

ANÁLISIS DE LA DEPENDENCIA DE LA POLINIZACIÓN *en la producción de limonero en el sureste español*

La polinización en los cítricos es principalmente entomófila, sin embargo, los requerimientos de polinización en este género han sido clasificados como altamente variables debido a su biología floral. El objetivo de este trabajo fue definir experimentalmente la dependencia del servicio de polinización para la producción de fruta de la variedad de limonero 'Verna 51'.

M. MORENO¹, C.M. RODRÍGUEZ¹, M. PÉREZ-MARCOS², J.A. SÁNCHEZ-SÁNCHEZ², O. PÉREZ-TORNERO^{1*}

¹Equipo de Mejora Genética de Cítricos, Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), La Alberca (Murcia), España

²Equipo de Control Biológico y Servicios Ecosistémicos, Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), La Alberca (Murcia), España

* Autor para correspondencia: olalla.perez@carm.es

Los cítricos son un grupo de frutales que pertenecen a la familia *Rutaceae* y son cultivados en todas las áreas de clima templado o subtropical. El limonero (*Citrus limon* [L.] Osbeck) es la tercera especie de cítricos más cultivada en el mundo, solo por detrás del naranjo y el mandarino (FAOSTAT, 2020), siendo España el principal país productor de limones del área mediterránea (Valverde, 2019).

La polinización en los cítricos es principalmente entomófila, producida por abejas, mientras que el viento tiene poca importancia. Esto es debido a que el polen de los cítricos es pesado, viscoso y adherente (Agustí y Primo-Millo, 2020).

La polinización entomófila es indispensable para la producción global de alimentos. Los insectos polinizadores son los responsables de la producción de una significativa porción de nuestra comida, incluyendo frutos, semillas

y frutos secos. Estudios recientes sugieren que el 75% de la producción global agrícola dependen de animales, principalmente insectos, para su producción (Klein *et al.* 2007). Sin embargo, en la actualidad se observa que gran parte de los cultivos entomófilos sufre limitaciones de producción derivadas de la polinización: no logran alcanzar la producción máxima porque no reciben los aportes máximos posibles de polen, tanto en cantidad como en calidad, por parte de los insectos (Garibaldi *et al.* 2016).

Los requerimientos de polinización en los cítricos han sido clasificados como altamente variables (Klein *et al.*, 2007) debido a las importantes diferencias que existen entre las distintas variedades y especies en cuanto al grado de partenocarpia o auto-compatibilidad (Chao 2005; Botías *et al.* 2017a), haciendo las generalizaciones de poco valor. Giannini *et al.* (2020) establecieron que los naranjos tienen una modesta dependencia de los poli-

nizadores. Sin embargo, para Wolowski *et al.* (2019) la dependencia de las mandarinas tangerinas es esencial, llegando a un incremento del 100% en la producción cuando se mantienen los servicios de polinización en las áreas de cultivo (Roubik, 2018). Incluso en cítricos que producen frutos sin semillas, los cuales son altamente demandados por el mercado de fruta fresca, requieren la estimulación de la polinización para ser producidos, cuando no tienen partenocarpia autónoma (Yang *et al.*, 2020).

Aunque los cultivos de cítricos han sido ampliamente estudiados, el manejo necesario para asegurar una mayor polinización y producción de fruta de numerosas variedades es aún poco conocido (Sanford, 2011).

El objetivo de este trabajo fue definir experimentalmente la dependencia del servicio de polinización para la producción de fruta de una variedad de limonero, 'Verna 51', en dos localizaciones diferentes del sureste español.



FIGURA 1
Fincas de estudio en dos localizaciones del área del cultivo de limonero en el sureste español. A.- Alhama de Murcia (Región de Murcia); B.- Almoradí (Alicante, Comunidad Autónoma de Valencia). En cada imagen se identifica la parcela de limoneros 'Verna 51', donde se realizó el estudio, y la posición de la parcela de limoneros 'Fino 49' más cercana.

Materiales y métodos

- Área de estudio y material vegetal

El estudio fue llevado a cabo en los años 2019, 2020 y 2021 en dos fincas de limoneros situadas en localizaciones diferenciadas del sureste español: Alhama de Murcia (37.873107, -1.290732), en la Región de Murcia, y Almoradí (38.072264, -0.782878), en la provincia de Alicante (**Figura 1**). Estas fincas tienen parcelas de distintas variedades de limonero. En concreto el estudio se realizó en dos parcelas de limonero 'Verna 51', las cuales se situaban cerca de otras parcelas de la variedad de limonero 'Fino 49' (**Figura 1**), ya que estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que estas dos variedades eran muy compatibles (Botías *et al.*, 2017a).

