

Pollen-pistil interaction in 'Manzanillo' olive (*Olea europaea* L.) under self-, free- and cross-pollination

Interacción polen-pistilo en olivo (*Olea europaea* L.) 'Manzanillo de Sevilla' bajo autopolinización, polinización libre y cruzada

Alberto Sánchez-Estrada^{1, 2}; Julián Cuevas^{2*}

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Coordinación de Alimentos de Origen Vegetal. Carretera a La Victoria km 0.6, Hermosillo, Sonora, C. P. 8300, MÉXICO.

²Universidad de Almería, Departamento de Agronomía, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentaria (ceiA3), La Cañada de San Urbano s/n, Almería, C. P. 04120, ESPAÑA.

*Corresponding author: jcuevas@ual.es, tel. (34) 950 01 5559.

Abstract

Manzanillo' olive (*Olea europaea* L.) cultivar suffers from pollination deficits that make it difficult for growers to achieve high productivity. This variety has been designated as completely self-incompatible by some authors, while others label it as partially self-incompatible. The aim of this study was to determine the degree of self-incompatibility and identify obstacles to self-fertilization in 'Manzanillo'. For this, in a multivarietal orchard in El Ejido-Almería, Spain (36° 50' NL, 2° 24' WL), a completely randomized experiment was established with four pollination treatments (self-pollination, free-pollination, and cross-pollination with pollen from 'Picual' and 'Sevillano'). Pollen adhesion and germination, pollen tube growth and fertilization every three days after pollination were evaluated. Analyses showed no differences among treatments in pollen adhesion. The effect of pollination on pollen germination was erratic, because although free-pollination showed more germination than self-pollination at the beginning, the differences disappeared at nine days after anthesis. The clearest self-incompatibility reaction was detected in the growth of the pollen tube, with little and late growth of the pollen tube under self-pollination. The lowest fertilization rate was observed with self-pollination, and the highest with free-pollination

Keywords: pollen-pistil self-compatibility, pollen adhesion, pollen germination, pollen tube growth, fertilization.

Resumen

El cultivar de olivo (*Olea europaea* L.) 'Manzanillo de Sevilla' sufre a menudo déficit de polinización que dificultan la consecución de una productividad alta. Esta variedad ha sido señalada como completamente autoincompatible por algunos autores, mientras que otros la etiquetan como parcialmente autoincompatible. El objetivo del presente estudio fue determinar el grado de autoincompatibilidad e identificar el obstáculo a la autofecundación en 'Manzanilla de Sevilla'. Para ello, en un huerto multivarietal en El Ejido-Almería, España (36° 50' latitud norte y 2° 24' longitud oeste) se estableció un experimento completamente al azar con cuatro tratamientos de polinización (autopolinización, polinización libre, y polinización cruzada con polen de 'Picual' y de 'Gordal Sevillana'), y se evaluó la adhesión y germinación del polen, el crecimiento del tubo polínico y la fecundación cada tres días después de la polinización. Los análisis mostraron ausencia de diferencias entre tratamientos en cuanto a la adhesión del polen. El efecto de la polinización sobre la germinación del polen fue errático, pues, aunque la polinización libre mostró mayor germinación que la autopolinización al inicio, las diferencias desaparecieron a los nueve días. La reacción de autoincompatibilidad más clara se detectó en el crecimiento del tubo polínico, apreciándose un crecimiento escaso y tardío del tubo polínico bajo autopolinización. La tasa de fecundación más baja se observó con la autopolinización, y la más alta con polinización libre.

Palabras clave: autocompatibilidad polen-pistilo, adhesión del polen, germinación del polen, crecimiento del tubo polínico, fecundación.



Introduction

The olive (*Olea europaea* L.) is a preferentially allogamous crop that responds positively to cross-pollination, leading to an increase in fruit set (Cuevas & Polito, 1997; Lavee & Datt, 1978; Sibbett, Freeman, Ferguson, & Polito, 1992). The system that dominates self-incompatibility relationships in olive is complex (Franklin-Tong & Franklin, 2003; Seifi, Guerin, Kaiser, & Sedgley, 2011), making its study of great importance because of its significance in flower fertilization and fruit set, and therefore in pollination designs (selection, number and location of pollinizers) in the plots.

Some authors contend that the olive has a sporophytic self-incompatibility (Breton, Farinelli, & Shafiq, 2014; Collani et al., 2012), while others contend it has a gametophytic-type self-incompatibility (Ateyyeh, Stosser, & Qrunfleh, 2000; Cuevas & Polito, 1997; Serrano & Olmedilla, 2012). The latter is characterized, although with exceptions, by the inhibition of pollen tube growth in the style, which prevents (or hinders) self-fertilization (de Nettancourt, 1977).

Different methods have been developed to study the self-compatibility level of cultivated and wild plants. One of the most accepted methods is the analysis under fluorescence microscopy of the processes that lead to fruit set (Heslop-Harrison & Heslop-Harrison, 1970), in which pollen adhesion and germination levels on the stigma, pollen tube growth through the style and fertilization levels are analyzed (Vuletin-Selak, Cuevas, Goreta-Ban, & Perica, 2018). These analyses make it possible to identify the self-incompatibility reaction in a clear manner when comparing samples of flowers subjected to self-pollinating treatments against free- or cross-pollination, with pollen from other previously selected cultivars. Given the existing controversy in this respect and the importance of the olive's self-incompatible response, the aim of this study was to determine the degree of self-incompatibility and identify the obstacles to self-fertilization in 'Manzanillo'.

