

# Reduction of seed number in 'Yashar' mandarin by application of copper sulfate and different pollen grains sources

## Reducción del número de semillas en mandarina 'Yashar' mediante la aplicación de sulfato de cobre y diversas fuentes de granos de polen

Davood Hashemabadi<sup>1\*</sup>; Behzad Kaviani<sup>1</sup>; Hamidreza Gholipour<sup>1</sup>; Malek Ghasemi<sup>2</sup>; Mojtaba Khorrami Raad<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Horticultural Science, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, IRAN.

<sup>2</sup>Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Horticultural Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Ramsar, IRAN.

<sup>3</sup>University of Melbourne, School of Ecosystem and Forest Sciences, Faculty of Science, Creswick, AUSTRALIA.

\*Corresponding author: davoodhashemabadi@yahoo.com, tel. 0098 91 11 38 05 51.

### Abstract

The citrus trade market welcomes cultivars with different characteristics such as being totally seedless or having fewer seeds, having thin and vividness skin, high ratio of sugar to acid, being watery, easy peeling and relatively large fruit. Furthermore, a wide range of cultivars should be available according to fruit ripening time from very early (precocious) to very late (serotinous). 'Yashar' mandarin is a hybrid obtained by crossing of the 'Minneola' tangelo and 'Changsha' mandarin. The fruits of this cultivar grow in the northern regions of Iran, and it ripen in May, thus, they are considered the late-ripening mandarin cultivars. One of the deficiencies of this cultivar is that it is full of seeds (25-30). The aim was to evaluate pollination impacts regarding different sources of pollen grains ('Valencia' orange, 'Hamlin' orange, sour orange, and free pollination) on 'Yashar' mandarin characteristics. Two separate experiments were performed. In the first experiment, the effect of pollen grains of different citrus cultivars ('Valencia' orange, 'Hamlin' and sour orange) and a free-pollination treatment as a control group was evaluated. In the second experiment, the effect of foliar application of copper sulfate at the rate of 25 mg·L<sup>-1</sup> was conducted in stages 30, 60 and 80 % of open flowers. One free pollination treatment as a control group was evaluated as well. The index of fruit technology was obtained by pollination with 'Hamlin' and sour orange pollen grains. The foliar spraying with copper sulfate, when 30 % of the flowers had opened, reduced the number of seeds in the 'Yashar' mandarin cultivar.

**Keywords:** citrus, hybridization, metaxenia, pollen grain, seedlessness, xenia.

### Resumen

En el mercado comercial de los cítricos se aprecian los cultivares con diferentes características, como presentar menos semillas o carecer totalmente de éstas, una piel delgada y brillante, y una elevada proporción de dulzura frente a la acidez; además, de ser frutos jugosos, fáciles de pelar y relativamente grandes. También se debe disponer de una amplia gama de cultivares según el tiempo de maduración de la fruta, desde muy temprana (precoz) a muy retrasada (tardía). La mandarina 'Yashar' es un híbrido obtenido mediante la cruce del tangelo 'Minneola' y la mandarina 'Changsha'. Los frutos de este cultivar crecen al norte de Irán, y maduran en mayo, por lo cual se considera como un cultivar de maduración tardía. Uno de los defectos de dicho cultivar es que tiene demasiadas semillas (entre 25 y 30). El objetivo fue evaluar los impactos de la polinización con diferentes fuentes de granos de polen (naranjas 'Valencia', 'Hamlin', agria y polinización libre) sobre las características de mandarina 'Yashar'. Se desarrollaron dos experimentos. En el primero se evaluó el efecto de los granos de polen y un tratamiento de polinización libre (testigo). En el segundo se analizó el efecto de la aplicación foliar de 25 mg·L<sup>-1</sup> de sulfato de cobre durante las etapas de 30, 60 y 80 % de flores abiertas y un tratamiento con polinización (testigo). El índice tecnológico más alto se obtuvo mediante la polinización con naranjas 'Hamlin' y agria. El asperjado foliar con sulfato de cobre, cuando el 30 % de las flores habían abierto, redujo el número de semillas en la mandarina Yashar.

**Palabras clave:** cítrico, hibridación, metaxenia, granos de polen, ausencia de semillas, xenia.



## Introduction

'Yashar' mandarin (*Citrus tangerine* 'Tanaka') was produced in 2009 through the intersection of 'Minneola' tangelo tangerine (*C. paradisi* cv. 'Duncan' × *C. reticulata* cv. 'Dancy') as a mother parent and 'Changsha' mandarin (*C. changsha* tangerine) as a father parent in the Citrus Research Institute in Khorramabad, Tonekabon, Iran (Golein, Alian, Ebrahimi, & Nazerian, 2012) (Figure 1). 'Yashar' mandarin is one of the serotinous cultivars (mostly yields in May) with high performance and appropriate quantitative and qualitative characteristics. It has large fruit with sufficient fruit juice, dark orange flesh, and a desirable smell and taste. 'Yashar' mandarin is a seeded cultivar, and it shows biennial bearing, and resistance to the cold condition. 'Yashar' mandarin trees have a wide and broad crown, and their branches are almost without thorns (Golein et al., 2012).

Being full of seeds is one of the most important disadvantages of 'Yashar' mandarin. Cross-pollination and using chemical compounds are some techniques to reduce the number of seeds in various plants such as citrus. Hybridization among different genus is one of the corrective techniques to produce new citrus cultivars. Consumers have always been cautious about different characteristics of citrus cultivars, such as being totally seedless or having fewer seeds, having thin skin and desirable taste. Citrus breeders have always try to create such characteristics in new genotypes and cultivars.

The use of suitable pollinators can be one of the most impressive and safest farming methods from an environmental point of view to improve fertility level and the quality of fruits which are self-incompatible cultivars (Ioannis, Papadakis, Protopapadakis, & Ioannis, 2009). Different effects of pollen grain sources on quantitative, qualitative, physical and biochemical characteristics of citrus fruits has been reported (Wallace & Lee, 1999; Wallace, King, & Lee, 2002; Talaie, Golein, Ebrahimi, & Vezvaei, 2002; Alinezhad-Jahromi, Zarei, & Mohammadkhani, 2019). The effect of pollination on the number of seeds in an incompatible variety of mandarin 'Afourer' showed that few seedless fruits were formed on free-pollinated trees. At the same time, the use of anti-bee nets resulted in producing a high percentage of seedless fruits (Gambetta et al., 2013). Appropriate management of pollinators increased the quantity and quality of mandarins (Wallace et al., 2002).

A study on the effect of 'Balady' mandarin pollen grains on 'Balady' sour lemon, 'Agamy' and 'Hosni', revealed that no significant differences were observed in total soluble solids (TSS), acidity (TA) and vitamin C content of fruits (Kitat, El-Azad, & Wehida, 1994). The

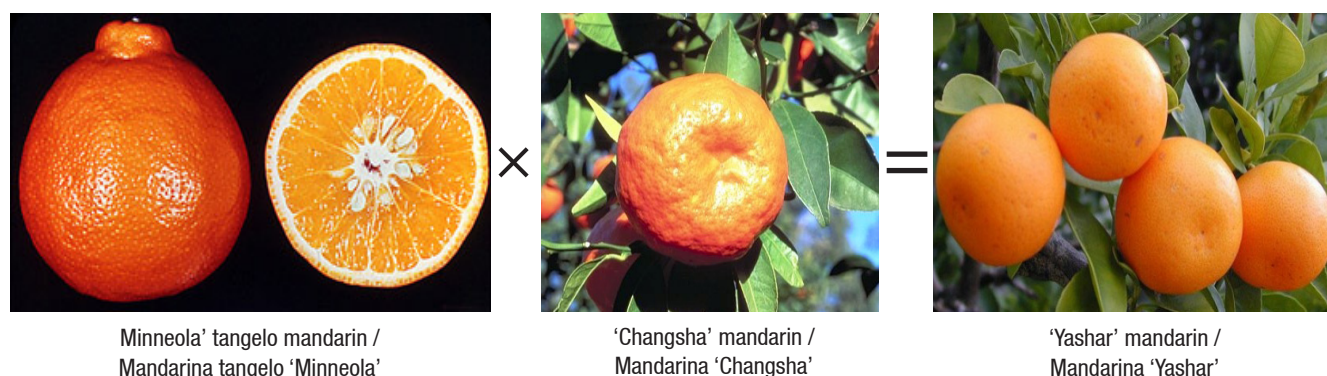
## Introducción

La mandarina 'Yashar' (*Citrus tangerine* 'Tanaka') se creó en 2009 mediante la cruce de tangelo 'Minneola' tangerina (*C. paradisi* cv. 'Duncan' × *C. reticulata* cv. 'Dancy'), como el progenitor femenino, y mandarina 'Changsha' (*C. changsha* tangerine), como el masculino, en el Instituto de Investigaciones en Cítricos en Khorramabad, Tonekabon, Irán (Golein, Alian, Ebrahimi, & Nazerian, 2012) (Figura 1). La mandarina 'Yashar' es uno de los cultivares seróticos (la mayor parte de su producción se da en mayo) de alto rendimiento y características cuantitativas y cualitativas adecuadas. Tiene frutos grandes con suficiente jugo, pulpa de color naranja oscuro, y olor y sabor deseables. Este cultivar es de semilla, bienal y resistente al frío; además, tiene copa ancha y amplia, y sus ramas casi no tienen espinas (Golein et al., 2012).

