

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**MANCHADO POSTCOSECHA DE MANDARINA SATSUMA  
'OKITSU': CARACTERIZACIÓN ANATÓMICA, EFECTO DE  
FACTORES AMBIENTALES Y MANEJO POSTCOSECHA**

**por**

**Pablo ZÓCALO MARTÍNEZ**

TESIS presentada como uno de los  
requisitos para obtener el título de  
Magíster en Ciencias Agrarias, Opción  
Ciencias Vegetales

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
DICIEMBRE 2016**

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Ing. Agr. Dra. Joanna Lado, Lic. Dra. Gabriela Speroni, Ing. Agr. Dra. Ana Cecilia Silveira, Ing. Agr. M.Sc. Alejandra Borges, Ing. Agr. M.Sc. Alfredo Gravina e Ing. Agr. Dra. Giuliana Gambetta, el 23 de diciembre de 2016. Autor: Ing. Agr. Pablo Zócalo. Directora Ing. Agr. Dra. Giuliana Gambetta.

*Dedico este trabajo a Analía, Diego y Felipe...*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a Analía, Diego y Felipe por su paciencia y apoyo en toda mi formación, además de ser los motivadores fundamentales de mi vida.

A mi directora de Maestría Giuliana Gambetta por su profesionalismo, compromiso y gran paciencia, además de su constante ayuda para ser mi guía en todo este proceso de aprendizaje.

A Florencia por su colaboración y responsabilidad en todas las etapas de la investigación.

A Claudia por su compromiso con la investigación y sus enseñanzas en técnicas completamente nuevas para mí en el área de Botánica. También a Alejandra por siempre hacerse un tiempo para trabajar y explicarme temas en el área estadística, a Marcelo por trasmitirme sus conocimientos y abrirme las puertas del laboratorio de suelos para los análisis de minerales con total confianza y libertad y a Alfredo por sus conocimientos y apoyo.

También a Carolina, Santiago, Marcelo, Daniel y Pablo por las jornadas de trabajo de campo.

A Gilles y a la empresa San Miguel por darme la libertad para poder dedicarme a la investigación.

Al grupo postcosecha de cítricos y a INIA por fomentar y apoyar mediante UPEFRUY toda esta investigación.

Gracias también a mis padres, hermanos y especialmente a mamá y “el gordo”.

## TABLA DE CONTENIDO

|  |           |
|--|-----------|
| PÁGINA DE APROBACIÓN .....   | II        |
| AGRADECIMIENTOS .....  | III       |
| RESUMEN .....  | VII       |
| SUMMARY .....  | VIII      |
| <b>1. <u>INTRODUCCIÓN</u></b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>1.1. CRECIMIENTO Y MADURACIÓN DE LOS FRUTOS<br/>    CÍTRICOS</b> .....  | <b>2</b>  |
| <b>1.1.1. <u>Anatomía del fruto</u></b> .....  | <b>3</b>  |
| <b>1.2. MANEJO POSTCOSECHA DE LOS FRUTOS CÍTRICOS</b> .....  | <b>4</b>  |
| <b>1.2.1. <u>Desverdizado</u></b> .....  | <b>4</b>  |
| <b>1.2.2. <u>Encerado</u></b> .....  | <b>5</b>  |
| <b>1.2.2.1. Cera natural</b> .....   | <b>5</b>  |
| <b>1.2.2.2. Encerado</b> .....   | <b>6</b>  |
| <b>1.3. DESÓRDENES FISIOLÓGICOS ASOCIADOS A LA VIDA<br/>    POSTCOSECHA</b> .....  | <b>8</b>  |
| <b>1.3.1. <u>Daños causados por frío (<i>Chilling injury, peel pitting</i>)</u></b> .....                                | <b>9</b>  |
| <b>1.3.2. <u>Daños no asociados al frío</u></b> .....  | <b>11</b> |
| <b>1.3.2.1. Colapso de la corteza en mandarinas (<i>Rind breakdown</i>)</b><br>.....                                     | <b>11</b> |
| <b>1.3.2.2. Colapso de la corteza en naranjas (<i>Rind staining/ Rind<br/>            breakdown</i>)</b> .....           | <b>13</b> |
| <b>1.3.2.3. Picado de la corteza en mandarina ‘Encore’ (<i>Peel pitting</i>)</b><br>.....                                | <b>14</b> |
| <b>1.3.2.4. Picado de la corteza en mandarina ‘Fallglo’ y pomelo<br/>            ‘Marsh’ (<i>Peel pitting</i>)</b> ..... | <b>14</b> |
| <b>1.3.2.5. Peteca</b> .....   | <b>16</b> |
| <b>1.3.2.6. Oleocelosis</b> .....  | <b>17</b> |

|   |    |
|---|----|
| 1.3.2.7. Manchado postcosecha de la mandarina Satsuma.....  | 18 |
| 1.4. HIPÓTESIS y OBJETIVOS.....   | 19 |
| 2. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....  | 21 |
| 2.1. DESCRIPCIÓN Y CARACTERIZACIÓN ANATÓMICA DEL<br>MANCHADO.....                                   | 21 |
| 2.1.1. <u>Caracterización anatómica</u> .....   | 21 |
| 2.1.2. <u>Zona del fruto afectada</u> .....   | 23 |
| 2.1.3. <u>Grosor de Cáscara</u> .....   | 23 |
| 2.2. RELACIÓN CON NUTRIENTES MINERALES.....   | 24 |
| 2.3. EFECTO DEL DESVERDIZADO Y ENCERADO DE FRUTOS....   | 26 |
| 2.3.1. <u>Incidencia y severidad</u> .....  | 27 |
| 2.3.2. <u>Evaluación de color de los frutos</u> .....   | 26 |
| 2.4. CONDICIONES AMBIENTALES.....   | 28 |
| 2.5. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....   | 29 |
| 3. <u>RESULTADOS</u> .....  | 30 |
| 3.1. DESCRIPCIÓN Y CARACTERIZACIÓN ANATÓMICA DEL<br>MANCHADO.....                                   | 30 |
| 3.1.1. <u>Caracterización anatómica de la cáscara de mandarina Satsuma</u><br><u>‘Okitsu’</u> ..... | 30 |
| 3.1.2. <u>Descripción y caracterización anatómica de la mancha</u> .....                            | 32 |
| 3.1.3. <u>Zona del fruto afectada</u> .....   | 34 |
| 3.1.4. <u>Grosor de Cáscara</u> .....   | 34 |
| 3.2. EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE NUTRIENTES MINERALES<br>.....                                      | 35 |
| 3.2.1. <u>Concentración de minerales en la cáscara</u> .....  | 35 |
| 3.2.2. <u>Concentración de minerales en hojas fructíferas (muestreo de</u><br><u>otoño)</u> .....   | 37 |
| 3.3. EFECTO DEL DESVERDIZADO Y ENCERADO DE FRUTOS....   | 37 |
| 3.3.1. <u>Incidencia y severidad año 1</u> .....  | 38 |
| 3.3.2. <u>Incidencia y severidad año 2</u> .....  | 40 |

|  |     |
|--|-----|
| 3.3.3. <u>Zona de aparición del daño en el fruto</u> .....   | 42  |
| 3.3.4. <u>Color de frutos</u> .....  | 42  |
| 3.4. <u>CONDICIONES AMBIENTALES</u> .....  | 44  |
| 3.4.1. <u>Condiciones ambientales previo a la cosecha</u> .....  | 44  |
| 3.4.2. <u>Condiciones ambientales durante el desverdizado</u> .....  | 46  |
| 3.4.3. <u>Condiciones ambientales durante el almacenamiento</u> .....  | 48  |
| 3.4.4. <u>Condiciones ambientales durante la vida de mostrador</u> .....   | 48  |
| 4. <u>DISCUSIÓN</u> .....  | 49  |
| 5. <u>CONCLUSIONES</u> .....   | 55  |
| 6. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....   | 56  |
| 7. <u>ANEXOS</u> .....   | 70  |
| 7.1. Manchado postcosecha de mandarina Satsuma ‘Okitsu’:<br>caracterización anatómica, efecto de factores ambientales y manejo<br>postcosecha..... | 70  |
| 7.2. Diferentes tipos de daños de cáscara.....   | 98  |
| 7.3. Condiciones ambientales no controladas (fuera de cámara de<br>desverdizado), año 1 .....  | 100 |

## **RESUMEN**

En Uruguay, en los últimos años se ha detectado durante la etapa de postcosecha de mandarina Satsuma ‘Okitsu’, un manchado de la cáscara de los frutos, de bordes difusos, que en algunos años ha ocasionado importantes pérdidas. La incidencia del manchado varía entre años y entre establecimientos. Durante 2 años, se estudió el daño a nivel micro y macroscópico, su asociación con la concentración de nutrientes minerales en el flavedo, los factores ambientales previos a la cosecha y el efecto del desverdizado y encerado de frutos en su incidencia. A los 15 días de almacenamiento comenzó a visualizarse entre las glándulas de aceite, una zona irregular de color pardo, avanzando en superficie y oscureciéndose a los 30 días de almacenamiento. Luego de la vida de mostrador, en los casos más severos, dicha zona del tejido se deprimió, y a nivel microscópico se observó un colapso celular en la zona sub-epidérmica, avanzando hacia el parénquima subyacente y en algunos casos hacia la epidermis, pero la cutícula nunca se vio afectada. No se encontró asociación entre el daño y la concentración de macronutrientes en la cáscara de los frutos; sin embargo, la zona manchada presentó mayor concentración de micronutrientes. La mayor incidencia de frutos manchados (17 % de los frutos desverdizados y encerados), determinada el primer año, se asoció a un período de mayor temperatura, menor humedad relativa y precipitaciones, durante las 2 semanas previas a la cosecha, en comparación con el segundo año (7 % de incidencia en frutos desverdizados y encerados). El tratamiento de desverdizado no afectó la incidencia a los 30 días de almacenamiento + 15 días de vida de mostrador, mientras que el encerado de frutos (polietileno y goma laca, 18 % SST) la disminuyó significativamente desde 15 % a menos del 6 %. Los resultados sugieren que condiciones pre o postcosecha favorables a la deshidratación de frutos, promueven el manchado postcosecha de la mandarina Satsuma ‘Okitsu’.

Palabras clave: calidad de frutos, daño celular, desverdizado de frutos, desorden fisiológico, encerado de frutos.

# **Satsuma ‘Okitsu’ Postharvest Rind Breakdown: Anatomical Characterization, Effect Of Environmental Factors And Postharvest Treatments**

## **SUMMARY**

In the last years, a postharvest fuzzy edge rind breakdown has been observed in Satsuma ‘Okitsu’ mandarin in Uruguay, resulting in important losses. The disorder incidence varies among years and orchards. For 2 years we studied the microscopic and macroscopic damage, its association to peel mineral nutrients, environmental pre-harvest conditions, and the effect of postharvest fruit degreening and waxing on its incidence. After 15 days of storage irregular brownish areas boarding oil glands started to appear in the peel, with an increase in surface area and darkening after 30 days of storage. After 15 days of shelf life, more severe symptoms depressed and cell collapse could be microscopically detected at the sub-epidermis level. Damage advanced to the subjacent parenchyma and occasionally to the epidermis, but the cuticle was never affected. No association between rind breakdown and peel macronutrient concentration was found. However, damaged zones presented higher micronutrient concentrations. In the first year, the highest rind breakdown incidence (17 % of degreening and waxed fruit) was associated with higher maximum temperatures, lower relative humidity and less precipitation during the last 2 weeks before harvest, compared to the second year (7 % of damaged degreening and waxed fruit). Fruit degreening did not affect rind breakdown incidence after 30 days of cold storage + 15 days of shelf life, while fruit waxing (polyethylene and shellac, 18 % TSS) significantly reduced the incidence of damaged fruit, from 15 % to less than 6 %. Results suggest that pre and postharvest dehydration conditions promote this rind breakdown of Satsuma ‘Okitsu’ mandarin.

Key words: fruit quality, cell damage, fruit degreening, physiological disorder, fruit waxing

## **1. INTRODUCCIÓN**

La citricultura en el Uruguay tiene un enfoque exportador, que se ha consolidado en los últimos 25 años. Actualmente existen 15340 hectáreas, distribuidas en dos zonas del país; el 83 % se encuentra en los departamentos de Río Negro, Paysandú, Salto y Artigas y el 17 % restante en Colonia, San José, Montevideo y Canelones (MGAP-DIEA, 2015). Las principales especies cultivadas son las naranjas, que presentan una superficie de 7844 ha, las mandarinas, 5940 ha, los limones, 1352 ha y los pomelos con apenas 160 ha.

En el año 2014 Uruguay produjo 287.341 toneladas, de las cuales el 42 % se destinó a la exportación como fruta fresca. El grupo de las mandarinas es el que ha presentado mayor aumento en los últimos años, tanto en la superficie cultivada, como en el volumen de fruta producido. En el año 2014 alcanzó las 104.846 toneladas producidas. Dentro de las mandarinas, el grupo de las Satsumas presentó una fuerte expansión en la década del 90 y principios del 2000, pasando de 8.668 toneladas exportadas en 1999 a 13.398 en 2006 (MGAP-DIEA, 2006, 2003). Este grupo representaba en el año 2012, 1.432 ha de las 6.129 totales ocupadas por las mandarinas (MGAP-DIEA, 2012). Esta variedad es la de maduración más temprana y alcanza la madurez fisiológica, cuando aún su cáscara permanece de color verde. Por tanto, para su exportación se hace imprescindible emplear la práctica del desverdizado mediante la aplicación postcosecha de etileno.

La apertura de nuevos mercados, ha permitido que los cítricos uruguayos se distribuyan en todo el mundo, pero con ello surgen nuevos desafíos ya que el viaje a destino, en algunos casos, puede demorar hasta 60 días (Lejano Oriente). Conocer los factores que afectan la calidad de los frutos al momento de la cosecha y durante su vida postcosecha, es fundamental para adecuar el manejo y disminuir las pérdidas.

Los cítricos son frutos no climatéricos por lo que presentan una baja tasa respiratoria aunque hayan alcanzado su madurez, esto les permite tener un largo período de almacenamiento. En esas condiciones, los frutos pueden sufrir alteraciones, entre ellas los manchados de cáscara, cuya manifestación normalmente responde a diferentes factores y no a un único agente causal.

Estos daños tienen en común que desvalorizan el producto, debilitan la cáscara, permitiendo el acceso de patógenos y que es difícil preverlos, ya que en general se manifiestan luego del empacado de los frutos y después de un período de almacenamiento en frío, ya sea en cámaras o durante el viaje a su destino final.

Algunos de estos desórdenes, que causan importantes pérdidas económicas son el picado de la corteza, colapso de la corteza, peteca, oleocelosis, daños por frío y otras alteraciones de la corteza asociadas a la senescencia.

### **1.1. CRECIMIENTO Y MADURACIÓN DE LOS FRUTOS CÍTRICOS**

El fruto cítrico es una baya modificada denominada 'hesperido'. La cáscara está compuesta por el flavedo (exocarpo coloreado con glándulas de aceite) y el albedo (mesocarpo esponjoso), mientras que la pulpa por vesículas de jugo (endocarpo membranáceo con pelos terminados en vesículas que rellenan el lóculo). El crecimiento y desarrollo del fruto puede durar entre 6 y 12 meses, según la especie y cultivar. La curva de crecimiento tiene una evolución sigmoideal con tres fases: fase I, caracterizada por la división celular, fase II, determinada fundamentalmente por el agrandamiento celular y la acumulación de agua y azúcares, en la que el fruto incrementa notablemente su tamaño, y la fase III, en la que prácticamente se detiene el crecimiento y comienza la maduración (Bain, 1958). Durante la fase III se dan los cambios asociados a la madurez, cambio de color debido a la disminución de los pigmentos verdes y el aumento de los pigmentos amarillo-rojizos, principalmente,

junto con la disminución de la acidez y aumento de azúcares en el jugo. Los cambios debido al proceso de maduración de los frutos cítricos ocurren de forma relativamente independiente en la cáscara y la pulpa, siendo la falta de conexiones vasculares una de las razones de dicha característica (Monselise, 1977). Los cítricos son frutos no climatéricos, dado que durante la fase III su tasa respiratoria es baja y decreciente y carecen de un pico autocatalítico de producción de etileno (Goldschmidt et al., 1993, Eaks, 1970, Aharoni, 1968). Sin embargo, las aplicaciones de etileno estimulan el cambio de color de los frutos y aceleran la senescencia (Goldschmidt et al., 1993, Pons et al., 1992, Apelbaum et al., 1976), mientras que las giberelinas retrasan el proceso (Agustí et al., 1988). Variables como la acidez y el contenido de azúcares prácticamente no son afectados por las aplicaciones de estas sustancias, lo que ha permitido controlar alteraciones de la cáscara sin afectar el índice de madurez de los frutos (Agustí et al., 1988, Kuraoka et al., 1977).

