

Departamento de Agronomía  
**Universidad Nacional del Sur**

**Trabajo de Intensificación**

***Tema:***

**Cuantificación y estratificación vertical de la producción de polen en líneas androfértiles de girasol (*Helianthus annuus* L.)**



***Alumno:* Yanina M. Bonjour**

***Año:* 2021**

***Docente tutor:* Dr. Luis F. Hernández (DA-UNS)**

***Docentes consejeros:* Ing. Agr., Mg. L.A. Caro (DA-UNS)**

**Lic. Cs. Biol., Mg. A.C. Flemmer (DA-UNS)**

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas involucradas en este proyecto. En primer lugar, a mi docente tutor Luis F. Hernández quien me impulsó en la realización de este trabajo, ofreciéndome siempre su guía y apoyo para llevarlo a cabo; a Andrea Flemmer y Luis Caro docentes consejeros de esta tesina quienes siempre estuvieron dispuestos a ayudarme.

A toda la cátedra de Morfología Vegetal por su excelente predisposición, amabilidad y calidez humana, siempre dispuestos a impulsar el desarrollo de sus alumnos.

Al Ing. Agr. Daniel Álvarez (INTA - EEA Manfredi) por la provisión del material experimental utilizado en este trabajo.

Agradezco también a todo el personal Docente y No docente de la Universidad Nacional del sur y a mis compañeros de Syngenta por ayudarme en mi desarrollo profesional y personal.

Por último, pero no menos importante, a mis amigos y a toda mi familia: a mi mamá Cristina, mi abuela Josefa, tíos y primos quienes siempre me impulsaron a dar lo mejor de mí y estuvieron presentes en cada paso que di.

Y en especial quiero agradecerle a mi hijo León quien me enseñó que en esta vida todo se aprende.

## CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>2</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<u>Características morfo-fisiológicas de los genotipos androfértiles y su relación con la polinización</u>	<b>9</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>11</b>
<u>Generales</u>	<b>11</b>
<u>Particulares</u>	<b>11</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>11</b>
<u>Sitio experimental, material utilizado y manejo del cultivo</u>	<b>11</b>
<u>Evaluación del crecimiento y desarrollo de las plantas</u>	<b>15</b>
<u>Cuantificación de la producción polínica</u>	<b>16</b>
<u>Recuento del número de granos de polen por flor (GPF).</u>	<b>17</b>
<u>Análisis de los resultados</u>	<b>19</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>19</b>
<b>DISCUSIÓN y CONCLUSIONES</b>	<b>27</b>
<b>ANALISIS ESTADÍSTICOS</b>	<b>30</b>
<i>Anexo 1: ANDEVA simple, comparando la producción polínica de las flores del sector externo e interno del capítulo en cada línea estudiada (Análisis de las Líneas A, B, C y D).</i>	<b>30</b>
<i>Anexo 2: ANDEVA doble, analizando líneas x posición de los capítulos.</i>	<b>32</b>
<b>RESULTADOS PUBLICADOS EMERGENTES DE ESTE TRABAJO</b>	<b>32</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>32</b>

## LISTADO DE TABLAS y FIGURAS

### Tablas

Tabla 1: Descripción de los estadios vegetativos (V) y reproductivos (R) (según Schneiter y Miller, 1981), observados en el ensayo.	20-21
Tabla 2: Días de antesis de la línea A, con detalle de la altura promedio a los capítulos superior (SUP), medio (MED) e inferior (INF) y el subestadio de R registrado al momento de muestrear las flores del sector externo (EXT) e interno (INT) de cada capítulo.	22
Tabla 3: Días de antesis de la línea B, con detalle de la altura promedio a los capítulos superior (SUP), medio (MED) e inferior (INF) y el subestadio de R5 registrado al momento de muestrear las flores del sector externo (EXT) e interno (INT) de cada capítulo.	23
Tabla 4: Días de antesis de la línea C, con detalle de la altura promedio a los capítulos superior (SUP), medio (MED) e inferior (INF) y el subestadio de R5 registrado al momento de muestrear las flores del sector externo (EXT) e interno (INT) de cada capítulo.	23
Tabla 5: Días de antesis de la línea D, con detalle de la altura promedio a los capítulos superior (SUP), medio (MED) e inferior (INF) y el subestadio de R5 registrado al momento de muestrear las flores del sector externo (EXT) e interno (INT) de cada capítulo.	23

### Figuras

Figura 1: Obtención de un híbrido simple: Cruzamiento de Línea madre A con Línea padre R, con descendencia F1 fértil. S, Ms y ms indican citoplasma estéril, genotipo dominante fértil y genotipo recesivo estéril respectivamente.	7
Figura 2: Obtención de un híbrido triple: El cruzamiento de la línea madre A con la línea mantenedora B, da como resultado descendencia F1 estéril la cual se cruza con la línea padre, restauradora, dando como resultado un híbrido fértil de tres líneas, también llamado híbrido triple. S, N, Ms y ms indican citoplasma estéril, citoplasma fértil, genotipo dominante fértil y genotipo recesivo estéril respectivamente.	8
Figura 3: Lote de producción de semillas donde se diferencian las líneas de plantas hembra (monocefálicas) y líneas de plantas macho (multicefálicas).	9
Figura 4: Parcela experimental en donde se implantaron las cuatro líneas estudiados, mostrando una etapa temprana de su desarrollo.	12
Figura 5: A la izq.: vasos descartables con sustrato comercial. A la der.: Cajas de Petri con las semillas en proceso de germinación.	13

Figura 6: Parcela experimental mostrando diseño de plantación de las líneas en antesis y condiciones de borde a las que estuvieron sometidas las plantas.	<b>14</b>
Figura 7: Ejemplares de la línea “C” en antesis, mostrando su grado de ramificación y posición de los capítulos. Las plantas de esta línea fueron las que presentaron la mayor altura registrada en el ensayo.	<b>15</b>
Figura 8: Muestreo en sector externo del capítulo en una de líneas de girasol utilizadas en este trabajo.	<b>16</b>
Figura 9: A la izq.: Hemocitómetro (cámara de Neubauer) utilizado para el conteo. A la der.: Detalle de la cámara del hemocitómetro con los cuatro cuadrantes utilizados para el conteo de polen.	<b>18</b>
Figura 10: A la izq.: Granos de polen libres montados en agua observados con microscopía convencional (luz visible). A la der.: Granos de polen montados en la retícula de la cámara del hemocitómetro, observados con microscopía de contraste de fases.	<b>19</b>
Figura 11: Granos de polen por flor en los capítulos de cada línea estudiada en este trabajo a tres niveles de distribución vertical: CAPSUP: capítulos superiores, CAPMED: capítulos intermedios y CAPINF: capítulos basales o inferiores, todos ellos discriminados en sector del capítulo externo (Ext) e interno (Int). Las líneas verticales sobre las barras indican el desvío estándar de cada observación.	<b>25-26</b>
Figura 12: Relación entre el nivel de emergencia de la rama que porta el capítulo (superior, medio e inferior) y la producción polínica promedio de sus flores (distribución vertical) en las cuatro líneas androfértiles estudiadas. Las líneas horizontales corresponden a los desvíos estándar de cada nivel. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los valores de granos de polen/flor (Sección Análisis Estadísticos, Anexo 2). La comparación de cada línea androfértil, el nivel de inserción de los capítulos y cantidad de polen por posición de los capítulos en las plantas se realizó de manera individual para cada línea. Análisis polínico realizado cuando los capítulos alcanzaron el estado floral R.5.1, de Schneiter y Miller, 1981.	<b>28</b>

## RESUMEN

En las líneas restauradoras ramificadas (androfértiles o machos) utilizadas para la producción de semilla híbrida de girasol, la calidad polinizadora de las mismas incide directamente sobre el rendimiento de las líneas androestériles (hembras). Algunas fallan, posiblemente por la poca cantidad y/o baja calidad del polen producido durante el período de polinización.

El objetivo de este trabajo fue cuantificar, en antesis, la producción polínica de 4 líneas androfértiles de girasol con diferente arquitectura de ramificación. Las plantas de estas líneas se hicieron crecer bajo riego en parcelas experimentales ubicadas en el Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur (ciudad de Bahía Blanca; 38° 45' S.; 62° 11' O.). En antesis de los capítulos (estados reproductivos R5.1 y R5.2) se cuantificó el número de granos de polen por flor (GPF) en flores de capítulos ubicados en diferentes niveles de ramificación de la planta (capítulos superiores, medios e inferiores), sectorizando a su vez a las flores en los capítulos en dos sectores (flores externas [SE] e internas [SI]).