- Diseño y configuración del experimento

Muestreo de insectos polinizadores

La abundancia de los insectos polinizadores que visitaban el cultivo del limonero se estimó realizando muestreos visuales mediante transectos, andando en paralelo a las líneas de limonero, durante periodos de 15 minutos. La abundancia de insectos polinizadores en cada transecto se estimó contando el número de indi-

Aunque los cítricos han sido ampliamente estudiados, el manejo necesario para asegurar una mayor polinización y producción de fruta es aún poco conocido

viduos que acudían a las flores. Esto se repitió en 3 ocasiones. Los insectos polinizadores se identificaron *in situ* al máximo nivel de identificación posible. Los muestreos se realizaron de 10:00 a 15:00 en condiciones soleadas, con una temperatura superior a 20°C y baja velocidad del viento. En cada muestreo, se registraron las condiciones de temperatura y viento.

Tratamientos de polinización

Para analizar la dependencia de polinizadores en el limonero 'Verna 51', y la relación con su biología floral, se diseñaron una serie de tratamientos: Auto-polinización (AP), Polinización-cruzada (PC), estos dos tratamientos se realizaron de manera manual, Partenocarpia (P) y Contribución de insectos (CI).

Para llevar a cabo el tratamiento de auto-polinización se seleccionaron unas 100 flores, de diferentes árboles, de la variedad de limonero 'Verna 51', en las dos localizaciones de estudio, un día antes de la antesis, en la época de máxima floración (abril-mayo). Las flores fueron emasculadas y polinizadas a mano con su propio polen. Para realizar el tratamiento de polinización cruzada, se siguió el mismo procedimiento anterior, pero las flores fueron polinizadas con el polen de la variedad de limonero 'Fino 49', variedad muy compatible con 'Verna 51' (Botías *et al.*, 2017a). En el análisis de la capacidad partenocárpica de la variedad de limonero 'Verna 51', unas 100 flores, un día antes de la antesis, fueron embolsadas inmediatamente después de la emasculación, para evitar una posible polinización. Por último, para estudiar la dependencia del servicio de polinización en

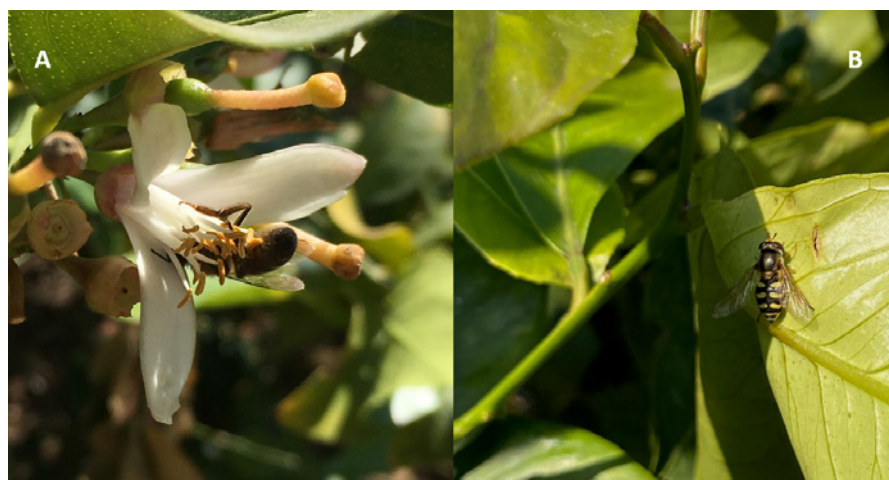


FIGURA 2
A) *Apis mellifera* (Apoidea, Hymenoptera) en una flor de limonero (abril de 2019, Almoradí, Alicante). (B) *Eupodes* sp (Syrphidae, Diptera) reposando en el envés de una hoja tras visitar varias flores de limonero (abril de 2021, Almoradí, Alicante).

la producción de esta variedad de limonero, se marcaron también 100 flores un día antes de la antesis, en cada localización del estudio, a las que se permitió el acceso libre de los insectos, después de comprobar que las flores eran viables.

Durante la realización de los tratamientos se tomaron diferentes observaciones como las temperaturas,

mínima y máxima, durante la polinización y la aparición de diferentes plagas.

En todos los tratamientos se registró el cuajado (cada 4 semanas) y, cuando los frutos alcanzaron el carácter comercial, se analizó la relación entre el origen del polen y la producción, el peso y el diámetro de los frutos y el número de semillas.