Una de las desventajas más importantes de la mandarina 'Yashar' es que presenta una gran cantidad de semillas. La polinización cruzada y el uso de compuestos químicos son algunas técnicas para reducir el número de semillas en diversas plantas, como los cítricos. La hibridación entre diferentes géneros es una técnica correctiva para producir nuevos cultivares de cítricos. Los consumidores siempre han sido exigentes con las diferentes características de los cultivares, como que carezcan totalmente de semillas (o que tengan menos semillas), que tengan una cáscara fina y un sabor deseable. En este sentido, los fitogenetistas de cítricos siempre han intentado conseguir estas características en los nuevos genotipos y cultivares.

El uso de polinizadores adecuados puede ser uno de los métodos de cultivo más seguro desde el punto de vista medioambiental, ya que mejora el nivel de fertilidad y la calidad de los frutos que son de cultivares auto-incompatibles (Ioannis, Papadakis, Protopapadakis, & Ioannis, 2009). Se han reportado diversos efectos de las fuentes de granos de polen sobre las características cuantitativas, cualitativas, físicas y bioquímicas de los cítricos (Wallace & Lee, 1999; Wallace, King, & Lee, 2002; Talaie, Golein, Ebrahimi, & Vezvaei, 2002; Alinezhad-Jahromi, Zarei, & Mohammadkhani, 2019). Al evaluar el efecto de la polinización sobre el número de semillas en una variedad incompatible de mandarina 'Afourer' se obtuvieron pocos frutos sin semillas en árboles polinizados libremente, y el uso de redes anti-abejas resultó en un alto porcentaje de frutos sin semillas (Gambetta et al., 2013). Por su parte, Wallace et al. (2002) señalan que el manejo adecuado de los polinizadores aumentó la cantidad y la calidad de las mandarinas.

Un estudio sobre el efecto de granos de polen de mandarina 'Balady' en limón agrio 'Balady', 'Agamy' y 'Hosni' reveló que no existen diferencias significativas en los sólidos solubles totales (SST), la acidez titulable (AT) y



**Figure 1. Origin of hybrid 'Yashar' mandarin through hybridization between 'Minneola' tangelo and 'Changsha' mandarins.**  
**Figura 1. Origen del cultivar de mandarina 'Yashar' a través de la hibridación entre tangelo 'Minneola' y mandarinas 'Changsha'.**

pollination with 'Moro' blood orange pollen grains on 'Clementine' mandarin significantly reduced the number of seed (Alinezhad-Jahromi et al., 2019). Different sources of pollen grains had a significant effect on the fruits of three mandarin cultivars, such as their sugar content, acidity and number of seeds and their weight (Wallace & Lee, 1999).

The results of controlled pollination on 'Clementine' mandarin showed that the highest percentage of fruits were related to pollinated flowers with sweet lemon pollen grains. The lowest percentage of them were related to self-pollinated flowers. Furthermore, the highest and lowest live seeds were gained from flowers pollinated with 'Lisbon' lemon pollen grains and self-pollinated pollen grains (Alinezhad-Jahromi et al., 2019). The effects of pollen grains of nine cultivars of citrus on 'Page' mandarin demonstrated that 'Hamlin' orange is the best pollinator (Golein et al. 2012). Local mandarins and clustered lemon are the best pollinators for 'Clementine' mandarins according to the weather conditions of the northern part of Iran (Asadi Abkenar, 1996).

Copper sulfate ( $\text{CuSO}_4$ ) has played different roles in agriculture for different purposes. Some of its important applications are as follow: a pesticide, a stimulator to form some vitamins (also its metabolic role in some enzyme systems), and its role as biosynthesis and the effects of ethylene and also its role in the process of producing seedless fruits (Kyamarsi, & Eshghi, 2011; Mesejo, Martínez-Fuentes, Reig, Rivas, & Agustí, 2013). The aforementioned salt is mainly absorbed from the soil as  $\text{Cu}^{2+}$  ion, and it has also been used as foliar spraying. The application of copper sulfate in seed reduction has been reported in cultivar 'Fortune' mandarin, cultivar 'Clemenules' of the 'Clementine' mandarin and cultivar 'Afourer' tangor. Copper sulfate can have inhibitory effects on pollen tube growth and seed formation (Mesejo et al.,

el contenido de vitamina C en los frutos (Kitat, El-Azad, & Wehida, 1994). Mientras que, la polinización con granos de polen de naranja sanguina 'Moro' en mandarina 'Clementine' redujo significativamente el número de semillas (Alinezhad-Jahromi et al., 2019). Wallace y Lee (1999) mencionan que diversas fuentes de granos de polen mostraron un efecto positivo significativo en los frutos de cultivares de mandarina, tales como en su contenido de azúcar, acidez, número de semillas y peso.

Los resultados de la polinización controlada en mandarina 'Clementine' mostraron que el porcentaje más alto de frutos estuvo relacionado con flores polinizadas con granos de polen de limón dulce, y el porcentaje más bajo se relacionó con flores auto-polinizadas. Asimismo, las cantidades más altas y más bajas de semillas activas se obtuvieron a partir de flores polinizadas con granos de polen de limón 'Lisboa' y con auto-polinización, respectivamente (Alinezhad-Jahromi et al., 2019). Golein et al. (2012), al evaluar los granos de polen de nueve cultivares de cítricos, demostraron que la naranja 'Hamlin' es el mejor polinizador de la mandarina 'Page'. Las mandarinas locales y los limones de racimo son los mejores polinizadores para mandarinas 'Clementine', de acuerdo con las condiciones climáticas del norte de Irán (Asadi Abkenar, 1996).

El sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) ha jugado diferentes roles en la agricultura. Algunos de sus principales usos son como pesticida, como estimulador para formar ciertas vitaminas (además de su papel metabólico en algunos sistemas enzimáticos), en la biosíntesis y los efectos del etileno, y como mediador en los procesos para producir frutos sin semilla (Kyamarsi & Eshghi, 2011; Mesejo, Martínez-Fuentes, Reig, Rivas, & Agustí, 2013). Dicha sal es absorbida, principalmente, desde el suelo como ion  $\text{Cu}^{2+}$ , aunque se ha suministrado mediante aspersión foliar. La aplicación de sulfato de cobre en la reducción de semillas se ha reportado en el cultivar de mandarina 'Fortune', 'Clemenules' de la mandarina

2013). It has also been reported that copper sulfate caused 'Shiraz' black grapes cultivar to become seedless (Kyamarsi & Eshghi, 2011).

The present study aimed to evaluate the sprays with copper sulfate and pollination impacts regarding different sources of pollen grains ('Valencia' orange, 'Hamlin' orange, sour orange and free pollination) on 'Yashar' mandarin characteristics particularly seed number to choose the best pollinator.

## Materials and methods

### Place of research

This study was carried out on 'Yashar' mature mandarin trees grafted on identical and healthy sour orange rootstocks regarding their growth condition at the Citrus Research Institute of Ramsar city, Mazandaran, Iran. Ramsar is considered one of the subtropical regions regarding climate, and its altitude is -20 m a. s. l. Its longitude is 50.65° from the east, and its latitude is 36.90° from the north. The average, maximum and minimum, temperatures are 35 and -2 °C, respectively, and the annual rainfall is 800-1,500 mm.

### First experiment

In the first experiment (done on 2018), the effect of pollen grains of different citrus cultivars ('Valencia' orange, 'Hamlin' orange and sour orange) and free pollination (control group) on the carpel of the 'Yashar' mandarin was evaluated in a randomized completely block design with four treatments and three replications.

#### *Selection of 'Yashar' mandarin trees for pollination*

From the trees in the 'Yashar' plot, 12 healthy trees (Figure 2A) were selected and marked in terms of growth rate, size and shape of the crown and even equality of the rootstocks. These trees were reproduced by grafting the scion on a sour orange tree as a rootstock.

#### *Selecting pollinator trees*

In order to choose pollinator cultivars, those cultivars that were free of pests and diseases were used and were either low-seeded or high-seeded (full of seeds).

#### *Performing manual pollinating operations*

For pollination, 100 flowers were selected in each combination, and the flowers were isolated in clear wax bags 24 h before the petals were supposed to open. At the same time, the blossoms of the 'Valencia', 'Hamlin' and sour orange cultivars were separated

'Clementine' y el cultivar de tangor 'Afourer'. Lo anterior debido a que el sulfato de cobre puede tener efectos inhibitorios sobre el crecimiento del tubo de polen y la formación de semillas (Mesejo et al., 2013). Además, se ha reportado que el sulfato de cobre causó que el cultivar de uvas negras 'Shiraz' dejara de tener semillas (Kyamarsi & Eshghi, 2011).

El objetivo del presente estudio fue evaluar aspersiones con sulfato de cobre y los impactos de la polinización con diversas fuentes de granos de polen (naranjas 'Valencia', 'Hamlin', agria y polinización libre) sobre características de mandarina 'Yashar', particularmente el número de semillas, para elegir el mejor polinizador.