Materials and methods

Plant material and orchard location

The experiment was carried out in a multivarietal orchard with different olive tree varieties ('Picual', 'Manzanillo', 'Sevillano', 'Arbequina', 'Frantoio', 'Blanqueta' and 'Hojiblanca'), located at the Cajamar Experimental Station, Las Palmerillas, El Ejido, Almería, Spain (36° 50' NL, 2° 24' WL and at 84 masl). For the experiments, four 18-year-old adult trees of the 'Manzanillo' cultivar, open vase trained and with 6 x 8 m spacing, were used. Orchard management

Introducción

El olivo (*Olea europaea* L.) es un cultivo preferentemente alógamo que responde positivamente a la polinización cruzada, lo que produce un incremento del amarre de frutos (Cuevas & Polito, 1997; Lavee & Datt, 1978; Sibbett, Freeman, Ferguson, & Polito, 1992). El sistema que domina las relaciones de autoincompatibilidad en el olivo es complejo (Franklin-Tong & Franklin, 2003; Seifi, Guerin, Kaiser, & Sedgley, 2011), lo cual genera que su estudio sea de gran importancia por su trascendencia en la fecundación de las flores y amarre de frutos, y por ende en los diseños de polinización (selección, número y ubicación de pies polinizadores) en las parcelas.

Algunos autores afirman que el olivo presenta una autoincompatibilidad de tipo esporofítica (Breton, Farinelli, & Shafiq, 2014; Collani et al., 2012), mientras que otros, atribuyen al olivo una autoincompatibilidad de tipo gametofítica (Ateyyeh, Stosser, & Qrunfleh, 2000; Cuevas & Polito, 1997; Serrano & Olmedilla, 2012). Esta última se caracteriza, aunque con excepciones, por la inhibición del crecimiento del tubo polínico, lo que evita (o dificulta) la autofecundación (de Nettancourt, 1977).

Se han desarrollado diferentes métodos para estudiar el nivel de autocompatibilidad de las plantas cultivadas y silvestres. Uno de los métodos más aceptados es el análisis bajo microscopía de fluorescencia de los procesos que conducen al amarre de frutos (Heslop-Harrison & Heslop-Harrison, 1970), en el cual se analizan los niveles de adhesión y germinación del polen sobre el estigma, el crecimiento del tubo polínico a través del estilo y los niveles de fecundación (Vuletin-Selak, Cuevas, Goreta-Ban, & Perica, 2018). Estos análisis permiten identificar la reacción de autoincompatibilidad de una manera clara cuando se comparan muestras de flores sometidas a tratamientos de autopolinización contra polinización libre o cruzada, con polen de otros cultivares seleccionados previamente. Dada la controversia existente al respecto y la trascendencia de la respuesta autoincompatible del olivo, se planteó como objetivo de este trabajo determinar el grado de autoincompatibilidad e identificar el obstáculo a la autofecundación en 'Manzanilla de Sevilla'.

Materiales y métodos

Material vegetativo y localización de la huerta

El experimento se llevó a cabo en un huerto multivarietal con árboles de diferentes variedades de olivo ('Picual', 'Manzanillo de Sevilla', 'Gordal Sevillana', 'Arbequina', 'Frantoio', 'Blanqueta' y 'Hojiblanca'), localizado en la Estación Experimental de Cajamar, paraje Las Palmerillas, El Ejido, Almería,

included drip irrigation and soil maintenance through no tillage and chemical and physical weed removal.

Experimental design and treatments

The experimental design was completely randomized with four pollination treatments as a source of variation, which were: self-pollination (SP), free-pollination (FL), and cross-pollination using pollen from 'Sevillano' (XS) and 'Picual' (XP).

SP was achieved by covering the fruiting branches prior to anthesis with silk paper bags. The deposition of self-pollen onto the stigmas was favored by continuously shaking the branches. On the other hand, the branches subjected to FP were left uncovered, receiving, without restriction, pollen dispersed by the wind from nearby trees: 'Picual', 'Sevillano', 'Arbequina', 'Frantoio', 'Blanqueta' and 'Hojiblanca' (distances to them between 8 and 30 m). For the cross-pollination treatments, fresh pollen was applied manually with a fine brush to the stigmas of the open flowers. In all cases, pollination was carried out at the beginning of flowering and repeated every two days on two more occasions.

The pollen used for cross-pollination was previously collected from 'Sevillano' (XS) and 'Picual' (XP) trees in the same orchard, following the procedure described by Cuevas and Polito (2004). The viability of the pollen was determined before its use by means of the fluorochromatic staining test proposed by Heslop-Harrison and Heslop-Harrison (1970) and slightly modified by Pinillos and Cuevas (2008). Pollen viability was 87.1 and 86.7 % for 'Sevillano' and 'Picual', respectively. Cross-pollinated flowers remained bagged before and after each manual pollination.

Pollen-pistil interaction

Pollen-pistil interaction was evaluated in 20 flowers from each treatment at 3, 6 and 9 days after pollination (dap) (60 flowers in total per treatment). Pollination was carried out on the day of anthesis, which was assured by eliminating the open flowers on a given day and the closed flowers on the following day, so that all the remaining flowers opened between a given day and the following day. Treatments were applied as explained above.

The collected flowers were fixed with FAE (formalin, glacial acetic acid and 70 % ethanol, at a 1:2:17 v/v ratio) until observation. The fixed flowers were processed according to the procedure described by Cuevas, Rallo, and Rapoport (1994). The staining was done with aniline blue and immediately afterwards the observations were made under fluorescence microscopy as proposed by Martin (1958) using an epifluorescence microscope

España, ubicado a los 36° 50' de latitud norte, 2° 24' de longitud oeste y a 84 msnm. Para los experimentos se utilizaron cuatro árboles adultos de 18 años de edad del cultivar 'Manzanilla de Sevilla' conducidos en vaso, con marcos de plantación de 6 x 8 m. El manejo del huerto incluía riego por goteo y mantenimiento del suelo mediante no laboreo y eliminación de malezas en forma química y física.