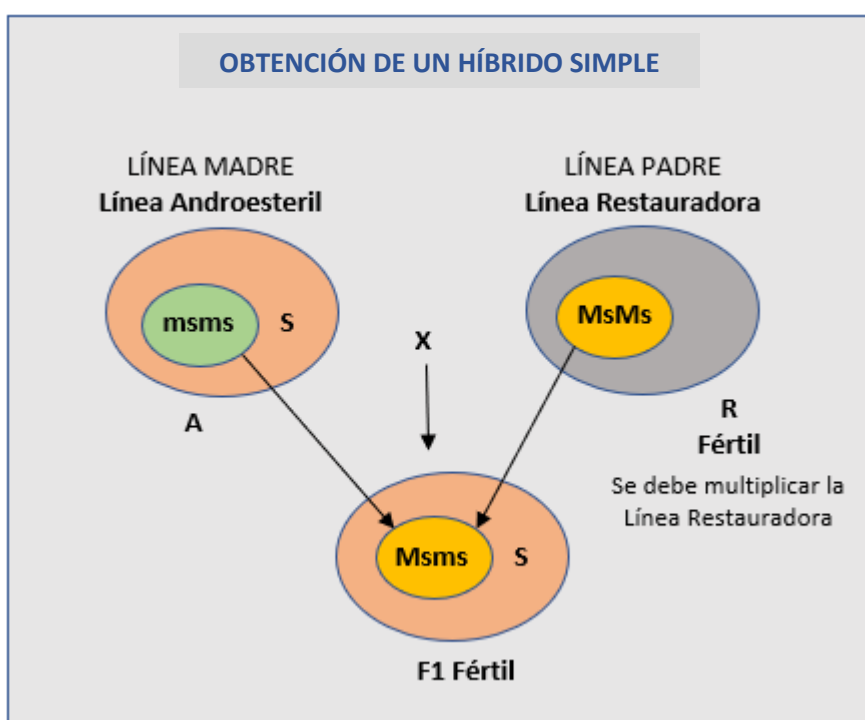
Se observó que la distribución polínica en cada uno de los niveles estudiados fue comparativamente uniforme dentro de cada línea, como también en las flores de cada región de los capítulos analizadas. No se observaron diferencias significativas ( $p=0,23$ ) entre las líneas en el número de GPF por nivel en la planta o por sector del capítulo (SE y SI), con valores que oscilaron entre 27.600 y 33.400 GPF.

Sin embargo, se pudo observar una tendencia a presentar diferencias en sentido vertical para los distintos niveles de ramificación de las plantas en cada una de las líneas estudiadas, siendo, en general, los capítulos del estrato superior los que presentaron una tendencia a producir mayor cantidad de polen en sus flores.

Se podría asociar esta característica de estos capítulos con un mayor potencial para ser visitados por polinizadores. Por lo tanto, los resultados descriptos en este trabajo sientan las bases para estudiar el posible mejoramiento genético que favorezca una mayor producción polínica en los capítulos de los estratos más altos de las líneas androfértiles de girasol utilizadas para la producción de semilla híbrida.

## INTRODUCCIÓN

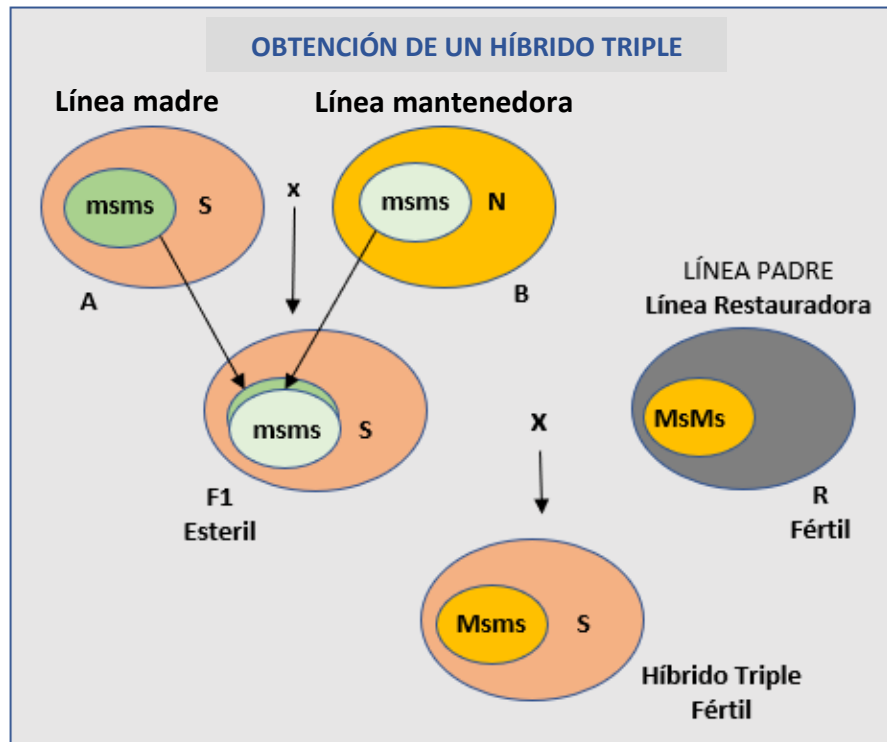
Los criaderos de semillas producen híbridos de girasol (*Helianthus annuus* L.) simples e híbridos de tres líneas, también definidos como híbridos triples. Un híbrido simple es aquel que proviene del cruzamiento entre una línea androestéril (hembra) llamada **línea A**, y una línea androfértil (macho) restaurador de la fertilidad (**línea R**) (Figura 1).



*Figura 1:* Obtención de un híbrido simple: Cruzamiento de Línea madre A con Línea padre R, con descendencia F1 fértil. S, Ms y ms indican citoplasma estéril, genotipo dominante fértil y genotipo recesivo estéril respectivamente.

Un híbrido de tres líneas proviene del cruzamiento de una hembra (**línea A**) con una línea mantenedora (**línea B**) para producir un híbrido simple androestéril. Este híbrido se cruzará con una línea restauradora de la fertilidad (**línea R**) para producir un híbrido fértil de tres líneas (Figura 2).

El uso de parentales ramificados (machos) garantiza que la producción de polen sea abundante y se mantenga durante un período largo de tiempo, generalmente hasta dos semanas durante la floración de las líneas androestériles (hembras).

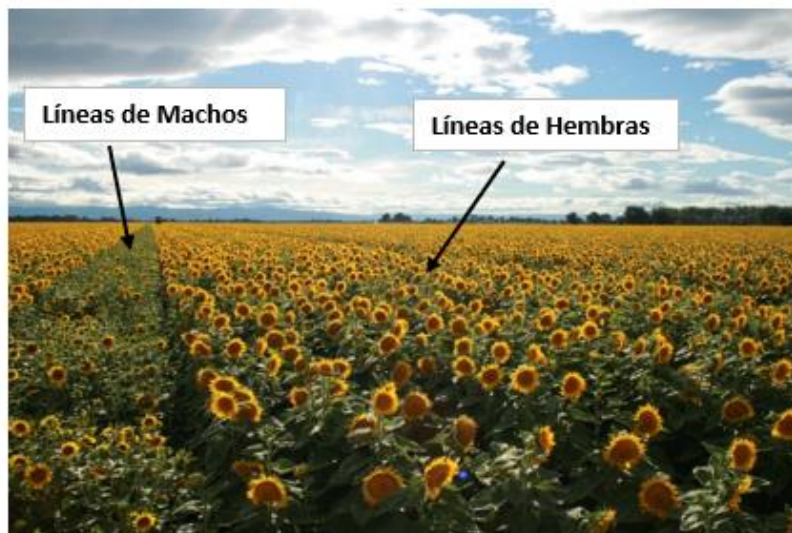


**Figura 2:** Obtención de un híbrido triple: El cruzamiento de línea madre A con la línea mantenedora B, da como resultado descendencia F1 estéril la cual se cruza con la línea padre, restauradora, dando como resultado un híbrido fértil de tres líneas, también llamado híbrido triple. S, N, Ms y ms indican citoplasma estéril, citoplasma fértil, genotipo dominante fértil y genotipo recesivo estéril respectivamente.