### **1.1.1. Anatomía del fruto**

El flavedo que corresponde al exocarpo, está formado por una capa de células epidérmicas, estomas y sus células acompañantes y parénquima subepidérmico con glándulas de aceite. Las paredes celulares de la epidermis están fuertemente cutinizadas para evitar la pérdida de agua y su superficie está cubierta por la cutícula compuesta mayoritariamente por ceras. Por debajo de la epidermis aparecen varias capas subepidérmicas, de células parenquimáticas de forma más o menos globosa, entre las cuales se encuentran las glándulas de aceite. Las células parenquimáticas contienen cloroplastos, que durante la maduración se transforman en cromoplastos. El mesocarpo ocupa una posición intermedia del pericarpo y en la mayoría de los frutos cítricos es blanco. Durante la fase I del desarrollo del fruto, sus células son meristemáticas, poseen forma poligonal sin espacios intercelulares, dando lugar a un tejido compacto. La mayor parte del crecimiento del fruto durante este estado, se debe al aumento del espesor del mesocarpo, mientras que los lóculos crecen relativamente poco. Durante la fase II, la división celular en el mesocarpo

cesa y se originan numerosos espacios aéreos entre las paredes celulares. El endocarpo es la parte más interna del pericarpo y está formado por una epidermis que delimita los lóculos y por unas pocas filas de células parenquimáticas. Durante la fase I, sus células originan los pelos glandulosos con vesículas, que se llenarán de jugo durante la fase II (Agustí 2003).

## **1.2. MANEJO POSTCOSECHA DE LOS FRUTOS CÍTRICOS**

### **1.2.1. Desverdizado**

Los frutos de mandarinas de ciclo corto, alcanzan los estándares de maduración sin lograr la coloración externa requerida, por lo que se desverdizan con etileno después de la cosecha. El desverdizado es una técnica utilizada para estimular el cambio de color de los frutos cítricos (Porat 2008, Goldschmidt et al., 1993 Pons et al., 1992). Consiste en disponer los frutos en cámaras donde se modifica la atmósfera, mediante el agregado o inyección de etileno ( $C_2H_4$ ) a bajas concentraciones, controlando la temperatura, humedad relativa (HR) y la concentración de oxígeno ( $O_2$ ) y dióxido de carbono ( $CO_2$ ), (Cuadro 1). El período de desverdizado oscila entre 24 y 72 horas en la mayoría de los casos. La duración del proceso está vinculada al color con que llegan los frutos a la planta de empaque; cuanto más verde, más tiempo se requiere para alcanzar la coloración adecuada. Vázquez (2005) señala la importancia de la reducción del tiempo de exposición al etileno, ya que en este proceso el fruto es sometido a condiciones que no solo estimulan el cambio de color, sino también la velocidad de respiración y procesos tales como el ablandamiento, aumentando además la tendencia al manchado y la ocurrencia de otras alteraciones fisiológicas. Meier, (2005) reporta que a mayor tiempo de desverdizado, mayor es la incidencia de manchas en la cáscara, por lo que se recomienda no superar las 48 horas.

Una vez completado el período, y previo al pasaje por la línea de empaque, los frutos se mantiene durante 24 horas en lo que se conoce como ‘descanso’. Este lapso se considera necesario, para que la cáscara de los frutos se recupere y adquiera nuevamente la resistencia para tolerar adecuadamente el trabajo en la línea, los rozamientos, el contacto con los cepillos, etc.

Cuadro 1. Rango de temperatura, concentración de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y HR recomendados para desverdizar mandarinas Clementinas y Satsumas (Mazzuz, 1996).

| Factor   | Rango                  |
|--|------------------------|
| Temperatura                                    | 20-22 ° C.             |
| Concentración de C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> | 1-5 mg L <sup>-1</sup> |
| Concentración de O <sub>2</sub>                | ≈ 21 %                 |
| Concentración de CO <sub>2</sub>               | < 1 %                  |
| HR   | 90-95 %                |

Los principales efectos del etileno consisten en acelerar la pérdida de clorofilas (Katz et al., 2004, Shimokawa et al., 1978) y la síntesis de carotenoides coloreados (Rodrigo y Zacarías, 2007) en la cáscara, sin cambios significativos en la concentración de azúcares y ácidos del jugo (Mayuoni et al., 2011). Por tratarse de un regulador del crecimiento vinculado a los procesos de maduración y senescencia, su aplicación desencadena la aparición de desórdenes fisiológicos y podredumbres causadas por hongos (Cronje et al., 2011, Plaza et al., 2004, Eckert y Eaks, 1989). Por el contrario, disminuye la incidencia del colapso de la corteza en naranjas ‘Navelina’ y ‘Navelate’ (Cajuste y Lafuente, 2007, Lafuente y Sala, 2002).

## **1.2.2. Encerado**

### **1.2.2.1. Cera natural**

Durante el desarrollo, los frutos cítricos generan una capa superficial de cera natural en la parte externa de la cutícula, formada por pequeñas placas superpuestas,

que los protege de la deshidratación, gracias a su carácter lipofílico y les da un aspecto brillante (Conesa, 2004). La pérdida de peso involucra principalmente a la cáscara y no a la pulpa de los frutos (Hagenmaier y Baker, 1995,1994). La cera también protege los frutos frente a infecciones y heridas y se compone de una mezcla compleja de metabolitos, cuyos principales componentes son ésteres de ácidos grasos superiores con alcoholes de cadena larga, pero también se encuentran presentes importantes proporciones de hidrocarburos, cetonas, alcoholes y aldehídos (Fahn, 1978).

La capa de cera natural se deteriora con las prácticas agrícolas y con el lavado y cepillado que se le da a los frutos para eliminar los restos de suciedad y tratamientos fitosanitarios. La pérdida de cera natural provoca una mayor deshidratación y un aumento de la permeabilidad, ya que facilita la entrada de oxígeno O<sub>2</sub> aumentando la tasa respiratoria. Este aumento lleva a la disminución del contenido de azúcares, cambios en el sabor, pérdida de calidad y la reducción del ácido ascórbico (Kaplan, 1986). Todas estas alteraciones provocan un deterioro del producto y una desvalorización comercial del mismo. Para evitar estas pérdidas la industria ha desarrollado ceras artificiales que son ampliamente utilizadas en la línea de empaque y protegen al fruto durante su almacenamiento y transporte.

### **1.2.2.2 Encerado**

La aplicación de ceras permite reducir la disminución de peso por pérdida de agua, proporcionar una barrera para limitar el intercambio gaseoso, mejorar el aspecto cosmético, proporcionar un soporte para la aplicación de fungicidas y reguladores de crecimiento y reducir algunas alteraciones fisiológicas y daños por frío (Conesa, 2004, Hagenmaier y Baker, 1995,1994, Kaplan, 1986, Namesny y Urtiaga, 1985).

Generalmente se emplean ceras al agua del tipo emulsiones acuosas, compuestas por ceras vegetales (carnauba) y/o ceras sintéticas (polietileno). Éstas suelen llevar resinas para complementar el efecto de las ceras y mejorar el brillo (Mazzuz, 1996). Otra opción es el empleo de películas o recubrimientos comestibles que se elaboran con biopolímeros naturales de alto peso molecular, que proporcionan una matriz macromolecular con resistencia cohesiva alta. Los tipos de macromoléculas que se emplean para este propósito son hidrocoloides (proteínas, polisacáridos) los cuales debido a su naturaleza hidrofílica, son muy sensibles al agua. Los otros componentes mayoritarios en la formulación lo constituyen los lípidos y resinas, pero las formulaciones pueden incluir plastificantes, emulsificantes, agentes de superficie activa (surfactantes), agentes de liberación específica de compuestos, lubricantes, etc., por lo que se trata de formulaciones multicomponentes (Baldwin et al., 1995, Gennadios y Weller, 1990). Las sustancias hidrofóbicas como las ceras y resinas y algunas proteínas no solubles en agua, resultan ser los componentes más eficientes para limitar la pérdida de humedad; sin embargo si se emplean como componente único o principal, se obtienen películas gruesas y quebradizas (Bósquez, 2003).

De acuerdo a lo expuesto por Martínez-Jávega et al., (1992) las ceras a utilizar actualmente para mandarinas y naranjas suelen formularse con polietileno, candelilla, carnauba (8-10 %), pudiendo llevar algo de goma-laca (2-4 %), sin sobrepasar la concentración de sólidos solubles totales del 12 %, para evitar incremento de volátiles en jugo y malos sabores. En el caso de limones puede aumentarse sin riesgos el contenido en sólidos totales hasta el 18 %. Según lo expresado por Roger (1988), el contenido de sólidos solubles totales de las ceras define indirectamente el grado de recubrimiento, el cual, de ser excesivo provocaría respiración anaeróbica, alterando el sabor debido a la formación de etanol y acetaldehído.

### **1.3. DESÓRDENES FISIOLÓGICOS ASOCIADOS A LA VIDA POSTCOSECHA**

Los frutos cítricos pueden sufrir diversos desórdenes fisiológicos durante el almacenamiento y transporte postcosecha. Algunos de ellos, solo afectan al flavedo, otros al albedo y otros a la cáscara en su conjunto, provocando pérdida de calidad cosmética, lo que genera problemas al momento de la comercialización. En estos casos es importante la incidencia (proporción de frutos afectados) y la severidad (proporción de la superficie del fruto afectado). En Uruguay, dado que los frutos se exportan a mercados lejanos, los síntomas suelen desarrollarse durante el traslado, lo que los convierte en aún más problemáticos por la imposibilidad de clasificar o eliminar previamente estos frutos.

Existen numerosos desórdenes fisiológicos descritos en la literatura, pero dado que se carece de una terminología única para denominarlos, resulta complicado identificar si se trata de desórdenes similares o diferentes. En general, el nombre incluye la descripción de la sintomatología y la especie y/o cultivar que lo manifiesta, como por ejemplo el ‘colapso de la corteza’ del naranjo dulce ‘Navelate’ (‘Navelate’ rind breakdown) reportado por Agustí et al. (2001). En ocasiones la terminología que describe un mismo desorden varía según la región, por ejemplo ‘peel pitting’ o ‘rind breakdown’ según sea en España (Alfárez et al., 2004) o en Sudáfrica (Van Rensburg et al., 2004), respectivamente. Esto hace aún más difícil establecer el tipo de fisiopatía involucrada.

La mayoría de los desórdenes fisiológicos que afectan la cáscara de los frutos cítricos se asocia a aspectos genéticos, nutricionales y hormonales, así como a las condiciones ambientales ocurridas durante el desarrollo y maduración y/o durante su almacenamiento (Agustí et al. 2004a, Kruger et al. 2004, Porat et al. 2004). Un mismo factor puede afectar de manera diferente a los frutos, así como diferentes factores pueden inducir una sintomatología similar, por lo que no es posible asignar una única causa a un desorden particular. En términos generales, estas alteraciones

involucran desequilibrios hídricos y nutricionales relacionados a las condiciones ambientales, lo que conjuntamente determina la susceptibilidad de los frutos al momento de la cosecha (Agustí, 2003).

Los daños pueden clasificarse según momento de aparición, en daños de precosecha y de postcosecha, aunque algunos de estos desórdenes pueden aparecer o desarrollarse en ambas etapas. A su vez, se pueden dividir en daños asociados o no asociados al frío ('chilling' y 'non-chilling physiological disorders', respectivamente), (Grierson, 1986). Los desórdenes que afectan principalmente la cáscara han sido vinculados a las relaciones hídricas dentro de la planta, atribuyéndose a la pérdida de agua del fruto hacia el árbol y/o hacia la atmósfera (Agustí et al., 2004a). A partir de la cosecha, las condiciones de almacenamiento, también afectarán su manifestación (Cronje et al., 2011).

### **1.3.1. Daños causados por frío ('chilling injury', 'peel pitting')**

Existe extensa información sobre el efecto negativo de las bajas temperaturas en la cáscara de los frutos cítricos y alternativas para disminuir la incidencia del daño (Lafuente y Zacarías, 2006, Schirra, 1992).

La mayoría de las especies y variedades de cítricos pueden sufrir daños por frío cuando son almacenados a temperaturas entre 8-10° C, variando su sensibilidad entre ellas. Se acepta que los pomelos, limones y limas son las especies más susceptibles (Ritenour 2005, Alférez et al., 2004, Petraceck et al., 1995, Cohen et al., 1994, Pantastico et al., 1968). También se ha reportado susceptibilidad en mandarinas 'Nova', 'Fortune' y tangor 'Ortanique' (Almela et al., 1992) y naranjas de ombligo (Agustí et al., 2004 a, b, Vercher et al., 1994).

Los síntomas de daño por frío se manifiestan como pequeñas lesiones profundas de color marrón-rojizo a negro, que se inician en áreas discretas del

flavedo y evolucionan, pudiendo abarcar amplias áreas de afección, reduciendo su calidad (Agustí et al., 2004a), (Anexo 2, Figura 1). Inicialmente las células epidérmicas colapsan como consecuencia de la ruptura del tonoplasto. La acumulación posterior de sustancias fenólicas y volátiles desarrollan el picado en el flavedo, y el deterioro del citoplasma altera la estructura y el metabolismo de las ceras que protegen la epidermis (Agustí et al., 2004 a, Vercher et al., 1994, Almela et al., 1992, Cohen et al., 1990).

El daño se ha relacionado fundamentalmente a las bajas temperaturas durante el almacenamiento de los frutos (Martínez-Jávega et al., 1992), aunque también se ha citado su aparición previo a la recolección, asociado a la presencia de vientos fuertes ( $25 \text{ m s}^{-1}$ ) y fríos (temperatura máxima, 15-18 °C y mínima, 4-10 °C), con humedad relativa baja (40-45 %), (Almela et al., 1992). En esta situación meteorológica, la evapotranspiración es alta, y si se dan condiciones de elevada permeabilidad cuticular, la alteración aparece a los pocos días (Agustí et al., 2004a).

En estudios realizados por Vercher et al. (1994), se demostró que este trastorno puede asociarse a una mayor permeabilidad de la cutícula y la membrana, que ven modificadas sus funciones fisiológicas, lo que favorece la pérdida de agua hacia la atmósfera y altera el balance hídrico de dichas zonas. En pomelo ‘Marsh’ la variación del contenido de agua en la cáscara es un factor clave en la incidencia de daño (Alfárez et al., 2005). Este cultivar, es más sensible a las bajas temperaturas que los pomelos rojos ‘Ruby Red’, ‘Rio Red’ y ‘Flame’ (Dou, 2004). Lado et al. (2015) reportan que la tolerancia a las bajas temperaturas durante el almacenamiento de pomelos rojos, se explica por la mayor concentración de licopeno presente en las áreas coloreadas del flavedo.

Luego de la cosecha, la incidencia de daños por frío se puede minimizar a través de la aplicación de tratamientos como el calentamiento intermitente (Salvador et al., 2007), o el acondicionamiento a baja y alta temperatura, que incrementa la tolerancia al frío y previene el ataque de patógenos (Lafuente et al., 2005, Porat et

al., 2000). Los tratamientos con altas temperaturas cambian la composición lipídica de las membranas, provocando un aumento de ácidos grasos insaturados, incrementando la fluidez de las membranas (Lurie, 1998), lo cual contrarresta la rigidez de las mismas provocada por las bajas temperaturas. Según Salvador et al. (2007), el almacenamiento previo a altas temperatura 30-35 °C y alta HR puede favorecer la síntesis de proteínas, modificando las propiedades de las membranas celulares, generando una base para la tolerancia térmica.

El desverdizado produce la aceleración de la senescencia e incrementa el contenido de compuestos volátiles de aroma desagradable en el jugo y las podredumbres (Plaza et al., 2004, Eckert y Eaks, 1989). Aplicaciones continuas de diferentes dosis de etileno en limas, mandarinas, pomelos y naranjas durante el almacenamiento a 0 °C, incrementan el daño en forma proporcional a la dosis de etileno (Yuen et al., 1995). En mandarina ‘Fortune’, la aplicación de etileno previo al almacenamiento también promueve el incremento del daño (Gosalbes et al., 2004; Lafuente et al., 2001). Sin embargo, aplicaciones continuas durante el almacenamiento, disminuyen los daños en el mismo híbrido (Lafuente et al., 2004).

La aplicación de ceras postcosecha (goma laca, polietileno o carnauba) reduce el daño causado por el frío en pomelos blancos y rojos almacenados durante 2 meses a 4 °C y 92 % de HR, con efecto diferente según el cultivar (Dou, 2004). Aplicaciones de tratamientos con ceras y tiabendazol también han favorecido el control del daño por frío en pomelos (Wardowski et al., 1986).