## Materiales y métodos

### Sitio de la investigación

El estudio se condujo en dos experimentos separados en árboles de mandarina 'Yashar' maduros e injertados sobre portainjertos de naranja agria idénticos y sanos en cuanto a su condición de crecimiento, en el Instituto de Investigaciones de Cítricos de la ciudad de Ramsar, Mazandaran, Irán. Ramsar es considerada una región subtropical por su clima. Se ubica en la longitud 50.65° este y la latitud 36.90° norte a 20 m s. n. m. Las temperaturas promedio, máxima y mínima, son 35 y -2 °C, respectivamente, y la precipitación anual es de entre 800 y 1,500 mm.

### Primer experimento

En el primer experimento (realizado en 2018) se evaluó el efecto de granos de polen de diversos cultivares de cítricos (naranjas 'Valencia', 'Hamlin' y agria), así como la polinización libre (grupo testigo), sobre el carpelo de mandarina 'Yashar' bajo un diseño en bloques completamente aleatorizados, con cuatro tratamientos y tres repeticiones.

#### *Selección de árboles de mandarina 'Yashar' para polinización*

Se seleccionaron 12 árboles sanos de la parcela 'Yashar' (Figura 2A) y se marcaron en términos de tasa de crecimiento, tamaño, forma de la copa y tipo de portainjertos. Estos árboles se propagaron mediante estacas, usando un árbol de naranja agria como portainjertos.

#### *Selección de árboles polinizadores*

Para elegir los cultivares polinizadores, se buscaron cultivares que estuvieran libres de plagas y enfermedades, y que tuvieran pocas o muchas semillas (llenos de semillas).

while their opening stage was close enough. They were collected, their anthers were separated and kept in Petri dishes. The anthers were split after 24 h at ambient room temperature (24 to 26 °C), and their pollen grains were released (Figures 2B and C). By selecting the flowers from the desired trees, the flowers were castrated (Figure 2D) and then the packing operation was performed. After the pistil preparation in 'Yashar' mandarin, the pollen of the cultivars was transferred to them (Figure 2E), and they were covered again with paper bags (Figure 2F). Four to five days after inoculation, the bags were opened, and the numbers of formed fruits were counted. In order to prevent fruits from falling or being picked, they were covered with plastic nets (Figure 2G).

### *Measured characteristics*

The fruits were harvested after ripening (harvest index was proportion of TSS to TA), and they were transferred to the Plants Breeding and Seed and Scion Preparation laboratory of the Department of Citrus Research Institute, Ramsar, Iran. At the laboratory, different characteristics such as weight, length, diameter, skin thickness and fruit volume, number of seeds, percentage of fruit juice, vitamin C in fruit flesh, total phenol in the flesh, the antioxidant capacity of flesh, TSS, TA, technology index and vividness of fruit skin were measured.

### **Second experiment**

In the second experiment (done on 2019), the impact of foliar spraying of copper sulfate at the rate of 25 mg·L<sup>-1</sup> was conducted at stages of 30, 60 and 80 % of blossoming fruit flowers and a free pollination treatment (control) was evaluated in randomized completely block design with four treatments and three replications.

### *Selecting 'Yashar' mandarin trees for foliar spraying*

From the trees in the 'Yashar' plot, 12 healthy and uniform trees with the age of 15-16 years were marked in terms of growth rate, size and shape of the crown and even equality in the rootstocks. All of these trees were reproduced by bud grafting on a sour orange tree.

### *Time of spraying*

Foliar spraying of 25 mg·L<sup>-1</sup> copper sulfate (with the use of water) was conducted in May at three different times. The first time was done on May 10<sup>th</sup>, while 30 % of the flowers were opened. The second time was on May 14<sup>th</sup>, when 60 % of the flowers were opened. The last time

### *Polinización manual*

Para esta etapa, se seleccionaron 100 flores de cada combinación, y se aislaron con bolsas claras enceradas 24 h antes de la expectativa que los pétalos abrieran. Al mismo tiempo, se colectaron las flores de los cultivares 'Valencia', 'Hamlin' y naranja agria cuando su etapa de apertura estaba lo suficientemente cerca. Las anteras se separaron y se mantuvieron en cajas de Petri. Después de 24 h, las anteras se cortaron a temperatura ambiente (24 a 26 °C) y se liberaron sus granos de polen (Figuras 2B y C). Una vez seleccionadas las flores que se deseaban polinizar, estas se emascularon (Figura 2D) y se empacaron. Después de la preparación del pistilo en mandarinas 'Yashar', se les transfirió el polen de los cultivares (Figura 2E) y se cubrieron de nuevo con bosas de papel (Figura 2F). De cuatro a cinco días después de la inoculación, se abrieron las bolsas y se contaron los frutos formados. Para evitar que los frutos cayeran o los cosecharan, se cubrieron con redes de plástico (Figura 2G).

### *Características evaluadas*

Los frutos se cosecharon después de la maduración (el indicador de cosecha fue la proporción de los SST frente a la AT) y se transfirieron al Laboratorio de Mejoramiento Genético de Plantas y Preparación de Semillas y Vástagos del Departamento del Instituto de Investigación de Cítricos, Ramsar, Irán. En el laboratorio se midió el peso, la longitud, el diámetro, el grosor de la piel, el volumen del fruto, el número de semillas, el porcentaje de jugo del fruto, la concentración de vitamina C en la pulpa del fruto, los fenoles totales en la pulpa, la capacidad antioxidante de la pulpa, los SST, la AT, el índice tecnológico y el brillo de la piel del fruto.

### **Segundo experimento**

En el segundo experimento (realizado en 2019) se evaluó el impacto del asperjado foliar de 25 mg·L<sup>-1</sup> de sulfato de cobre en las etapas de 30, 60 y 80 % de las flores frutales en floración, así como el tratamiento de polinización libre (testigo). Esto se realizó bajo un diseño de bloques completamente aleatorizado, con cuatro tratamientos y tres repeticiones.

### *Selección de árboles de mandarina 'Yashar' para asperjado foliar*

De los árboles de la parcela "Yashar" se marcaron 12 árboles, con edades de entre 15 y 16 años, sanos y homogéneos en términos de tasa de crecimiento, tamaño, forma de la copa y tipo de portainjertos. Estos árboles se propagaron mediante yema en un árbol de naranja agria.



**Figure 2.** The process of artificial cross pollination. A) 'Yashar' mandarin tree, B) collection of pollen grains, C) preparation of pollen grains, D) castration of flowers, E) manual pollination, F) operation of hybridizing and packaging, and G) fruits covered with plastic nets.

**Figura 2.** Proceso de polinización artificial cruzada. A) Árbol de mandarina 'Yashar', B) recolección de granos de polen, C) preparación de granos de polen, D) emasculación de flores, E) polinización manual, F) operación de hibridación y empaque, y G) frutos cubiertos con redes de plástico.

was on May 17<sup>th</sup>, when 80 % of the flowers were opened. Foliar spraying was done in the morning while it was sunny and there was no wind, and it was done by using low-pressure hand sprayer.

#### *Measured characteristics*

In this experiment, the same characteristics were evaluated as in the previous one. A digital caliper (Digit-Cal, Switzerland) with an accuracy of 0.01 mm was used to measure length, diameter and thickness characteristics. Fruit weight was measured with a digital scale with an accuracy of 0.01 g. To measure fruit volume, water displacement was used as well. In order to measure the volume of fruits, each fruit was immersed in a beaker containing 1 L of water one by one. Then the content of each fruit in mL was obtained by measuring the amount of water poured down with the help of a measuring cylinder. At the midpoint of the fruit, the vividness of the skin was measured by using a chromometer (CR400-Minolta, Japan) (Alinezhad-Jahromi et al., 2019).

With the help of a juicer, the fruit extract was extracted, and its amount was measured using a measuring cylinder. In order to measure TSS, optical refractometer (Atago-ATC-20E, Japan) with a range of 0 to 20 % was used. In this regard, a drop of fruit extract was placed on the device, and its Brix degree was read. To measure titrable acidity, 10 mL of fruit juice was mixed with 20 mL of distilled water, and two-three drops of phenolphthalein were added to it. Then the resulting mixture was titrated into pink by using a digital burette (Rudolf Brand) containing sodium hydroxide 0.1 N. By placing the volume of sodium hydroxide 0.1 N in the following formula, the titrable acidity was obtained based on the percentage of citric acid (Alinezhad-Jahromi et al., 2019).

$$TA = 0.064 \times \text{Volume of consumed sodium hydroxide}$$

The technology index was obtained by multiplying the percentage of the extract in TSS divided by 100 (Castricini, Silva, Silva, & Rodrigues, 2017).

$$\text{Technology index} = \frac{TSS \times \text{Fruit juice percentage}}{100}$$

After some initial evaluations, an amount of the fruit flesh was sampled for chemical tests, and then it was placed in a freezer at -80 °C. The 1 g of flesh tissue was mixed separately in 2 mL of methanol, and after being squished, the samples were kept in a refrigerator for 24 h. Then, the samples were centrifuged for 10 min at 6,000 rpm. The supernatant of the samples was gently removed with a sampler, and it was placed in tubes with lids, and it was kept at -20 °C for further measurements.