Las líneas macho, además, se siembran en fecha diferida para evitar una falta de polen en el momento de floración de la hembra. Previo a la cosecha de las semillas, las plantas macho son eliminadas, cosechándose únicamente la semilla producida sobre las plantas de la hembra androestéril (Figura 3).

La producción de semilla híbrida de girasol tiene rendimientos muy dispares, ya que existen numerosas variables involucradas, tanto del ambiente como propias de las plantas, que inciden en los mismos. El agua edáfica disponible, la fertilidad del suelo, la temperatura ambiente (Hernández y Orioli, 1994; Connor y Hall, 1997). El genotipo de los materiales parentales utilizados y su performance frente a la aparición de enfermedades, como también la producción polínica de las líneas androfértiles (Anfinrud, 1997), inciden directa o indirectamente en la expresión del potencial del rendimiento, el cual puede verse afectado, además, por fallas en la polinización o en la fecundación (Wilcock y Neiland, 2002).





**Figura 3:** Lote de producción de semillas donde se diferencian las líneas de plantas hembra (monocefálicas) y líneas de plantas macho (multicefálicas).

El girasol es una planta alógama de polinización entomófila. El polen es pesado y fácilmente aglomerable, con una superficie espinosa adaptada al transporte por insectos (<http://www.asagir.org.ar>) Un excesivo calor y sequedad ambiental pueden ocasionar una fuerte desecación de los granos de polen y afectar también la fecundación (Arroquy, 2015). La accesibilidad al néctar es un factor que también interfiere en la polinización. Esta característica está asociada a la longitud de la corola; a mayor longitud menor accesibilidad a los nectarios. Días fríos, lluviosos y nublados determinan una menor producción de néctar y de polen, así como también la disminución en el trabajo de los insectos polinizadores (Arroquy, 2015).

Entender de qué forma cada una de estas variables actúa controlando el rendimiento del cultivo, es uno de los principales objetivos de fisiólogos y fitomejoradores, con el fin de incrementar la eficiencia de manejo y producción.

### Características morfo-fisiológicas de los genotipos androfértiles y su relación con la polinización

Durante el período de antesis, el desarrollo reproductivo y la calidad polinizadora de los genotipos de girasol androfértiles, son los responsables directos del éxito o fracaso de la producción del cultivo (Anfinrud *et al.*, 1997).

Dentro de la gran variedad de genotipos androfértiles utilizados se detectan algunos que afectan el buen rendimiento de la hembra. Las razones pueden ser varias y entre ellas podemos nombrar la calidad (viabilidad) y cantidad de polen producido. Asimismo, la hembra y el macho pueden diferir en la sensibilidad termo y fotoperiódica con desfases en su fenología y, consecuentemente, en la calidad de la polinización de los frutos. Un tiempo prolongado de producción resultará posiblemente, en la existencia de polen viable por más tiempo, y consecuentemente en una buena polinización del parental femenino androestéril (Fernández-Martínez y Knowles, 1982).

La arquitectura vegetativa de los machos es muy diversa. Desde el punto de vista de la ramificación, se han determinado cuatro tipos de canopeos ramificados: ramificación tipo salvaje, ramificación a lo largo de todo el tallo pero con un capítulo principal o dominante, ramificación basal y ramificación apical. Con respecto a la orientación espacial de los capítulos en la planta, existen genotipos con capítulos erectos, semi erectos y péndulos. El grado de ramificación y la posición relativa de los capítulos sobre las ramas tienen relación directa con la producción de polen (Fernández-Martínez y Knowles, 1982).

Las características deseables de un genotipo androfértil se enumeran a continuación:

- 1- Capítulo principal con un diámetro no menor de 10 cm.
- 2- Ramificación abundante con capítulos secundarios de diámetro no menor al 50% del capítulo principal en la mayoría de las ramas.
- 3- Ramificación ascendente (semi erecta) con capítulos que alcancen estratos altos del canopeo y que no queden por debajo del capítulo primario o principal.
- 4- Antesis extendida que duplique aproximadamente el período de floración de la hembra.
- 5- Buena atracción de polinizadores.

Siendo la arquitectura de los parentales masculinos un rasgo morfológico importante, no se conocen totalmente las consecuencias inmediatas de las características del desarrollo de las plantas androfértiles sobre la capacidad polinizadora (calidad y cantidad del polen producido) de las mismas, la capacidad de la

distribución de las inflorescencias para atraer a los polinizadores y a la posible incidencia de estos factores sobre la producción de semilla híbrida (Wyatt, 1982).

La información disponible a la fecha sobre la producción polínica en el período de polinización por parte de las líneas restauradoras ramificadas es por lo tanto muy escasa.

## OBJETIVOS

### Generales

Realizar en cuatro líneas parentales androfértiles de girasol, la caracterización de la fenología reproductiva y morfológica de las plantas como así también la cuantificación de la producción polínica.

### Particulares

Evaluar en cuatro líneas androfértiles de girasol las siguientes características: fenología vegetativa y reproductiva y producción de granos de polen de los capítulos ubicados en diferentes niveles en la planta (capítulos primarios, secundarios y terciarios), sectorizando las flores de las inflorescencias en flores externas (sector externo o SE) y flores internas (sector interno o SI).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sitio experimental, material utilizado y manejo del cultivo

El trabajo se realizó en el campo experimental del Departamento de Agronomía de la UNS (62°11' O, 38°45' S). El suelo donde se ubicaron las parcelas experimentales es clasificado taxonómicamente como Ustipsamment típico (Soil Survey Staff, 2014) por lo que el mantenimiento hídrico del mismo se realizó utilizando riego por goteo durante todo el ciclo del cultivo (Figura 4).



*Figura 4:* Parcela experimental en donde se implantaron las cuatro líneas estudiadas, mostrando una etapa temprana de su desarrollo.

Se utilizaron cuatro líneas androfértiles las cuales fueron provistas por la Estación Experimental Agropecuaria del INTA - Manfredi. Las mismas fueron identificadas en este trabajo, por razones de confidencialidad, como **Línea A**, **Línea B**, **Línea C** y **Línea D**.

La siembra se realizó el día 3/11/2014. Para asegurar el éxito en la implantación, semillas de las cuatro líneas se colocaron a germinar sobre paños húmedos dentro de cajas de Petri, a temperatura ambiente y con dos repeticiones por cada línea.

Al mismo tiempo se prepararon vasos plásticos descartables con sustrato comercial, donde las semillas fueron colocadas una vez germinadas. Luego de emergidas, todas las plántulas fueron llevadas al invernáculo del Departamento de Agronomía, y se colocaron sobre una mesada donde contaban con riego automático por aspersión dos veces al día (Figura 5).



**Figura 5:** A la izq.: vasos descartables con sustrato comercial. A la der.: Cajas de Petri con las semillas en proceso de germinación.

Cuando las plántulas alcanzaron de dos a cuatro hojas verdaderas (V2/V4; Schneiter y Miller, 1981) se realizó el trasplante a campo. El diseño de plantación fue en tresbolillo a fin de asegurar la máxima expresión fenotípica de las líneas en cuestión. Se colocaron en esta disposición 12 plantas de cada línea de girasol utilizada en este trabajo, a un metro de distancia entre plantas del mismo surco y un distanciamiento entre surcos de 0,70 m. Paralelamente, se sembraron dos surcos distanciados a 0,70 m de una línea androestéril (hembra) para imitar las condiciones de borde que se producen en un lote de producción de semilla (Figura 6).

El manejo del cultivo siguió las técnicas convencionales recomendadas para la región pampeana. Se realizaron dos fertilizaciones con nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ) aplicando una dosis de 60 kg N/ha en los estadios de cuatro hojas verdaderas (V4) y con inflorescencia visible (R1) (Schneiter y Miller, 1981). El control de malezas se realizó de manera manual.



*Figura 6: Parcela experimental mostrando diseño de plantación de las líneas en antesis y condiciones de borde a las que estuvieron sometidas las plantas.*

Se debe mencionar que durante todo el ciclo se controló la sanidad de las líneas utilizadas en el ensayo. Durante el período en el que fue realizado este trabajo se registraron en distintas zonas del país, principalmente en el valle bonaerense del río Colorado (VBRC), ataques de la chinche diminuta (*Nysius simulans* Stal [Hemiptera: Heteroptera]). Las condiciones predisponentes para esta plaga (invierno anterior con escaso número de heladas, lluvias por encima de la media y primavera seca) lograron que la misma aumentara su población, alcanzando densidades muy altas pasando a considerarse como una “plaga emergente” (Renzi *et al.*, 2015). El lote ensayado en este trabajo no fue la excepción. El ataque comenzó cuando las plantas aún se encontraban en estado vegetativo (V7/V8; Schneiter y Miller, 1981) cercano al desarrollo reproductivo y según observaciones la línea “D” fue la que mostró mayor susceptibilidad a la plaga. Para asegurar la continuidad de este proyecto y evitar que se perdieran plantas, se realizó control químico con un insecticida piretroide de base acuosa de uso hogareño (d-Fenotrina 0,13% + Praletrina 0,11%), dando resultados satisfactorios.