Diseño experimental y tratamientos

El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro tratamientos de polinización como fuente de variación, los cuales fueron: autopolinización (AP), polinización libre (PL), y polinización cruzada utilizando polen de 'Gordal Sevillana' (XS) y de 'Picual' (XP).

La AP se logró cubriendo los ramos fructíferos previo a la antesis con bolsas de papel seda. La deposición del polen propio sobre los estigmas se favoreció agitando los ramos continuamente. Por su parte, los ramos sometidos a PL se dejaron sin cubrir recibiendo, sin restricción, el polen dispersado por el viento de los árboles cercanos: 'Picual', 'Manzanilla de Sevilla', 'Gordal Sevillana', 'Arbequina', 'Frantoio', 'Blanqueta' y 'Hojiblanca' (distancias entre 8 y 30 m). Para los tratamientos de polinización cruzada se aplicó manualmente, con un pincel fino, polen fresco (XS y XP) a los estigmas de las flores abiertas. En todos los casos, la polinización se realizó al inicio de la floración y se repitió cada dos días en dos ocasiones más.

El polen utilizado para la polinización cruzada se recolectó previamente de árboles de 'Gordal Sevillana' y 'Picual' del mismo huerto, siguiendo el procedimiento descrito por Cuevas y Polito (2004). La viabilidad del polen se determinó antes de su uso mediante la prueba de tinción fluorocromática propuesta por Heslop-Harrison y Heslop-Harrison (1970) y ligeramente modificada por Pinillos y Cuevas (2008). La viabilidad del polen fue de 87.1 y 86.7 % para 'Gordal Sevillana' y 'Picual', respectivamente. Las flores con polinización cruzada permanecieron embolsadas antes y después de cada polinización manual.

Interacción polen-pistilo

La interacción polen-pistilo se evaluó en 20 flores de cada tratamiento a los 3, 6 y 9 días después de la polinización (ddp) (60 flores en total por tratamiento). La polinización se realizó el día de antesis, la cual se aseguró eliminando las flores abiertas en un día determinado y las flores cerradas al día siguiente, por lo que todas las flores restantes abrieron entre un día determinado y el siguiente. Los tratamientos se aplicaron como se explicó anteriormente.

(Nikon Labophot, Tokyo, Japan). In each flower sampled, pollen adherence to stigma, pollen germination, pollen tube growth and fertilization levels were quantified. The results of the 20 flowers were averaged for each treatment and pollination date.

The number of pollen grains adhered to flower stigmas was estimated by counting the number of pollen grains in three small areas of the stigma, and then calculated at flower level taking into account the average size of the 'Manzanillo' stigma reported by Griggs, Hartmann, Bradley, Iwakiri, and Whisler (1975). Pollen germination was expressed as a percentage, as the relationship between adhered and germinated pollen grains. A pollen grain was considered germinated when it presented a pollen tube of at least a length equal to the diameter of the pollen. The growth of the pollen tube in the style of each flower was evaluated taking into account the following ranges: null (no pollen tubes were observed), scarce (fewer than five pollen tubes), moderate (5 to 25 pollen tubes) or massive (more than 25 pollen tubes), and expressed as a percentage of flowers found for each range of pollen tubes. Finally, a flower was considered fertilized when there was a pollen tube in the micropyle or an ovule had become a developing seed, a condition proven by the size of the ovule (more than three times its initial size), and the other three ovules became senescent (Cuevas et al., 1994; Seifi et al., 2011).

Adhesion and germination values were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) in a completely randomized design and Tukey's multiple comparison test ($P \leq 0.05$). Percentage data were subjected to angular transformation prior to analysis. Fertilization results were analyzed using the chi-square test ($P \leq 0.05$). The Infostat version 2017e program (Universidad de Córdoba, Córdoba, Argentina) was used for the analyses.

Results and discussion

Analysis of the pollen-pistil interaction showed no differences among treatments in the adhesion of pollen grains ($P > 0.05$). There was a slight increase in the number of grains adhered to the oldest flowers, indicating that the receptivity of the stigma was maintained until 9 dap. FP and XS treatments showed about 1,900 pollen grains per flower, while XP and SP had about 2,000 and 2,200 pollen grains per flower, respectively, at 3 dap. At 6 dap, the differences were small and not significant (2,700 pollen grains per flower for SP and FP, and 2,800 pollen grains per flower for XS and XP). The oldest flowers (9 dap) showed the highest number of pollen grains, reaching 3,000 grains in all treatments, with the exception of XP which averaged 5,500 pollen grains in the stigma (Figure 1a).

Las flores colectadas se fijaron con FAE (formalina, ácido acético glacial y etanol al 70 %, en una proporción 1:2:17 v/v) hasta observación. Las flores fijadas se procesaron de acuerdo con lo expuesto por Cuevas, Rallo, y Rapoport (1994). La tinción se realizó con azul de anilina para realizar las observaciones bajo microscopía de fluorescencia según, lo propuesto por Martin (1958), en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Labophot, Tokio, Japón). En cada flor muestreada se cuantificó la adhesión del polen al estigma, la germinación del polen, el crecimiento del tubo polínico y los niveles de fecundación de acuerdo con la fecha de la misma. Los resultados de las 20 flores se promediaron para cada tratamiento y fecha de polinización.