#### *Tiempo de aspersión*

El asperjado foliar de 25 mg·L<sup>-1</sup> de sulfato de cobre (con agua) se realizó en mayo en tres ocasiones distintas. La primera tuvo lugar el día 10, cuando 30 % de las flores estaban abiertas. La segunda fue el día 14, con 60 % de las flores abiertas. La última fue el día 17, cuando el 80 % de las flores se encontraban abiertas. El asperjado foliar se realizó con un aspersor manual de baja presión durante la mañana, mientras estaba soleado y no había viento.

#### *Características evaluadas*

En el segundo experimento se evaluaron las mismas características que en el primero. Para medir la longitud, el diámetro y el grosor se utilizó un vernier digital (Digit-Cal, Suiza) con una precisión de 0.01 mm. El peso de los frutos se midió en una báscula digital con precisión de 0.01 g. Para determinar el volumen de los frutos, se utilizó el desplazamiento de agua: cada fruto se sumergió (uno a la vez) en un vaso de precipitados que contenía 1 L de agua; posteriormente, se obtuvo el volumen de cada fruta en mL a partir del agua derramada con ayuda de una probeta graduada. El brillo de la piel se midió en el punto medio de la fruta con un colorímetro (CR400-Minolta, Japón) (Alinezhad-Jahromi et al., 2019).

El extracto de la fruta se obtuvo con un exprimidor, y el volumen se midió en una probeta. Para medir los SST se utilizó un refractómetro óptico (Atago-ATC-20E, Japón) con un rango de 0 a 20 %. Para ello, se colocó una gota del extracto de la fruta en el aparato y se leyeron los °Brix. Para determinar la AT, se mezclaron 10 mL del jugo de la fruta con 20 mL de agua destilada, y se le añadieron de dos a tres gotas de fenolftaleína; la mezcla resultante se tituló con una bureta digital (Rudolf Brand) que contenía hidróxido de sodio al 0.1 N. La AT se obtuvo a partir del porcentaje de ácido cítrico y el gasto de hidróxido de sodio (Alinezhad-Jahromi et al., 2019).

$$AT = 0.064 \times \text{Volumen consumido de hidróxido de sodio}$$

El índice tecnológico se obtuvo de acuerdo con lo reportado por Castricini, Silva, Silva, y Rodrigues (2017) mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Índice tecnológico} = \frac{SST \times \text{Porcentaje de jugo de fruta}}{100}$$

Después de algunas evaluaciones iniciales, se tomó una muestra de la pulpa de los frutos para realizar pruebas químicas, y luego se colocó en un congelador a -80 °C. Se mezcló, por separado, 1 g de tejido de pulpa en 2 mL de metanol y, después de prensarlas, las muestras se guardaron en un refrigerador durante 24 h. Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 6,000 rpm. El sobrenadante de las muestras se retiró cuidadosamente con una pipeta, se colocó en

Total phenol was measured by the Folin-ciocalteu method (Aksoy, Kolay, Ağılönü, Aslan, & Kargioğlu, 2013). In this regard, 250 µL of 10 % Folin was added to 200 µL of centrifuged methanolic extract. After 5 min, 200 µL of 7 % sodium carbonate was added to the mixture. After keeping it at room temperature for 90 min in a dark condition. The absorbance rate of the extract was read at 675 nm using a Nano-drop spectrophotometer (1000-ND, USA). Total phenol content obtained from the standard curve equation was measured as milligrams of gallic acid (mg·g<sup>-1</sup>).

The antioxidant capacity of fruit flesh (%) was measured by the free radical scavenging of DPPH (2, 2-diphenyl, 1-picryl hydrazyl) method (Aksoy et al., 2013). Therefore, 50 µL of methanolic extract extracted from fruit flesh were diluted in 450 µL of distilled water. After vortexing, 25 µL of the resulting dilution was removed and poured into a tube with a lid. Then, 100 µL of DPPH was added to the aforementioned solution, and the resulting solution was kept at room temperature for 20 min in a dark condition. The absorption rate of DPPH and the prepared samples at 517 nm were read by using a Nano-drop spectrophotometer (ND-1000 model, USA). Vitamin C was used to prepare standard curve (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995).

Vitamin C was measured by titration with dichlorophenol-indophenol solution (Mazumdar, & Majumder, 2003). At first, 1 g of the sample was weighed, and it was poured into a Falcon 15 mL tube; then, 3 mL of 3 % metaphosphoric acid was added and squished. Then, it was stored in a refrigerator for 15 to 20 min at 4 °C. The aforementioned solution was centrifuged, and 3 mL of it was taken. It was poured into a beaker and a magnet was placed in it. With a digital burette, dichloroindophenol solution was added until pink appeared, and the burette number was recorded. The amount of vitamin C (mg·100 g<sup>-1</sup> fresh weight) was calculated using the following formula:

$$\text{Vitamin C} = \frac{e \times d \times b}{c \times a} \times 100$$

where *a* is the weight of the sample, *b* is metaphosphoric volume used for extraction, *c* is the volume of solution consumed for titration, *d* is the colour factor (amount of solution used for titration), and *e* is the volume of colour solution used for each sample.

#### Data analysis

The obtained data were first recorded in Excel software. Then, the statistical analysis was performed using MSTATC software (MSTAT-C, 1991). Duncan test (*P* < 0.05) was used to find out the significance of differences among the mean value.

tubos con tapa y se conservó a -20 °C para mediciones posteriores.

Los fenoles totales se determinaron con el método Folin-ciocalteu (Aksoy, Kolay, Ağılönü, Aslan, & Kargioğlu, 2013). Se agregaron 250 µL de solución Folin al 10 % a 200 µL de extracto metanólico centrifugado. Después de 5 min, se agregaron 200 µL de carbonato de sodio al 7 % a la mezcla y se mantuvo a temperatura ambiente durante 90 min en condiciones de oscuridad. La tasa de absorbancia del extracto se leyó a 675 nm en un espectrofotómetro Nano-drop (1000-ND, EUA). El contenido de fenoles totales obtenido a partir de la ecuación de la curva estándar se reportó en miligramos de ácido gálico (mg·g<sup>-1</sup>).

La capacidad antioxidante de la pulpa fresca (%) se midió por el método de eliminación de radicales libres DPPH (2,2-difenil, 1-picirilhidrazilo) (Aksoy et al., 2013). Para ello, se diluyeron 50 µL de extracto metanólico de pulpa de los frutos en 450 µL de agua destilada. Después de mezclar en el vórtex, se removieron 25 µL de la dilución resultante y se vertieron en un tubo con tapa. Posteriormente, se añadieron 100 µL de DPPH a la solución anterior y se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 min en oscuridad. La tasa de absorción del DPPH y de las muestras preparadas se leyeron a 517 nm en un espectrofotómetro Nano-drop (ND-1000, EUA). Se usó la vitamina C para preparar la curva estándar (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995).

La concentración de vitamina C se midió por titulación con solución diclorofenol-indofenol (Mazumdar, & Majumder, 2003). Primero, se pesó 1 g de muestra y se colocó en un tubo Falcon de 15 mL; posteriormente, se agregaron 3 mL de ácido metafosfórico al 3 %, se exprimó y se almacenó la muestra en un refrigerador durante 15 a 20 min a 4 °C. Transcurrido el tiempo, la mezcla se centrifugó, se tomaron 3 mL y se vertieron en un vaso de precipitados que contenía un imán en su interior. Se agregó una solución de dicloroindofenol con una bureta digital hasta cambio a color rosa y se registró el gasto obtenido. La cantidad de vitamina C (mg·100 g<sup>-1</sup> de peso fresco) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Vitamina C} = \frac{e \times d \times b}{c \times a} \times 100$$

Donde *a* es el peso de la muestra, *b* es el volumen de ácido metafosfórico utilizado para extracción, *c* es el volumen de solución en la titulación, *d* es el factor de color (cantidad de solución utilizada para la titulación) y *e* es el volumen de la solución de color utilizado para cada muestra.

#### Análisis de datos

Los datos obtenidos se registraron en el programa Excel. Posteriormente, el análisis estadístico se desarrolló



## Results

### First experiment

#### Number of seed

The mean comparison showed that the lowest number of seeds was obtained in 'Yashar' mandarin pollinated by 'Valencia' orange (Table 1). This result showed that compatible pollen grains and sufficient pollinators were available in the plot where the experiment took place.

#### Morphological characteristics

In the present study, there was no significant difference between weight, diameter and volume of fruit and fruit juice percentage in pollinated flowers by different pollen grains and self-pollinated flowers. However, the highest fruit weight, fruit diameter and fruit volume were obtained in fruits pollinated with 'Valencia' orange pollen grains, and the highest percentage of juice was recorded in pollinated flowers with sour orange pollen grains (Table 1). Free-pollinated or self-pollinating flowers had the lowest values for characteristics like weight, length, diameter and volume of fruit and the percentage of fruit juice.

utilizando el programa MSTATC (MSTAT-C, 1991). La prueba de Duncan ( $P < 0.05$ ) se utilizó para averiguar la significancia de las diferencias entre los valores de las medias.