Como último punto respecto a sanidad, la línea “B” sufrió daños totales en 3 plantas debido a las principales enfermedades fúngicas que atacan el cultivo de girasol:

podredumbre húmeda del tallo, hoja y capítulo [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary] y verticilosis [*Verticillium dahliae* Kleb], pese a que las mismas son de baja incidencia en la zona debido al clima que caracteriza a la región (principalmente baja humedad ambiental). Este ataque no interfirió con el desarrollo de las demás plantas dentro de la parcela.

#### Evaluación del crecimiento y desarrollo de las plantas

Durante todo el ciclo del cultivo hasta el estadio de antesis completa (R6), se observó y evaluó de forma periódica el desarrollo y crecimiento de las plantas. El seguimiento fenológico del ciclo del cultivo se llevó a cabo siguiendo la escala visual de Schneiter y Miller (1981).



**Figura 7:** Ejemplares de la línea "C" en antesis, mostrando su grado de ramificación y posición de los capítulos. Las plantas de esta línea fueron las que presentaron la mayor altura registrada en el ensayo.

## Cuantificación de la producción polínica

A los efectos de cuantificar la producción de granos de polen, se muestrearon flores de 3 plantas representativas de cada línea. En cada planta, los capítulos se clasificaron en tres niveles de distribución vertical, según el nivel de emergencia de la rama que portaba cada capítulo: capítulos superiores (principales), capítulos intermedios y capítulos basales o inferiores. A su vez, en cada capítulo, se discriminó entre flores del sector externo (SE) y flores del sector interno (SI).

Durante toda la etapa de antesis de las plantas seleccionadas de las distintas líneas, se tomaron muestras de flores del capítulo principal y de los capítulos secundarios a diferentes niveles y de ambos sectores de cada capítulo a medida que las flores iban alcanzando la etapa de emisión polínica (anteras pre-dehiscentes y estigma encerrado) (Figura 8).



**Figura 8:** Muestreo en sector externo del capítulo en una de líneas de girasol utilizadas en este trabajo.



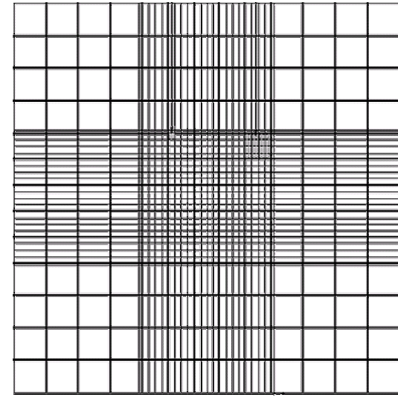
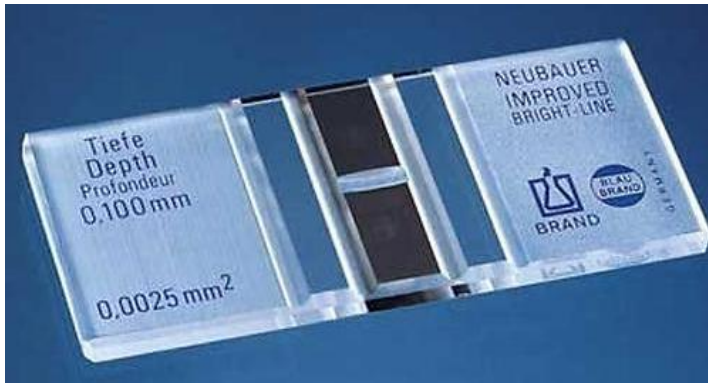
Las flores fértiles fueron extraídas utilizando una pinza fina, lavando la misma luego de cada extracción para disminuir el error que pudiera existir por contaminación de polen de las flores contiguas. A continuación, las flores extraídas se colocaron en tubos tipo *Eppendorf*® , correctamente identificados, conteniendo una solución fijadora FAA (50% alcohol etílico, 35% agua destilada, 10% formol, 5% ácido acético glacial; Ruzin 1999) para su conservación y posterior análisis.

#### Recuento del número de granos de polen por flor (GPF).

Para cuantificar el polen, se realizaron los análisis de recuento de granos de polen por flor (GPF) siguiendo el procedimiento definido por Godini (1981).

Del total de las flores previamente recolectadas se extrajeron 3 flores de cada tubo las que fueron colocadas dentro de otro tubo tipo *Eppendorf*® de 5 ml de capacidad conteniendo 0,5 ml de una solución acuosa de detergente Triton X-100 (Eter Octilfenólico de Decaetilenglicol) al 1%. Las flores fueron estrujadas dentro del recipiente con una varilla de vidrio, la cual fue cuidadosamente escurrida dentro del tubo, utilizando una alícuota de la solución con detergente. El recipiente con el estrujado de las flores en suspensión se colocó en un agitador vertical "vórtex" para permitir la salida del polen desde el interior de las anteras y lograr una suspensión de polen homogénea. Finalmente, con una micropipeta automática se tomó una alícuota de la suspensión de polen y se la colocó en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) el cual retiene un volumen de 0,1  $\mu$ l en cada cuadrante (Bastidas, 2015; Figura 9).

Las observaciones para el recuento del polen en el retículo del hemocitómetro se realizaron con un microscopio binocular Nikon, Mod. Labophot 2 utilizando luz visible y contraste de fases.



**Figura 9:** A la izq.: Hemocitómetro (cámara de Neubauer) utilizado para el conteo. A la der.: Detalle de la cámara del hemocitómetro con los cuatro cuadrantes utilizados para el conteo de polen.

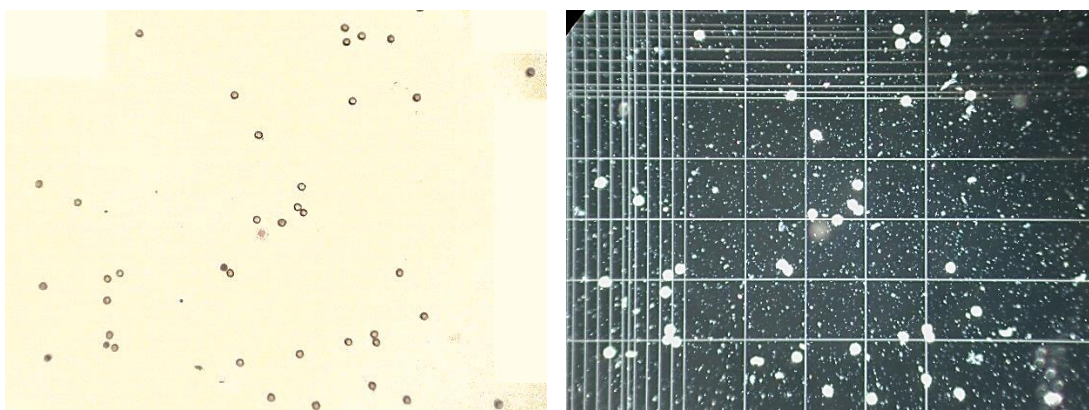
Los cálculos que se realizaron para obtener el número de GPF, a partir del número contado en la alícuota observada en el hemocitómetro, fueron los siguientes:

$$\text{N}^\circ \text{ granos/ml} = \frac{\text{N}^\circ \text{ granos contados/N}^\circ \text{ cuadrantes utilizados}}{0,0001 \text{ ml}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$\text{N}^\circ \text{ granos Polen/Flor (GPF)} = \text{N}^\circ \text{ granos/ml} \times \text{Volumen Original} \quad (\text{Ecuación 2})$$

En dónde: N° granos contados es la cantidad de granos de polen contados en los cuatro cuadrantes del hemocitómetro (Figura 10); el N° de cuadrantes utilizados en este caso fueron cuatro (I, II, III y IV) y, por lo tanto, se lo debe dividir por 0,0001 ml, ya que este es el volumen de suspensión que contiene cada uno de esos cuatro cuadrantes (Ecuación 1).