El número de granos de polen adheridos a los estigmas de las flores se estimó contando el número de granos de polen en tres áreas pequeñas del estigma, y luego se calculó a nivel de flor teniendo en cuenta el tamaño promedio del estigma de 'Manzanilla de Sevilla' reportado por Griggs, Hartmann, Bradley, Iwakiri, y Whisler (1975). La germinación del polen se expresó en porcentaje, como la relación entre los granos de polen adheridos y los germinados. Un grano de polen se consideró germinado cuando presentó un tubo polínico de al menos una longitud igual al diámetro del polen. El crecimiento del tubo polínico en el estilo de cada flor se evaluó tomando en cuenta los siguientes rangos: nulo (no se observaron tubos polínicos), escaso (menos de cinco tubos polínicos), moderado (de 5 a 25 tubos polínicos) o masivo (más de 25 tubos polínicos), y se expresó en porcentaje de flores encontradas por cada rango de tubos polínicos. Finalmente, una flor se consideró fecundada cuando había un tubo polínico en el micrópilo o un óvulo se había convertido en una semilla en desarrollo, condición comprobada con el tamaño del óvulo (más de tres veces de su tamaño inicial), y los otros tres óvulos se tornaban senescentes (Cuevas et al., 1994; Seifi et al., 2011).

Los valores de adhesión y germinación se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía en un diseño completamente al azar y una comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$). Los datos porcentuales se sometieron a una transformación angular previo a su análisis. Los resultados de fecundación se analizaron mediante la prueba de chi-cuadrado (X^2) ($P \leq 0.05$). Para los análisis se utilizó el programa Infostat versión 2017e (Universidad de Córdoba, Córdoba, Argentina).

Resultados y discusión

El análisis de la interacción polen-pistilo no mostró diferencias entre tratamientos en la adhesión de los granos de polen ($P > 0.05$). Se apreció un ligero aumento en el número de granos adheridos en las flores de mayor edad, lo que indica que la receptividad del

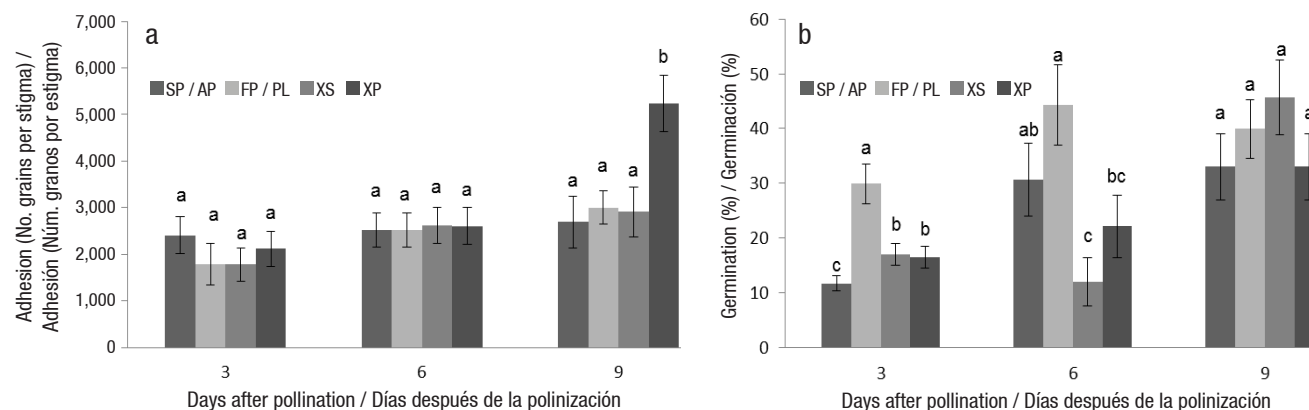


Figure 1. Analysis of variance of pollen adhesion (a) and germination (b) in 'Manzanillo' olive flowers under conditions of self-pollination (SP), free-pollination (FP), and cross-pollination with pollen from 'Sevillano' (XS) and pollen from 'Picual' (XP). The bars represent the mean of 20 observations (flowers) and their standard error. Percentage data were subjected to angular transformation prior to analysis. ^aMeans with the same letter on each sampling day do not differ significantly (Tukey, $P \leq 0.05$).

Figura 1. Análisis de la varianza de la adhesión (a) y germinación del polen (b) en flores de olivo 'Manzanillo de Sevilla' bajo condiciones de autopolinización (AP), polinización libre (PL), y polinización cruzada con polen de 'Gordal de Sevillano' (XS) y polen de 'Picual' (XP). Las barras representan la media de 20 observaciones (flores) y su error estándar. Los datos porcentuales fueron sometidos a transformación angular previo a su análisis. ^aMedias con la misma letra en cada día de muestreo no difieren significativamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

The percentage of pollen grains germinated at 3 dap was 11.7 % in SP flowers, 29.9 % under FP, and 17.1 % in XS and XP. A notable increase in pollen germination was observed at 6 dap for SP, FP and XP, reaching values of 30.6, 44.3 and 22.1 %, respectively. The lowest germination level was observed in the XS treatment at 6 dap, which showed an anomalous decrease in the values (Figure 1b), reversed at 9 dap. At this last date, there were no significant differences among treatments ($P > 0.05$) (Figure 1b).