- Análisis de los datos

Todos los datos obtenidos en el estudio fueron analizados mediante el programa estadístico SPSS (versión 25, IBM®). El efecto de los tratamientos sobre los diferentes resultados fue analizado a través de un ANOVA y se utilizó el test de la diferencia mínima significativa o LSD (Least Significant Difference) para estudiar las diferencias entre los tratamientos, en los casos en los que el ANOVA dio diferencias significativas entre ellos. Las gráficas presentadas en este estudio fueron desarrolladas mediante el software Sigmaplot® v. 14, y los valores representados son las medias y los errores típicos de las medias.

Resultados y discusión

Aunque el estudio fue llevado a cabo durante tres años consecutivos, no se han tenido en cuenta los resultados de los tratamientos realizados en 2020, ya que se tuvieron muchos problemas a la hora de realizar el seguimiento de los ensayos o el registro de los resultados, debido a las restricciones por el SARS-CoV 2.

En los dos años de muestreo se registró un total de 581 insectos polinizadores. Entre ellos el 98% fueron abejas, siendo *Apis mellifera* (Figura 2) la única especie de abeja registrada en el cultivo, mientras que el 2% de insectos restante que visitaron el cultivo fueron dípteros, predominando entre ellos los sírfidos (Figura 2). En general, la abundancia media de abejas, teniendo en cuenta las dos localizaciones en conjunto, fue más alta en el primer año con respecto al segundo año, oscilando entre $1,58 \pm 0,1$ y $0,36 \pm 0,03$ individuos/árbol, respectivamente, no observándose diferencias significativas entre las localidades del muestreo (Tabla 1). En cuanto a los dípteros, la abundancia media no varió significativamente entre años ni localidades (Tabla 1).

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que afectan a los procesos de la biología reproductiva de las plantas, sobre todo a la germinación del polen (Kakani y col, 2005) y a la actividad de los in-

TABLA 1
Abundancia media por árbol ($\pm$ SE) de los taxones de insectos polinizadores observados en las dos localidades en los dos años de muestreo.

LOCALIDAD	GRUPO TAXONÓMICO	NÚMERO MEDIO DE INSECTOS POR ÁRBOL	
		2019	2021
ALMORADÍ (ALICANTE)	Apoidea	$1,40 \pm 0,13$	$0,37 \pm 0,08$
	Diptera	$0,01 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,06$
ALHAMA DE MURCIA (MURCIA)	Apoidea	$1,77 \pm 0,10$	$0,35 \pm 0,01$
	Diptera	$0,02 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,03$

TABLA 2
Temperaturas recogidas durante la realización de los distintos tratamientos en las parcelas de limonero de dos localizaciones del sureste español durante dos años.

AÑO	ALMORADÍ	ALHAMA DE MURCIA
2019	Mínima: 20°C	Mínima: 21°C
	Máxima: 27°C	Máxima: 25°C
2021	Mínima: 22°C	Mínima: 18°C
	Máxima: 23°C	Máxima: 22°C