De esa manera se obtuvo el número de granos de polen presentes en 1 ml de suspensión, el cual se multiplicó por el volumen original (en este caso, 0,5 ml), para obtener el N° de granos de polen presentes en una flor (Ecuación 2).



**Figura 10:** A la izq.: Granos de polen libres montados en agua observados con microscopía convencional (luz visible). A la der.: Granos de polen montados en la retícula de la cámara del hemocitómetro, observados con microscopía de contraste de fases.

### Análisis de los resultados

El análisis estadístico del número de GPF se realizó mediante ANDEVA doble (líneas x posición de capítulos) y ANDEVA simple para comparar flores externas e internas en cada híbrido (ver Apéndice de Análisis estadísticos- Anexos 1 y 2). El programa estadístico utilizado fue **InfoStat** (versión 2010; Grupo InfoStat, Fac. Cs. Agropecuarias-UNCor, Córdoba), (Di Rienzo *et al.*, 2008).





## RESULTADOS







En general las plantas de las líneas androfértiles estudiadas tuvieron un buen crecimiento y desarrollo, así como también buen perfil sanitario bajo las condiciones dadas en el sitio experimental.

Si bien no se registró el porte de las plantas respecto a su ramificación y posición de los capítulos, sí fueron registradas las alturas desde el suelo hasta las yemas florales de los capítulos seleccionados para realizar el recuento polínico. La línea “D” fue la de menor porte, con una altura promedio de 70 cm a la yema floral del capítulo principal. Las restantes líneas resultaron con una altura promedio superior, siendo la “C” la de mayor altura (108 cm) y uniformidad dentro de sus individuos (Figura 7).

En la Tabla 1, se presenta la observación fenológica de los estadios que presentaron las plantas, en promedio de las cuatro líneas de parentales androfértiles utilizados en este trabajo, siguiendo el criterio de la escala visual de Schneiter y Miller (1981).

**Tabla 1:** Descripción de los estadios vegetativos (V) y reproductivos (R) (según Schneiter y Miller, 1981), observados en el ensayo.

ESTADIO (Schneiter y Miller, 1981)	DESCRIPCIÓN	FOTO
VE-EMERGENCIA	La plántula ha emergido y la primera hoja más allá de los cotiledones tiene menos de 4 cm de largo.	
Vn	Se determina contando el número de hojas verdaderas V-1, V-2, V-3, de al menos 4 cm de longitud. Si se ha producido la senescencia de las hojas inferiores, se cuentan las cicatrices de las hojas (excluyendo los cotiledones).	
R1	El brote terminal forma una cabeza floral en miniatura. Cuando se ve directamente desde arriba, las brácteas inmaduras tienen una apariencia de estrella de muchos puntos.	
R2	El brote inmaduro se alarga de 0,5 a 2,0 cm por encima de la hoja más cercana unida al tallo.	

R3	El brote inmaduro se alarga más de 2 cm por encima de la hoja más cercana.	
R4	La inflorescencia comienza a abrirse. Cuando se ve directamente desde arriba, las flores liguladas inmaduras son visibles.	
R5	El comienzo de la floración se divide en subestados dependiendo del porcentaje de área del capítulo que ha completado su floración. Por ejemplo. R-5.1 (10%), R-5.5 (50%), R5.9 (90%).	
R6	Floración completa, las flores liguladas comienzan a marchitarse.	
R7	La parte posterior de la cabeza comenzó a ponerse amarilla pálida.	
R8	Las brácteas permanecen verdes.	
R9	Brácteas amarillas y marrones, planta en madurez fisiológica.	

**VE:** En un período de 4 días, desde el 8/11 hasta el 12/11 se registró la emergencia de la primera hoja verdadera en todas las plántulas.

**V2/V4:** El día 21/11/2014 todas las plántulas contaban con 2 a 4 hojas verdaderas.

**R1:** En este estadio se hizo más evidente la diferencia madurativa de las líneas analizadas en este proyecto. En las líneas C y D el botón floral del capítulo principal comenzó a observarse el día 23/12/2014. Una semana después, en esas mismas plantas se diferenciaron las yemas axilares que posteriormente dieron origen a los capítulos secundarios y terciarios. En la línea A este estadio se observó en algunas plantas el día 5/1/2015, mientras que la línea B comenzó a diferenciarlos una semana posterior a la línea A.

**R5:** en este estadio se realizó el muestreo de las flores (Tablas 2 a 5). La línea D fue la más avanzada comenzando este estado el día 8/1/2015; en orden cronológico le sigue la línea A que comenzó a abrir sus flores el día 12/1/2015, la línea B lo hizo el día 20/1/2015 y, por último, la línea C el día 28/1/2015.

**Tabla 2:** Días de antesis de la línea A, con detalle de la altura promedio a los capítulos superior (SUP), medio (MED) e inferior (INF) y el subestadio de R5 registrado al momento de muestrear las flores del sector externo (EXT) e interno (INT) de cada capítulo.

Línea A	Altura promedio a la yema floral (cm)	Capítulo	Sector	Sub-estadio R5	Días en antesis	
	75.7	SUP	EXT	R5.1		30
			INT	R5.5		
	49.3	MED	EXT	R5.1		
			INT	R5.6		
	36.3	INF	EXT	R5.1		
			INT	R5.6		

**Tabla 3:** Días de antesis de la línea B, con detalle de la altura promedio a los capítulos superior (SUP), medio (MED) e inferior (INF) y el subestadio de R5 registrado al momento de muestrear las flores del sector externo (EXT) e interno (INT) de cada capítulo.

Línea B	Altura promedio a la yema floral (cm)	Capítulo	Sector	Sub-estadio R5	Días en antesis	
	75.7	SUP	EXT	R5.1		<b>30</b>
			INT	R5.5		
	49.3	MED	EXT	R5.1		
			INT	R5.6		
	36.3	INF	EXT	R5.1		
INT			R5.6			

**Tabla 4:** Días de antesis de la línea C, con detalle de la altura promedio a los capítulos superior (SUP), medio (MED) e inferior (INF) y el subestadio de R5 registrado al momento de muestrear las flores del sector externo (EXT) e interno (INT) de cada capítulo.

Línea C	Altura promedio a la yema floral (cm)	Capítulo	Sector	Sub-estadio R5	Días en antesis	
	108.3	SUP	EXT	R5.1		<b>18</b>
			INT	R5.5		
	74.3	MED	EXT	R5.1		
			INT	R5.6		
	34	INF	EXT	R5.1		
INT			R5.5			

**Tabla 5:** Días de antesis de la línea D, con detalle de la altura promedio a los capítulos superior (SUP), medio (MED) e inferior (INF) y el subestadio de R5 registrado al momento de muestrear las flores del sector externo (EXT) e interno (INT) de cada capítulo.

Línea D	Altura promedio a la yema floral (cm)	Capítulo	Sector	Sub-estadio R5	Días en antesis	
	53.6	SUP	EXT	R5.1		<b>15</b>
			INT	R5.5		
	34	MED	EXT	R5.1		
			INT	R5.5		
	18.7	INF	EXT	R5.1		
INT			R5.5			

**R6:** Siguiendo el mismo orden cronológico descrito en el estadio anterior, entre finales del mes de enero y mediados del mes de febrero de ese mismo año todas las líneas completaron su floración.

El uso de líneas restauradoras ramificadas asegura una producción de polen abundante y de larga duración. Entre las líneas estudiadas, el número de días en antesis fue entre un 50 y un 66% mayor en las líneas A y B que en las líneas C y D (Tablas 2 a 5). Conviene destacar en este punto que, si bien la línea "C" fue la más tardía, su floración fue la más uniforme en tiempo y forma. La altura a la yema floral del capítulo principal fue muy similar entre plantas (108 cm en promedio, Tabla 4), como así también la cantidad y tipo de ramificación.

