

SINTOMATOLOGÍA DEL ABORTO EN FLORES PISTILADAS DE NOGAL (*Juglans regia* L.) ‘SERR’
Pistillate flower abortion symptoms on ‘Serr’ walnut (*Juglans regia* L.)

Cristián González R.¹ y Gamalier Lemus S.^{1*}, y Gabino Reginato²

ABSTRACT

Pistillate flower abscission (PFA) affects severely walnut (*Juglans regia* L.) production, mainly on ‘Serr’. A study on symptoms of flower abortion in walnut ‘Serr’, induced by excess or lack of pollen, was carried out following evolution of flowers and peduncles. Hand pollinated flowers, with different pollen concentrations: 0, 1, 5, 25, 50 and 100% pollen diluted (w/w) in talcum powder, showed external and internal abortion symptoms. External ones were recorded directly from the tree, and, for internal ones, flower excisions stained with blue Toluidin-0 at 0.05% were analyzed under optical microscope. Excess of pollen abortion showed flowers with a rapid damage. Growth rate was very low, the involucre brightness was lost and stigma turned necrotic, regarded to lack of pollen aborted flower. Normal flowers continued growing up to fruit harvest without lose brightness. Excess of pollen abortion induced flower drop with or without attached peduncle. Two separation zones can be present: distal and proximal zone of peduncle. Peduncle scar allowed differentiate abortion induced by excess or lack of pollen, or drop due to another reasons.

Key words: lack of pollen, excess of pollen, pollination, *Juglans regia*.

¹ Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación La Platina, Casilla 439/3, Santiago, Chile. E-mail: csalez123@gmail.com; glemus@inia.cl *Autor para correspondencia

² Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Casilla 1004, Santiago, Chile.
Received: 2 agosto 2007. Accepted: 12 diciembre 2007.

INTRODUCCIÓN

En el nogal cv. Serr, y en muy menor grado también en otros cultivares, la producción de fruto en algunas temporadas es baja, principalmente debido a dos eventos: el aborto de flores pistiladas provocado por una alta densidad de polen en los huertos, y/o la caída de flores por falta de polinización. Hendricks *et al.* (1985), Catlin *et al.* (1990), Polito *et al.* (1998) y Lemus *et al.* (2001) señalan que ambos eventos están sujetos a la dinámica de la floración del nogal y de las condiciones ambientales que la afectan.

La acumulación de frío invernal y la edad de los árboles son factores que influyen en el grado de traslape de la floración femenina y masculina, y en consecuencia, en el nivel de aborto que pueda ocurrir por exceso o falta de polen, situación que dificulta el pronóstico anual de la producción en cada huerto (Hendricks *et al.*, 1985; McGranahan *et al.*, 1994; Polito *et al.*, 1998; Lemus, 2005).

Se entiende por pistillate flower abortion (PFA) a la pérdida de flores pistiladas temprano en la estación. Según Polito *et al.* (1998) esta pérdida es provocada por un exceso de polen en los estigmas, lo que provoca descomposición y formación de etileno, el que difunde hacia el resto de la flor, generándose altos ambientes de esta hormona, provocando deterioro y daño en los tejidos vegetales.

Investigaciones realizadas por Rovira y Aletá (1997) y Polito (1998), en condiciones de campo, señalan pérdidas de hasta un 90% por aborto debido a exceso de polen, y que esta situación varía ampliamente entre variedades, sitios y años. Según Krueger (2000) las pérdidas por PFA, en general, son mayores a las pérdidas por falta de polinización.

Evaluaciones realizadas en Chile durante la temporada 2005-2006 indican que el aborto por exceso de polen se presentó en el rango de 40 a 90%, afectando la producción (Lemus, 2005); sin embargo, el aborto por falta de polen no supera el 5%, situación que confirma lo señalado por Krueger (2000).

El problema del aborto por exceso de polen es importante en el cv. Serr, y en menor grado en 'Hartley' y 'Chandler' (Catlin *et al.*, 1990; McGranahan *et al.*, 1994; Lemus, 2005; González, 2006). Se ha informado recientemente que la aplicación de reguladores de crecimiento que actúan como inhibidores de la síntesis de etileno, como aminoetoxivinilglicina (AVG) reduce el problema del aborto por exceso de polen (Lemus *et al.*, 2007). Otras alternativas evaluadas han sido remecer árboles con el objetivo de eliminar parte de los amentos de la planta (Lemus, 2005); actualmente se está probando el regulador de crecimiento 1-metilciclopropeno (1-MCP), que actúa a nivel de receptores de etileno inhibiendo su acción (Lemus, 2005).