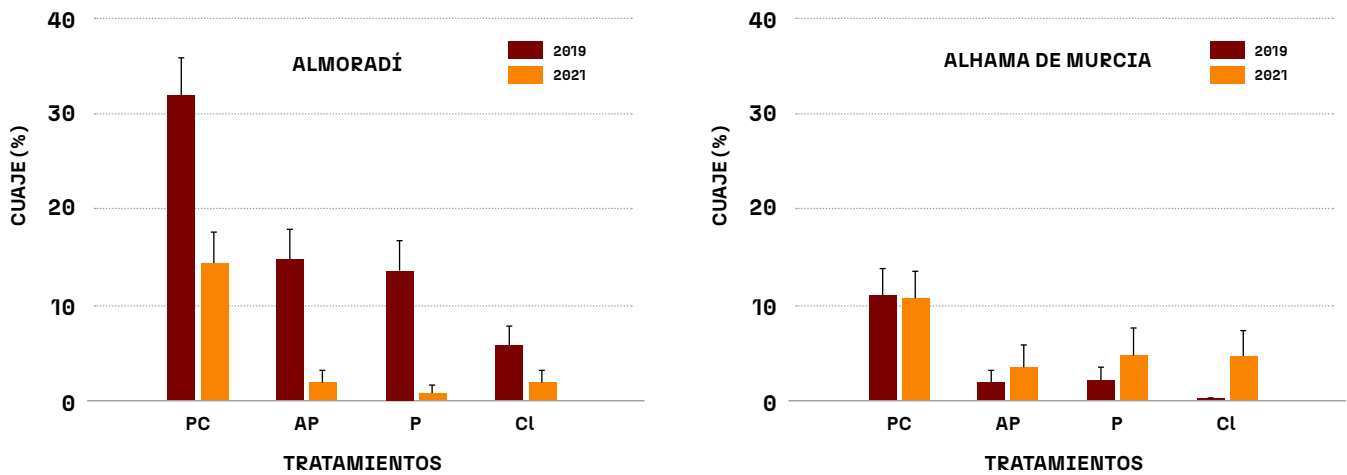


GRÁFICO 1

Resultados de cuaje, en la variedad de limonero 'Verna 51', de los tratamientos realizados en dos localizaciones distintas, Almoradí (Alicante) y Alhama de Murcia (Murcia). PC: polinización cruzada; AP: autopolinización; P: partenocarpia; CI: contribución de insectos. Los datos representan los valores medios $\pm$ error estándar.

sectos (Spiegel-Roy and Goldschmidt, 1996). Resultados previos de nuestro laboratorio en limonero mostraron que el porcentaje de germinación del polen, en el laboratorio, fue aumentando con la temperatura hasta los 25°C, y estos resultados fueron confirmados con los obtenidos en el campo (Botías Rubio *et al.*, 2017b). En este trabajo, las temperaturas registradas en los dos años y las dos localizaciones del experimento muestran que en 2019 las temperaturas medias durante la época de floración y polinización fueron más altas que en 2021 (Tabla 2), alcanzándose temperaturas óptimas para la germinación del polen (Botías Rubio *et al.*, 2017b) sobretodo en la finca de Almoradí (Alicante).

Las altas temperaturas en 2019 podrían explicar la mayor actividad de insectos polinizadores en las parcelas en este año (Tabla 1). Sin embargo, debido a la gran cantidad de factores que pueden afectar a las poblaciones de insectos polinizadores (i.e., colmenas o poblaciones de insectos polinizadores silvestres establecidas en la zona, temperaturas en los días previos al muestreo, tratamientos realizados en la parcela, entre otros), se realizarán estudios específicos sobre la

interacción de polen-temperatura-polinizadores para obtener resultados concluyentes.

Cuando se analizó el porcentaje de cuaje en los distintos tratamientos, en los dos años del ensayo y en las dos localizaciones, se pudo observar que la temperatura media afectó a los porcentajes de cuaje en la finca de Almoradí, situada en la provincia de Alicante (Gráfico 1), observándose los porcentajes más altos en 2019 con una temperatura máxima que llegó a los 27°C durante la polinización. En la finca de Alhama de Murcia, las temperaturas durante los dos años del ensayo fueron parecidas, obteniéndose también porcentajes de cuaje similares que fueron en general bajos si se comparan con los obtenidos en la otra finca.

Los resultados obtenidos muestran que, aunque se observaron diferencias importantes entre las dos localizaciones debido a las temperaturas durante la polinización, el porcentaje de cuaje fue superior en los tratamientos de PC, siendo mínimo o nulo en los tratamientos de AP, P y de CI (Gráfico 1). Resultados anteriores de nuestro equipo, en estudios de biología floral en limonero (Botías *et al.*, 2017a), mostraron que la variedad 'Verna 51'

produjo un porcentaje de cuaje superior en los ensayos de PC, con polen de 'Fino 49', que en los de AP o P.

La polinización por insectos (CI) tuvo un éxito considerablemente bajo. En este sentido, aunque en las fincas donde se llevó a cabo el ensayo había parcelas cercanas de 'Fino 49', los árboles de limonero tienen una floración muy abundante, por lo que los insectos polinizadores tendrían a su disposición recursos suficiente sin tener que recorrer grandes distancias. Esto lleva a pensar que los insectos del tratamiento CI transportarían principalmente polen de los árboles más próximos (i.e., de la variedad "Verna 51") lo que coincide con que los resultados obtenidos sean similares a los obtenidos en los tratamientos de autopolinización (AP) (Gráfico 1). Cuando se analizaron los resultados en cuanto a características del fruto se pudo observar que en 2019, en el ensayo realizado en la finca localizada en Almoradí (Alicante), no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en el diámetro y la altura de los frutos por efecto de los tratamientos (Tabla 3). Sin embargo, el tratamiento produjo un efecto significativo ($P < 0.05$) en el peso de los frutos y muy significativo ($P < 0.001$)