### **1.3.2. Daños no asociados al frío**

#### **1.3.2.1. ‘Colapso de la corteza’ en mandarinas (‘rind breakdown’)**

El ‘colapso de la corteza’ que afecta principalmente a las mandarinas Clementinas y en menor medida a las Satsumas, se asocia a largos períodos de almacenamiento. Se manifiesta como manchas de color marrón oscuro, distribuidas

al azar en el flavedo (Anexo 2, Figura 2). El daño celular se hace evidente en las capas subepidérmicas del flavedo de frutos afectados, así como en el área adyacente a las glándulas de aceite. Esto puede provocar su colapso y liberación de aceites esenciales, con la consecuente fitotoxicidad en el tejido. La epidermis permanece inalterada, tanto en los frutos afectados como en los sanos (Cronje et al., 2011, Van Rensburg et al., 2004).

El desorden se relaciona con las condiciones ambientales durante la precosecha y particularmente con la posición del fruto en el árbol, siendo los más afectados los ubicados en el interior (Cronje et al. 2011, Van Rensburg et al., 2004). Los frutos del exterior presentaron mayor concentración de minerales, principalmente K, Mn, Fe, Cu y Zn (Van Rensburg et al., 2004) y un mayor contenido de carbohidratos (Cronje et al., 2011), lo que sugiere que el menor nivel de daño podría explicarse por un mejor estado nutricional en frutos expuestos. Sin embargo, un manchado similar fue reportado en mandarina Satsumas por Zócalo (2009), con una mayor incidencia en los frutos ubicados en el exterior de la copa.

El tratamiento con ácido 3,5,6 triclora-2 piridil-oxiacético (3,5,6-TPA) al inicio de la fase II del crecimiento del fruto, la recolección temprana y un menor tiempo de desverdizado con etileno, disminuyen la incidencia en mandarinas Clementinas (Van Rensburg et al., 2004). Por el contrario, ésta se incrementa con los tratamientos de postcosecha que promueven la senescencia de los frutos (etileno, período de almacenamiento largo y temperaturas medias de 7,5 °C), (Cronje et al., 2011).

En las condiciones de Uruguay, el uso de ceras más impermeables, con mayor proporción de goma laca (4-8 %), redujo la aparición de manchas tipo picado de corteza en mandarina Satsuma 'Okitsu', sin embargo, se registró una disminución de su palatabilidad (Zócalo 2009).

### **1.3.2.2. ‘Colapso de la corteza’ en naranjas (‘rind staining’/ ‘rind breakdown’)**

Las naranjas del grupo navel son propensas a desarrollar el ‘colapso de la corteza’ a partir del cambio de color (Agustí et al., 2001), aunque también puede aparecer durante el almacenamiento. Si bien la incidencia postcosecha en frutos maduros es independiente de la fecha de cosecha, aumenta con la maduración del fruto (Alfárez y Zacarías, 2001).

Los frutos afectados se caracterizan por la presencia inicial de depresiones en el flavedo, que evolucionan formando zonas secas de color marrón rojizo que cubren gran parte de la cara externa del fruto (Agustí et al., 2001). A nivel microscópico, se inicia como una depresión del tejido epidérmico y subepidérmico, sobre los que sobresalen las glándulas de aceites esenciales, aunque éstas no se rompen. El área deprimida adquiere coloración marrón oscuro, ocupa mayor superficie, se seca y se deprime a medida que avanza el tiempo. Esta alteración está asociada a la pérdida de agua de las células situadas en la zona de coexistencia del flavedo con el albedo, avanzando hacia el exterior alcanzando la epidermis y hacia el interior afectando las capas más profundas del albedo. La epidermis, aparece intacta durante varias semanas; la cera de la superficie y la cutícula son similares en zonas sanas y dañadas de frutos de naranja ‘Navelate’ con síntomas iniciales (Agustí et al., 2004a).

En general el ‘colapso de la corteza’ se desarrolla durante el otoño e invierno. Este desorden aparece luego de cambios bruscos de la HR durante el desarrollo del fruto. La aparición de los primeros síntomas coincide con días de alta temperatura, baja HR y alta tasa de evapotranspiración, seguido de un período de baja temperatura, alta HR y baja evapotranspiración (Agustí et al., 2001). En forma opuesta a lo que ocurre con las Clementinas, la mayor proporción de frutos afectados se ubica en el exterior del árbol y en la cara externa del fruto (Agustí et al., 2004a).

En postcosecha, el almacenamiento de frutos en condiciones que reduzcan la pérdida de humedad, puede disminuir los síntomas de esta fisiopatía (Porat et al. 2004, McCornack, 1970), mientras que los cambios de HR durante el almacenamiento aumentan la incidencia de este desorden en las naranjas de ombligo (Alfárez et al., 2003). La temperatura también influye en el nivel de daño; naranjas ‘Valencia’ almacenadas a 21 °C manifestaron mayor daño que las almacenadas a 4 °C (Dou et al. 2001). El desverdizado de frutos de naranja ‘Navelate’ (4 días, 10 mg L<sup>-1</sup> de etileno, 22 °C y 90-95 % de HR), redujo notablemente la incidencia del daño (Establés, 2008).

#### **1.3.2.3. ‘Picado de la corteza’ en mandarina ‘Encore’ (‘peel pitting’)**

El picado de frutos que ha sido descrito en mandarina ‘Encore’, se caracteriza por la presencia de manchas cloróticas, que se corresponden con una depresión y colapso de un número variable de capas de células subepidérmicas. El daño celular se asocia con la desorganización de las membranas internas de los plástidos y comienza a manifestarse con altas temperaturas, como las que ocurren en el mes de setiembre en el hemisferio norte y solo se observa en la zona expuesta de los frutos. En consecuencia, la alteración se ha asociado a altas radiaciones y altas temperaturas durante largos períodos de tiempo. La radiación solar puede estar implicada en la alteración estructural de la cutícula y corteza, ya que una temperatura alta durante un largo período, puede inducir a una deshidratación localizada, que conduce a plasmólisis y al colapso de la membrana. (Medeira et al., 1999).

#### **1.3.2.4. ‘Picado de la corteza’ en mandarina ‘Fallglo’ y pomelo ‘Marsh’ (‘peel pitting’)**

El ‘picado de la corteza’ descrito en pomelo ‘Marsh’ y mandarina ‘Fallglo’ se manifiesta luego de la cosecha, cuando los frutos se mantienen a temperatura

superior a 15 °C. Inicialmente se observan lesiones tostadas en áreas discretas de la cáscara, que se extienden y tornan de color marrón oscuro. Este desorden se asocia al colapso de las glándulas de aceite, provocando leves depresiones en las regiones por encima de éstas. En el tejido epidérmico, subepidérmico y en el albedo subyacente a las glándulas, se observa colapso celular y células con pérdida de la orientación característica (Petracek et al., 1998, 1995).

En la mandarina ‘Fallglo’, los frutos que fueron encerados y almacenados a 15,5 °C presentaron picado, mientras que los frutos no encerados y almacenados a la misma temperatura, o los almacenados a 4,5 °C, no fueron afectados. Esto se puede explicar debido a que la aplicación de ceras restringe el intercambio gaseoso (Hagenmaier y Baker, 1994). En este trabajo, el encerado modificó la capacidad de intercambio gaseoso entre la atmósfera y la cáscara, bajando los niveles de O<sub>2</sub> y provocando que se elevaran los niveles de CO<sub>2</sub>, favoreciendo de esta manera los daños en la cáscara del fruto; el desverdizado durante 24 horas previo al encerado no afectó la ocurrencia del picado (Petracek et al., 1998). Se observa también un efecto del tipo de componente de las ceras, con una mayor incidencia en frutos tratados con goma laca frente a polietileno y carnauba (Petracek et al., 1998).

Estudios realizados en ambos cultivares, indican que la modificación de las relaciones hídricas en la cáscara, son un factor clave en la incidencia de este desorden. Los frutos de pomelo almacenados a 20 °C, a HR constante, baja (30 %) o alta (90 %), desarrollaron bajos niveles de ‘picado de la corteza’, aún siendo encerados inmediatamente a la cosecha. Por el contrario, cuando los frutos se almacenaron a 30 % de HR y se transfirieron a un ambiente con 90 % de HR, la incidencia del desorden aumentó marcadamente, mientras que esto no ocurrió si la transferencia se realizó a la inversa. La remoción de la cera natural con el lavado, no afectó su manifestación, mientras que el encerado artificial la incrementó solo si los frutos habían sufrido un período de deshidratación previo a su almacenamiento (Alfárez y Burns, 2004). Tanto en mandarina ‘Fallglo’ como en pomelo ‘Marsh’, dos horas de permanencia a baja HR fueron suficientes para aumentar la incidencia

del picado cuando fueron transferidos a una condición de 90 % de HR; un comportamiento similar se observó cuando la cosecha se realizó a baja HR (Alfárez et al., 2005).

#### **1.3.2.5. Peteca**

Este desorden fisiológico afecta la cáscara de los limones (Anexo 2, Figura 3) y se caracteriza por presentar lesiones necrosadas y hundidas, que al inicio afectan solo al albedo pero pueden continuar hasta el flavedo (Fichet et. al. 2012). A pesar de existir deposición de aceites esenciales en los espacios intercelulares de las células del albedo, no se evidencia una ruptura importante de las glándulas de aceite (Storey y Treeby, 2002).

Aunque se desconocen los agentes causales que predisponen a los frutos a manifestar el daño, éste se asocia a factores de pre y postcosecha. Se cree que estaría relacionado con desbalances nutricionales, ya que en las zonas afectadas se encontró menor concentración de K y Na y mayor concentración de Mg, Mn y Ca, comparado con las zonas sanas (Storey y Treeby, 2002). Undurraga et al. (2007) encontraron que el mayor nivel de peteca también se asocia con un mayor porcentaje de calcio en frutos almacenados hasta por 35 días.

Durante 35 días de almacenamiento, los limones 'Eureka' conservados a 11 °C desarrollaron más peteca que a 3 °C y 7 °C. Los frutos además, manifestaron el daño visible desde los 15 días de almacenamiento (Undurraga et al., 2007). Sin embargo, en otro experimento, los mismos autores encontraron mayor incidencia de peteca en limones almacenados a 3° C con respecto a 7° C (Undurraga et al, 2009).

El desarrollo del desorden en limón 'Meyer' se agravó con el encerado y cepillado. Las ceras a base de polietileno indujeron mayor daño que las formulaciones basadas en carnauba. El desverdizado y/o el almacenamiento antes del

encerado disminuyeron la susceptibilidad de los frutos, mientras que la aplicación de Guazatina (octametildiamina, iminodi (octametileno) diamina, octametenbis(imino-octametileno) diamina y carbamonitrilo), fungicida para el control de *Geotrichum candidum*, no la modificó. La temperatura de almacenamiento entre 10 °C y 25 °C no afectó los niveles de daño (Wild, 1991).

#### **1.3.2.6. Oleocelosis**

La oleocelosis es una alteración fisiológica originada por la liberación de aceites esenciales desde las glándulas del flavedo (Anexo 2, Figura 4). Generalmente es ocasionada por daños mecánicos, que provocan la ruptura de la epidermis y las glándulas de aceite, liberándolo y extendiéndolo por las grietas, provocando una rápida degeneración de las células epidérmicas (Agustí et al., 2004 a). El aceite liberado en la superficie es tóxico y causa la necrosis de las células, además se producen reacciones de oxidación que colaboran con que el área inicialmente se oscurezca y luego se deprima (Roger 1988).

Este daño puede ocurrir en todas las variedades de cítricos, pero las naranjas del grupo navel, los limones y limas son especialmente sensibles (Browning et al., 1995, Whiteside et al., 1988). Cuando no se realizan las medidas preventivas y/o los cuidados necesarios en cosecha, transporte y empaque, el nivel de daño puede alcanzar porcentajes muy altos.

Se asocia a la manipulación de frutos con la cáscara turgente como consecuencia de rocío (Eaks, 1969), alta HR y bajas temperaturas (Grierson, 1986), situación que generalmente se da en las primeras horas de la mañana (Browning et al., 1995). Cuando los frutos están turgentes al momento de cosecha, es suficiente con la presión ejercida por los dedos al realizar la cosecha para provocar la rotura de las glándulas de aceite y la posterior manifestación del daño. Los síntomas se agravan cuando los frutos se desverdizan, ya que la zona afectada permanece de

color verde (Wardowski et al., 1986). Cuando los frutos ya han cambiado de color, la fitotoxicidad del aceite no es tan visible, observándose zonas decoloradas o ligeramente necrosadas (Agustí et al., 2004a).

### **1.3.2.7. Manchado postcosecha de la mandarina Satsuma**

En Uruguay y la zona de Concordia (Argentina), en los últimos años se ha detectado durante la postcosecha de la mandarina Satsuma, un manchado con características diferentes de los mencionados anteriormente (Anexo 2, Figura 5). De acuerdo a la información proporcionada por las empresas citrícolas, el daño comienza aproximadamente a los 10-20 días de almacenamiento postcosecha, independientemente de la temperatura de almacenamiento. Su incidencia entre quintas y años parece ser muy variable y se desconocen las causas que lo provocan.

El desorden se inicia como pequeñas manchas de color marrón, de bordes poco definidos, rodeando las glándulas de aceite, que permanecen intactas. Con el tiempo de almacenamiento, la superficie afectada va aumentando, hasta cubrir porciones importantes del flavedo.

Los primeros estudios microscópicos realizados desde la fase II del crecimiento del fruto hasta la maduración y postcosecha (Da Luz et al., 2014), indican que el daño se manifiesta en el parénquima subepidérmico. Inicialmente, se observa una leve disgregación de las capas celulares, posteriormente el citoplasma se retrae y da lugar al colapso celular que avanza hacia el albedo, pero sin afectarlo. El daño avanza hacia la epidermis y hacia el parénquima subyacente, sin afectar la cutícula. En las etapas más avanzadas las células epidérmicas presentan el contenido citoplasmático contraído. Si bien las glándulas de aceite no se ven afectadas en las primeras manifestaciones celulares del manchado, posteriormente se observa una distorsión del contenido celular, con materiales condensados en las caras internas (Da Luz et al., 2014).

Sin embargo a nivel nacional y regional existe muy poca información en la temática, que permita conocer los principales factores asociados con el desarrollo de esta fisiopatía.

#### **1.4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Con estos antecedentes, en este trabajo se plantearon las siguientes hipótesis:

- Las manchas que afectan la cáscara de los frutos de mandarina Satsuma ‘Okitsu’ en postcosecha son consecuencia del colapso celular del flavedo
- La concentración de macro y micronutrientes del flavedo afecta la incidencia y severidad del manchado
- El desverdizado postcosecha de los frutos incide sobre su aparición
- El encerado de los frutos limita la incidencia
- Los factores ambientales precosecha se relacionan con la incidencia del manchado

El objetivo general de este trabajo fue estudiar la aparición y desarrollo del manchado postcosecha de frutos de mandarina Satsuma ‘Okitsu’ en las condiciones de Uruguay.

Los objetivos específicos fueron:

- Determinar anatómicamente el desarrollo de la mancha de frutos de mandarina Satsuma ‘Okitsu’ luego de 30 días de almacenamiento y 15 días de vida de mostrador
- Analizar la posible asociación entre la concentración de nutrientes minerales en hojas y flavedo de frutos y la aparición del desorden
- Evaluar el efecto del desverdizado postcosecha de los frutos en la incidencia del manchado

- Determinar el posible rol protector de las ceras aplicadas en la planta de empaque
- Estudiar el efecto de la temperatura, humedad relativa y precipitaciones durante el ciclo de crecimiento sobre la incidencia del manchado

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

Se seleccionó un cuadro de árboles de mandarina Satsuma ‘Okitsu’ (*Citrus unshiu* Marc.), injertada sobre ‘Trifolia’ (*P. trifoliata* (L) Raf.), en una quinta comercial ubicada en la zona de Chapicuy, Paysandú (Uruguay, 31°40’ S, 57°52’ W), con historia de alta incidencia de frutos manchados. Los experimentos se llevaron a cabo durante dos años consecutivos. Al alcanzar la madurez comercial (9/03 y 14/03, año 1 y 2 respectivamente), se cosecharon frutos provenientes de 4 parcelas de 5 plantas en buen estado sanitario y con riego localizado. Se seleccionaron frutos de color y tamaño homogéneo (relación a/b entre -0,20 y -0,15, CIELab y diámetro ecuatorial entre 55 y 65 mm), (Figura 1).



Figura 1. Frutos de mandarina Satsuma ‘Okitsu’ en la cosecha (año 1).