La hipótesis de este experimento es que la sintomatología de la flor abortada, tanto por exceso como por falta de polen, es característica de cada tipo de aborto, lo cual permitiría distinguir ambos eventos una vez ocurridos.

El objetivo de este estudio fue describir la sintomatología externa e interna de la flor polinizada y de la no polinizada, en comparación con la flor que se desarrolla normalmente, sin abortar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar del estudio

El experimento se realizó durante la primavera de 2004, en el nocal del Campo Experimental Los Tilos (33°44' S; 70°38' O; 513 m.s.n.m.) del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), ubicado en la Comuna de Buin, Región Metropolitana.

Se utilizaron árboles adultos de la variedad Serr, injertados sobre patrón *J. regia* en 1983, plantados a una distancia de 6 x 6 m. Los árboles estaban conducidos en eje central y eran regados por surcos. Se seleccionaron 48 árboles; se marcó una rama en la parte media del árbol, con orientación Este, y 20 flores pistiladas.

Concentraciones de polen

Durante el período fenológico de liberación de polen, denominado Fm y Fm₂ (Solignat citado por Gil-Albert, 1996), que representan el inicio y término de la dehiscencia de anteras, respectivamente, se colectó polen sacudiendo los amentos en frascos de vidrio; luego el polen se diluyó con talco (peso/peso), para obtener diferentes concentraciones para realizar las pruebas de polinización manual. Las concentraciones usadas fueron 0; 1; 5; 25; 50 y 100% (peso/peso).

Para estimar la cantidad de polen aplicado, se hizo un recuento por aplicación o carga con un hematocímetro (Herka^R, Neubauer, Germany) bajo microscopio óptico (Carl Zeiss, Zeiss, Germany). Para esto se utilizó una carga de polen por concentración, con cinco repeticiones. Cada carga se diluyó sobre dos gotas de agua destilada, y en el campo visual formado se realizaron cuatro lecturas. De esta manera, al promediar el número de granos de polen contados en cada lectura, se estimó la equivalencia entre el número de granos de polen por mm² de campo visual y las concentraciones aplicadas.

Aplicación de polen

La aplicación de polen se realizó sobre flores pistiladas en los estados fenológicos receptivos Ff₁, que representa el inicio de la separación del estigma, y Ff₂ que corresponde al estigma separado y coloración verde pálida: plena floración femenina, según Solignat citado por Gil-Albert (1996).

Para realizar la polinización, las flores se cubrieron con algodón y gasa en el estado de pre-receptividad. Se polinizaron las 20 flores pistiladas cuando alcanzaron el estado indicado. Después de polinizar, las flores se cubrieron nuevamente con el algodón para evitar contaminación con polen externo al estudio. La polinización se realizó depositando una carga de polen en los estigmas de cada flor, mediante la goma de la parte posterior de un lápiz de grafito, considerada como superficie de contacto de área conocida. El grado de cubrimiento fue superficial, es decir, sin aglomeraciones de polen. La **Figura 1** muestra los estados de desarrollo de las flores pistiladas utilizadas en este estudio.



Figura 1. Estados de receptividad de la flor pistilada del nogal cv. Serr: (A) Estado de pre-receptividad; (B) Inicio de receptividad; (C) Plena receptividad; (D) Posreceptividad.

Figure 1. Receptivity stage of pistillate flower on 'Serr' walnut: (A) Pre-receptivity stage; (B) Full receptivity; (C) Post-receptivity.

Se evaluó semanalmente el número de flores abortadas, y se determinó visualmente la presencia de pedúnculo adherido a la flor, y presencia de necrosis estigmática al momento de retirar el algodón. Por otro lado, se observaron las zonas de abscisión. Se consideró fruto cuajado aquel cuyo involucre presentaba un diámetro mayor a 7 mm.

Estudio del pistilo

Para observar el pistilo se realizaron cortes longitudinales con un bisturí. Posteriormente, cada corte se colocó en azul de toluidina-O al 0,05% por 5 min; se trabajó bajo microscopio óptico. Con este procedimiento se observó la sintomatología interna de la flor pistilada.