## Resultados

### Primer experimento

#### Número de semillas

La comparación de medias mostró que el número de semillas más bajo se obtuvo con mandarina 'Yashar' polinizada con naranja 'Valencia' (Cuadro 1). Este resultado mostró la disponibilidad de granos de polen compatibles y polinizadores suficientes durante el experimento.

#### Características morfológicas

En el presente estudio, no hubo diferencias significativas entre el peso, el diámetro y el volumen del fruto, y el porcentaje de jugo del fruto en flores polinizadas por diferentes granos de polen y flores auto-polinizadas. Sin embargo, los mayores pesos, diámetros y volúmenes de fruto se obtuvieron en frutos polinizados con granos de polen de naranja 'Valencia', y el mayor porcentaje de

**Table 1. Mean comparison of the effect of pollination by pollen grains of 'Valencia' orange, 'Hamlin' orange and sour orange on seed number and some morphologic and physiologic traits of 'Yashar' mandarin.**

**Cuadro 1. Comparación de medias del efecto de la polinización con granos de polen de naranja 'Valencia', 'Hamlin' y naranja agria sobre el número de semillas, y algunos rasgos morfológicos y fisiológicos de la mandarina 'Yashar'.**

Treatment / Tratamiento	Fruit weight (g)/ Peso del fruto (g)	Fruit length (mm)/ Longitud de fruto (mm)	Fruit diameter (mm)/ Diámetro del fruto (mm)	Fruit skin thickness (mm)/ Grosor de la piel del fruto (mm)	Fruit volume (mL)/ Volumen del fruto (mL)	Seed number / Número de semillas	Fruit juice (%) / Jugo del fruto (%)	Flesh vitamin C (mg·100 g <sup>-1</sup> ) / Vitamina C de la pulpa (mg·100 g <sup>-1</sup> )	Flesh total phenol (mg·100 g <sup>-1</sup> ) / Fenoles totales de la pulpa (mg·100 g <sup>-1</sup> )	Flesh antioxidant capacity (%) / Capacidad antioxidante de la pulpa (%)	Total soluble solids (%) / Sólidos solubles totales (%)	Titration acidity (%) / Acidez titulable (%)	Technology index / Índice tecnológico	Skin vividness / Brillo de la piel
Testigo / Control	130.80 a <sup>2</sup>	56.54 b	56.75 a	3.06 a	110.00 a	24.07 a	52.30 a	65.47 a	84.23 a	0.51 a	13.17 b	1.94 a	6.89 b	57.72 a
'Hamlin'	142.10 a	57.72 b	67.87 a	2.03 b	133.60 a	19.47 a	71.45 a	45.09 b	77.43 a	0.65 a	13.61 a	2.12 a	9.72 a	60.58 a
'Valencia'	171.00 a	65.13 a	73.14 a	2.59 a	167.00 a	18.73 a	63.32 a	45.72 b	90.13 a	0.55 a	12.28 d	2.12 a	7.78 ab	58.30 a
Naranja agria	168.20 a	61.45 ab	70.31 a	3.08 a	150.70 a	20.77 a	77.56 a	42.60 c	88.33 a	0.57 a	12.86 c	1.86 a	9.97 a	56.88 a
CV (%)	11.30	5.01	4.49	14.56	20.45	9.30	13.53	12.84	7.43	20.99	1.80	11.38	12.69	3.32

<sup>2</sup>Means with different letters on the same column are significantly different (Duncan,  $P \leq 0.05$ ).

<sup>2</sup>Medias con la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Duncan,  $P \leq 0.05$ ).

Based on the results of the analysis of variance, fruit length and thickness of fruit skin were significantly affected by pollen grain sources ( $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ ). The highest fruit length and the highest thickness of fruit skin in pollinated flowers with 'Valencia' oranges and sour oranges were obtained, respectively. The minimum thickness of the fruit skin was estimated in pollinated flowers with 'Hamlin' orange pollen grains (Table 1).

### *Physiological characteristics*

There was no significant difference between skin vividness, total phenol content, and antioxidant capacity in flowers pollinated by different pollen grains and self-pollinated flowers. The highest antioxidant capacity with the highest vividness of skin was recorded in pollinated flowers with 'Hamlin' orange pollen grains as well (Table 1).

Based on the results of the analysis of variance, the amount of vitamin C and SST as well as the technology index (sequentially,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ ) were influenced by pollen grain sources (Table 1). The highest amount of vitamin C and SST, respectively, were found in self-pollinated flowers and pollinated flowers with 'Hamlin' orange pollen grains. The highest technology index was recorded in pollinated flowers with sour orange and 'Hamlin' orange pollen grains. Also, the lowest technology index was obtained in pollinated flowers with free pollen grains.

## **Second experiment**

### *Number of seed*

The results of analysis of variance showed that foliar spraying with copper sulfate at different stages of flower opening had a significant effect on seed number ( $P < 0.01$ ). The analysis of mean comparison showed that the seed number produced in fruits of flowers treated with copper sulfate in all stages of flower opening (30, 60 and 80 %) were less than the number of seeds produced in fruits from flowers in the control group (Table 2, Figure 3). The lowest number of seeds was obtained in 'Yashar' mandarin while they were treated with copper sulfate at the stage when 30 % of flowers were opening.

### *Morphological characteristics*

The highest fruit length, fruit weight and fruit volume were recorded in flowers sprayed with copper sulfate at the stage when 60 % of flowers were opening, y the highest fruit skin thickness was recorded in flowers sprayed at the stage when 30 % of flowers were opening (Table 2). Changes were insignificant regarding the characteristics of those products sprayed with copper

jugo se registró en flores polinizadas con granos de polen de naranja agria (Cuadro 1). Las flores de polinización libre, o auto-polinizadas, presentaron los valores más bajos en dichas características y en longitud de fruto.

De acuerdo con los resultados del análisis de varianza, la longitud del fruto y el grosor de su piel fueron afectados significativamente por el origen de los granos de polen ( $P < 0.01$  y  $P < 0.05$ ). La mayor longitud y el mayor grosor de la piel del fruto se obtuvieron en flores polinizadas con naranjas 'Valencia' y naranjas agrias, respectivamente. El menor grosor se observó en flores polinizadas con granos de polen de naranja 'Hamlin' (Cuadro 1).

### *Características fisiológicas*

No hubo diferencias significativas entre el brillo de la piel, el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante en flores polinizadas por diferentes granos de polen y flores auto-polinizadas. La mayor capacidad antioxidante y el mayor brillo de la piel se registró en las flores polinizadas con granos de polen de naranja 'Hamlin' (Cuadro 1).

Con base en los resultados del análisis de varianza, la cantidad de vitamina C y de SST, así como el índice tecnológico ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$  y  $P < 0.05$ , respectivamente) fueron influenciados por los diferentes tipos de granos de polen (Cuadro 1). La cantidad más alta de vitamina C y SST se encontró en flores auto-polinizadas y flores polinizadas granos de polen de naranja 'Hamlin', respectivamente. El índice tecnológico más alto se observó en las flores polinizadas con granos de polen de naranja agria y naranja 'Hamlin', y el índice tecnológico más bajo se obtuvo en flores auto-polinizadas.

## **Segundo experimento**

### *Número de semillas*

Los resultados del análisis de varianza mostraron que el asperjado foliar con sulfato de cobre en distintas etapas de apertura de las flores tuvo un efecto significativo sobre el número de semillas ( $P < 0.01$ ). En el análisis de comparación de medias se puede observar que el número de semillas producido en los frutos de las flores tratadas con sulfato de cobre, en todas las etapas de apertura de flor (30, 60 y 80 %), fue menor que el número de semillas producido en los frutos de flores testigo (Cuadro 2, Figura 3). El menor número de semillas se obtuvo en las mandarinas 'Yashar' tratadas con sulfato de cobre en la etapa de apertura de 30 % de las flores.

