lo registrado con polen fresco, después de 48 semanas de almacenamiento a 4 °C, mientras que en dos variedades de Tangelo (*C. reticulata* × *C. maxima* × *C. paradisi*), tres de pomelo (*C. maxima*.) y tres de mandarina (*C. reticulata*) la pérdida fue de 60% y en tres variedades de naranja, se perdió 49%. En ese mismo estudio, las muestras de polen de todas las especies y variedades conservadas a temperatura ambiente no presentaron granos de polen viables después de 8 días.

En nuestro estudio, el polen se conservó en el laboratorio a temperatura ambiente, que fluctuó entre 21 °C y 30 °C, lo que propició que la capacidad de germinación del polen se redujera rápidamente. Las muestras de polen tomadas dos horas después de la antesis alcanzaron los porcentajes más altos de germinación en los genotipos 'Colimex' y el 'Citrange C-35'. En las muestras tomadas 24 h después de la antesis los porcentajes de germinación bajaron casi a la mitad en ambos genotipos. Mientras que en los genotipos 'Colimón' y 'Lise' los resultados fueron ligeramente diferentes y los mayores porcentajes de germinación se alcanzaron a las 24 h después de la antesis. Sin embargo, para las 48 h de almacenamiento, la viabilidad se redujo significativamente en todos los genotipos evaluados, que registraron en promedio 0.28% de granos de polen germinados.

Un resultado similar fue descrito por Shekari *et al.* (2016) en ortiga borde (*Leonurus cardiaca*) quienes registraron porcentajes de germinación de 82.84, 24.37, 11.04 y 0.19 en muestras de polen colectado a 2, 24, 48 y 72 h después de la antesis, mientras que el polen almacenado a -60 °C mantuvo los más altos valores de germinación *in vitro* después de las 48 semanas de almacenamiento. Es necesario, continuar este trabajo y determinar las mejores condiciones para la conservación a bajas temperaturas o crioconservación, lo que ayudará a contar con polen en cualquier época del año y coincidir con los donadores de semilla y eficientar el mejoramiento genético de limón mexicano.

## Conclusiones

La viabilidad del polen de limón mexicano de las variedades ‘Colimex’ y ‘Lise’ resultó baja si se compara con lo observado con el ‘Citrange C-35’, pero puede ser útil para utilizarse como progenitor masculino en programas de mejoramiento genético por hibridación. La longevidad del polen de genotipos de limón mexicano y del ‘Citrange C-35’ es de apenas 24 h si se almacena a temperatura ambiente, por lo tanto, si el polen se conserva bajo esta condición, debe utilizarse el mismo día de la liberación de las anteras o máximo 24 h después para obtener mejores resultados de fertilización de óvulos.

## Agradecimientos

Al fondo SEP-CONACYT por el financiamiento del proyecto de investigación: hibridación interploide para generar genotipos de limón mexicano triploides, sin semillas y con tolerancia a tristeza y al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por el financiamiento del proyecto de investigación: evaluación y mejoramiento de híbridos de limón mexicano con mayor tolerancia al HLB-antracnosis y buena calidad de fruta.

## Literatura citada

- Ahmed, S.; Rattanpal, H. S.; Ahmad, E. and Singh, G. 2017. Influence of storage duration and storage temperature on *in-vitro* pollen germination of citrus species. *Inter. J. Current Microbiol. Appl. Sci.* 6(5):892-902. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.605.099>.
- Basso-Alves, J. P.; Agostini, K. and de Pádua, T. S. 2011. Pollen and stigma morphology of some *Phaseoleae species* (Leguminosae) with different pollinators. *Plant Biol.* 13(4):602-610. DOI:10.1111/j.1438-8677.2010.00416.x.
- Baswal, A. K.; Rattanpal, H. S. and Sidhu, S. G. 2015. Assessment of pollen viability and floral biology in sweet orange (*Citrus sinensis* obseck) cultivars under subtropical conditions of Punjab. *The Bioscan.* 10(4):1573-1576.
- Brewbacker, J. L. and Kwack, B. H. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Am. J. Bot.* 50(9):747-858.
- Cerovic, R.; Pajic, Z.; Filipovic, M.; Fotiric-Aksic, M.; Radicevic, S.; Nikolic, D. and Dordevic, M. 2014. Pollen germination and pollen tube growth in ZP maize lines. *Genetik.* 46(3):935-948. DOI: 10.2298/GENSR1403935C.
- Dafni, A. and Firmage, D. 2000. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Systematics and Evolution.* 222:113-132.