Diseño experimental

Se utilizó un diseño de bloques al azar con estructura factorial (6 x 2). Los factores correspondieron a concentraciones de polen (6) y estados de desarrollo de la flor pistilada (2). Se consideraron cuatro bloques según perímetro de tronco: 82 - 110; 70 - 74,5; 60 - 67,5; y 45 - 53,5 cm. El estudio constó de 12 tratamientos y cuatro repeticiones; cada repetición correspondió a una rama con 20 flores polinizadas por árbol.

El aborto, la presencia de pedúnculo adherido a la flor y la necrosis estigmática se evaluaron en porcentaje, y se analizaron a través de análisis de varianza. Para separar las medias se usó una prueba de comparación múltiple de Tukey. Se utilizó el programa estadístico Stat Graphics (2.1) (Statistical Graphics Corporation, 1999). En todos los análisis realizados se utilizó un nivel de significación de 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recuento de polen

El número de granos de polen por mm^2 de superficie aplicada varió de 0 a 111 para las diferentes concentraciones de polen aplicado (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Densidad de polen en la superficie de contacto (granos mm^{-2}) para cada concentración de polen evaluada.

Table 1. Pollen density in the contact surface (grains mm^{-2}) for each evaluated pollen concentration.

Concentración de polen (%)	Densidad granos de polen (granos mm^{-2})
0	0
1	5
5	10
25	28
50	52
100	111

Aborto de la flor pistilada en dos estados de desarrollo a diferentes concentraciones de polen

El aborto por exceso de polen se presentó temprano en la temporada, es decir 3 a 4 semanas después del inicio de receptividad, alrededor del 20 de octubre. Por el contrario, el aborto por falta de polen se presentó 1 a 2 semanas después que se observó del aborto por exceso de polen. Esto coincide con lo mencionado por Catlin *et al.* (1987); McGranahan *et al.* (1994) y Polito (1998).

Se observó un creciente aborto de flores pistiladas a medida que aumentó la concentración de polen. Con polen al 5% (10 granos mm⁻² de superficie aplicada) se alcanzó un 96,9% de aborto, y la máxima cuaja se presentó con 1% de polen (5 granos mm⁻²) (**Figura 2**). Este resultado confirma que el cv. Serr requiere una baja concentración de polen para que ocurra cuaja sin aborto floral.

Se observaron diferencias significativas en el aborto por exceso de polen entre 0 y 1% de polen, según la prueba de rango múltiple de Tukey ($P \leq 0,05$). También hubo diferencia entre 0% y cualquier concentración igual o superior a 5%. Además, una concentración de 1% de polen presentó un menor aborto que concentraciones iguales o superiores a 5% (**Figura 2**). Al analizar el efecto de 5; 25; 50 y 100% de polen no se observaron diferencias en la magnitud del aborto, por lo que se puede señalar que para el cv. Serr aplicaciones de polen entre 0 y 5% favorecen la cuaja, sin presentar aborto floral por exceso de polen.

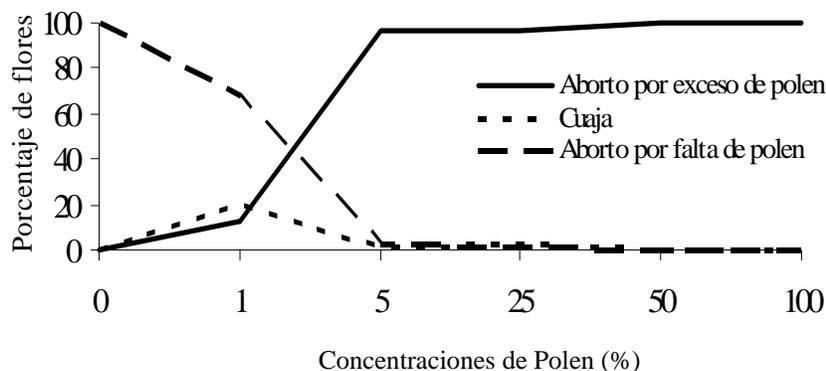


Figura 2. Cuaja y aborto floral en nogal ‘Serr’.

Letras distintas indican diferencias significativas según prueba de Tukey ($p \leq 0,05$) entre concentraciones de polen.

Figure 2. Set fruit and flower abortion on ‘Serr’ walnut.

Different letters indicate significant differences according to Tukey ($p \leq 0.05$)

Los diferentes estados florales polinizados no presentaron diferencias significativas, lo que sugiere que la intensidad del aborto es independiente de estas épocas o estados de polinización. Por lo anterior, cualquier monitoreo de la cantidad de granos de polen debe realizarse antes y durante los estados de receptividad de la flor pistilada.