### **2.1. DESCRIPCIÓN Y CARACTERIZACIÓN ANATÓMICA DEL MANCHADO**

#### **2.1.1. Caracterización anatómica**

La caracterización anatómica del desorden se realizó seleccionando frutas manchadas luego de desverdizadas (1-5 mg L<sup>-1</sup> de etileno, CO<sub>2</sub><0,2 %, 18-22° C de temperatura (T) y 90-95 % HR, durante 96 horas), enceradas, almacenadas durante 30 días (T: 4,5-8 °C, HR > 90 %, CO<sub>2</sub> < 0,5 %) y 15 días de vida de mostrador (T media 15 °C, HR media 82 %). Se realizaron cortes de cáscara de zonas sanas y

manchadas de 4 frutos por parcela. Se seccionaron trozos de 1-2 cm x 1-3 cm que se fijaron en formol, ácido acético y alcohol 70 %, 5:5:90 (FAA) hasta el procesamiento del material siguiendo metodología descrita por Da Luz et, al. (2014). Se realizaron cortes a mano alzada de trozos de aproximadamente 0,5 cm x 0,5 cm del material fijado en FAA, se incluyeron en parafina utilizando vaselina como intermediario (Johansen, 1940; Locquin y Langeron, 1985), (Figura 2). La deshidratación del material se realizó en 11 pasos sucesivos de concentraciones ascendentes de etanol desde 20 a 100 %, aumentando el tiempo de inmersión desde 15 min hasta 120 min. Posteriormente se transfirió a una solución intermedia de etanol-tolueno (EtOH-tolueno), variando la dilución (2:1, 1:2; 1:1) y el tiempo de inmersión de 30 min a 120 min. La muestra se transfirió a parafina líquida en tres etapas de 30 min, 150 min y 360 min, para la sustitución total del tolueno. Tras el embebido completo de la muestra, se vertió parafina líquida en un molde y se introdujo la muestra, según la orientación deseada de corte, solidificándose a temperatura ambiente.

Los cortes se realizaron en micrótopo de rotación (American Optical Corp. Spencer 820 Microtone, USA) y se hizo el pegado con adhesivo de Haupt en estufa a 30 °C, 2 horas. El desparafinado se realizó con xilol I 5 min, xilol II 5 min. Las muestras se colorearon mediante la técnica de doble coloración de safranina-fast green (EtOH 100° 5 min, EtOH 70° 5 min, EtOH 30° 5 min, agua destilada 5 min, Safranina 10 min, agua destilada I 5 min, agua destilada II 5 min, EtOH 50° 5 min, EtOH 95° 5 min, EtOH I 100° 5 min, EtOH II 100° 5 min, Fast green 4 s, aceite de clavo 10 s, mezcla aclarante 20 s., xilol I 5 min, xilol II 5 min) y se montaron en Bálsamo de Canadá. La observación de los preparados se realizó en microscopio óptico (Nikon E100, Japón) y se capturaron imágenes con máquina digital (Nikon Coolpix P5100, Japón).

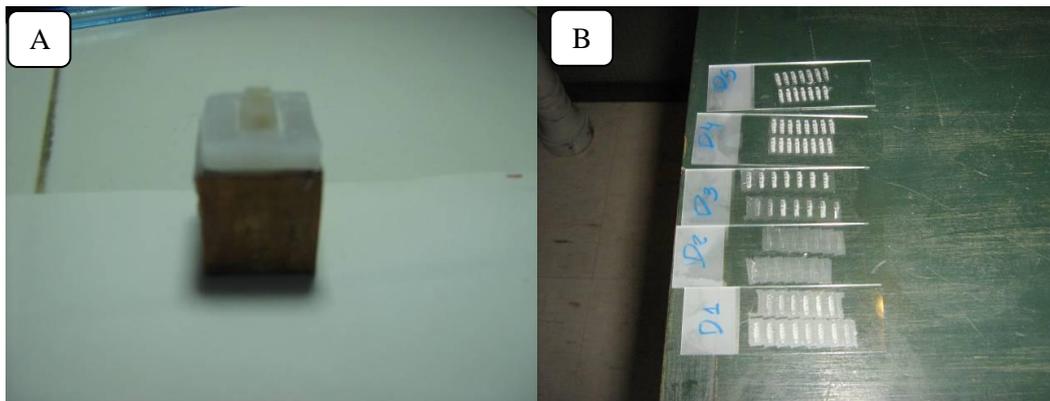


Figura 2. Bloque de material incluido en parafina (A); cortes de tejido preparado para su observación en microscopio (B).

### **2.1.2. Zona del fruto afectada**

El segundo año y luego de los 30 días de almacenamiento refrigerado a 4-7 °C, HR>85 % y luego de 15 días de vida de mostrador a (T media de 15 °C, HR media 82 %) se evaluó la zona de aparición del daño en 180 frutos. Para ellos los frutos se dividieron en 5 zonas: cáliz, superior, ecuador, inferior y estilar.

### **2.1.3. Grosor de Cáscara**

En cada fecha de evaluación se cortaron a nivel del ecuador tres frutos por parcela y por tratamiento y se midió con calibre digital (Mitutoyo Sul America Ltd, Brasil) el grosor de la cáscara de frutos sanos y de zonas sanas y manchadas de frutos manchados (Figura 3).

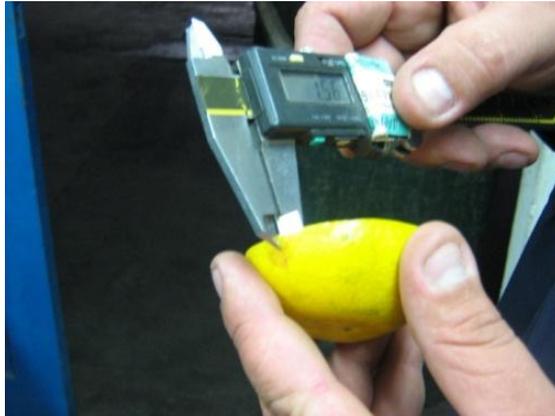


Figura 3. Evaluación de grosor de cáscara de un fruto de mandarina Satsuma ‘Okitsu’.

## **2.2. EVALUACION DEL CONTENIDO DE NUTRIENTES MINERALES**

En los dos años de experimentos se determinó la concentración de nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), hierro (Fe), cobre (Cu), manganeso (Mn) y cinc (Zn). Las evaluaciones se realizaron en hojas provenientes de ramas fructíferas de las 4 parcelas, muestreadas en abril, y en el flavedo de frutos sanos y en zonas sanas y manchadas de frutos con manchas, luego de 30 días de almacenamiento.

Para la determinación, se extrajo mediante un bisturí el flavedo de los frutos (Figura 4 A). Luego de esto, las muestras se secaron a 60 °C (Thermolyne, F-A1730, USA) durante 48 horas y se molieron en molino (General Electric, 5XBP00C, Mexico) hasta un tamaño menor a 1 mm. El contenido de N se determinó por el método de Kjeldahl (Bremmer y Mulvaney, 1982), a partir de 0,5 g de muestra seca (Figura 4 B-D). Se realizó la digestión con 10 mL ácido sulfúrico (96 %), 3 g de catalizador y 10 mL de peróxido de hidrógeno (35 %). La valoración se realizó con ácido clorhídrico, utilizando NaOH (40 %) como alcalinizante y ácido bórico como solución indicadora. A partir de una dilución con ácido clorhídrico de las cenizas de 1 g de muestra (obtenidas por calentamiento en mufla a 500 °C), el P se determinó

por el método colorimétrico del ácido ascórbico (Murphy y Riley, 1962), el Mg, Ca, Fe, Zn, Cu y Mn se determinaron por absorción atómica (Perkin Elmer, 3300, USA) y el K por espectrometría de emisión (Perkin Elmer, 3300, USA), (Isaac y Kerber, 1971).



Figura 4. A) Extracción de flavedo de frutos de mandarina Satsuma 'Okitsu'. B) Muestra seca y molida. C) Destilación de N. D) Valoración de N.

### 2.3. EFECTO DEL DESVERDIZADO Y ENCERADO DE FRUTOS

Luego de la cosecha, en los 2 años de la investigación, los frutos provenientes de cada parcela se dividieron en cuatro tratamientos: Control (C: sin desverdizar, ni encerar), Encerado (E), Desverdizado (D), Desverdizado + Encerado (D+E), (Figura 5). Se colocaron 100 frutos por caja provenientes de la misma parcela (parcela de campo), totalizando 400 frutos por tratamiento y fecha de evaluación.

El desverdizado se realizó en cámara, con las siguientes condiciones: 1-5 mg L<sup>-1</sup> de etileno, CO<sub>2</sub><0,2 %, 18-22 °C de T y 90-95 % de HR, durante 72 horas en el año 1 y 96 horas en el año 2. El primer año, los frutos no desverdizados permanecieron a T y HR ambiente durante las 72 horas que tardó el desverdizado de los demás tratamientos, mientras que el segundo año, los frutos no desverdizados se almacenaron en una cámara con la misma T y HR que la desverdizada.

El encerado se realizó con cera comercial (18 % de sólidos solubles totales en base a 86 g L<sup>-1</sup> de cera de polietileno y 56 g L<sup>-1</sup> de goma laca) y se aplicó en línea de empaque convencional, mediante pulverización sobre rodillos de cerda y nylon.



Figura 5. Frutos de mandarina Satsuma 'Okitsu' desverdizados y no desverdizados.

El almacenamiento en frío se realizó durante 30 días a 4-7 °C, HR>85 % y CO<sub>2</sub><0,5 %; posteriormente los frutos se mantuvieron a temperatura ambiente simulando la vida de mostrador durante 7 días en el año 1 (T media 18,8 °C, HR media 84 %) y 15 días en el año 2 (T media 15,0 °C, HR media 82 %).

### **2.3.1. Incidencia y severidad**

Durante el primer año de investigación las evaluaciones se realizaron: a los 15 días de almacenamiento, a los 30 días de almacenamiento y finalmente luego de la vida de mostrador (7 días a T ambiente). Mientras que el segundo año de la investigación las evaluaciones se realizaron: a los 30 días de almacenamiento y luego de la vida de mostrador (15 días a T ambiente) Se evaluó el porcentaje de frutos manchados (incidencia) y la severidad del daño a través de cuatro categorías que se definen como: 0: cáscara sin manchas, 1: hasta 5 % de la superficie manchada (leve), 2: entre 5-15 % (media) y 3: más de 15 % de superficie manchada (severa).

Para determinar el porcentaje de la cáscara afectada del fruto, se utilizó una cuadrícula transparente y se estimó la superficie total y con daño de cada fruto (Figura 6). La severidad se expresó como frecuencia media acumulada (FMA), donde:  $FMA = \frac{\sum (\text{categoría} \times \text{número de frutos por categoría})}{\text{número de frutos totales}}$ .

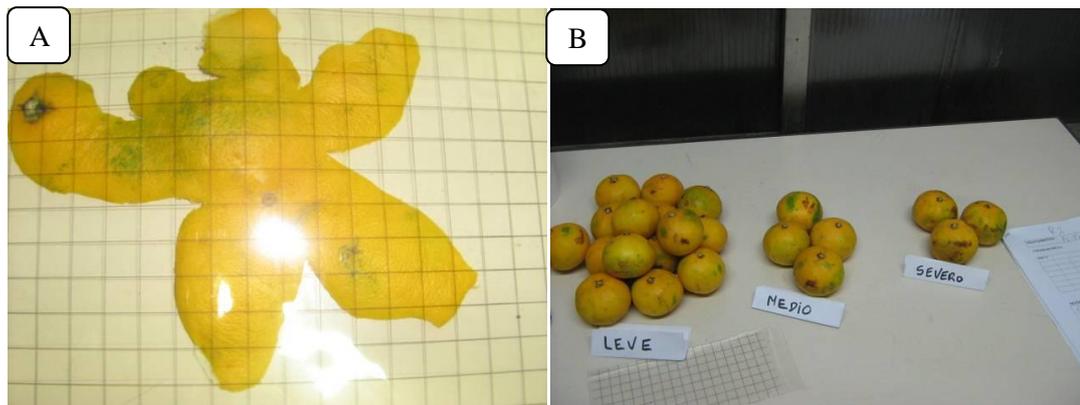


Figura 6. Cuadrícula para determinación de superficie manchada y área total de la cáscara del fruto (A). Frutos agrupados en tres categorías de acuerdo a la severidad del manchado (leve, media y severa) (B).

### **2.3.2. Evaluación de color de los frutos**

En la cosecha, luego del desverdizado, a la salida del almacenamiento y luego de la vida de mostrador se midió el color de los frutos, con colorímetro digital (Color Reader, CR-10, Minolta Co. Ltd. Japón), en una muestra de 20 frutos por tratamiento (5 por repetición). Se utilizó el sistema CIELAB, midiéndose las coordenadas  $L^*a^*b^*$ , donde L mide luminosidad y evoluciona de negro (0) a blanco (100), la coordenada a, evoluciona de verde (-) a rojo (+) en el círculo cromático y la coordenada b, de azul (-) a amarillo (+). Los resultados se presentan como relación a/b.

## **2.4. CONDICIONES AMBIENTALES**

Durante los dos años se registraron las precipitaciones diarias con pluviómetro y la temperatura y humedad relativa desde la última semana de diciembre hasta la cosecha, con sensores (Hygrochron<sup>TM</sup> iButton DS-1923G-F5, Dallas Semiconductors, USA), colocados en el interior de la copa de dos plantas y programados para el registro horario. Los sensores también se colocaron durante la

etapa de postcosecha, previo a la entrada a cámara, durante el desverdizado, almacenamiento y en la vida de mostrador.

## **2.5. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

El diseño experimental fue de bloques completos al azar con 4 repeticiones de 5 árboles en el campo y 100 frutos por repetición y fecha de evaluación en postcosecha por tratamiento. El porcentaje de frutos afectados (incidencia) se analizó ajustando modelos lineales generalizados, asumiendo distribución binomial con función de enlace logit ( $\text{Ln} [p/(1-p)]$ ) y pruebas de tipo Wald para los efectos fijos, con separación de medias por Tukey-Kramer. Las variables FMA, concentración de nutrientes en la cáscara de los frutos, grosor de cáscara y color se analizaron mediante modelos lineales generales y la separación de medias se realizó mediante prueba Tukey o Tukey-Kramer ( $p \leq 0,05$ ). El número de frutos manchados en cada zona se analizó ajustando modelos lineales generalizados, asumiendo distribución Poisson con función de enlace logaritmo natural [ $\text{Ln} (\mu)$ ] y separación de medias Tukey-Kramer ( $p \leq 0,05$ ). El efecto del tratamiento en la zona de aparición del desorden se analizó con la prueba Mantel-Haenszel Chi-Cuadrado, comparando perfiles de distribución de frecuencias.

El primer año, considerando las diferencias en T y HR de frutos desverdizados y no desverdizados, el efecto del encerado se analizó anidado dentro del desverdizado. El segundo año, se realizó un análisis con arreglo factorial de ambos factores (desverdizado y encerado) en cada fecha de evaluación.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. DESCRIPCIÓN Y CARACTERIZACIÓN ANATÓMICA DEL MANCHADO**

##### **3.1.1. Caracterización anatómica de la cáscara de mandarina Satsuma 'Okitsu'**

En la cáscara de frutos maduros de mandarina Satsuma se observó una capa de células epidérmicas pequeñas, rectangulares o cuadrangulares, sin espacios intercelulares, con una película externa de ceras de 2,5  $\mu\text{m}$  de espesor conformando la cutícula. Las células oclusivas de los estomas están elevadas por encima del nivel epidérmico, con 3 ó 4 células acompañantes, rectangulares, angostas y muy compactas, a cada lado de las células oclusivas. La región subepidérmica, que presenta de una a cuatro capas de células parenquimáticas, generalmente isodiamétricas a rectangulares sin espacios intercelulares, se diferencia claramente del tejido parenquimático subsiguiente, el parénquima adyacente. En éste se encontraron las glándulas de aceites esenciales y los terminales de haces vasculares.

Por otra parte se observó un aumento del tamaño celular hacia la zona más profunda, con un incremento de tamaño cada 3-4 capas, mientras que el citoplasma celular presentó menor densidad que en la zona subepidérmica. En las zonas donde las glándulas estaban cercanas entre sí, las células parenquimáticas fueron más oblongas y alargadas en sentido anticlinal.

Se observaron abundantes glándulas de aceite de diferentes tamaños, ubicadas a distintos niveles de profundidad en el tejido. Éstas, presentaron formas bien redondeadas o alargadas en sentido anticlinal o periclinal, conformadas por células alargadas dispuestas en varias capas en forma de anillo. Si bien predominan en esta

zona del tejido, algunas pueden ocupar la región sub-epidérmica hasta contactar con la propia epidermis. Los espacios intercelulares del tejido parenquimático aumentaron hacia la zona del albedo, que es un tejido esponjoso, constituido por células parenquimáticas de forma estrellada. En esta zona se encontraron abundantes haces vasculares (Figura 7).