- Davarynejad, G.; Szabó, Z.; Nyeki, J. and Szabó, T. 2008. Phenological stages pollen production level, pollen viability and *in vitro* germination capability of some sour cherry cultivars. *Asian J. Plant Sci.* 7:672-676. DOI:10.3923/ajps.2008.672.676.
- Demir, G.; Turgutoglu, E. and Kurt, S. 2015. Assessment of pollen viability and germination in seven varieties of lemon. *Ekin J. Crop Breed. Genetics.* 1:47-49.
- Dominguez, E. T.; Tullmann-Neto, A. and Sobrinho, J. T. 1999. Viabilidade do pólen em variedades de laranja doce. *Sci. Agricola.* 56(2):265-272. <https://dx.doi.org/10.1590/S0103-90161999000200002>.
- Gaaliche, B.; Afifa M.; Mehdi, T. and Messaoud, M. 2013. Assessment of pollen viability, germination, and tube growth in eight Tunisian Caprifig (*Ficus carica* L.) cultivars. *Inter. Scholarly Res. Notices Agron.* 2: 1-4. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/207434>.
- González, M. E.; Estévez, A.; Castillo, J.; Salomón, J.; Moré, O. y Hernández, M. M. 2002. La calidad del polen: requisito indispensable del mejoramiento tradicional de la papa en Cuba. *Rev. Latinoam. de la Papa.* 13:75-94.
- Gozlekci, S.; Uzun, H. I. and Tepe, S. 2011. Determination of pollen viability, germination, and quantity in loquat cultivars. *Acta Horticulturae (ISHS).* 887:281-284. <http://www.actahort.org/books/887/887.48.htm>.
- Kalinganire, A.; Harwood, C. E.; Slee, M. U. and Simons, A. J. 2000. Floral structure, stigma receptivity and pollen viability in relation to protandry and self-incompatibility in silky oak (*Grevillea robusta* A. Cunn.). *Annals Bot.* 86:133-148. doi:10.1006/anbo.2000.1170.
- Khan, S. A. and Perveen, A. 2014. *In vitro* pollen germination of five citrus species. *Pakistan Journal of Botany.* 46 (3):951-956.
- Khan, S. A.; Perveen, A. and Sarwar, G. R. 2013. Germination capacity and viability in pollen of *Prunus amygdalus* Batsch (Rosaceae). *Pakistan J. Bot.* 45(4):1383-1385.
- Kundu, M.; Dubey, A.; Srivastav, M.; Malik, S. and Singh, B. 2014. Effect of gamma ray irradiation and cryopreservation on pollen stainability, *in vitro* germination, and fruit set in Citrus. *Turkish J. Biol.* 38:1-9. Doi:10.3906/biy-1303-55.
- Leal, F. 1969. Influencia de los métodos de almacenamiento sobre la viabilidad del polen en citrus y poncirus. *Revista de la Facultad de Agronomía (Maracay).* 5(2):5-28.
- Lora, J.; Pérez de Oteyza, M. A.; Fuentetaja, P. and Hormaza, J. I. 2006. Low temperature storage and *in vitro* germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) pollen. *Scientia Hort.* 108:91-94. doi: 10.1016/j.scienta.2005.12.003.
- Maiti, R. and Rodríguez, H. G. 2015. Phenology, morphology and variability in pollen viability of four woody species (*Cordia boissieri*, *Parkinsonia texana*, *Parkinsonia aculeate* and *Leucophyllum frutescens*) exposed to environmental temperature in Linares, Northeast of Mexico. *Forest Res S1: 002.* doi:10.4172/2168-9776.S1-002.
- Moura, C. R. F.; Machado, C. A. and Ledo, A. S. 2015. *In vitro* germination and viability of pollen grains of coconut accessions. *Rev. Cienc. Agron.* 46(2):421-427. <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20150022>.
- Olatunji, T. L. and Morakinyo, J. A. 2016. Pollen grain and hybridization studies in the genus *Capsicum*. *Notulae Sci. Biol.* 8(1):134-138. DOI: 10.15835/nsb.8.1.9767.
- Patel, R. G. and Mankad, A. U. 2014. *In vitro* pollen germination - a review. *Inter. J. Sci. Res.* 3(5):304-307.
- Rejón, J. D.; Suárez, C. G.; Alché, J. D.; Castro, A. J. and Rodríguez-García, M. I. 2010. Evaluación de diferentes métodos para estimar la calidad del polen en distintos cultivares de olivo (*Olea europaea* L.) *Polen.* 20:61-72, 2010.