Sintomatología causada por exceso de polen

Se observó que la flor abortada por exceso de polen detuvo su crecimiento y cayó, teniendo un diámetro de 3 a 4 mm (**Figura 3**). Esto coincide con lo mencionado por McGranahan *et al.* (1994), Polito (1998), Krueger (2000) y Lemus *et al.* (2001); además, estos autores señalan que el pistilo crece hasta un diámetro de 0,3 a 0,5 mm.



Figura 3. Sintomatología de flores abortadas por exceso de polen (PFA). Zonas de separación. 1) Zona distal del pedúnculo; 2) Zona proximal del pedúnculo.

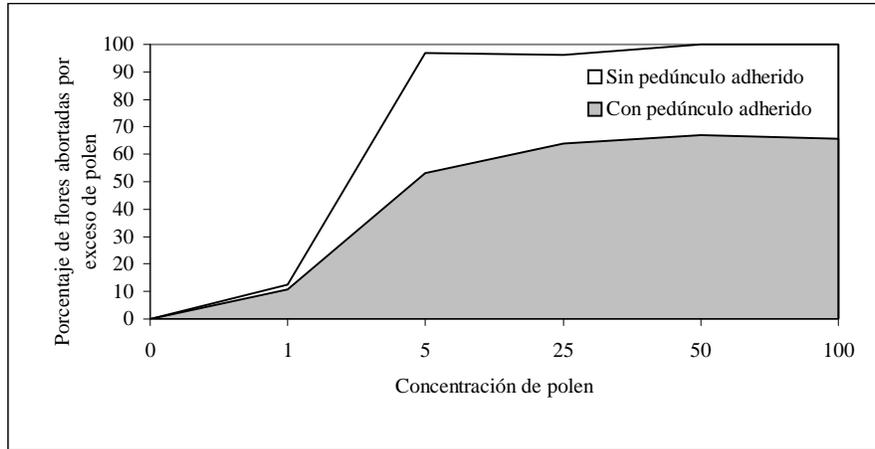
Figure 3. Pistillate flower abortion (PFA) symptoms on walnut. Excision layer. 1) Peduncle distal side; 2) Peduncle proximal side.

Además, se observaron dos zonas de separación: la primera en formarse, y no descrita en la literatura, se encontró en la zona distal del pedúnculo, y la segunda correspondió a la zona proximal del pedúnculo (**Figura 3**).

La zona de separación distal del pedúnculo representó el 36% de los casos, provocando la caída de las flores en ausencia de pedúnculo. Esto puede confundir a quienes atribuyen la falta de pedúnculo al aborto por falta de polen. El 64% restante presentó pedúnculo adherido, por efecto de la zona de separación proximal (**Figura 4**).

Del total de flores abortadas por exceso de polen, un 98,6% presentó necrosis estigmática (**Figura 4**), lo que coincide con lo descrito por Catlin *et al.* (1987), McGranahan *et al.* (1994) y Polito (1998), para flores que han recibido un exceso de polen (PFA).

A



B

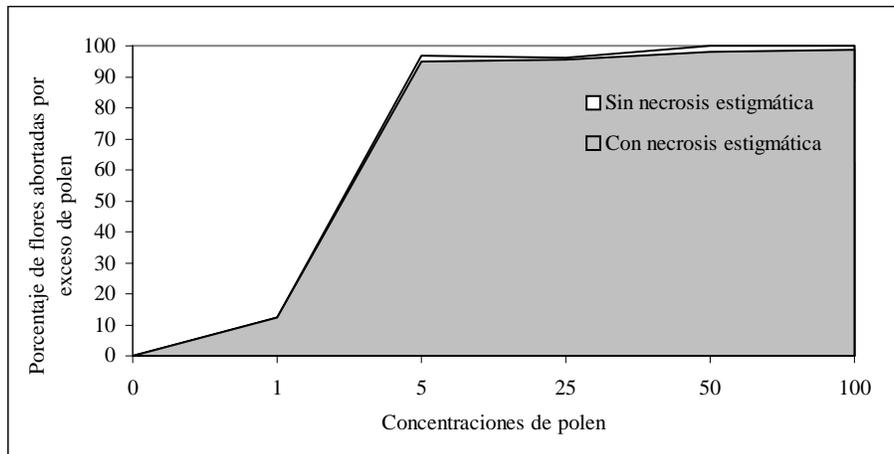


Figura 4. Sintomatología del aborto por exceso de polen en función de la concentración de polen. A) Pedúnculo; B) Necrosis estigmática.