The dynamics of pollen tube growth in the style varied greatly depending on the pollination treatment. In this sense, a higher percentage of flowers with more pollen tubes were observed in flowers subjected to FP, XS and XP treatments. The percentage of flowers showing more pollen tubes in the style was much higher in FP and cross-pollination (both XS and XP) conditions than with SP. These differences were especially noticeable at 6 and 9 dap. With the FP treatment, not only was a larger number of flowers with growing pollen tubes observed, but it was also common to see a larger number of pollen tubes per flower. The latter was also observed in cross-pollination (XS and XP), a situation that rarely occurred with SP, where most of the flowers did not show any pollen tubes in the style due to their early arrest in the stigma (Figure 2a and 2b). As expected, the number of pollen tubes observed in the transmission tissue of the style was higher in the oldest flowers (Table 1), as a consequence of the progressive growth of pollen tubes. This effect was more accentuated in the FP and XP treatments, indicating the absence of pollen

estigma se mantuvo hasta 9 ddp. Los tratamientos de PL y XS presentaron cerca de 1,900 granos de polen por flor, mientras que con XP y AP se contaron unos 2,000 y 2,200 granos de polen por flor, respectivamente, a los 3 ddp. A los 6 ddp, las diferencias fueron escasas y no significativas (2,700 granos de polen por flor para AP y PL, y 2,800 granos de polen por flor para XS y XP). Las flores de mayor edad (9 ddp) mostraron el mayor número de granos de polen, alcanzando los 3,000 granos en todos los tratamientos, con excepción de XP que obtuvo en promedio 5,500 granos de polen en el estigma (Figura 1a).

El porcentaje de granos de polen germinados a los 3 ddp fue de 11.7 % en flores AP, 29.9 % bajo PL, y de 17.1 % en XS y XP. Un notable incremento en la germinación del polen se observó a los 6 ddp para AP, PL y XP, alcanzando valores de 30.6, 44.3 y 22.1 %, respectivamente. El menor nivel de germinación se observó en el tratamiento XS a los 6 ddp, el cual mostró una disminución anómala en los valores (Figura 1b), que se revirtió a los 9 ddp. En esta última fecha, no hubo diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0.05$) (Figura 1b).

La dinámica del crecimiento del tubo polínico en el estilo varió mucho dependiendo del tratamiento de polinización. En este sentido, se observó mayor porcentaje de flores con más tubos polínicos en flores sometidas a los tratamientos de PL, XS y XP. El porcentaje de flores que mostró más tubos polínicos en el estilo fue mucho mayor en condiciones de PL y

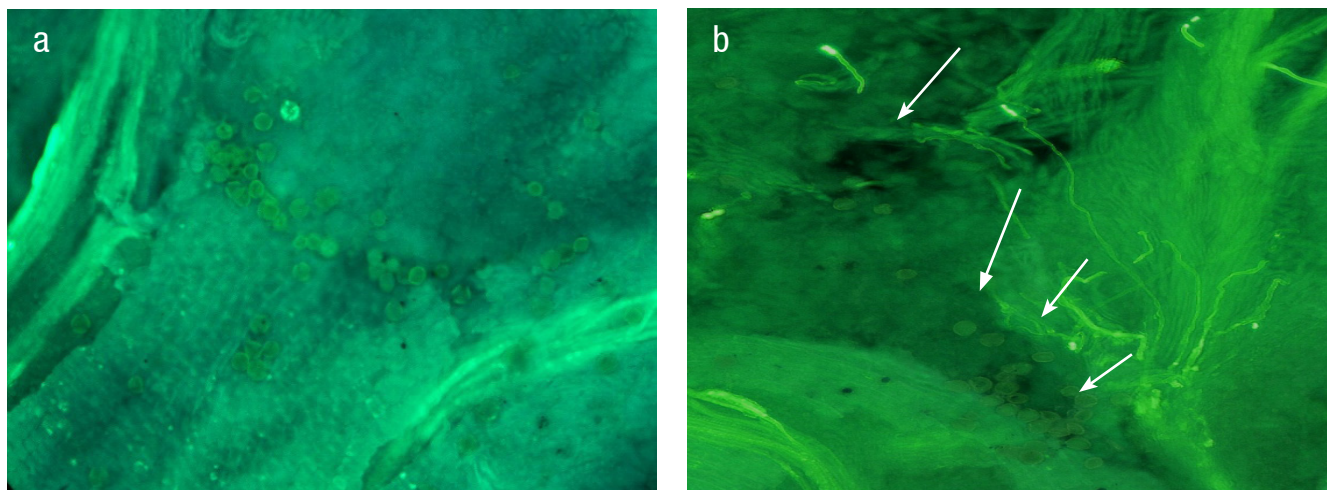


Figure 2. Pollen tube growth in 'Manzanillo' style under conditions of (a) self-pollination and (b) cross-pollination with 'Sevillano' pollen at 9 days after pollination.

Figura 2. Crecimiento del tubo polínico en el estilo de 'Manzanilla de Sevilla' bajo condiciones de (a) autopolinización y (b) polinización cruzada con polen de 'Gordal Sevillana' a los 9 días después de polinización.

Table 1. Number of pollen tubes in 'Manzanillo' flowers under conditions of self-pollination (SP), free-pollination (FP), cross-pollination with pollen from 'Sevillano' (XS) and cross-pollination with 'Picual' pollen (XP).

Cuadro 1. Número de tubos polínicos en de flores de 'Manzanilla de Sevilla' bajo condiciones de autopolinización (AP), polinización libre (PL), polinización cruzada con polen de 'Gordal Sevillana' (XS) y polinización cruzada con polen de 'Picual' (XP).