- Robles-González, M. M. y Medina-Urrutia, V. M. 1984. Observaciones sobre el desarrollo floral de dos tipos de limón mexicano *Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle y del limón persa *Citrus latifolia* Tanaka en Tecomán, Colima. *Agríc. Téc. Méx.* 10(1):31-45.
- Sharafi, Y. 2011. Investigation on pollen viability and longevity in *Malus pumila* L. *Pyrus communis* L. *Cydonia oblonga* L. *in vitro*. *J. Medicinal Plants Res.* 5:2232-2236.
- Shekari, A.; Nazeri, V. and Shokrpour, M. 2016. Pollen viability and storage life in *Leonurus cardiaca* L. *J. Appl. Res. Medicinal and Aromatic. Plants.* 3(3):101-104. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.02.004>.
- Soares, T. L.; de Oliveira, S.; Pereira, M. A.; Almeida, J.; da Silva, A.; Morais, L. S.; Hilo, E. and Nunes, O. 2008. *In vitro* germination and viability of pollen grains of banana diploids. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 8:111-118.
- Soares, T. L.; Jesus, O. N.; Santos-Serejo, J. A. and Oliveira, J. E. 2013. *In vitro* pollen germination and pollen viability in passion fruit (*Passiflora* spp.). *Rev. Bras. Fruticultura. Jaboticabal - SP.* 35(4):1116-1126. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452013000400023>.
- Sulusoglu, M. and Cavusoglu, A. 2014. *In vitro* pollen viability and pollen germination in cherry Laurel (*Prunus laurocerasus* L.). *The Scientific World J.* ID 657123. 7 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/657123>.
- Viloria, Z. and Grosser, J. W. 2005. Acid citrus fruit improvement via interploid hybridization using allotetraploid somatic hybrid and autotetraploid breeding parents. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 130(3):392-402.
- Wang, Y. L.; Guan, Z. Y.; Chen, F. D.; Fang, W. M. and Teng, N. J. 2012. Pollen viability, pistil receptivity, and embryo development in hybridization of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *The Sci. World J.* ID 678706. 8 p. doi:10.1100/2012/678706.
- Yeaman, R. L.; Roulston, T. H. and Carr, D. E. 2014. Pollen quality for pollinators tracks pollen quality for plants in *Mimulus guttatus*. *Ecosphere* 5(7):91-98. <http://dx.doi.org/10.1890/ES14-00099.1>.
- Zhang, C.; Tateishi, N. and Tanabe K. 2010. Pollen density on the stigma affects endogenous gibberellin metabolism, seed and fruit set, and fruit quality in *Pyrus pyrifolia*. *J. Exp. Bot.* 61:4291-4302. doi:10.1093/jxb/erq232.