En las zonas con tejido parenquimático se encontraron cristales romboidales, hexagonales y drusas. Las drusas se observaron en células individuales o en grupos de células de número variable.

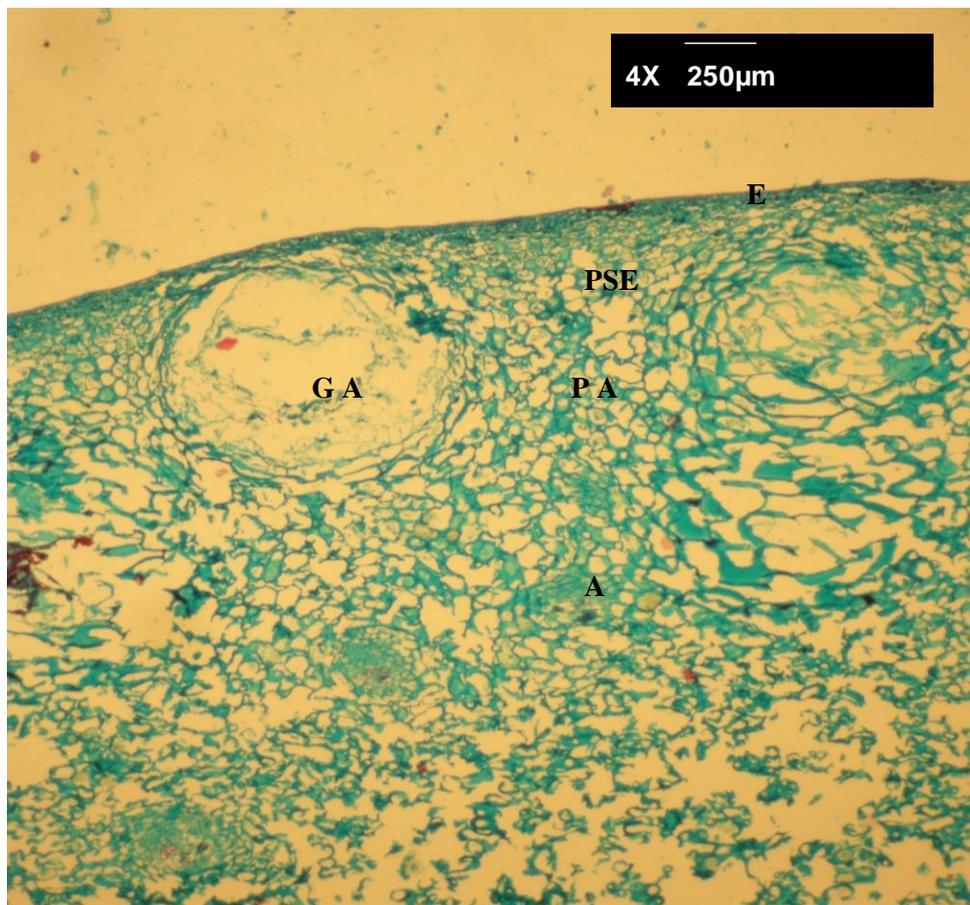


Figura 7. Corte transversal de la cáscara de mandarina Satsuma 'Okitsu' a los 30 días de almacenamiento y 15 de vida de mostrador. E: epidermis con cutícula exterior, PSE: parénquima subepidérmico, PA: parénquima adyacente, GA: glándula de aceite, A: albedo.

### **3.1.2. Descripción y caracterización anatómica de la mancha**

A los 15 días de almacenamiento comenzó a visualizarse el daño en la cáscara de algunos frutos. Inicialmente se observó, entre las glándulas de aceite, una zona irregular de color pardo, que con el paso del tiempo, avanzó en superficie y se oscureció quedando de color marrón. Finalmente, luego de la vida de mostrador, en los casos más severos, dicha zona del tejido se deprimió (Figura 8).



Figura 8. Frutos manchados de mandarina Satsuma 'Okitsu' a los 15 (A) y 30 (B) días de almacenamiento y luego de 7 (C) días de vida de mostrador, año 1.

Al observar microscópicamente el tejido en la zona manchada, luego de 30 días de almacenamiento y 15 de vida de mostrador, se detectó que el desorden celular se ubica fundamentalmente en la zona sub-epidérmica (Figura 9). Se observaron células con el contenido citoplasmático colapsado o retraído, teñidas intensamente de rojo con safranina, indicando la presencia de compuestos lipídicos (cutina, suberina, lignina, quitina). En las zonas más afectadas, las células parenquimáticas subyacentes, presentaron el mismo deterioro que las células subepidérmicas. En estos casos las células de la epidermis también colapsaron (Figura 9C). La pérdida de turgencia celular provocó un aplastamiento de las células, cuyas paredes adoptaron una morfología ondulada. Las glándulas de aceite en las zonas de daño más severo también fueron afectadas, las células hacia el interior de las mismas también colapsaron. El albedo no fue afectado.

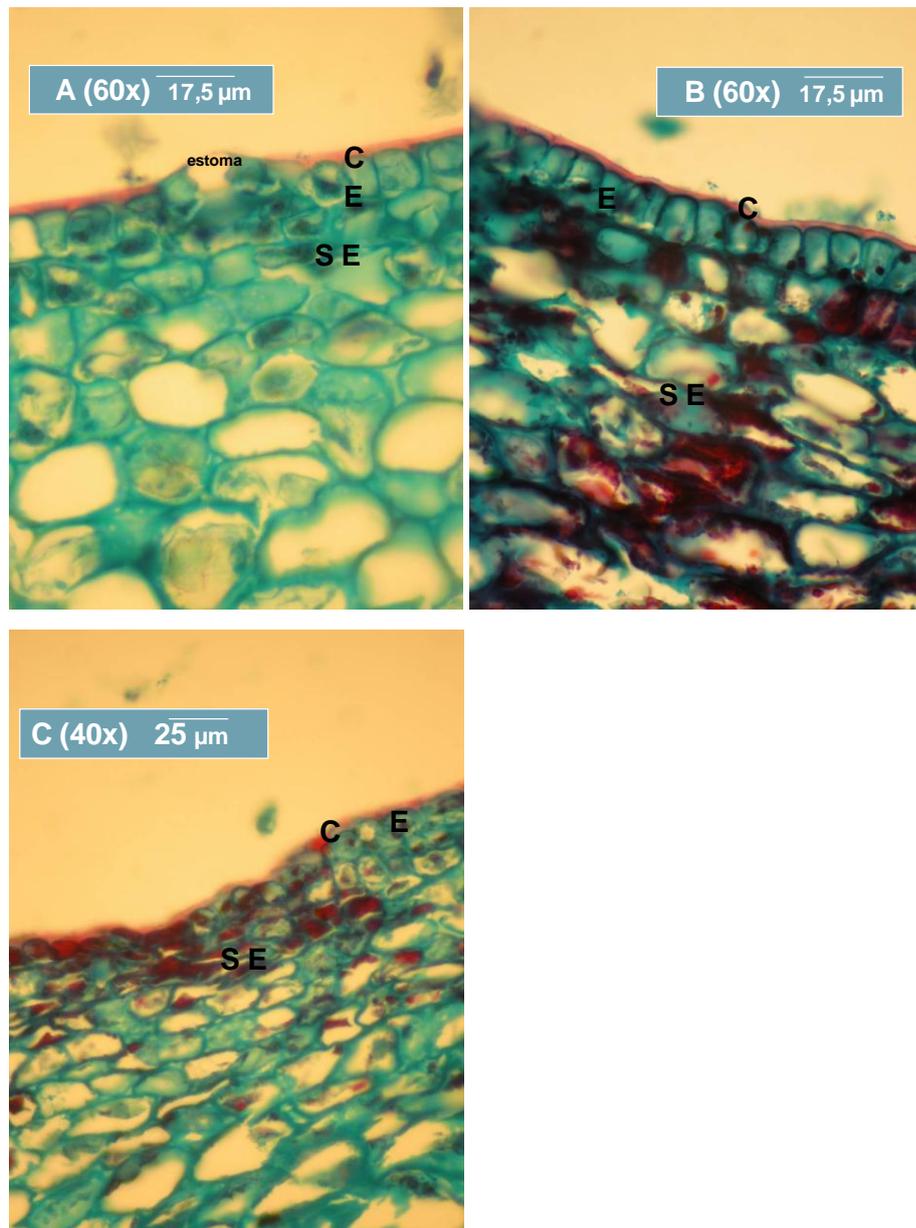


Figura 9: Corte transversal de la cáscara de mandarina Satsuma ‘Okitsu’ a los 30 días de almacenamiento y 15 días de vida de mostrador, donde se observa tejido sano (A), tejido levemente dañado: células colapsadas con pérdida de contenido celular por debajo de la epidermis (B) y tejido con daño severo: células de la epidermis y zona sub-epidérmica colapsadas, con células aplastadas por pérdida de turgencia (C). C: cutícula, E: epidermis SE: parénquima subepidérmico.

### 3.1.3. Zona del fruto afectada

El daño cuantificado a los 30 días de almacenamiento y luego de 15 días de vida mostrador, se manifestó en diferentes zonas del fruto, pudiendo aparecer en más de una de las zonas evaluadas. En más del 40 % de los frutos la mancha se localizó en la zona ecuatorial y en segundo lugar en la zona inferior, alcanzando casi al 30 % de los frutos (Cuadro 3, Figura 10). La zona del cáliz fue la menos afectada.

Cuadro 3. Número medio de frutos con manchas y porcentaje según zona del fruto afectada.

| Momento de muestreo                        | Frutos con manchas por zona |                     |                    |                     |                    |
|--|-----------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
|  | Cáliz<br>N°; (%)            | Superior<br>N°; (%) | Ecuador<br>N°; (%) | Inferior<br>N°; (%) | Estilar<br>N°; (%) |
| 30 días almacenamiento                     | 0,1 c <sup>z</sup> ; (1)    | 1,8 b; (19)         | 3,7 a; (44)        | 1,8 ab; (29)        | 1,1 b; (7)         |
| 30 días almacenamiento + 15 días mostrador | 0,1 c; (1)                  | 2,6 b; (17)         | 5,5 a; (47)        | 3,0 b; (28)         | 1,4 b; (7)         |

<sup>z</sup>Letras diferentes en filas indican diferencias significativas, Tukey-Kramer ( $P \leq 0,05$ )

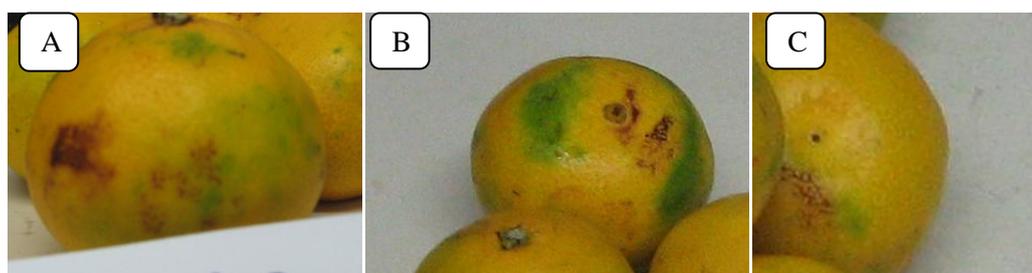


Figura 10. Frutos de mandarina Satsuma 'Okitsu' manchados en la zona ecuatorial y superior (A), cáliz y superior (B) e inferior y estilar (C).

### 3.1.4. Grosor de Cáscara

En términos generales, en los dos años de evaluación los frutos manchados presentaron la cáscara más delgada que los sanos. Al comparar zonas sanas de frutos

con y sin mancha, los frutos afectados tuvieron menor grosor de cáscara que los sanos, alcanzando significancia estadística el segundo año (Cuadro 4). Adicionalmente, al contrastar la zona sana de la cáscara de un fruto manchado con la dañada, esta última siempre fue más fina.

Cuadro 4. Grosor de cáscara en frutos sanos y manchados de mandarina Satsuma ‘Okitsu’ a los 30 días de almacenamiento y 7 días (año 1) o 15 días (año 2) de vida de mostrador.

|                |                       | <b>Grosor de Cáscara (mm)</b> |              |
|----------------|-----------------------|-------------------------------|--------------|
|                |                       | <b>Año 1</b>                  | <b>Año 2</b> |
|                | <b>Zona del fruto</b> |                               |              |
| Fruto sano     | Sana                  | 1,93 a <sup>z</sup>           | 2,01 a       |
| Fruto manchado | Sana                  | 1,80 a                        | 1,61 b       |
|                | Manchada              | 1,58 b                        | 1,42 c       |

<sup>z</sup>Letras distintas en columnas indican diferencias significativas, Tukey-Kramer ( $P \leq 0,05$ ).

### **3.2 EVALUACION DEL CONTENIDO DE NUTRIENTES MINERALES**

#### **3.2.1. Concentración de minerales en la cáscara**

Los resultados de las concentraciones de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg) en el flavedo de frutos sanos y en la zona sana y manchada de frutos afectados, se presentan en el Cuadro 5. En términos generales, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de macronutrientes entre las zonas evaluadas. La mayor concentración de P observada en la zona manchada el primer año, no pudo confirmarse el segundo año de análisis por lo que a priori no parecería existir relación causa-efecto entre la concentración de macronutrientes y la presencia del desorden.

Cuadro 5. Concentración de macronutrientes en el flavedo de frutos sanos y en la zona sana y manchada de frutos afectados de mandarina Satsuma ‘Okitsu’, a los 30 días de almacenamiento y 7 o 15 días de vida de mostrador en el año 1 y 2, respectivamente.

| Año | N (mg gPS <sup>-1</sup> ) |                     | P (mg gPS <sup>-1</sup> ) |            | K (mg gPS <sup>-1</sup> ) |            | Ca (mg gPS <sup>-1</sup> ) |                     | Mg (mg gPS <sup>-1</sup> ) |            |                     |            |       |       |       |
|-----|---------------------------|---------------------|---------------------------|------------|---------------------------|------------|----------------------------|---------------------|----------------------------|------------|---------------------|------------|-------|-------|-------|
|     | Fruto Sano                | Fruto manchado Zona |                           | Fruto Sano | Fruto manchado Zona       |            | Fruto Sano                 | Fruto manchado Zona |                            | Fruto Sano | Fruto manchado Zona |            |       |       |       |
|     |                           | Sana                | Con mancha                |            | Sana                      | Con mancha |                            | Sana                | Con mancha                 |            | Sana                | Con mancha |       |       |       |
| 1   | 18,5 a <sup>z</sup>       | 18,6 a              | 19,1 a                    | 0,63 b     | 0,69 ab                   | 0,73 a     | 10,8 a                     | 10,6 a              | 10,2 a                     | 14,2 a     | 15,4 a              | 14,3 a     | 1,3 a | 1,3 a | 1,1 a |
| 2   | 19,9 a                    | 20,7 a              | 17,8 a                    | 0,83 a     | 0,89 a                    | 0,90 a     | 9,9 a                      | 9,8 a               | 8,4 a                      | 13,0 a     | 12,2 a              | 13,1 a     | 1,0 a | 1,0 a | 0,9 a |

<sup>z</sup>Letras distintas en la misma fila por cada nutriente indican diferencias significativas en las comparaciones con test Tukey-Kramer ( $p \leq 0,05$ )

Cuadro 6. Concentración de micronutrientes en el flavedo de frutos sanos y en la zona sana y manchada de frutos afectados de mandarina Satsuma ‘Okitsu’, a los 30 días de almacenamiento y 7 o 15 días de vida de mostrador en el año 1 y 2, respectivamente.

| Año | Fe (μg gPS <sup>-1</sup> ) |                     | Cu (μg gPS <sup>-1</sup> ) |            | Mg (μg gPS <sup>-1</sup> ) |            | Zn (μg gPS <sup>-1</sup> ) |                     |            |        |        |        |
|-----|----------------------------|---------------------|----------------------------|------------|----------------------------|------------|----------------------------|---------------------|------------|--------|--------|--------|
|     | Fruto Sano                 | Fruto manchado Zona |                            | Fruto Sano | Fruto manchado Zona        |            | Fruto Sano                 | Fruto manchado Zona |            |        |        |        |
|     |                            | Sana                | Con mancha                 |            | Sana                       | Con mancha |                            | Sana                | Con mancha |        |        |        |
| 1   | 78,7 b <sup>z</sup>        | 81,0 b              | 96,9 a                     | 44,2 b     | 47,4 b                     | 62,8 a     | 10,4 b                     | 11,4 ab             | 12,1 a     | 9,6 b  | 9,7 b  | 11,6 a |
| 2   | 49,9 b                     | 91,0 a              | 96 a                       | 18,6 c     | 22,8 b                     | 28,2 a     | 13,9 b                     | 16,1 b              | 29,9 a     | 14,2 b | 20,1 a | 27 (*) |

<sup>z</sup>Letras distintas en la misma fila por cada nutriente indican diferencias significativas en las comparaciones con test Tukey-Kramer ( $p \leq 0,05$ ).