Pollination treatment/ Tratamiento de polinización	dap ¹ /ddp ¹	Number of pollen tubes grown in the style/ Número de tubos polínicos crecidos en el estilo			
		0	1-5	5-25	> 25
Percentage of flowers / Porcentaje de flores					
SP/AP	3	100	0	0	0
	6	75	25	0	0
	9	65	35	0	0
FP/PL	3	100	0	0	0
	6	45	50	5	0
	9	0	30	60	10
XS	3	95	5	0	0
	6	85	15	0	0
	9	45	65	0	0
XP	3	95	5	0	0
	6	60	30	10	0
	9	25	75	0	0

¹dap = days after pollination.

¹ddp = días después de polinización.

rejection and the growth of the pollen tube without obstacles in these treatments.

Due to the different growth of the pollen tube among pollination treatments, fertilization levels were higher in FP, XS (Figure 3) and XP than in SP, especially at 9 dap. With FP, more than half (65 %) of the flowers sampled were fertilized at 9 dap, while the percentages were lower with XS and XP, with values of 20 and 15 %, respectively. On the other hand, fertilization levels were even lower (5 % of flowers) under SP in the same sampling period (Table 2). A chi-square test indicates that at 9 dap the contingency table shows significant differences from the expected pattern, indicating that the pollination treatments produced different fertilization levels. The results were not significantly different on the previous dates, although the percentages of fertilized flowers were again higher under FP (Table 2).

Results confirm that 'Manzanillo' is a highly self-incompatible olive genotype, since the SP treatment resulted in very low and significantly ($P \leq 0.05$) lower levels of fertilization than FP. The self-incompatible response in 'Manzanillo' was characterized, above all, by poor growth of the pollen tubes in the style of SP flowers, as well as lower levels of pollen germination at 3 dap, as reported by Vuletin-Selak, Cuevas, Goreta-Ban, and Perica (2014).

Different authors have pointed out that the self-incompatible reaction in olive is characterized by the low capacity of the pollen tubes to penetrate beyond

polinización cruzada (tanto XS como XP), que con AP. Estas diferencias fueron especialmente notables a los 6 y 9 ddp. Con el tratamiento de PL no sólo se observó un número mayor de flores que presentaban tubos polínicos creciendo, sino que, además, fue común ver un número mayor de tubos polínicos por flor. Esto último también se observó en polinización cruzada (XS y XP), situación que rara vez ocurrió con la AP, donde la mayoría de las flores no mostraron ningún tubo polínico en el estilo debido a su detención temprana en el estigma (Figura 2a y 2b). Como se esperaba, la cantidad de tubos polínicos observados en el tejido de transmisión del estilo fue mayor en las flores más viejas (Cuadro 1), como consecuencia del crecimiento progresivo de tubos polínicos. Este efecto fue más acentuado en los tratamientos de PL y XP, lo que indica la ausencia de rechazo al polen y el crecimiento del tubo polínico sin obstáculos en estos tratamientos.

Debido al diferente crecimiento del tubo polínico entre tratamientos de polinización, los niveles de fecundación fueron más altos en flores de PL, XS (Figura 3) y XP, que en las AP, especialmente a los 9 ddp. Con la PL, más de la mitad (65 %) de las flores muestreadas estaban fecundadas a los 9 ddp, mientras que los porcentajes fueron más bajos con XS y XP, con valores de 20 y 15 %, respectivamente. Por su parte, con AP los niveles de fecundación fueron aún más bajos (5 % de las flores) en el mismo periodo muestreado (Cuadro 2). Una prueba de chi-cuadrado señala que a los 9 ddp la tabla de contingencia muestra alejamiento del patrón esperado, lo que indica que los tratamientos de polinización produjeron diferentes niveles de fecundación. Los

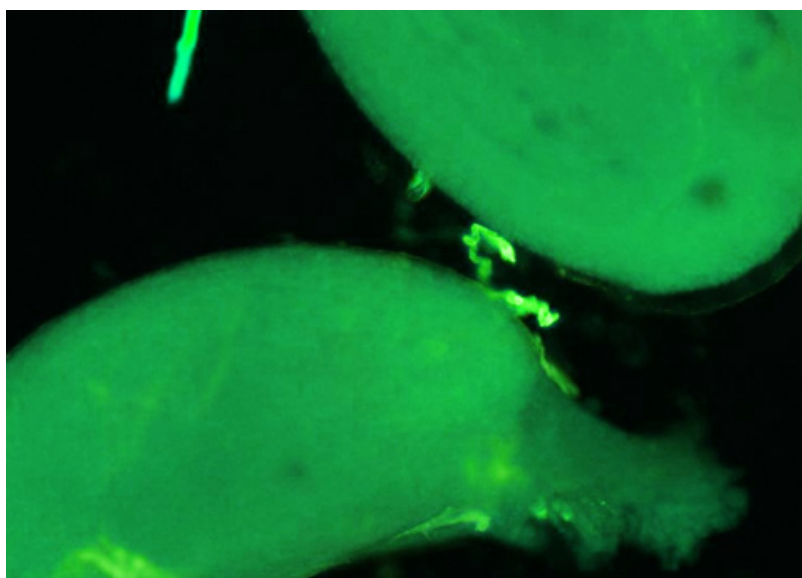


Figure 3. Fertilization of ovules from 'Manzanillo' flowers under cross-pollination with 'Sevillano' pollen at 9 days after pollination. The ovules were removed from the ovary to facilitate observation.

Figura 3. Fecundación de óvulos procedentes de flores de 'Manzanilla de Sevilla' bajo condiciones de polinización cruzada con polen de 'Gordal Sevillana' a los 9 días después de la polinización. Los óvulos se extrajeron del ovario para facilitar su observación.

Table 2. Contingency table of the number of ovules fertilized in flowers under self-pollination (SP), free-pollination (FP), cross-pollination with pollen from 'Sevillano' (XS) and cross-pollination with pollen from 'Picual' (XP).