Figure 4. Pistillate flower abscission symptoms associated to pollen concentration. A) Peduncle; B) Necrotic stigmata.

Se observó pérdida de color y brillo de las flores abortadas por exceso de polen. A los 10 días de caídas, las flores se presentaban deshidratadas, observándose una textura leñosa. Ésta es la situación que se observa habitualmente en temporadas con niveles altos de polen (**Figura 5**).



Figura 5. Sintomatología de flores abortadas por exceso de polen (PFA) para diferentes días después de abortadas.
Figure 5. Pistillate flower abortion (PFA) symptoms by excess of pollen to different days after abortion

Sintomatología causada por la falta de polen

En relación a la flor no polinizada, se apreció que un 94,1% de las flores cayeron con un tamaño de 7-8 mm de diámetro, aproximadamente. El 98,7% de las flores no presentaron pedúnculo adherido y la zona de separación distal del pedúnculo no se presentó necrótica, a diferencia de las flores abortadas por exceso de polen (**Figura 6**).

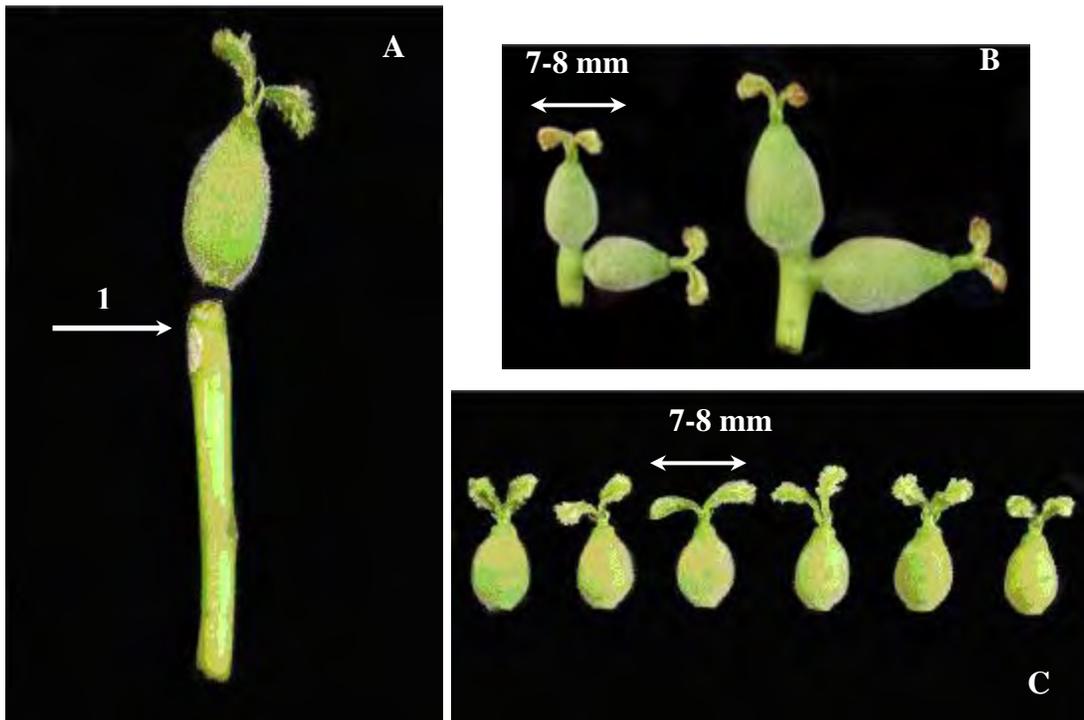


Figura 6. Sintomatología de flores no polinizadas (A y C) y de frutos cuajados (B). 1: Zona de separación.
Figure 6. Different symptoms between non pollinated flowers (A and C) and set fruits (B). 1: Excision layer.

Por lo tanto, también se da el caso que en una inflorescencia una flor cae por falta de polen y otra por exceso, aspecto que se visualiza con la presencia o no de la necrosis en la zona de separación.