(\*) Faltaron datos para el análisis estadístico.

En ambos años, se encontró mayor concentración de micronutrientes en la zona manchada de frutos afectados con respecto al flavedo de frutos sanos, y en algunas ocasiones a la zona sana del mismo fruto (Cuadro 6).

### **3.2.2. Concentración de minerales en hojas fructíferas (muestreo de otoño)**

De acuerdo a los estándares (Menino 2012; Legaz et al., 1995; Mara et al., 1980 a, b) , se encontró muy baja concentración foliar de K, baja concentración de P y Mg, y muy alta concentración de Ca y Cu (Cuadro 7). El N, que el primer año se encontraba en niveles muy buenos para hoja fructífera, tuvo un pronunciado descenso el segundo año. El Cu se encontró muy alto el primer año, pero el segundo se redujo a la mitad, aún manteniéndose en valores altos. Como consecuencia la relación Ca/Mg fue extremadamente alta. El Fe, Mn y Zn se encontraron dentro del rango óptimo para esta variedad.

Cuadro 7. Concentración de nutrientes minerales en hoja fructifera.

| Año | N                       | P    | K    | Ca   | Mg   | Fe                      | Cu    | Mn   | Zn   |
|-----|-------------------------|------|------|------|------|-------------------------|-------|------|------|
|     | (mg gPS <sup>-1</sup> ) |      |      |      |      | (µg gPS <sup>-1</sup> ) |       |      |      |
| 1   | 2,40                    | 0,10 | 0,51 | 5,01 | 0,23 | 107,5                   | 314,8 | 34,8 | 46,5 |
| 2   | 1,98                    | 0,10 | 0,46 | 4,69 | 0,18 | 88,8                    | 165,0 | 39,5 | 52,3 |

### **3.3. EFECTO DEL DESVERDIZADO Y ENCERADO DE FRUTOS**

La incidencia del desorden fisiológico varió entre años, alcanzando a los 30 días de almacenamiento el 17 % de los frutos desverdizados y encerados el primer año y solo el 7 % el segundo año (Figuras 11 y 13).

### 3.3.1. Incidenia y severidad en el año 1

Al momento de la cosecha y luego del desverdizado no hubo frutos manchados. La aparición del desorden recién se hizo evidente a partir de los 15 días de almacenamiento. La tendencia general fue de incremento del manchado durante el período de almacenamiento y luego de 7 días de vida de mostrador (Figura 11). Los tratamientos sin desverdizar, cuyos frutos permanecieron a T y HR ambiente durante las 72 horas que duró el desverdizado de los demás tratamientos (T-HR ambiente y T-HR controlada, respectivamente), presentaron desde los 15 días de almacenamiento, significativamente mayor porcentaje de frutos manchados que los no desverdizados ( $P \leq 0,05$ ), (Figura 12). Esta diferencia se mantuvo durante toda la vida postcosecha.

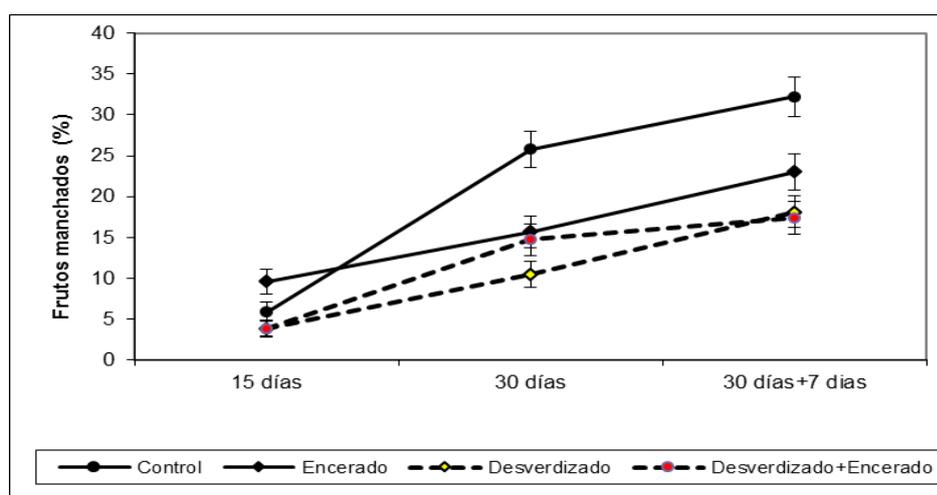


Figura 11. Evolución del manchado de mandarina Satsuma 'Okitsu' durante el almacenamiento (15 y 30 días) y luego de 7 días de vida de mostrador (30 + 7), expresado en porcentaje de frutos manchados, de acuerdo a los tratamientos de desverdizado y encerado.

En los frutos no desverdizados, la aplicación de cera disminuyó significativamente ( $P \leq 0,05$ ) la incidencia de manchado a los 30 días de almacenamiento, manteniéndose esa tendencia a los 7 días de vida de mostrador. Por

el contrario, en los frutos desverdizados, la aplicación de ceras no provocó diferencias significativas en la incidencia durante todo el período de estudio (Figura 12).

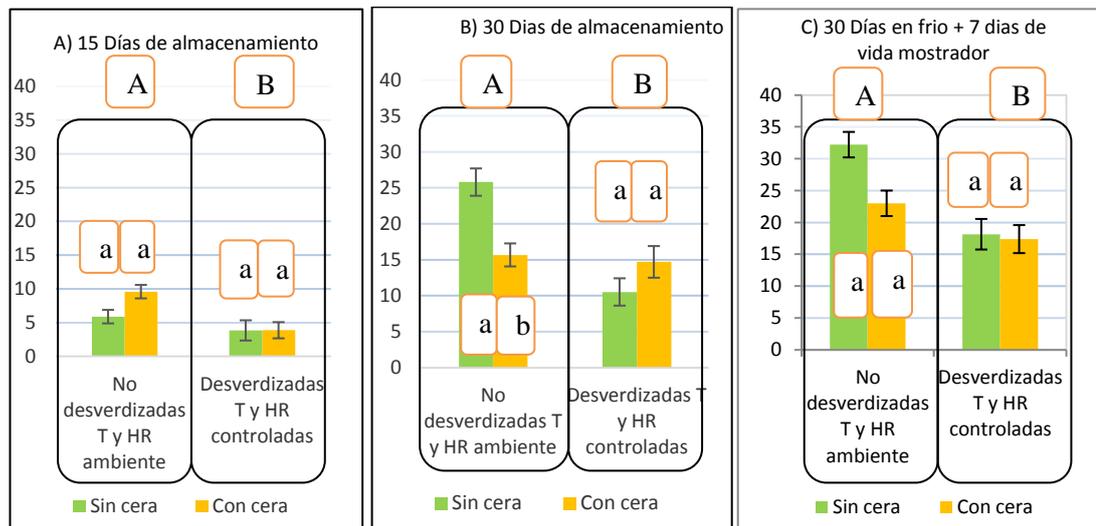


Figura 12. Porcentaje de frutos manchados de mandarina Satsuma ‘Okitsu’. Efecto del encerado según condición previa a la entrada a cámara: no desverdizado: T y HR ambiente y desverdizado: T y HR controlada. Letras diferentes indican diferencias significativas, Tukey-Kramer ( $P \leq 0,05$ ); letras mayúsculas: efecto desverdizado, letras minúsculas: efecto encerado anidado dentro de cada nivel de desverdizado.

La severidad, medida como frecuencia media acumulada del manchado, no presentó diferencias entre tratamientos a los 15 días de almacenamiento. A los 30 días, solamente se verificaron diferencias entre los frutos desverdizados con T y HR controladas y no desverdizados con T y HR ambiental, independientemente del tratamiento de encerado (Cuadro 8).

Cuadro 8. Frecuencia media acumulada (FMA) del manchado de frutos de mandarina Satsuma ‘Okitsu’ luego de 30 días de almacenamiento (no desverdizado: T y HR ambiente y desverdizado: T y HR controlada).

| Tratamiento     | FMA                  |
|-----------------|----------------------|
| Desverdizado    | 0,186 a <sup>z</sup> |
| No desverdizado | 0,300 b              |

<sup>z</sup>Letras distintas indican diferencias significativas, Tukey-Kramer ( $P \leq 0,05$ ).

### 3.3.2. Incidencia y severidad en el año 2

La evolución de la incidencia presentó un comportamiento similar a la del primer año, aunque con valores menores en todos los tratamientos (Figura 13). A diferencia del primer año y controladas las condiciones ambientales previo a la entrada al almacenamiento, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos a los 30 días de almacenamiento ( $P \leq 0,05$ ). A los 15 días de vida de mostrador, el tratamiento de desverdizado no afectó la incidencia de frutos manchados, mientras que el encerado la redujo significativamente, (Figura 14). El mismo comportamiento se observó en la FMA (Cuadro 9).

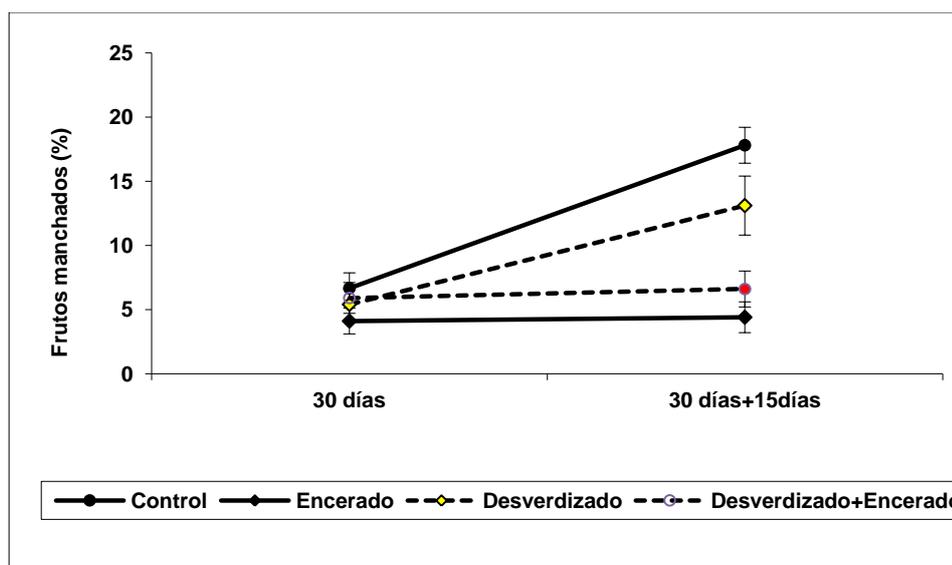


Figura 13. Evolución del manchado de frutos de mandarina Satsuma ‘Okitsu’ durante el almacenamiento (30 días) y luego de 15 días de vida de mostrador (30 + 15), expresado en porcentaje de frutos manchados de acuerdo a tratamientos de desverdizado y encerado.

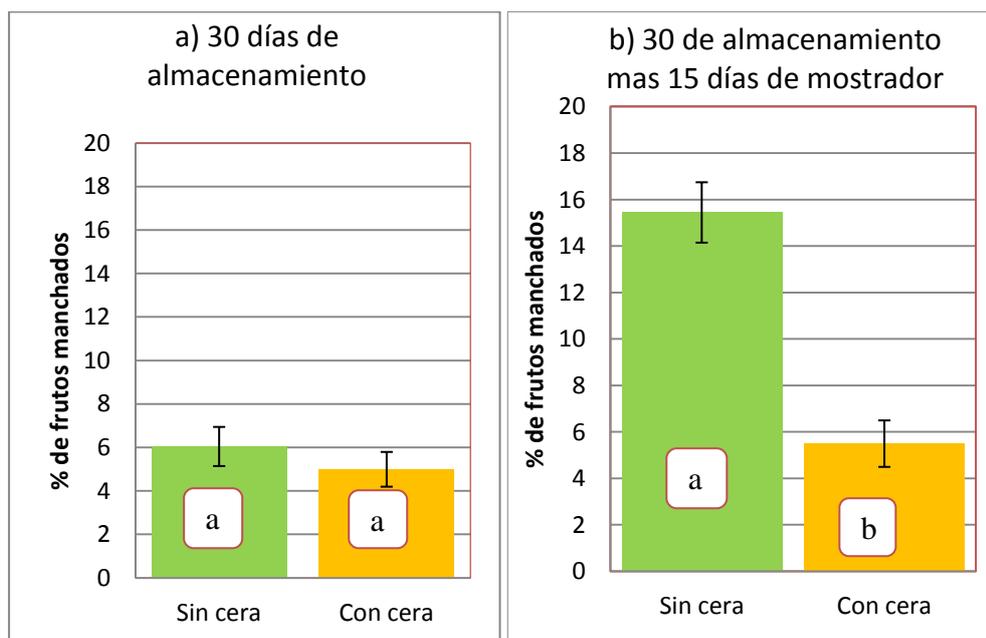


Figura 14. Efecto del encerado de frutos en la incidencia del manchado de mandarina Satsuma ‘Okitsu’, año 2. Letras diferentes por fecha de muestreo indican diferencias significativas, Tukey-Kramer ( $P \leq 0,05$ ).

Cuadro 9. Frecuencia media acumulada del manchado de frutos de mandarina Satsuma ‘Okitsu’ luego de 30 días de almacenamiento y 15 días de vida de mostrador.

| Tratamiento | FMA                  |
|-------------|----------------------|
| Encerado    | 0,104 b <sup>z</sup> |
| No encerado | 0,294 a              |

<sup>z</sup>Letras distintas indican diferencias significativas, Tukey-Kramer ( $P \leq 0,05$ ).

### 3.3.3. Zona de aparición del daño en el fruto

Los tratamientos no afectaron la zona de aparición de la mancha; en todos los casos los frutos se mancharon más en la zona del ecuador y en segundo lugar, en la zona inferior (Figura 15).

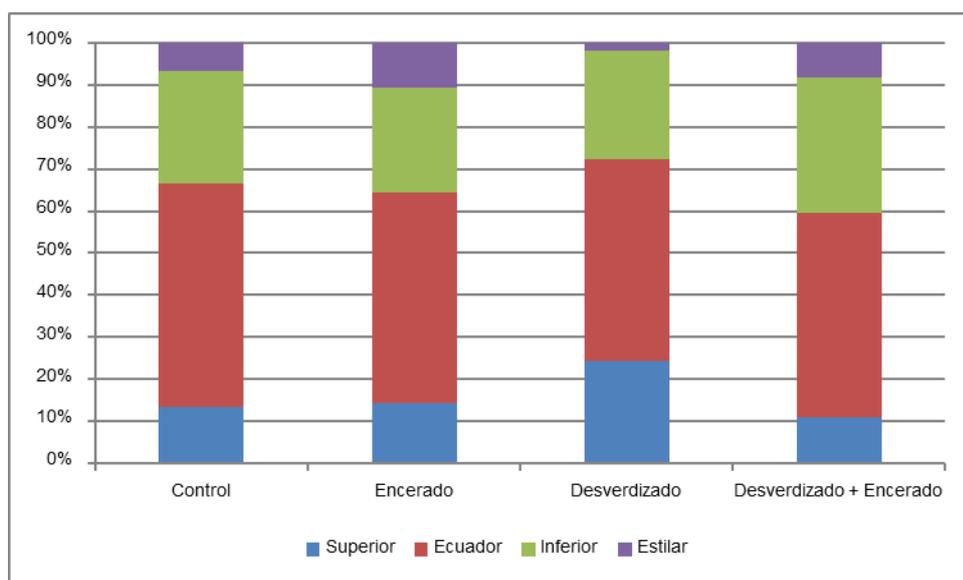


Figura 15. Zonas de aparición del daño en el fruto según tratamiento, año 2.

### 3.3.4. Color de frutos

En el cuadro 10 se presenta la evolución del color de los frutos desde el momento de la cosecha hasta el final del experimento. En general, en los cítricos, la relación  $a/b$  es un buen estimador del color de los frutos. Esta evoluciona de negativo a positivo cuando inician el cambio de color, por lo tanto el 0 indica el cambio de color. La variable  $a$  evoluciona de verde a rojo en el círculo cromático, mientras que la variable  $b$  lo hace de azul a amarillo, en el caso de los cítricos esta última es siempre positiva y se incrementa a medida que el fruto va adquiriendo una tonalidad amarillenta.