Cuadro 2. Tabla de contingencia del número de óvulos fecundados en flores bajo autopolinización (AP), polinización libre (PL), polinización cruzada con polen de 'Gordal Sevillana' (XS) y polinización cruzada con polen de 'Picual' (XP).

Days after pollination/ Días después de la polinización	Test value (X^2)/ Valor de la prueba (X^2)	Pollination treatments / Tratamientos de polinización			
		SP/AP	FP/PL	XS	XP
3	-----	0	0	0	0
6	X^2 (3, N = 20) = 2.5, p = 0.530	1	3	1	1
9	X^2 (3, N = 20) = 0.06, p = 0.005*	1	13	4	3

* $P \leq 0.05$

the first layers of the stigma cells, which could be measured as a lower pollen germination, as well as their inability to grow in the style (Bradley & Griggs, 1963; Cuevas & Polito, 1997). This agrees with what was found in this work. This rejection of 'self' pollen leads to a severe reduction in the percentage of fertilized flowers under SP (Shemer et al., 2014; Vuletin-Selak, Perica, Goreta-Ban, & Poljak, 2014). The analyses of pollen-pistil interaction in this work confirm the self-incompatible response of 'Manzanillo' and highlight the failure of 'self' pollen to achieve acceptable fertilization levels that allow sufficient productivity in monovarietal plots.

Pollen adhesion and germination in the stigma did not show a clear response, although there were slight improvement trends under FP, XS and XP treatments, and in the oldest flowers. This evolution confirms prolonged stigma receptivity in olive (Vuletin-Selak et al., 2014b). FP in the experimental plot, given its multivarietal orchard condition, reached the highest fertilization levels, above the levels found under cross-pollination (XB and XS).

Conclusions

'Manzanillo' is a highly self-incompatible cultivar that needs cross-pollination to achieve satisfactory flower fertilization levels. The results obtained in the analysis of pollen-pistil interaction indicate that reduced pollen tube growth, and therefore low fertilization levels, compromise fruit set and productivity levels in strictly monovarietal plots. This response suggests gametophytic self-incompatibility in 'Manzanillo'. Free-pollination in a multivarietal orchard improves fertilization levels. 'Sevillano' and 'Picual' appear as potential pollinators of 'Manzanillo' in Spain, although their fertilization levels were below those obtained under free-pollination.

End of English version

resultados no fueron significativamente diferentes en las fechas previas, en donde los porcentajes de flores fecundadas fueron superiores con la PL a los 6 ddp (Cuadro 2).

Los resultados confirman que 'Manzanillo de Sevilla' es un genotipo de olivo fuertemente autoincompatible, ya que el tratamiento de AP derivó en niveles muy bajos y significativamente ($P \leq 0.05$) menores de fecundación que la PL. La respuesta autoincompatible en 'Manzanilla de Sevilla' se caracterizó, sobre todo, por un escaso crecimiento del tubo polínico en el estilo de las flores AP, además de los niveles menores de germinación del polen a los 3 ddp, tal y como lo reportan Vuletin-Selak, Cuevas, Goreta-Ban, y Perica (2014).

Diferentes autores han señalado que en olivo la reacción autoincompatible se caracteriza por la baja capacidad de los tubos polínicos para penetrar más allá de las primeras capas de las células del estigma (lo que pudiera medirse como una menor germinación del polen), así como su incapacidad de crecer en el estilo (Bradley & Griggs, 1963; Cuevas & Polito, 1997), lo que concuerda con lo observado en este trabajo. Este rechazo al polen propio conduce a una reducción severa en el porcentaje de flores fecundadas bajo autopolinización (Shemer et al., 2014; Vuletin-Selak, Perica, Goreta-Ban, & Poljak, 2014). Los análisis de interacción polen-pistilo de este trabajo confirman la respuesta autoincompatible de 'Manzanillo de Sevilla' y resaltan el fracaso del grano de polen propio en lograr niveles aceptables de fecundación que permitan una productividad suficiente en las parcelas monovarietales.

La adhesión y la germinación del polen en el estigma no mostraron una respuesta clara, aunque hubo ligeras tendencias de mejora bajo los tratamientos de PL, XS y XP, y en flores de mayor edad. Esta evolución confirma una prolongada receptividad del estigma en olivo (Vuletin-Selak et al., 2014b). La PL en la parcela experimental, dada su condición de huerta multivarietal, alcanzó los