Los estigmas de las flores caídas por falta de polen se presentaron secos, pero mantuvieron su color verde pálido y el pistilo se expandió completamente. Los frutos cuajados presentaron estigmas completamente secos y de color pardo (Figura 6). Esto coincide con la descripción realizada por McGranahan *et al.* (1994), Polito (1998), Krueger (2000) y Lemus *et al.* (2001). Los frutos caídos por falta de polen alcanzaron un tamaño bastante uniforme, característica que facilita el diagnóstico a nivel de campo.

La superficie de contacto, tamaño y el color de la cicatriz en el pedúnculo permitieron diferenciar ambos tipos de aborto. La cicatriz provocada por exceso de polen era de superficie irregular y de un tamaño de 2 a 3 mm de diámetro y de color pardo. En cambio, la que se observó por falta de polen era de color blanquecino, de superficie lisa y de 4 a 5 mm de diámetro. Ambos tipos de cicatriz se pueden observar en la Figura 7.

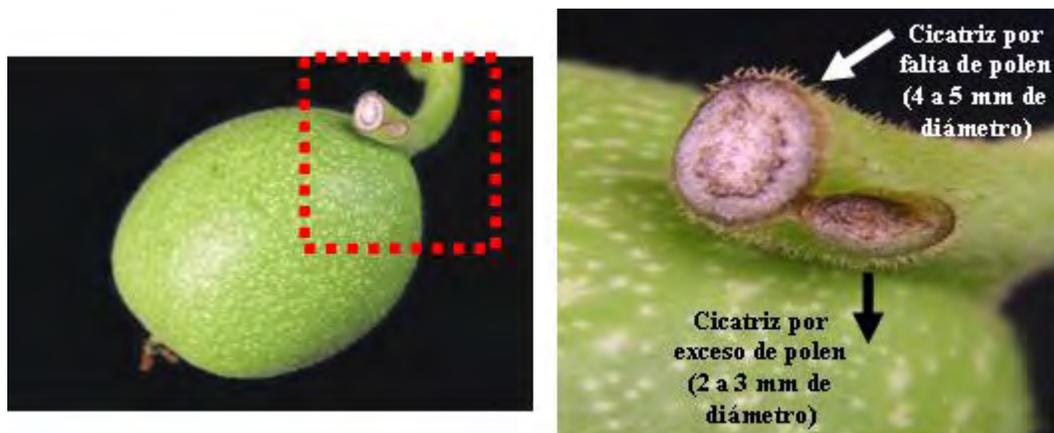


Figura 7. Cicatrices sobre el pedúnculo por efecto de exceso y falta de polinización.

Figure 7. Peduncle scar due to excess and lack of pollen.

Se observó posteriormente otra cicatriz producida por caída de fruto debida a otras causas. Ésta era similar, en cuanto a la superficie de contacto y color a la observada por falta de polen, sin embargo, era de 8 a 9 mm de diámetro, y claramente los frutitos caídos eran de diámetro superior a los observados por falta de polen. Este tipo de cicatriz es frecuentemente encontrada en años de carga alta (Figura 8).



Figura 8. Cicatriz asociada a otras causas.

Figure 8. Scar associated to other reasons.

Estudio del pistilo

En los dos tipos de flores abortadas se observó la presencia de evaginaciones placentarias, pero sin necrosis en aquellas que presentaron síntomas de aborto por exceso de polen (**Figura 9**). Esto no coincide con lo señalado por Catlin *et al.* (1989) y Lemus *et al.* (2001), quienes informaron que la necrosis de las evaginaciones placentarias permite diferenciar el aborto por exceso de polen de aquel por falta de polen. Las evaginaciones placentarias pueden ser consideradas estructuras de almacenamiento temporal, comparables a la placenta del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), las cuales desaparecen una vez que el embrión se extiende, situación también descrita para flores femeninas de nogal.