Los frutos se cosecharon con una relación  $a/b$  de -0,17 y -0,27 el primer y segundo año, respectivamente. Previo a la entrada a la cámara de almacenamiento y hasta 15 días de almacenamiento, solo se encontró diferencias entre los frutos desverdizados y sin desverdizar, independientemente de haber sido encerados o no. El primer año, a los 30 días de almacenamiento y luego de la vida de mostrador, además del efecto mencionado, se encontró un efecto significativo del encerado, que mantuvo los frutos más verdes. El segundo año, luego del almacenamiento, los frutos no desverdizados y encerados finalizaron con un color significativamente más verde que los provenientes de los demás tratamientos (Cuadro 10).

Cuadro 10.- Color de frutos por tratamiento durante todo el experimento, representado a través de la relación  $a/b$  de las coordenadas CIELAB.

| <b>Año</b> | <b>Tratamiento</b>      | <b>Cosecha</b> | <b>Entrada al almacenamiento en frío</b> | <b>15 días de frío</b> | <b>30 días de frío</b> | <b>30 días de frío + 7 días de mostrador</b>  |
|------------|-------------------------|----------------|--|------------------------|------------------------|---|
| 1          | Control                 | - 0,17         | - 0,04 b <sup>z</sup>                    | 0,09 b                 | 0,17 <sup>y</sup>      | 0,24  |
|            | Encerado                |                |  |                        | 0,12                   | 0,18  |
|            | Desverdizado            |                | 0,01 a                                   | 0,14 a                 | 0,26                   | 0,27  |
|            | Desverdizado + Encerado |                |  | 0,15                   | 0,23                   |   |
| <b>Año</b> | <b>Tratamiento</b>      | <b>Cosecha</b> | <b>Entrada al almacenamiento en frío</b> | <b>15 días de frío</b> | <b>30 días de frío</b> | <b>30 días de frío + 15 días de mostrador</b> |
| 2          | Control                 | -0,27          | -0,27 b                                  | -                      | 0,14 b                 | 0,31 a  |
|            | Encerado                |                |  | -                      | -0,01 c                | 0,16 b  |
|            | Desverdizado            |                | -0,07 a                                  | -                      | 0,19 a                 | 0,35 a  |
|            | Desverdizado + Encerado |                |  | -                      | 0,16 a                 | 0,30 a  |

<sup>z</sup> Letras distintas en un mismo año, indican diferencias significativas, Tukey-Kramer ( $P \leq 0,05$ ). <sup>y</sup> Efecto desverdizado y efecto encerado, sin interacción ( $P \leq 0,05$ ).

### 3.4. CONDICIONES AMBIENTALES

#### 3.4.1. Condiciones ambientales previas a la cosecha

Las precipitaciones ocurridas durante cada ciclo productivo, desde el mes de setiembre hasta el momento de la cosecha en el mes de marzo presentaron diferencias entre las temporadas (Figura 16). En el primer año las precipitaciones fueron menores que en el segundo, alcanzando 420 mm y 857 mm, respectivamente, mientras que la incidencia de frutos manchados fue mayor el primer año (Figuras 11 y 13). Adicionalmente, durante los 15 días previos a la cosecha, el primer año prácticamente no se registraron precipitaciones, mientras que el segundo año alcanzaron 48 mm en 4 días (Figura 17).

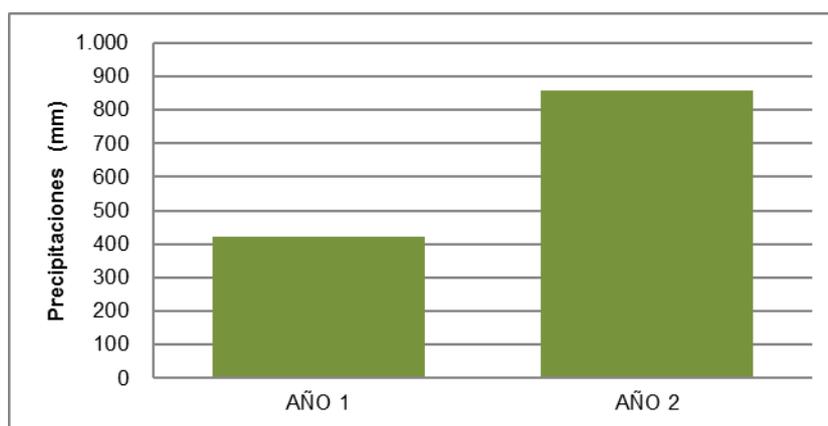


Figura 16. Precipitaciones (mm) registradas en cada temporada desde brotación hasta cosecha (setiembre-marzo).

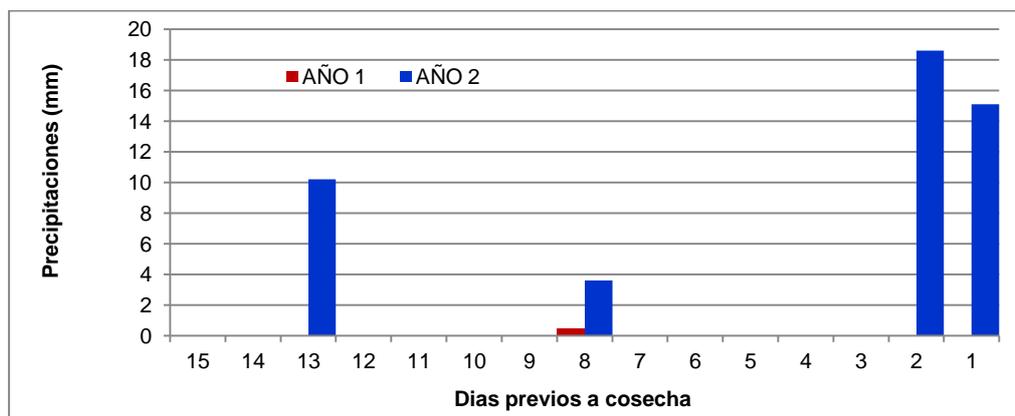


Figura 17. Precipitaciones (mm) registradas durante los 15 días previos a cosecha en las dos temporadas.

La temperatura media y mínima prácticamente no varió entre temporadas. Sin embargo, la temperatura máxima en las últimas dos semanas del ciclo, fue superior el primer año, superando en algunos días los 40 °C; este período coincide con la Fase III de crecimiento de los frutos (Figura 18).

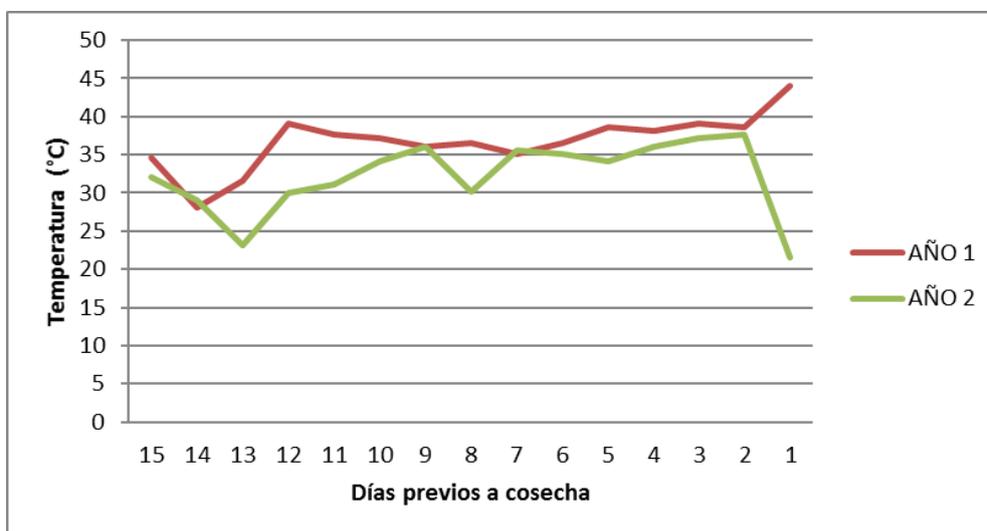


Figura 18. Temperatura máxima durante los 15 días previos a la cosecha en las dos temporadas.

La humedad relativa media diaria durante la primera temporada, fue menor en comparación a la segunda. Esta tendencia se acentuó en los últimos días previos a la

cosecha, cuando en la mayoría de los días la HR apenas sobrepasó el 50 %. El día previo a la cosecha, en la segunda temporada, la HR prácticamente duplicó los valores registrados en la primera (Figura 19).

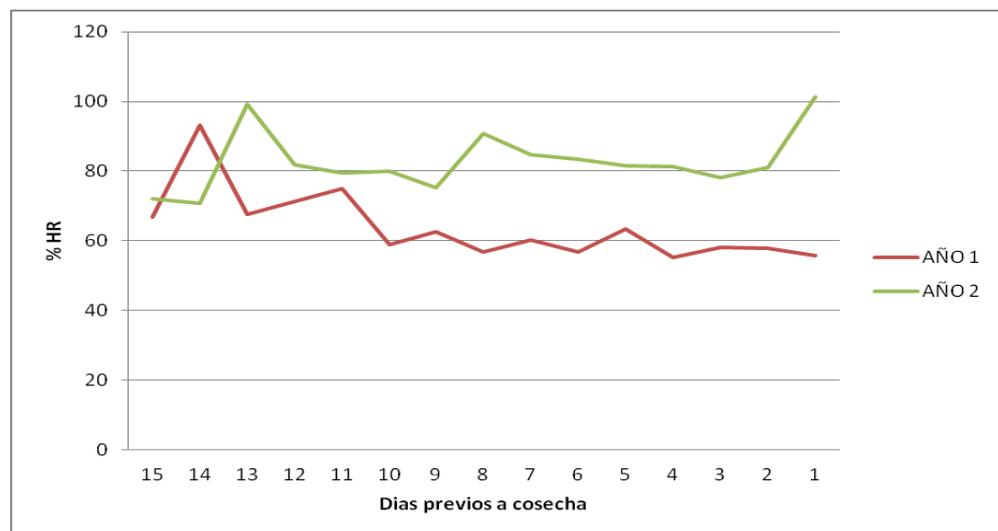


Figura 19. Humedad relativa media diaria (%) en las dos semanas previas a la cosecha, por temporada.

### **3.4.2. Condiciones ambientales durante el desverdizado**

El primer año, durante el período de desverdizado, los frutos de los tratamientos Control y Encerado, que no entraron a la cámara, se mantuvieron en una habitación sin control de temperatura y humedad. En esas condiciones, la temperatura media durante esos 4 días fue 25° C y alcanzó niveles de hasta 33° C; la HR media fue 65,2 % y presentó un mínimo de 52 % (Anexo 3, Figuras 1 y 2). Los frutos desverdizados, por el contrario, se mantuvieron con una temperatura media de 20 °C y 90 % de HR durante los 4 días.

El segundo año, los frutos no desverdizados se mantuvieron en una cámara con la temperatura y humedad relativa controladas. La temperatura logró mantenerse similar entre ambos tratamientos durante 60 horas, posteriormente, esta disminuyó unos 5° C en la cámara sin desverdizado (Figura 20).

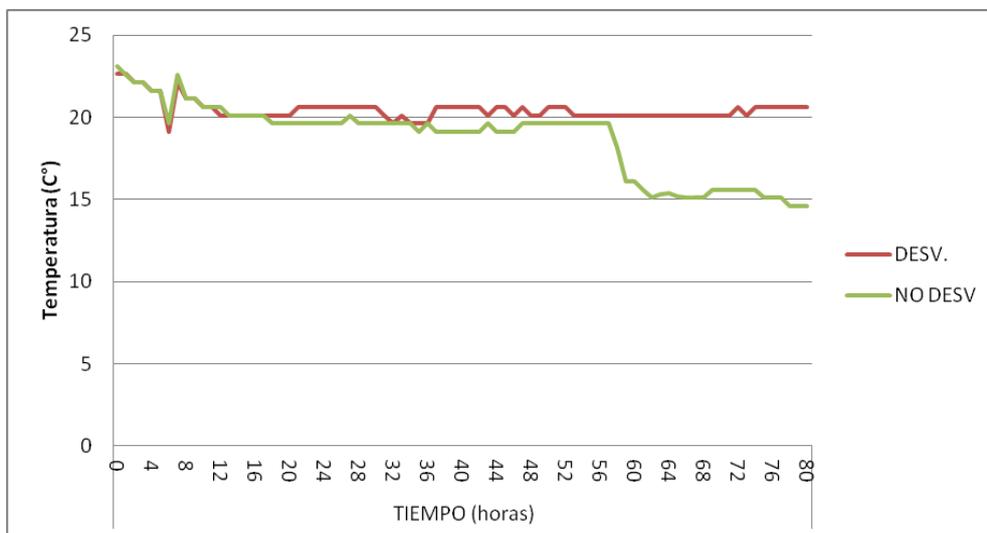


Figura 20. Temperatura (°C) en cámara de desverdizado y no desverdizado, año 2.

La humedad relativa en ambas cámaras se mantuvo en general por encima del 80 %, con un promedio de 91,2 % y 81,9 % en la cámara de desverdizado y no desverdizado, respectivamente (Figura 21).

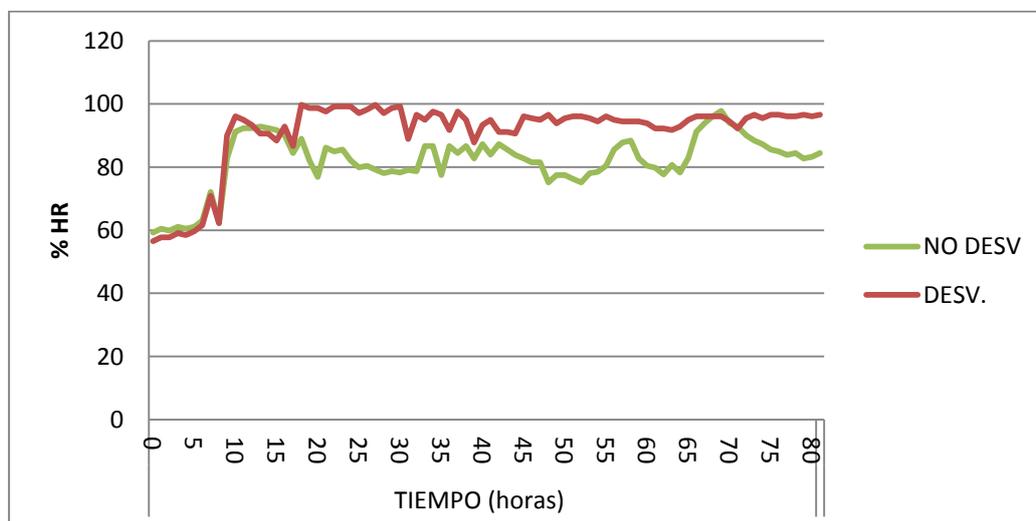


Figura 21. Humedad relativa (%) en cámara de desverdizado y no desverdizado, año 2.

### **3.4.3. Condiciones ambientales durante el almacenamiento**

Las condiciones ambientales durante el almacenamiento fueron muy similares entre años. La temperatura promedio fue aproximadamente 7° C, con un mínimo de 4° C y un máximo de 17,6 °C el día del ingreso a la cámara; la humedad relativa media fue 97 % en ambos años, con un mínimo de 83 % y 68 % en el año 1 y 2, respectivamente (Cuadro 11).

Cuadro 11. Temperatura (°C) y humedad relativa (%) mínima, media y máxima durante el almacenamiento en cámara años 1 y 2.

|       |                  | <b>Mínima</b> | <b>Media</b> | <b>Máxima</b> |
|-------|------------------|---------------|--------------|---------------|
| Año 1 | Temperatura (°C) | 4,13          | 7,5          | 14,4          |
|       | HR (%)           | 82,7          | 96,6         | 100           |
| Año 2 | Temperatura (°C) | 4,01          | 7,1          | 17,6          |
|       | HR (%)           | 67,8          | 97,5         | 100           |

### **3.4.4 Condiciones ambientales durante la vida de mostrador**

Durante la vida de mostrador, la temperatura media fue de 18,5 °C y 14,9 ° C, y la HR fue 80 % y 83,7 %, el primer y segundo año, respectivamente. En el cuadro 12 se presentan los valores promedios para ambas temporadas.