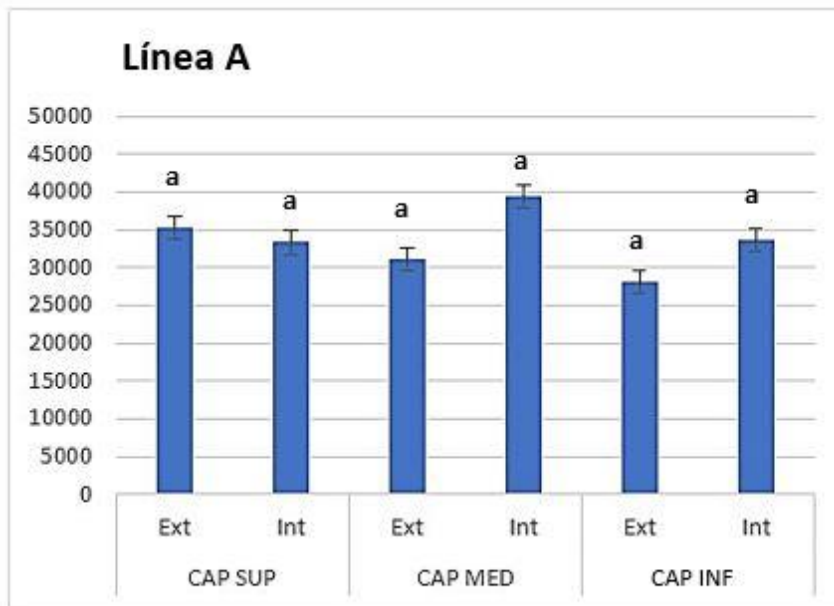
En la Figura 11 podemos observar los resultados de la producción de polen de las líneas estudiadas, según la ubicación de las flores en el sector externo e interno (SE y SI) de los capítulos.

El número de GPF observado en las distintas líneas osciló entre 21389 y 46389 (Figura 11, Análisis estadísticos- Anexo 1). Valores similares fueron reportados previamente para líneas parentales de girasol y sus híbridos obtenidos (Vear *et al.*, 1990) y más recientemente en genotipos comerciales de girasol por Astiz y Hernández (2013).

En las líneas androfértiles estudiadas en este trabajo, el perfil de producción de granos de polen según la posición del capítulo en la planta mostró interacción significativa ( $p < 0.05$ ) con la línea (Figura 12, Análisis estadísticos - Anexo 2). En general, en las líneas A, B y C, el número de GPF fue mayor en los capítulos superiores e intermedios que en los capítulos inferiores, aunque las diferencias solo fueron significativas en la línea C (Figura 12). En cambio, en la línea D esta variable fue mayor en los capítulos inferiores (Figura 12).



Granos de polen por flor



Granos de polen por flor

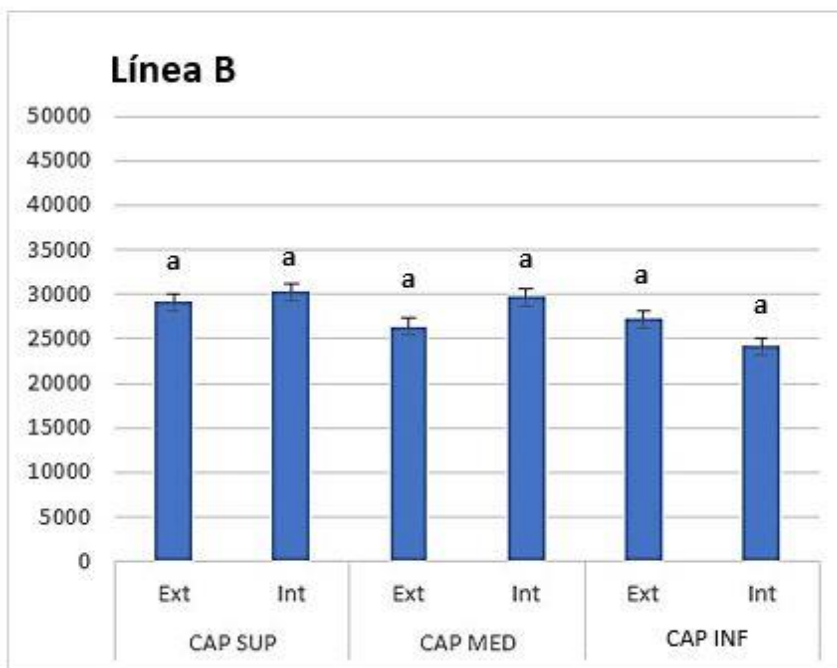
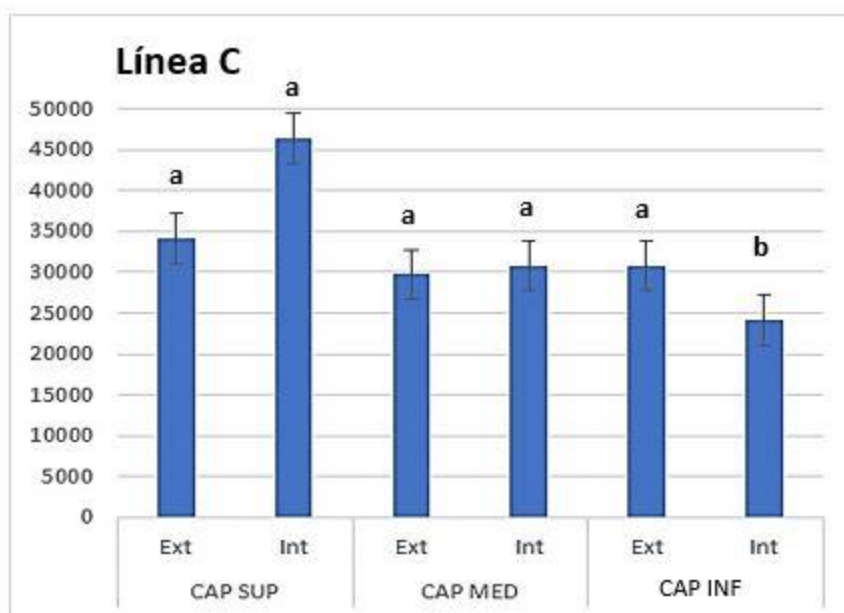
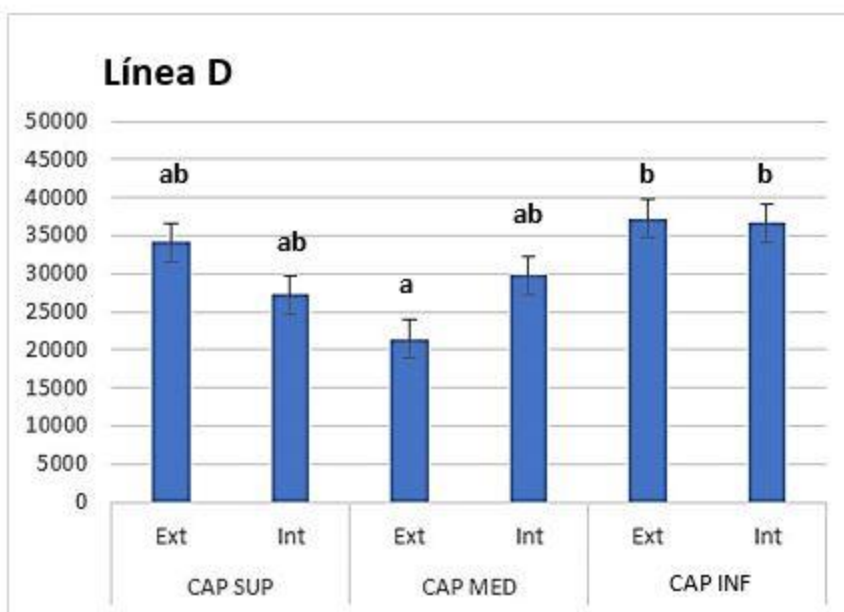


Figura 11. Ver leyenda en la página siguiente.

Granos de polen por flor



Granos de polen por flor



**Figura 11:** Granos de polen por flor en los capítulos de cada línea estudiada en este trabajo a tres niveles de distribución vertical: CAPSUP: capítulos superiores, CAPMED: capítulos intermedios y CAPINF: capítulos basales o inferiores, todos ellos discriminados en sector del capítulo externo (Ext) e interno (Int). Las líneas verticales sobre las barras indican el desvío estándar de cada observación.

## DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

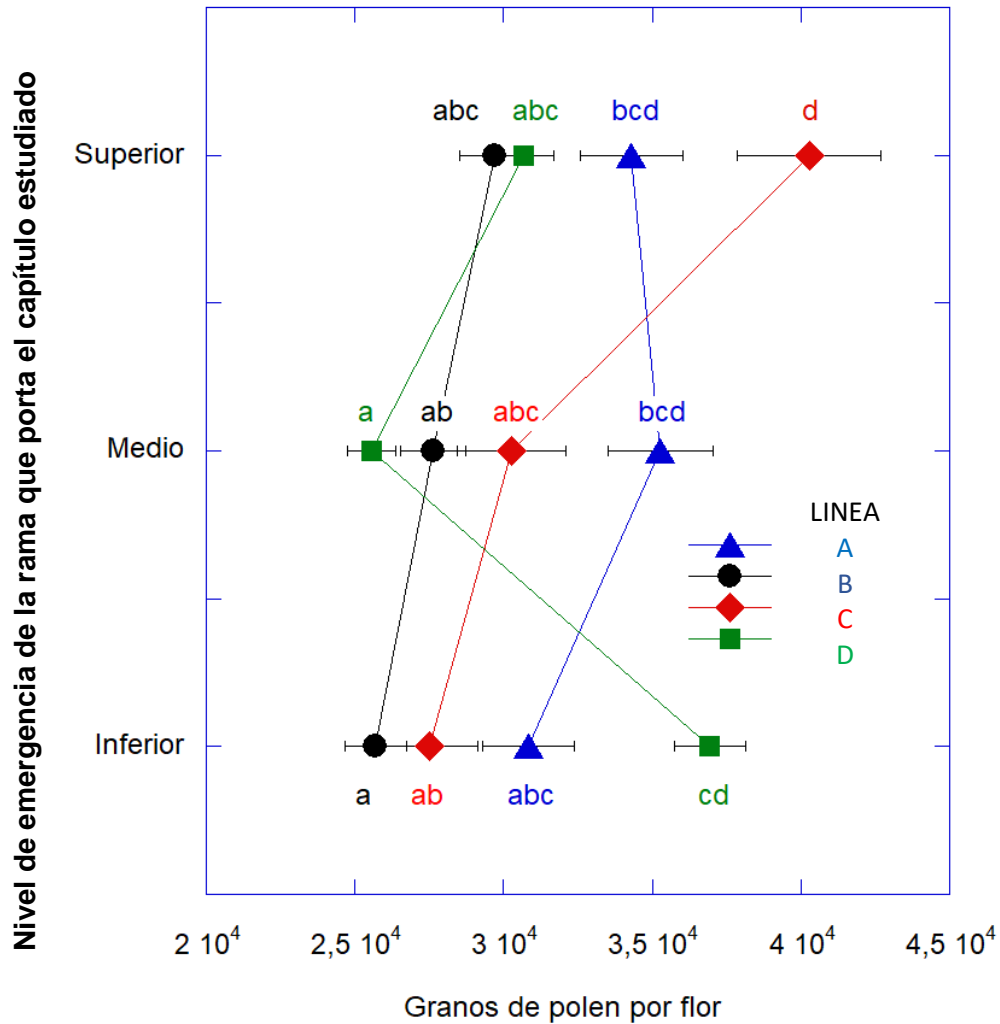
El número total de visitas de polinizadores que recibe una planta depende de la posición que tenga las flores, y está fuertemente correlacionado con una estratificación vertical; siendo las más visitadas las flores en posición relativamente más elevada (Klecka *et al.*, 2018). Si bien existen muchos polinizadores diurnos y nocturnos, la abeja doméstica (*Apis mellifera* L.) es el principal polinizador del girasol en la Argentina. Del comportamiento de la abeja como polinizador mientras realiza la recolección del polen y néctar dependerá, en gran medida, el éxito en la maximización del rendimiento en semilla. La producción de semilla híbrida de girasol se debe adaptar a un diseño de plantación eficiente para que los polinizadores en general, y las abejas en particular, puedan maximizar la recolección de polen y néctar y paralelamente realizar la polinización de las flores androestériles durante su actividad.

En las abejas, el movimiento en el cultivo es preferentemente horizontal y está caracterizado por una tendencia a volar entre plantas de similar altura; volar a una altura constante es ventajoso desde un punto de vista energético para la alimentación óptima de estos visitantes. Las abejas prefieren visitar a las flores que se ubican en los estratos más altos del canopeo, siguiendo un patrón de visita muy ordenado. Las flores cercanas al suelo son evitadas ya que requiere de la capacidad de maniobrar entre los tallos de las plantas, lo que puede ser un desafío cuando la densidad de plantas es alta (Klecka, *et al.*, 2018), tal es el caso en un lote de producción de semillas.

Generalmente, temprano por la mañana la abeja comienza visitando las líneas de machos primero para después pasar a recolectar néctar en las líneas de hembras. De esta manera, trabajando en las partes más altas aprovecha mejor la luz solar la cual favorece su actividad, ocurriendo lo contrario en días nublados y lluviosos, donde se pueden encontrar otros insectos polinizadores que contribuyen en menor medida (Ing. Agr. L. Gallez, DA-UNS, com. personal).

Los resultados obtenidos en este trabajo, (Figura 12), muestran que la línea “D” tiene mayor producción de polen en la parte superior e inferior y menor en la parte media de las plantas. Los capítulos de la línea “C” tienen una mayor producción en los estratos más altos y menor los bajos; en la línea “B” sucede algo similar a lo descripto

anteriormente, pero con un gradiente más diferenciado y los capítulos de la línea "A" tienen mayor producción de polen en la parte media (Figura 12).



**Figura 12:** Relación entre el nivel de emergencia de la rama que porta el capítulo (superior, medio e inferior) y la producción polínica promedio de sus flores (distribución vertical) en las cuatro líneas androfértiles estudiadas. Las líneas horizontales corresponden a los desvíos estándar de cada nivel. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los valores de granos de polen/flor (Sección Análisis Estadísticos, Anexo 2). La comparación de cada línea androfértil, el nivel de inserción de los capítulos y cantidad de polen por posición de los capítulos en las plantas se realizó de manera individual para cada línea. Análisis polínico realizado cuando los capítulos alcanzaron el estado floral R.5.1, de Schneiter y Miller, 1981.

De lo mencionado anteriormente se desprende que además de conocer la cantidad de polen que un macho pueda llegar a producir y la duración que tenga la antesis, se debe

conocer además cómo está distribuida en la planta la producción de polen, es decir, la distribución de la producción en los diferentes niveles de la planta.

Esto sería importante para planificar el diseño de plantación ya que si una línea macho tiene una producción polínica mayor en los capítulos del estrato superior, se podrían agregar más surcos para cubrir mejor a la hembra; y si por el contrario la producción de polen es mayor en los estratos más bajos, lo conveniente sería colocar menos surcos y más espaciados para que, las abejas como así también otros polinizadores voladores con preferencia a trabajar en estratos altos de las plantas, pudieran acceder a la mayor cantidad de polen posible.

De este trabajo surge que es importante el estudio de la producción de polen para ajustar, por ejemplo, el número de surcos de plantas macho y su espaciamiento entre surcos. Además, agregamos que sería factible analizar la posibilidad de seleccionar tendiendo a favorecer la producción de polen en los estratos más altos y así favorecer un mejor uso de la energía en la planta y maximizar la visita de las abejas.

En nuestro caso, si estuviéramos manejando en la producción de semilla una línea como la "D", estaríamos desperdiciando el polen de los capítulos inferiores y la planta invertiría energía en producir polen que no va a ser utilizado, en lugar de favorecer otro carácter de importancia. En cambio, en plantas con una distribución polínica como la observada en la línea "C", nos aseguraríamos el éxito de la polinización.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la línea "C" sería la más apta para la polinización en la producción de semilla híbrida, ya que desarrolló las plantas de mayor altura y además presentó mayor producción de polen en los capítulos superiores. Por lo tanto, entre las líneas estudiadas, sería el más visitado por la abeja doméstica.

Se concluye que, los resultados obtenidos en este trabajo sientan las bases para encarar estudios de selección que tiendan a la obtención de líneas de girasol androfértiles con mayor producción polínica en los capítulos ubicados por encima de la parte media de las plantas.

# ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

**Anexo 1: ANDEVA simple, comparando la producción polínica de las flores del sector externo e interno del capítulo en cada línea estudiada (Análisis Líneas A, B, C y D).**

## Análisis Línea A:

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Granos de polen/flor	18	0,32	0,03	18,90

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	221643870,37	5	44328774,07	1,11	0,4060
Línea	0,00	0	0,00	sd	sd
Nivel del capítulo y secto..	221643870,37	5	44328774,07	1,11	0,4060
Error	480092296,31	12	40007691,36		
Total	701736166,68	17			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 40007691,3589 gl: 12

Línea Medias n E.E.