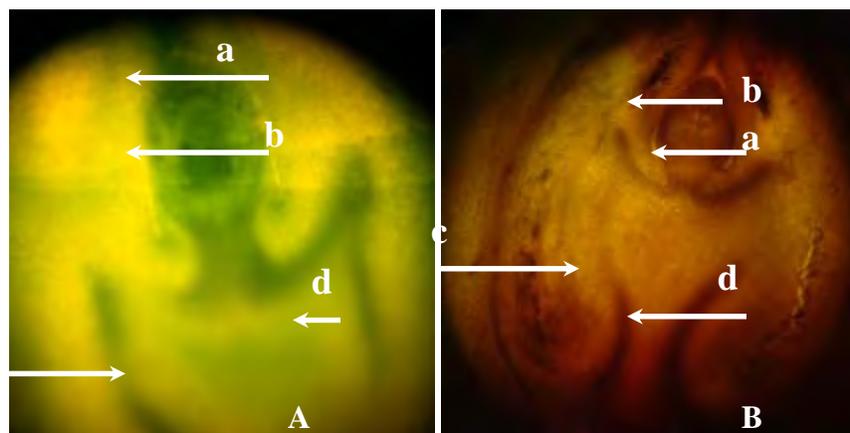


Figura 9. A) Corte longitudinal de una flor pistilada abortada por falta de polen (7-8 mm de diámetro); y B) abortada por exceso de polen. a: Integumento; b: nucelo, c: línea de separación entre las evaginaciones placentarias, y d: pared del ovario. Tinción azul de toluidina-O al 0,05%. 100x.

Figure 9. A) Along excision cut of a pistillate flower, aborted by lack of pollen (7-8 mm diameter); B) Aborted flower by excess of pollen. a: Integument; b: nucellus; c: line of separation between evaginations, and d) ovary wall . Toluidin-O blue stain at 0.05%. 100x.

Sin embargo, la imposibilidad de observar zonas necróticas al interior de la flor podría deberse, posiblemente, a un excesivo grosor del tejido. Por lo tanto, se recomienda el uso de otras técnicas de corte que permitan confirmar este resultado.

También se observó que algunas flores con síntomas de cuaja (7-8 mm) presentaron crecimiento del embrión (**Figura 10**). Por lo tanto, estigmas completamente secos y de color pardo son síntomas que permiten diferenciar una flor cuajada de aquella no polinizada.

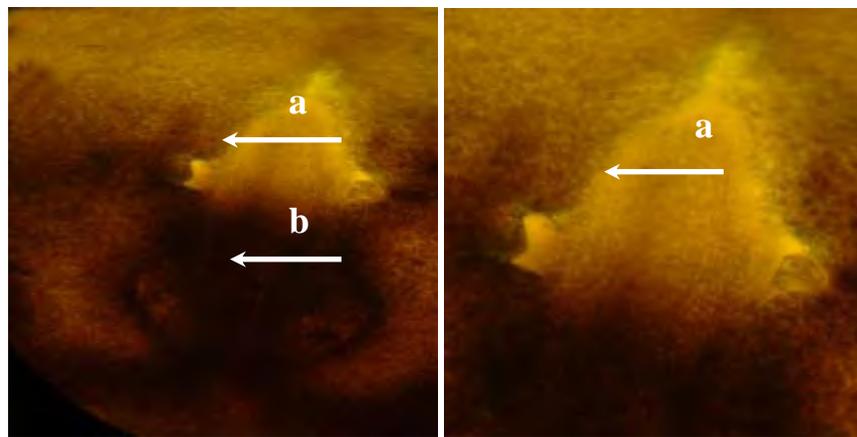


Figura 10. Corte longitudinal de una flor pistilada cuajada con 7-8 mm de diámetro. a: embrión; b: nucelo. Tinción azul de toluidina-O al 0,05%. 100x.

Figure 10. Along excision of a 7-8 mm diameter set pistillate flower. a: embryo; b: nucellus; Toluidine blue-O stain at 0.05%. 100x.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se realizó el presente estudio se puede concluir:

La flor abortada por exceso de polen presenta necrosis estigmática y se deteriora más rápido que las abortadas por falta de polinización

La flor abortada por exceso de polen puede caer con o sin pedúnculo adherido.

La flor abortada por exceso de polen puede presentar dos zonas de separación: zona distal del pedúnculo y zona proximal del pedúnculo.

La cicatriz en el pedúnculo es un elemento que permite diferenciar el aborto por exceso de polen, falta de polen, y caída por otras causas.