### *Características morfológicas*

El mayor peso, longitud y volumen de fruto se registraron en las flores asperjadas con sulfato de cobre en la fase de apertura de 60 % de las flores, y el

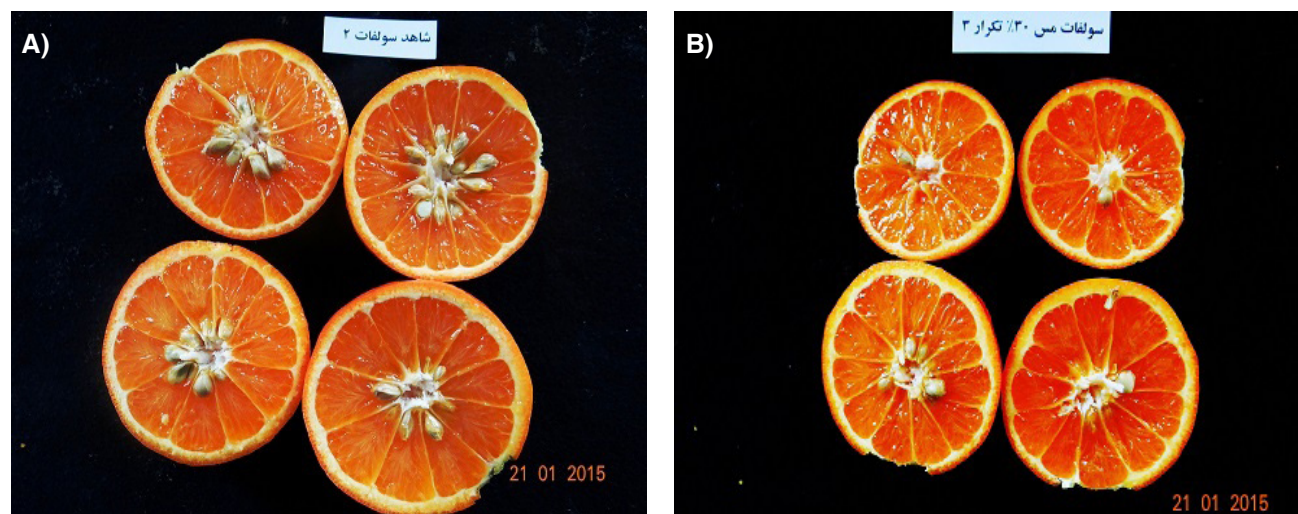
**Table 2. Mean comparison of the effect of spraying copper sulfate (25 mg·L<sup>-1</sup>) in three times (30, 60, and 80 % flowers opening) on seed number, and some morphologic and physiologic traits of 'Yashar' mandarin.**

**Cuadro 2. Comparación de medias del efecto de la aspersión foliar con sulfato de cobre (25 mg·L<sup>-1</sup>) en tres ocasiones (30, 60 y 80 % de las flores abriendo) sobre el número de semillas, y algunas características morfológicas y fisiológicas de mandarina 'Yashar'.**

Treatment/ Tratamiento	Fruit weight (g)/ Peso del fruto (g)	Fruit length (mm)/ Longitud de fruto (mm)	Fruit diameter (mm)/ Diámetro del fruto (mm)	Fruit skin thickness (mm)/ Grosor de la piel del fruto (mm)	Fruit volume (mL)/ Volumen del fruto (mL)	Seed number/ Número de semillas	Fruit juice (%)/ Jugo del fruto (%)	Flesh vitamin C (mg·100 g <sup>-1</sup> )/ Vitamina C de la pulpa (mg·100 g <sup>-1</sup> )	Flesh total phenol (mg·100 g <sup>-1</sup> )/ Fenoles totales de la pulpa (mg·100 g <sup>-1</sup> )	Flesh antioxidant capacity (%)/ Capacidad antioxidante de la pulpa (%)	Total soluble solids (%)/ Sólidos solubles totales (%)	Titration acidity (%)/ Acidez titulable (%)	Technology index/ Índice tecnológico	Skin vividness/ Brillo de la piel
Testigo/ Control	165.20 a <sup>2</sup>	60.21 a	71.06 a	2.58 a	153.50 a	25.93 a	73.15 a	58.19 a	67.83 a	0.48 a	13.02 a	1.86 a	9.52 a	59.38 bc
30	150.40 a	58.28 a	67.65 ab	2.76 a	140.00 a	17.48 c	60.02 b	47.23 a	68.32 a	0.60 a	12.20 a	1.84 a	8.21 b	59.95 b
60	167.20 a	61.44 a	71.49 a	2.52 a	195.60 a	19.05 bc	76.42 a	50.80 a	85.28 a	0.51 a	13.10 a	1.87 a	10.01 a	57.62 c
80	140.50 a	56.56 a	65.04 b	2.35 a	121.40 a	20.42 b	55.62 b	57.53 a	81.17 a	0.58 a	12.99 a	1.79 a	7.24 b	62.09 a
CV (%)	16.09	3.98	3.23	13.55	27.90	5.15	10.21	22.25	13.80	29.67	3.44	4.31	10.61	1.69

<sup>2</sup>Means with different letters on the same column are significantly different (Duncan,  $P \leq 0.05$ ).

<sup>2</sup>Medias con la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Duncan,  $P \leq 0.05$ ).



**Figure 3. A) Seed number in control plant (without treatment with copper sulfate), and B) seed number in fruits treated with copper sulfate through 30 % flowers opening.**

**Figura 3. A) Número de semillas en la planta testigo (sin tratamiento con sulfato de cobre) y B) número de semillas en frutos tratados con sulfato de cobre durante la etapa de 30 % de apertura de las flores.**

sulfate and those in the control group. The lowest fruit length, fruit weight and fruit skin thickness were observed in flowers sprayed with copper sulfate in the stage when 80 % of flowers were opening.

Based on the results of the analysis of variance, fruit diameter and fruit juice percentage were significantly ( $P < 0.05$ ) affected by foliar spraying with copper sulfate at different stages. The highest fruit diameter

mayor grosor de la piel del fruto se registró en las flores rociadas en la fase de apertura de 30 % de las flores, aunque sin diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Cuadro 2). Los valores más bajos en dichas variables se observaron cuando las flores se asperjaron en la fase de apertura de 80 % de las flores.

Con base en los resultados del análisis de varianza, el diámetro y el porcentaje de jugo del fruto fueron

(71.49 mm) and the percentage of fruit juice (76.42 mL) were obtained in flowers sprayed with copper sulfate in the stage when 60 % of flowers were opening (Table 2). The differences were insignificant in these two characteristics of flowers sprayed with copper sulfate with the highest value and those in the control group. The lowest fruit diameter (65.04 mm) and fruit juice percentage (55.62) were recorded in flowers sprayed with copper sulfate at the stage when 80 % of flowers were opening.

### *Physiological characteristics*

There was no significant difference between vitamin C of fruit flesh, total phenol of fruit flesh, the antioxidant capacity of fruit flesh, SST and TA of the fruit in flowers that were sprayed with copper sulfate in different stages when the different percentage of flowers were opening. However, the highest phenols of fruit flesh, SST and TA were found in flowers sprayed with copper sulfate at the stage when 60 % of flowers were opening (Table 2). The highest oxidative capacity was found in flowers sprayed with copper sulfate at the stage when 30 % of flowers were opening, and the highest amount of vitamin C was observed in the fruits of the control group.

The lowest phenol and antioxidant capacity of fruit flesh in the control group, the lowest SST and vitamin C in flowers sprayed with copper sulfate at the stage when 30 % of flowers were opening, and the lowest titrable acidity in flowers sprayed with copper sulfate at the stage when 80 % of flowers were opening were recorded (Table 2).

The flowers sprayed with copper sulfate in the stage when 60 % of the flowers were opening had the highest technology index (10.01). In comparison, the flowers sprayed with copper sulfate in the stage when 80 % of the flowers were opening had the lowest index of technology. Furthermore, the highest degree of fruit skin vividness was recorded in flowers that were sprayed with copper sulfate in the stage when 80 % of them were opening. In comparison, the lowest degree of fruit skin vividness was reported in flowers sprayed with copper sulfate at the stage when 60 % of them were opening (Table 2).

## **Discussion**

### **First experiment**

The direct impacts of pollen grains on fruit characteristics and seed formation were reported in other kinds of citrus. According to the results of the study of Alinezhad-Jahromi et al. (2019), the most and the least number of seeds were obtained from pollinated flowers by 'Lisbon' lemon pollen grains

afectados significativamente ( $P < 0.05$ ) por la aspersión foliar con sulfato de cobre en diferentes etapas. El mayor diámetro de fruto (71.49 mm) y porcentaje de jugo de fruto (76.42 mL) se obtuvieron en las flores asperjadas con sulfato de cobre en la etapa de apertura de 60 % de las flores (Cuadro 2), sin diferencias significativas con respecto al testigo. El diámetro y el porcentaje de jugo de fruto más bajos (65.04 mm y 55.62 %, respectivamente) se registraron en las flores asperjadas con sulfato de cobre en la etapa de apertura de 80 % de las flores.

### *Características fisiológicas*

No se observaron diferencias significativas en cuanto a la vitamina C, los fenoles totales, la capacidad antioxidante, los SST y la AT de la fruta de flores asperjadas con sulfato de cobre y la testigo. Sin embargo, los mayores valores de fenoles totales, SST y AT se encontraron en los frutos de flores tratadas con sulfato de cobre en la fase de apertura del 60 % de las flores (Cuadro 2). Mientras que, la mayor capacidad oxidativa se encontró en las flores rociadas con sulfato de cobre en la fase de apertura de 30 % de las flores, y la mayor concentración de vitamina C se observó en los frutos testigo.

Los valores más bajos de fenoles totales y capacidad antioxidante se registraron en el grupo testigo, mientras que los valores más bajos de SST y vitamina C se presentaron en las flores rociadas con sulfato de cobre en la fase de apertura del 30 %, y los valores más bajos de AT se registraron en las flores rociadas en su fase de apertura del 80 % (Cuadro 2).

En cuanto al índice tecnológico, el tratamiento con la aspersión de sulfato de cobre en la etapa de apertura del 60 % de las flores fue significativamente mayor al resto de los tratamientos (10.01). Por el contrario, las flores rociadas en la etapa de apertura del 80 % presentaron el menor índice. El mayor grado de brillo de la piel del fruto se registró en las flores asperjadas en la fase de apertura del 80 %, y el grado más bajo se registró en las flores rociadas en la fase en la que el 60 % de ellas se estaban abriendo (Cuadro 2).