Línea A 33472,21 18 1490,86 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 40007691,3589 gl: 12

Nivel del capítulo y secto.. Medias n E.E.

Inf-Ext	28055,53	3	3651,83	A
Med-Ext	31111,10	3	3651,83	A
Sup-Int	33333,33	3	3651,83	A
Inf-Int	33611,10	3	3651,83	A
Sup-Ext	35277,77	3	3651,83	A
Med-Int	39444,43	3	3651,83	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

## Análisis Línea B:

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Granos de polen/flor	18	0,12	0,00	26,54

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	90587246,92	5	18117449,38	0,34	0,8817
Línea	0,00	0	0,00	sd	sd
Nivel del capítulo y secto..	90587246,92	5	18117449,38	0,34	0,8817
Error	647684759,27	12	53973729,94		
Total	738272006,19	17			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 53973729,9389 gl: 12

Línea Medias n E.E.

Línea B 27685,18 18 1731,63 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 53973729,9389 gl: 12

Nivel del capítulo y secto.. Medias n E.E.

Inf-Int	24166,67	3	4241,61	A
Med-Ext	25555,53	3	4241,61	A
Inf-Ext	27222,20	3	4241,61	A
Sup-Ext	29166,67	3	4241,61	A
Med-Int	29722,23	3	4241,61	A
Sup-Int	30277,80	3	4241,61	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

## Análisis Línea C:

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Granos de polen/flor	18	0,62	0,46	20,01

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	834564172,85	5	166912834,57	3,90	0,0248
Línea	0,00	0	0,00	sd	sd
Nivel del capítulo y secto..	834564172,85	5	166912834,57	3,90	0,0248
Error	513425740,75	12	42785478,40		
Total	1347989913,60	17			

#### Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 42785478,3956 gl: 12

Línea	Medias	n	E.E.
Línea C	32685,19	18	1541,74 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 42785478,3956 gl: 12

Nivel del capítulo y secto..	Medias	n	E.E.
Inf-Int	24166,70	3	3776,48 A
Med-Ext	29722,23	3	3776,48 A
Med-Int	30833,30	3	3776,48 A
Inf-Ext	30833,37	3	3776,48 A
Sup-Ext	34166,67	3	3776,48 A
Sup-Int	46388,87	3	3776,48 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Análisis Línea D:

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Granos de polen/flor	18	0,45	0,22	24,52

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	567324154,32	5	113464830,86	1,96	0,1583
Línea	0,00	0	0,00	sd	sd
Nivel del capítulo y secto..	567324154,32	5	113464830,86	1,96	0,1583
Error	696298925,93	12	58024910,49		
Total	1263623080,26	17			

#### Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 58024910,4944 gl: 12

Línea	Medias	n	E.E.
Línea D	31064,81	18	1795,44 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 58024910,4944 gl: 12

Nivel del capítulo y secto..	Medias	n	E.E.
Med-Ext	21388,87	3	4397,91 A
Sup-Int	27222,23	3	4397,91 A B
Med-Int	29722,20	3	4397,91 A B
Sup-Ext	34166,67	3	4397,91 A B
Inf-Int	36666,67	3	4397,91 B
Inf-Ext	37222,23	3	4397,91 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Anexo 2: ANDEVA doble, analizando líneas x posición de los capítulos.

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Prom/granos x flor	72	0,32	0,19	22,66

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1401812668,22	11	127437515,29	2,54	0,0104
Líneas	355285047,84	3	118428349,28	2,36	0,0800
Posic. Cap.	232890452,94	2	116445226,47	2,32	0,1065
Posic. Cap.*Líneas	813637167,45	6	135606194,57	2,71	0,0215
Error	3005093546,34	60	50084892,44		
Total	4406906214,56	71			

### Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=8173,10909

Error: 50084892,4389 gl: 60

Posic. Cap.	Líneas	Medias	n	E.E.
MED	Línea D	25555,53	6	2889,20 A
INF	Línea B	25694,43	6	2889,20 A
INF	Línea C	27500,03	6	2889,20 A B
MED	Línea B	27638,88	6	2889,20 A B
SUP	Línea B	29722,23	6	2889,20 A B C
MED	Línea C	30277,77	6	2889,20 A B C
SUP	Línea D	30694,45	6	2889,20 A B C
INF	Línea A	30833,32	6	2889,20 A B C
SUP	Línea A	34305,55	6	2889,20 B C D
MED	Línea A	35277,77	6	2889,20 B C D
INF	Línea D	36944,45	6	2889,20 C D
SUP	Línea C	40277,77	6	2889,20 D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## RESULTADOS PUBLICADOS EMERGENTES DE ESTE TRABAJO

Bonjour, Y.M., L.A. Caro, M.A. Cantamutto, R.J. García y L.F. Hernández. 2015. Producción polínica en líneas androfértiles de girasol (*Helianthus annuus* L.) XXXV Jornadas Argentinas de Botánica V Congreso Latinoamericano y del Caribe de Cactáceas y Suculentas Salta, Argentina 23 al 26 de septiembre de 2015.

Bonjour, Y.M., A. C. Flemmer, L. A. Caro y L. F. Hernández. 2021. Producción de polen en los capítulos de líneas androfértiles de girasol (*Helianthus annuus* L.). Enviado a *AgroUNS*.

## REFERENCIAS

Anfinrud, M.N. 1997. Planting Hybrid Seed Production and Seed Quality Evaluation. En: Schneiter, A.A. (Ed.), Sunflower Technology and Production. ASA, CSSA, SSSA, Agronomy Series, Nº35, Madison, pp. 697-70.



- ASAGIR 2021. nota técnica en <http://www.asagir.org.ar> (página visitada en marzo 2021).
- Astiz, V y L.F. Hernández. 2013. Pollen production in sunflower (*Helianthus annuus* L.) is affected by air temperature and relative humidity during early reproductive growth. *Phyton* 82: 297-302
- Bastidas, O. 2015. Neubabuer chamber cell counting. En: [www.celeromics.com](http://www.celeromics.com) - Technical note.
- Connor, D.J. y A.J. Hall. 1997. Sunflower Physiology. En: Sunflower Technology and Production. A.A. Schneiter (Ed.) ASA, CSSA, SSSA, Winsconsin, pp. 113-182.
- Di rienzo J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, I. Gonzalez, M. Tablada y C.W. Robledo. 2008. *InfoStat, versión 2008*, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Fernández-Martínez, J. y P.F. Knowles. 1982. Genética de la polifloría en el girasol silvestre *Helianthus annuus* L. *Anales del INIA*, Ser. Agríc. Nº 17, pp 25-30.
- Godini A, 1981. Counting pollen grains of some almond cultivars by means of a hemocytometer *Riv Ortoflorofruttic. Ital.* 65: 173-178.
- Hernández, L.F. y G.A. Orioli. 1994. El ideotipo del girasol (*Helianthus annuus* L.). *AgriScientia*, 11: 1-12.
- Klecka J., J. Hadrava y P. Kolouskova. 2018. Vertical stratification of plant-pollinator interactions in a temperate grassland. *PeerJ* 6: e4998; DOI 10.7717/peerj.4998
- Renzi, J. P., Reinoso, O., Vasicek, J. P., Ávalos, M., Oquiñena, A. y M.A. Cantamutto. 2015. Impacto de la chinche diminuta (*Nysus* sp.) sobre el cultivo de girasol del valle bonaerense del Río Colorado 2014/15. Informe técnico E. E. A. Hilario Ascasubi N°43, 16 p.
- Ruzin SE, 1999. Plant Microtechnique and Microscopy. Oxford University Press, p. 322.
- Schneiter A. y J. Miller. 1981. Description of sunflower growth stages. *Crop Sci.* 21: 901-903.
- Soil Survey Staff. 2014. Keys to Soil Taxonomy, 12th ed. USDA-Natural Resources Conservation Service, Washington, DC.
- Vear, F., M.H. Pham-Delegue, D.T. de Labrouhe, R. Marilleau, Y. Loublier, M. le Métayer, P. Douault y J.P. Philippon. 1990. Genetical studies of nectar and pollen production in sunflower. *Agronomie* 10: 219-231.

Wilcock, C. y R. Neiland. 2002. Pollination failure in plants: why it happens and when it matters. *Trends in Plant Science*. 7: 270-277.

Wyatt, R. 1982. Inflorescence architecture: how flower number, arrangement, and phenology affect pollination and fruit-set. *Amer. J. Bot.* 69: 585-594.