RESUMEN

Sintomatología del aborto en flores pistiladas de nogal (*Juglans regia* L.) ‘Serr’. Cristián González R.¹ y Gamalier Lemus S.^{1*}, y Gabino Reginato². El aborto en flores postiladas (PFA) por exceso de polen que afecta al nogal (*Juglans regia* L.), disminuye considerablemente la producción de nueces, principalmente en el cultivar ‘Serr’. Se estudió la sintomatología del aborto por exceso y falta de polinización en flores y pedúnculo de este cultivar. Para esto se realizó polinización manual, utilizando diferentes concentraciones de polen sobre flores en diferentes estados de receptividad. Las concentraciones se obtuvieron mediante diluciones (peso/peso) de polen combinado con talco. Las concentraciones utilizadas fueron 0; 1; 5; 25; 50 y 100% de polen. Se observó la sintomatología externa e interna de la flor, mediante apreciación visual en el árbol y a través de cortes longitudinales en la flor para observación en microscopio óptico, utilizando como tinción azul de toluidina-O al 0,05%. La flor abortada por exceso de polen se deterioró rápidamente, presentó detención del crecimiento, pérdida del brillo del involucro y necrosis estigmática. La flor abortada por falta de polinización mostró un deterioro lento que se prolongó dos semanas más que la abortada por exceso de polen. La flor cuajada siguió creciendo, sin perder su brillo. La flor abortada por exceso de polen puede caer con o sin pedúnculo adherido. Se pueden presentar dos zonas de separación: zona distal y zona proximal del pedúnculo. La cicatriz en el pedúnculo permite diferenciar el aborto por exceso de polen, falta de polen y por otras razones.

Palabras clave: falta de polen, exceso de polen, polinización, *Juglans regia*.

LITERATURA CITADA

- Catlin, P., and E. Olsson. 1990. Pistillate flower abscission of walnut- 'Serr', 'Sunland', 'Howard' and 'Chandler'. HortScience 25:1391-1392.
- Catlin, P., and V. Polito. 1989. Cell and tissue damage associated with pistillate flower abscission of persian walnut. HortScience 24:1003-1005.
- Catlin, P., D. Ramos, G. Sibbett, W. Olson, and E. Olson. 1987. Pistillate flower abscission of the Persian walnut. HortScience 222:201-2005.
- Gil-Albert, F. 1996. Tratado de arboricultura frutal. Vol. 1. 103 p. Morfología y fisiología del árbol frutal. Mundi Prensa, Madrid, España.
- González, C. 2006. Descripción anatómica y morfológica del efecto de diferentes concentraciones de polen sobre el aborto de la flor pistilada de los nogales 'Serr' y 'Hartley'. 31 p. Tesis de grado Magíster en Ciencias Agropecuarias. Universidad de Chile, Escuela de Postgrado, Santiago, Chile.
- Hendricks, L., G. McGranahan, D. Ramos, B. Iwakiri, and H. Forde. 1985. Selection of varieties. p. 46-51. In Ramos, D (ed.) Walnut orchard management. Univ. Calif. Div. Agr. Natural Resources. Publ 21410. University of California, Oakland, California, USA.
- Krueger, W. 2000. Pollination of English walnut: practices and problems. HorTechnology 10:127-130.
- Lemus, G. 2005. Control de la caída de flores en nogal 'Serr'. Tierra Adentro 63:18-21.
- Lemus, G., C. González, and J. Retamales. 2007. Control of pistillate flower abortion in 'Serr' walnut in Chile by inhibiting ethylene biosynthesis with AVG. p. 305-307. In Ramina, A., C. Chang, J. Giovannoni, H. Klee, P. Perata, and E. Woltering (eds.) Advances in plant ethylene research: Proceedings of the 7th International Symposium on the Plant Hormone Ethylene. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Lemus, G., J. Valenzuela, y A. Lobato. 2001. Origen y botánica. p. 9-23. In Lemus, G. (ed.) El nogal en Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Santiago, Chile.

McGranahan ,G., D. Voyiatzis, P. Catlin, and V. Polito. 1994. High pollen loads can cause pistillate flower abscission in walnut. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119:505-509.

Polito, V. 1998. Floral biology: flower structure, development and pollination. p. 127-132. *In* Ramos, D. (ed.) Walnut production manual. Univ. Calif. Div. Agr. Natural Resources. Publ 3373. University of California, Oakland, California, USA.

Polito, V., K. Pinney, and J. Labavitch. 1998. Fruit growth and development. p. 139-143. *In* Ramos, D. (ed.) Walnut production manual. Univ. Calif. Div. Agr. Natural Resources. Publ 3373. University of California, Oakland, California, USA.

Rovira, M., and N. Aletá. 1997. Pistillate flower abscission on four walnut cultivars. *Acta Hort. (ISHS)* 442:231-234.

Statistical Graphics Corporation. 1999. Stat Graphics Plus (2.1). Copyright 1994-1996. Statistical Graphics Corporation, Rendón, Virginia, USA.