## **Discusión**

### **Primer experimento**

Los impactos directos de los granos de polen sobre las características del fruto y la formación de semillas se reportaron en otras especies de cítricos. De acuerdo con los resultados obtenidos por Alinezhad-Jahromi et al. (2019), las cantidades mayores y menores de semillas se obtuvieron de flores polinizadas por granos de polen de limón 'Lisboa' y de flores auto-polinizadas, respectivamente. De acuerdo con Vithanage (1991), el tangor 'Ellendale' auto-polinizado produjo menos

and self-pollinated flowers, respectively. According to Vithanage (1991), the self-pollinating tangor 'Ellendale' produced fewer fruits and seeds, while pollinating with pollen grains of 'Murcott' and 'Emperor' resulted in larger fruits with more seeds. 'Shaddock' fruits showed the highest number of seeds after cross-pollination with 'Balady' mandarin, while grapefruit-pollinated flowers had larger, heavier and highest quality (Atawia et al., 2016).

According to the outcomes of the present study, with increasing the quantity of characteristics in 'Yashar' mandarin, 'Valencia' orange and in most physiological characteristics, 'Hamlin' orange and sour orange are suggested as suitable pollinators. Fruits with free-pollinated or self-pollinated flowers had the lowest values in most morphological and physiological characteristics. Similar results were reported from some other citrus fruits (Talaie et al., 2002; Mesejo et al., 2013; Atawia et al., 2016; Alinezhad-Jahromi et al., 2019). The type of pollen grain plays an important role in the number of seeds produced in hybrid fruits and the quantitative and qualitative characteristics of the fruit (Atawia et al., 2016; Alinezhad-Jahromi et al., 2019).

Direct impacts of pollen grain sources on qualitative fruit characteristics of other citrus fruits including *C. reticulata* (Wallace & Lee, 1999), *C. aurantifolia* 'Swingle' (Kitat et al., 1994), *C. maxima* (Atawia et al., 2016) and *Citrus tangerina* 'Clementine' (Alinezhad-Jahromi et al., 2019) were reported. The impacts of different pollen grains on the quantitative and qualitative characteristics of 'Yashar' mandarin and other citrus fruits can be attributed to the phenomena of xenia and metaxenia.

The sour orange and 'Duncan' grapefruit pollen had more impacts on increasing the average length of 'Page' mandarin in comparison with the pollinating with the pollen grains of local mandarin, sweet lemon, 'Hamlin' orange and 'Mars' orange. The effect of 'Duncan' grapefruit pollen grain on the enhancement of SST in 'Page' mandarin fruit was higher than the pollen grain effect of 'Mars' orange, sour orange and sweet lemon (Golein et al. 2012). The impacts of pollination with different citrus seeds on quantitative characteristics such as weight, volume, length, the diameter of the fruit and fruit skin thickness had been shown (Golein et al. 2012).

Manual cross-pollination of 'Clementine' mandarin with a cluster lemons pollen increased the TSS in 'Clementine' mandarins compared to pollination with pollen grains of frost 'Valencia' orange, 'Siaervaz' local orange and sweet lemon (Asadi Abkenar, 1996).

The technology index is an important indicator in the citrus industry. A higher amount of it shows the better

frutos y semillas, mientras que la polinización con granos de polen de 'Murcott' y 'Emperador' resultó en frutos más grandes con más semillas. Por otro lado, los frutos de 'Shaddock' presentaron el mayor número de semillas tras la polinización cruzada con mandarina 'Balady', mientras que las flores polinizadas con pomelo produjeron frutos más grandes, pesados y de mayor calidad (Atawia et al., 2016).

De acuerdo con los resultados del presente estudio, debido al aumento en la cantidad de las características de la mandarina 'Yashar', la naranja 'Valencia' y, en la mayoría de las características fisiológicas, la naranja 'Hamlin' y la naranja agria se sugieren como polinizadores adecuados. Los frutos de flores de polinización libre o autógama presentaron los valores más bajos en la mayoría de las características morfológicas y fisiológicas. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros cítricos (Talaie et al., 2002; Mesejo et al., 2013; Atawia et al., 2016; Alinezhad-Jahromi et al., 2019). El tipo de grano de polen desempeña un papel importante en el número de semillas producidas en los frutos híbridos, así como en las características cuantitativas y cualitativas del fruto (Atawia et al., 2016; Alinezhad-Jahromi et al., 2019).

Se han reportado impactos directos de acuerdo con el origen de los granos de polen sobre las características cualitativas del fruto de otros cítricos, como *C. reticulata* (Wallace & Lee, 1999), *C. aurantifolia* 'Swingle' (Kitat et al., 1994), *C. maxima* (Atawia et al., 2016) y *Citrus tangerina* 'Clementine' (Alinezhad-Jahromi et al., 2019). Los impactos de diversos granos de polen sobre las características de la mandarina 'Yashar' y otros cítricos pueden ser atribuidos a los fenómenos de xenia y metaxenia.

Golein et al. (2012) menciona que el polen de la naranja agria y de la toronja 'Duncan' impactaron, con mayor intensidad, en el aumento de la longitud en mandarina 'Page', en comparación con la polinización con granos de polen de mandarina local, limón dulce, naranja 'Hamlin' y naranja 'Mars'. Asimismo, el polen de toronja 'Duncan' incrementó la concentración de SST en frutos de mandarina 'Page'. El mismo autor señala el impacto de la polinización con diversos cítricos sobre características como el peso, el volumen, el diámetro del fruto y el grosor de la piel del fruto.

La polinización cruzada manual de mandarina 'Clementine' con polen de limones agrupados incrementó los SST en estas mandarinas, en comparación con los granos de polen naranja 'Valencia' congelada, naranja local 'Siaervaz' y limón dulce (Asadi Abkenar, 1996).

El índice tecnológico es un indicador importante en la industria cítrica. Los valores mayores de éste se relacionan con una mejor calidad del jugo de la fruta; además, indica su idoneidad para la industria

quality of produced fruit juice, and it also indicates its suitability for conversion industries (Kluge, 2003). Due to the high technology index and the ripening time of 'Yashar' mandarin, it proves that it is the best for conversion industries. The effect of 'Salustiana' orange, 'Siaervaz' orange, and 'Shel Mahaleh' natural hybrid pollen has impacts on the increment of the vitamin C in 'Page' mandarin more than the effect of pollen grains of sweet lemons, local mandarin, sour oranges, 'Duncan' grapefruit, and 'Hamlin' oranges (Golein et al. 2012).

## Second experiment

In the present study, the positive effect of foliar spraying of copper sulfate on reducing the number of seeds in 'Yashar' mandarin was demonstrated. Foliar spraying at a concentration of 25 mg·L<sup>-1</sup> copper sulfate on the 'Afourer' mandarin tree at full flowering stage, decreased the number of seeds in each fruit and increased the percentage of seedless fruits (Mesejo et al., 2013). Copper sulfate treatment on 'Shiraz' black grape cultivar reduced the percentage of becoming seedless compared to the control group; besides, it increased vitamin C (Kyamarsi & Eshghi, 2011). In some studies, enhancement in seedless fruit percentage was reported while they are sprayed with copper sulfate (Ikeda, Ishikawa, Yazawaand, & Baba, 2002).

Foliar spraying with copper sulfate reduced the size and weight of some fruits, including grapes and wheat (Kyamarsi, & Eshghi, 2011; Yadavi, Maghsoudi, & Janzadeh-Deh Sheikh, 2019). Since, gibberellin is also produced in seeds, the reduction of seeds in the fruit has a negative effect on the production of gibberellin; in this regard, the reduction of seeds reduces the production and effect of gibberellin hormone; thus, it will reduce the weight and size of the fruit (Kyamarsi, & Eshghi, 2011). Applying copper sulfate in wheat reduced seedling weight and increased the amount of TSS in the fruit (Yadavi et al., 2019).

The use of copper in some plants stimulated the production of various secondary metabolites (Bamneshin, Hatamzadeh, Naqavi, & Mirjalili, 2019). Accordingly, copper has direct and indirect impacts on different genetic and epigenetic stages, and it causes changes in the quantitative and qualitative characteristics of plants.

## Conclusions

The result of current study demonstrated that 'Valencia' orange pollen grains produced 'Yashar' mandarin fruits with fewer seeds. The number of seeds produced in fruits of foliar sprayed flowers with copper sulfate at all stages when flowers were opening was less than the number of seeds in fruits of the control group (not being foliar sprayed with copper sulfate). The lowest number

de la transformación (Kluge, 2003). Debido al alto índice tecnológico y al tiempo de maduración de la mandarina 'Yashar', se considera que ésta es la mejor para las industrias de la transformación. De acuerdo con Golein et al. (2012), la influencia del polen de naranja 'Salustiana', naranja 'Siaervaz', y el polen híbrido natural 'Shel Mahaleh' impacta sobre el incremento de la vitamina C en mandarina 'Page', más que los granos de polen de limones dulces, mandarina local, naranjas agrias, toronja 'Duncan' y naranjas 'Hamlin'.