References / Referencias

- Ateyyeh, A. F., Stösser, R., & Qrunfleh, M. (2000). Reproductive biology of the olive (*Olea europaea* L.) cultivar 'Nabali Baladi'. *Journal of Applied Botany*, 74(5), 255-270. Retrieved from <https://goo.gl/1eUq7y>
- Bradley, M. V., & Griggs, W. H. (1963). Morphological evidence of incompatibility in *Olea europaea* L. *Phytomorphology*, 13, 141-156.
- Breton, C. M., Farinelli, D., & Shafiq, S. (2014). The self-incompatibility mating system of the olive (*Olea europaea*) functions with dominance between S-alleles. *Tree Genetics & Genomes*, 10(4), 1055-1067. doi: 10.1007/s11295-014-0742-0
- Collani, S., Galla, G., Ramina A., Barcaccia, G., Alagna, F., Cáceres, E. M., & Perrotta, G. (2012). Self-Incompatibility in olive: A new hypothesis on the S-Locus genes controlling pollen-pistil interaction. *Acta Horticulturae*, 967, 133-142. doi: 10.1007/actaHortic.2012.967.15
- Cuevas, J., Rallo, L., & Rapoport, H. F. (1994). Crop load effects on floral quality in olive. *Scientia Horticulturae*, 59(2), 123-130. doi: 10.1016/0304-4238(94)90079-5
- Cuevas, J., & Polito V. S. (1997). Compatibility relationships in 'Manzanillo' olive. *HortScience*, 32(6), 1056-1058. Retrieved from <https://journals.ashs.org/hortsci/view/journals/hortsci/32/6/article-p1056.pdf>
- Cuevas, J., & Polito V. S. (2004). The role of staminate flowers in the breeding system of *Olea europaea* (Oleaceae): an Andromonoecious, wind-pollinated taxon. *Annals of Botany*, 93(5), 547-553. doi: 10.1093/aob/mch079
- De Nettancourt, D. (1977). The genetic basic of self-incompatibility. In: de Nettancourt, D. (Ed.), *Incompatibility and Incongruity in wild and cultivated plants* (pp. 25-72). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Franklin-Tong, N., & Franklin F. C. (2003). Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. *Trends in Plant Science*, 8(12), 598-602. doi: 10.1016/j.tplants.2003.10.008
- Griggs, W., Hartmann, H., Bradley, M. V., Iwakiri, B. T., & Whisler, J. (1975). Olive pollination in California. *Bulletin, California Agriculture Experimental Station*, 869, 3-50. Retrieved from <https://archive.org/details/olivepollination0869grig>
- Heslop-Harrison, J., & Heslop-Harrison, Y. (1970). Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technology*, 45(3), 15-20. doi: 10.3109/10520297009085351
- Lavee, S., & Datt, Z. (1978). The necessity of cross-pollination for fruit set of 'Manzanillo' olives. *Journal of Horticultural Science*, 53(4), 261-266. doi: 10.1080/00221589.1978.11514827
- Martin, F. W. (1958). Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology*, 34(3), 125-128. doi: 10.3109/10520295909114663
- mayores niveles de fecundación, por encima de los niveles encontrados bajo polinización cruzada (XB y XS).

Conclusiones

'Manzanillo de Sevilla' es un cultivar fuertemente autoincompatible que necesita de polinización cruzada para alcanzar niveles satisfactorios de fecundación de las flores. Los resultados obtenidos en el análisis de la interacción polen-pistilo indican que el escaso crecimiento del tubo polínico, y por ende los bajos niveles de fecundación, comprometen los niveles de amarre de frutos y la productividad en parcelas estrictamente monovarietales. Esta respuesta sugiere una autoincompatibilidad de tipo gametofítico en 'Manzanillo de Sevilla'. La polinización libre en un huerto multivarietal mejora los niveles de fecundación. 'Gordal Sevillana' y 'Picual' aparecen como potenciales polinizadores de 'Manzanillo de Sevilla' en España, aunque sus niveles de fecundación quedaron por debajo de los obtenidos con polinización libre.

Fin de la versión en español

- Pinillos, V., & Cuevas, J. (2008). Standardization of the fluorochromatic reaction test to assess pollen viability. *Biotechnic & Histochemistry*, 83(1), 15-21. doi: 10.1080/10550290801987204
- Seifi, E., Guerin, J., Kaiser, B., & Sedgley, M. (2011). Sexual compatibility and floral biology of some olive cultivars. *New Zealand Journal Crop Horticultural Science*, 39(2), 141-151. doi: 10.1080/01140671.2011.560165
- Serrano, I., & Olmedilla, A. (2012). Histochemical location of key enzyme activities involved in receptivity and self-incompatibility in the olive tree (*Olea europaea* L.). *Plant Science*, 197, 40-49. doi: 10.1016/j.plantsci.2012.07.007
- Shemer, A., Biton, I., Many, Y., Vaknin, Y., Lavee, S., Avidan, B., & Ben-Ari, G. (2014). The olive cultivar 'Picual' is an optimal donor for 'Barnea'. *Scientia Horticulturae*, 172(9), 278-284. doi: 10.1016/j.scienta.2014.04.017
- Sibbett, G. S., Freeman, M., Ferguson, L., & Polito, V. S. (1992). Effect of topically applied 'Sevillano' pollen on normal-seeded and parthenocarpic "shotberry" fruit set of 'Manzanillo' olive. *HortTechnology*, 2(2), 228-230. Retrieved from <https://journals.ashs.org/horttech/view/journals/horttech/2/2/article-p228.pdf>
- Vuletin-Selak, G., Cuevas, J., Goreta-Ban, S., & Perica, S. (2014a). Pollen tube performance in assessment of compatibility in olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 165, 36-43. doi: 10.1016/j.scienta.2013.10.041

- Vuletin-Selak, G., Cuevas, J., Pinillos, V., Goreta-Ban, S., Poljak, M., & Perica S. (2014b). Assessment of effective pollination period in olive (*Olea europaea*) by means of fluorescence microscopy and plant response to sequential pollinations: limitations and drawbacks of current methodologies. *Trees*, 28, 1497-1505. doi: 10.1007/s00468-014-1053-7
- Vuletin-Selak, G., Perica, S., Goreta-Ban, S., & Poljak, M. (2014c). The effect of temperature and genotype on pollen performance in olive (*Olea europaea* L.). *Scientia Horticulturae*, 156(7), 38-46. doi: 10.1016/j.scienta.2013.03.029
- Vuletin-Selak, G., Cuevas, J., Goreta-Ban, S., & Perica, S. (2018). Determination of compatibility relationships between olive cultivars: an overview of available methods. *Acta Horticulturae*, 1199, 115-120. doi: 10.17660/ActaHortic.2018.1199.19