TABLA 3

Resultados de la calidad de los frutos de la variedad de limonero ‘Verna 51’ del ensayo realizado en los años 2019 y 2021 en las fincas de limonero situadas en Alhama de Murcia (Murcia) y Almoradí (Alicante)

FINCA: ALMORADÍ 2019					
TRAT.	Nº FRUTOS	PESO (G)	DIÁMETRO (MM)	ALTURA (MM)	Nº SEMILLAS
PC	39	183.26±0787 ab	66.61±00.98	94.65±02.25	1.24±0.25 a
AP	18	209.22±16.48 a	68.83±01.62	101.08±04.22	0.06±0.06 b
P	16	158.00±16.57 b	62.67±02.22	88.21±05.15	0.00±0.00 b
CI	7	227.00±34.78 a	69.88±04.00	105.21±09.14	0.00±0.00 b
FINCA: ALHAMA DE MURCIA 2019					
TRAT.	Nº FRUTOS	PESO (G)	DIÁMETRO (MM)	ALTURA (MM)	Nº SEMILLAS
PC	13	148.38±08.66	63.13±01.36	83.17±02.29	2.33±0.33 a
AP	3	135.33±14.52	57.60±01.44	96.69±04.93	0.00±0.00 b
P	2	115.00±39.00	55.78±07.26	80.30±07.56	0.00±0.00 b
CI	0	-	-	-	-
FINCA: ALMORADÍ 2021					
TRAT.	Nº FRUTOS	PESO (G)	DIÁMETRO (MM)	ALTURA (MM)	Nº SEMILLAS
PC	17	167.41±12.25	67.30±01.53	90.94±03.06	1.65±0.38
AP	2	214.00±34.00	71.37±04.54	105.11±13.46	0.00±0.00
P	1	186.00±00.00	70.05±00.00	86.09±00.00	0.00±0.00
CI	2	177.00±39.00	66.97±04.23	94.15±11.19	1.50±0.50
FINCA: ALHAMA DE MURCIA 2021					
TRAT.	Nº FRUTOS	PESO (G)	DIÁMETRO (MM)	ALTURA (MM)	Nº SEMILLAS
PC	10	245.17±27.22	70.80±02.37	112.53±05.86	0.92±0.50
AP	3	180.86±24.27	64.75±03.07	96.44±06.83	0.29±0.18
P	4	221.40±11.78	69.43±01.29	104.56±02.68	0.00±0.00
CI	4	205.33±23.78	67.23±02.40	103.82±05.96	1.33±0.60

PC: polinización cruzada; AP: autopolinización; P: partenocarpia; CI: contribución de insectos. Los datos representan los valores medios ± error estándar. Datos con diferentes letras indican diferencias significativas según el test LSD (P≤0.05)

en el número de semillas (**Tabla 3**). Los frutos con menor peso fueron los procedentes del tratamiento de partenocarpia, mientras que el mayor número de semillas fue observado en los frutos del tratamiento de polinización cruzada, lo que coincidiría con los resultados obtenidos en estudios previos (Botías *et al.*, 2017a). En la finca de Alhama de Murcia (Murcia), solo se observaron diferencias muy significativas ($P<0.001$) para el número de semillas, obteniéndose un mayor número en los frutos de PC, aunque el número de frutos obtenidos en AP o CI fue muy bajo o nulo, no pudiéndose comparar los resultados. En 2021, tanto en la finca localizada en Almoradí (Alicante) como en la de Alhama de Murcia

(Murcia), no se observaron diferencias significativas para ninguno de los parámetros de fruto analizados, aunque el número de frutos obtenidos en todos los tratamientos fue bastante bajo. En general, no se pudo establecer una relación directa clara entre el tratamiento y los parámetros del fruto.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo se podría establecer que en fincas de la variedad de limonero ‘Verna 51’ se podría aumentar la producción de fruta si se plantaran filas de árboles de la variedad ‘Fino 49’ intercaladas con otras de ‘Verna 51’. Los insectos podrían polinizar las flores de ‘Verna 51’ con polen de ‘Fino 49’, que ha mostrado ser muy compatible con ‘Verna 51’ (Botías *et al.*, 2017a),

obteniéndose un mayor porcentaje de cuaje en los tratamientos de PC con polen de esta variedad de limonero. Por otra parte, en esta situación también se aumentaría el número de semillas por fruto, como se ha visto en los resultados de este trabajo, aunque el número de semillas por fruto no fue demasiado alto.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Proyecto RTA2017-00051-C02-01.

Bibliografía

Queda a disposición del lector interesado en el correo electrónico: redaccion@editorialagricola.com