## Segundo experimento

En el presente estudio se demostró el efecto positivo del asperjado foliar de sulfato de cobre sobre la reducción del número de semillas en mandarina 'Yashar'. Mesejo et al. (2013) observaron que al asperjar 25 mg·L<sup>-1</sup> de sulfato de cobre sobre árboles de mandarina 'Afourer' en etapa de floración completa se disminuyó el número de semillas en cada fruto e incrementó el porcentaje de frutos sin semilla. Por otro lado, el tratamiento de sulfato de cobre sobre el cultivar de uva negra 'Shiraz' redujo el porcentaje de transformación hacia la ausencia de semillas en comparación con el grupo testigo; además, incrementó el contenido de vitamina C (Kyamarsi & Eshghi, 2011). En algunos estudios se reportó el aumento del porcentaje de frutos sin semilla cuando se realizaron aspersiones con sulfato de cobre (Ikeda, Ishikawa, Yazawaand, & Baba, 2002).

La aspersión foliar con sulfato de cobre redujo el tamaño y el peso de algunos frutos, incluyendo uvas y trigo (Kyamarsi, & Eshghi, 2011; Yadavi, Maghsoudi, & Janzadeh-Deh Sheikh, 2019). Dado que la giberelina también se produce mediante semillas, la reducción de semillas en los frutos puede tener un efecto negativo en su producción, ya que puede reducir la producción y el efecto de esta hormona, lo cual reduciría el peso y el tamaño del fruto (Kyamarsi & Eshghi, 2011). Yadavi et al. (2019) indican que la aplicación de sulfato de cobre en trigo redujo el peso de las plántulas e incrementó la cantidad de SST en el grano.

El uso de cobre en algunas plantas estimuló la producción de varios metabolitos secundarios (Bamneshin, Hatamzadeh, Naqavi, & Mirjalili, 2019). En consecuencia, el cobre tiene impactos directos e indirectos en diferentes etapas genéticas y epigenéticas, lo cual provoca cambios en las características cuantitativas y cualitativas de las plantas.

## Conclusiones

Los resultados de este estudio demostraron que los granos de polen de naranja 'Valencia' produjeron frutos de mandarina con menos semillas. Asimismo, el número de semillas en los frutos con flores asperjadas con sulfato de cobre en todas las etapas en que las flores estaban abriendo fue menor que el alcanzado

of seeds was obtained in 'Yashar' mandarin sprayed with copper sulfate when 30 % of flowers were opening.

In designing the 'Yashar' mandarin garden, it is necessary to evaluate the appropriate distance of this tree from other citrus trees. Also, the pollinators and other factors affecting pollination in the garden should be carefully managed.

#### End of English version

#### References / Referencias

- Aksoy, L., Kolay, E., Ağılönü, Y., Aslan, Z., & Kargioğlu, M. (2013). Free radical scavenging activity, total phenolic content, total antioxidant status, and total oxidant status of endemic *Thermopsis turcica*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 20(3), 235-239. doi: 10.1016/j.sjbs.2013.02.003
- Alinezhad-Jahromi, H., Zarei, A., & Mohammadkhani, A. (2019). Analysis the effects of pollen grain sources on the fruits set and their characteristics of 'Clementine' mandarin using microscopic and molecular approaches. *Scientia Horticulturae*, 249, 347-354. doi: 10.1016/j.scienta.2019.02.010
- Atawia, A. R., Abd EL-Latif, F. M., EL-Badawy, H. E., Abo-Aziz, A. B., Abou Rayya, M. S., Baiea, M. H., & Abdelkhalek, A. (2016). Effect of various pollination treatments on yield characteristics and fruit quality of shaddock fruits. *International Journal of Science and Engineering Research*, 7(5), 1-9. Retrieved from <https://www.ijser.org/researchpaper/Effect-of-various-pollination-treatments-on-yield-characteristics-and-fruit-quality-of-shaddock-fruits.pdf>
- Bamneshin, M., Hatamzadeh, A., Naqavi, M. R., & Mirjalili, M. H. (2019). The effect of copper sulphate elicitor on gene expression of TXS, DBAT, BAPT, DBTNB and biosynthesis of some taxanes in *Taxus baccata* L. cell culture. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 50(3), 51-62. doi: 10.22059/IJFCS.2018.245425.654403
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebens Wissen and Technology*, 28(1), 25-30. doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5
- Castricini, A., Silva, J. T., Silva, I. P., & Rodrigues, M. G. (2017). Quality of 'Tahiti' acid lime fertilized with nitrogen and potassium in the semiarid region of Minas Gerais. *Revista Brasilia Frutic*, 39(2), 288. doi: 10.1590/0100-29452017288
- Gambetta, G., Gravina, A., Fasiolo, C., Fornero, C., Galiger, S., Inzaurrealde, C., & Rey, F. (2013). Self-incompatibility, parthenocarpy and reduction of seed presence in 'Afourer' mandarin. *Scientia Horticulturae*, 164, 183-188. doi: 10.1016/j.scienta.2013.09.002

en el grupo testigo (sin aspersión foliar de sulfato de cobre). El menor número de semillas se obtuvo con mandarina 'Yashar' asperjada con sulfato de cobre cuando 30 % de las flores estaban abriendo.

Por lo anterior, se sugiere que cuando se diseñe una huerta de mandarina 'Yashar', se evalúe la distancia de este árbol a otros árboles de cítricos, además de los polinizadores y otros factores que pueden afectar la polinización en la huerta.

#### Fin de la versión en español

- Golein, B., Alian, Y. M., Ebrahimi, Y., & Nazerian, F. (2012). 'Yashar', a new late ripening mandarin hybrid. *Research Achievement for Field and Horticulture Crops*, 1(1), 11-25. doi: 10.22092/RAFHC.2012.100116
- Ikeda, F., Ishikawa, K., Yazawaand, S., & Baba, T. (2002). Induction of compact clusters with large seedless berries in the grape cultivar 'Fujiminori' by the use of streptomycin, gibberellins, and CPPU. *Acta Horticulturae*, 640, 251-256. doi: 10.17660/ActaHortic.2004.640.43
- Ioannis, E., Papadakis, E., Protopapadakis, E., & Ioannis, N. T. (2009). Yield and fruit quality of 'Nova' hybrid [*Citrus clementina* Hort. ex Tanaka (*C. reticulata* Blanco × *C. paradisi* Macfad)] and two 'Clementine' varieties (*C. clementina* Hort. ex Tanaka) as affected by self- and cross-pollination. *Scientia Horticulturae*, 121(1), 38-41. doi: 10.1016/j.scienta.2009.01.011
- Kitat, E. M., El-Azad, F. M., & Wehida, B. M. (1994). Metaxenia in lime (*Citrus aurantifolia* Swin). *Alexandria Journal of Agricultural Research*, 22, 85-90.
- Kluge, R. A. (2003). Temperatura de armazenamento de tangores 'Murcote' minimamente processados. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25(3), 535-536.
- Kyamarsi, M., & Eshghi, S. (2011). Effect of application time of copper sulfate, streptomycin and GA<sub>3</sub> on parthenocarpy and quality of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. 'Siyah-e-Shiraz'). *Journal of Horticultural Science*, 25(3), 344-350. doi: 10.22067/JHORTS4.V1390I0.11379
- Mazumdar, B. C., & Majumder, K. (2003). *Methods on physico-chemical analysis of fruits*. Daya Publishing House, New Delhi.
- Mesejo, C., Martínez-Fuentes, A., Reig, C., Rivas, F., & Agustí, M. (2013). The inhibitory effect of CuSO<sub>4</sub> on *Citrus* pollen germination and pollen tube growth and its application for the production of seedless fruit. *Plant Science*, 170(1), 37-43. doi: 10.1016/j.plantsci.2005.07.023
- MSTAT-C (1991). *A software program for the design, management and analysis of agronomic research experiments*. Michigan State University, East Lansing, USA.
- Talaie, A., Golein, B., Ebrahimi, Y., & Vezvaei, A. (2002). Investigation and inducing the appropriate pollen for

- 'Page' mandarin. *Iranian Journal of Agricultural Science*, 33, 171-177.
- Vithanage, V. (1991). Effect of different pollen parents on seediness and quality of 'Ellendale' tangor. *Scientia Horticulturae*, 48(3-4), 253-260. doi: 10.1016/0304-4238(91)90133-J
- Wallace, H. M., & Lee, H. S. (1999). Pollen source, fruit set and xenia in mandarin. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 74(1), 82-86. doi: 10.1080/14620316.1999.11511077
- Wallace, H. M., King, B. J., & Lee, H. S. (2002). Pollen flow and the effect on fruit size in an imperial mandarin orchard. *Horticultural Science*, 37(1), 84-86. doi: 10.21273/HORTSCI.37.1.84
- Yadavi, A. R., Maghsoudi, E., & Janzadeh-Deh Sheikh, J. (2019). The effect of copper sulphate on germination indices and morphophysiological characteristics of four wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). *Iranian Journal of Seed Science and Research*, 6(1), 107-119.