Cuadro 12. Temperatura (°C) y humedad relativa (%) mínima, media y máxima de durante la vida de mostrador, años 1 y 2.

|       |                  | <b>Mínima</b> | <b>Media</b> | <b>Máxima</b> |
|-------|------------------|---------------|--------------|---------------|
| Año 1 | Temperatura (°C) | 11,6          | 18,5         | 21,7          |
|       | HR (%)           | 63,1          | 80,0         | 98,8          |
| Año 2 | Temperatura (°C) | 7,6           | 14,9         | 19,6          |
|       | HR (%)           | 57,3          | 83,7         | 100           |

#### **4. DISCUSIÓN**

El manchado de mandarina Satsuma ‘Okitsu’ comenzó a manifestarse externamente a los 15 días de almacenamiento en el primer año de investigación. Al inicio, se observó una zona irregular de color pardo entre las glándulas de aceite, que se fue incrementando y oscureciendo con el tiempo. Finalmente, después de 30 días de almacenamiento y 7 – 15 días de vida de mostrador, en los casos más severos dicha zona del tejido se deprimió (Figura 9). A nivel microscópico, después de un período de más de 45 días de haber sido cosechados los frutos, el daño se localizó en el tejido subepidérmico, similar a lo encontrado por Da Luz et al. (2014) en frutos previo a la cosecha. En zonas con daño leve, se observó disgregación de células con deterioro parcial de sus paredes, mientras que en zonas con daño más severo, las células presentaron su citoplasma retraído, dando lugar a un colapso celular con la consiguiente pérdida de turgencia, provocando aplastamiento celular. En estos frutos también se afectaron las glándulas de aceites esenciales, sin presentarse daños en la cutícula.

El deterioro celular y la consiguiente oxidación enzimática del contenido vacuolar, rico en sustancias fenólicas, podría estar explicando la coloración marrón que se observa a simple vista cuando se manifiesta este desorden (Matile, 1984).

El ‘colapso de la corteza’, reportado en mandarinas Satsumas y Clementinas en las condiciones productivas de Sudáfrica, presenta un daño celular en las capas subepidérmicas del flavedo y en el área adyacente a las glándulas de aceite. Éstas pueden colapsar, liberando aceites esenciales, con la consecuente fitotoxicidad del tejido. La epidermis permanece inalterada, tanto en los frutos afectados como en los sanos (Cronje et al., 2011, Van Rensburg et al., 2004). Los daños encontrados en nuestro experimento son muy similares a los descritos anteriormente, con la diferencia que en zonas de daño muy severo, las células de la epidermis colapsaron. Por otro lado, a diferencia del desorden en estudio, los frutos de naranjas ‘Navelina’

y 'Navelate' afectados por el 'colapso de la corteza' en las condiciones de España, se caracterizan por una depresión inicial del flavedo, que posteriormente se vuelve de color marrón rojizo (Agustí et al., 2001). Esta alteración está asociada a la pérdida de agua de las células situadas en la zona de coexistencia del flavedo con el albedo, avanzando hacia el exterior alcanzando la epidermis y hacia el interior afectando las capas más profundas del albedo. En forma similar a nuestros resultados (Figura 9), la epidermis de los frutos de naranja 'Navelate' aparece intacta durante varias semanas y tanto la composición de la cera de la superficie como la cutícula, son similares en zonas sanas y dañadas (Agustí et al., 2004a). En términos generales nuestros resultados concuerdan parcialmente con descripciones realizadas para los diferentes desórdenes fisiológicos mencionados previamente. Sin embargo, el manchado de la mandarina Satsuma 'Okitsu' causado por el frío, difiere de lo descrito para diferentes especies cítricas en respuesta a este factor. En estos frutos, desde el inicio las células epidérmicas colapsan como consecuencia de la ruptura del tonoplasto y el deterioro del citoplasma altera la estructura y el metabolismo de las ceras que protegen la epidermis (Agustí et al., 2004a, Vercher et al., 1994, Almela et al., 1992, Cohen et al., 1990). Por lo tanto, el manchado puede asociarse a una mayor permeabilidad de la cutícula en las zonas afectadas del fruto, lo que favorece la pérdida de agua hacia la atmósfera y altera el balance hídrico de dichas zonas (Vercher et al., 1994). El manchado en estudio tampoco parece asociarse al picado de la corteza descrito en frutos de pomelo 'Marsh' y mandarina 'Fallglo', que se asocia al colapso de las glándulas de aceite, provocando leves depresiones en las regiones por encima de éstas. En el tejido epidérmico, subepidérmico y en el albedo subyacente a las glándulas, se observa colapso celular y células con pérdida de la orientación característica (Petraceck et al., 1998, 1995).

El porcentaje de frutos manchados varió entre años y se incrementó con el tiempo de almacenamiento y la vida mostrador. La incidencia de frutos manchados luego del desverdizado y encerado, alcanzó a los 30 días de almacenamiento un 17 % de los frutos el primer año y un 7 % el segundo (Figuras 12 y 13). Las condiciones ambientales previas a la cosecha, podrían afectar la manifestación de desórdenes

fisiológicos, ya que estarían generando una mayor o menor sensibilidad de los frutos al manchado. En este experimento, en el primer año las precipitaciones fueron 420 mm desde la floración hasta la cosecha, y durante los 15 días previos a la misma no alcanzaron a 1 mm. Por el contrario, en el segundo año las precipitaciones fueron 857 mm en el ciclo de crecimiento y en 4 de los últimos 15 días, totalizaron 48 mm (Figuras 16 y 17). Adicionalmente, la temperatura en los días previos a la cosecha en el primer año fue siempre superior a la registrada en el segundo. Con respecto a la HR, ésta fue en promedio menor el primer año de investigación, presentado valores que no alcanzaron el 60 %, mientras que en el segundo año los valores promedio superaron el 80 % en el mismo periodo. Considerando en conjunto las variables ambientales, la incidencia del daño podría estar relacionada con bajas precipitaciones y HR y alta temperatura ambiente durante los días previos a la cosecha. Probablemente el estrés ocasionado por la deshidratación de la planta determinó una mayor sensibilidad de los frutos a manifestar el manchado en estudio. El ‘colapso de la corteza’ de naranja ‘Navelate’ se ha asociado a la presencia de vientos y baja HR (40-45 %), lo que provoca alta evapotranspiración (Almela et al., 1992) y a cambios bruscos de la HR durante el desarrollo del fruto (Agustí et al., 2004 a y b, 2001).

La localización del daño fue mayoritariamente en la zona ecuatorial; más del 40 % de los frutos afectados lo presentó en esta región, mientras que solo el 1 % de los frutos manifestó el daño en la zona del cáliz. Según Roger (1988), este tipo de daño se puede atribuir al pasaje de los frutos por las líneas de empaque (rodillos, cepillos, etc.), por lo tanto, se esperaría que la zona del ecuador se manchara más. En nuestra investigación, los frutos solo se trasladaron al pasar por la enceradora y lo hicieron durante el mismo tiempo los dos años, mientras que la incidencia de frutos manchados varió notablemente entre años, por lo que consideramos que la zona ecuatorial es más sensible, independiente del traslado que realicen los frutos por la línea de empaque.

Los frutos manchados presentaron la cáscara más fina que los sanos y a su vez, en las zonas afectadas estaba más delgada que en las sanas. El grosor de la cáscara se

ha vinculado con la nutrición mineral. Concentraciones elevadas de K promueven el incremento del grosor de la cáscara de los frutos (Obreza, 2003, Embleton et al., 1973, Jones y Embleton 1969, Jones et al., 1967), mientras que los bajos niveles de nitrógeno en el suelo se han asociado con frutos de cáscara fina (Le Roux y Crous, 1938). Considerando el análisis foliar como una medida del estado nutricional de las plantas del experimento, el contenido de K fue bajo en ambos años (0,51 % y 0,46 %) y no se relacionó con la incidencia de frutos manchados. El N varió considerablemente, siendo más alto el primer año (2,40 %), de mayor incidencia, que el segundo (1,98 %), de menor incidencia.

En los dos años de estudio, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de macronutrientes (N, P, K, Ca y Mg) en el flavedo de frutos manchados y no manchados. Por el contrario, en los frutos dañados, los micronutrientes (Fe, Cu, Mn y Zn) se encontraron en mayor concentración. En estos frutos, las zonas con manchas también presentaron mayor nivel de micronutrientes que las sanas, sin diferencias en las concentraciones de macronutrientes. La mayor presencia de Fe, Cu, Mn y Zn en los frutos afectados y en las zonas dañadas, podría estar relacionada al incremento de enzimas superóxido dismutasas (SODs), ya que este grupo de metaloproteínas es considerado de defensa primaria frente a las especies reactivas de oxígeno (ROS) y su reacción es mediada por dichos iones metálicos (Arbona y Gómez-Cadenas, 2012). Se sugiere que las condiciones ambientales precosecha promotoras de la deshidratación, ocurridas en este experimento, podrían haber provocado un incremento del estrés oxidativo y ROS (Arbona et al., 2008) y consecuentemente un incremento de las SODs. Adicionalmente, el nivel foliar de Fe y Cu alcanzó mayores valores el primer año, de mayor incidencia de frutos manchados, que el segundo. En frutos cítricos, en estudios realizados durante el almacenamiento, se ha demostrado el efecto beneficioso de estas enzimas en el control de desórdenes de cáscara. En la cáscara de mandarina ‘Fortune’, las SODs aumentan en respuesta al acondicionamiento térmico (3 días a 37 °C), por lo que se sugiere su participación en la disminución del daño por frío (Sala y Lafuente, 1999). En naranja ‘Navelate’ aumentan en respuesta a la conservación a baja HR (Sala y

Lafuente, 2004), lo que se asocia a una menor incidencia del ‘colapso de la corteza’ (Lafuente y Sala, 2002).

Considerando estos resultados en forma global, no se puede establecer una relación entre los macronutrientes y la aparición de las manchas, mientras que la mayor concentración de micronutrientes podría ser consecuencia y no causa del desorden. Sin embargo, estos resultados preliminares no son suficientes para establecer relaciones causa-efecto, abriéndose una nueva línea de investigación, que considere mecanismos de defensa de la cáscara del fruto cítrico en respuesta al estrés oxidativo.

El tratamiento de desverdizado con etileno para acelerar el cambio de color de los frutos, no afectó el porcentaje de frutos manchados. Este tratamiento se ha reportado como promotor de varios desórdenes en la cáscara, tales como el daño por frío y la podredumbre de cáliz en naranja ‘Shamouti’ (Porat et al., 1999), también se encontró ennegrecimiento del cáliz y frutos con manchas de cáscara en mandarinas Satsumas cuando el tratamiento es prolongado (Vázquez, 2005). Sin embargo, también se ha propuesto un efecto protector del etileno frente al estrés (Yang y Hoffmann, 1984), disminuyendo el daño por frío en naranjas ‘Navelate’ (Lafuente et al. 2004), la incidencia de peteca en limones (Wild, 1991) y el ‘colapso de la corteza’ en naranjas ‘Navelina’ y ‘Navelate’ (Establés, 2008, Cajuste y Lafuente, 2007, Lafuente y Sala, 2002). Uno de los efectos positivos del tratamiento con etileno consiste en estimular el metabolismo fenólico en la cáscara de los frutos, probablemente activando mecanismos adicionales de defensa (Cajuste y Lafuente, 2007).

El encerado de los frutos disminuyó la incidencia y severidad del manchado en ambas temporadas. La disminución del daño puede deberse a que las ceras (goma laca y polietileno) aplicadas en postcosecha, reducirían la pérdida de agua, al proporcionar una barrera que limite el intercambio gaseoso, logrando una menor deshidratación. Estos resultados también fueron encontrados en trabajos con

mandarinas y pomelos (Zócalo 2009, Conesa 2004, Dou 2004, Kaplan 1986, Hagenmaier y Baker, 1995,1994).

El tiempo de almacenamiento incrementó la incidencia y severidad del manchado, acelerándose en el periodo de vida de mostrador con una temperatura media entre 15 y 19 °C. Este agudizamiento del daño es esperable, ya que una vez colapsadas las células, la pérdida del contenido celular, su degradación y oxidación es un proceso gradual que está asociado a la respiración y evaporación. Dou et al. (2001) en sus investigaciones sobre el colapso de la corteza encontraron patrones de comportamiento similares, determinando la importancia de la temperatura en el nivel de daño; naranjas ‘Valencia’ almacenadas a 21 °C manifestaron mayor daño que las almacenadas a 4 °C. El encerado de los frutos logró disminuir estos efectos negativos durante el almacenamiento y su vida postcosecha; en forma similar, nuestros resultados demuestran el efecto protector de las ceras, reduciendo la incidencia de frutos manchados durante el almacenamiento y la vida de mostrador.

## **5. CONCLUSIONES**

El manchado de mandarina Satsuma 'Okitsu' se manifestó principalmente en la zona ecuatorial de los frutos, luego de 15 días de conservación.

La incidencia y severidad del manchado fue variable entre años, incrementándose con el tiempo de almacenamiento y durante la vida mostrador.

La zona manchada presentó distorsión del tejido subepidérmico, con colapso celular, sin daños a nivel de la cutícula. En frutos con síntomas severos la epidermis presentó daños, permaneciendo inalterada en las zonas con síntomas leves.

No se observó una relación entre el manchado y el contenido de macronutrientes en el flavedo de los frutos tras el almacenamiento. La concentración de algunos micronutrientes (Fe, Cu, Mn y Zn) fue mayor en zonas afectadas.

La mayor incidencia se asoció a condiciones de menor humedad relativa, mayor temperatura y menores precipitaciones durante los 15 días previos a la cosecha.

El tratamiento de desverdizado con etileno no afectó el nivel de manchado, mientras que el encerado de los frutos disminuyó la incidencia y severidad de los síntomas.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**

Agustí M. 2003. Citricultura. 2ª. ed. Madrid, Mundi-Prensa. 424 p.

Agustí M, Almela V, Juan M. 2004 a. Alteraciones fisiológicas de los frutos cítricos. Madrid. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. 126 p.

Agustí M, Almela V, Juan M, Martínez-Fuentes A, Mesejo C. 2004 b. Quality of citrus fresh consumption as affected by water relationship. *Acta Horticulturae*. 632: 141-148.

Agustí M, Almela V, Alférez F, Juan M, Taedos FR, Zacarias L. 2001. Histological and physiological characterization of rind breakdown of “Navelate” sweet orange. *Annals of Botany*. 88 (3): 415-422.

Agustí M, Almela V, Guardiola JL. 1988. Aplicaciones de ácido giberélico para el control de alteraciones de la corteza de las mandarinas asociadas a la maduración. *Investigación Agraria Protección Vegetal*. 3 (2): 125-137.

Aharoni, Y. 1968. Respiration of oranges and grapefruit harvested at different stages of development. *Plant Physiology*. 43: 99-102.

Alférez F, Burns J.K. 2004. Postharvest peel pitting at non-chilling temperatures in grapefruit is promoted by changes from low to high relative humidity during storage. *Postharvest Biology and Technology*. 32: 79-87.

Alférez F, Zacarías L. 2001. Postharvest pitting in navel oranges at non-chilling temperature: Influence of relative humidity. *Acta Horticulturae*. 553: 307-308.

- Alfárez F, Zacarías L, Burns JK. 2005. Low relative humidity at harvest and before storage at high humidity influence the severity of postharvest peel pitting in citrus. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 130 (2): 225-231.
- Alfárez F, Burns JK, Zacarías L. 2004. Postharvest peel pitting in citrus is induced by changes in relative humidity. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 117: 355-358.
- Alfárez F, Agustí M, Zacarías L. 2003. Postharvest rind staining in 'Navel' oranges is aggravated by changes in storage relative humidity: Effect on respiration, ethylene production and water potential. *Postharvest Biology and Technology*. 28 (1): 143-152.
- Almela V, Agustí M, Juan M, Zaragoza S. 1999. Colapso de la corteza de la naranja Navelate. Posibilidades de control. *Actas Horticultura*. 26: 217-222.
- Almela V, Agustí M, Juan M. 1992. El picado del fruto de la mandarina Fortune. Descripción de la alteración y factores que lo influyen. *Levante Agrícola*. 31 (319): 80-86.
- Apelbaum A, Goldschmidt EE, Ben-Yehoshua S. 1976. Involvement of endogenous ethylene in the induction of colour change in Shamouti oranges. *Plant Physiology*. 57: 836-838.
- Arbona V, Gómez-Cadenas A. 2012. Antioxidant system in Citrus under nutrient stress conditions: Latest developments. En: Srivastava AK (Ed.). *Advances in Citrus Nutrition*. Londres, Inglaterra. Springer. 13-24.

- Arbona V, Hossain Z, López-Climent MF, Pérez-Clemente RM, Gómez-Cadenas A. 2008. Antioxidant enzymatic activity is linked to waterlogging stress tolerance in citrus. *Physiologia Plantarum*. 132 (4): 452-466.
- Bain JM. 1958. Morphological, anatomical and physiological changes in the developing fruit of the Valencia orange *Citrus sinensis* (L) Osbeck. *Australian Journal of Botany*. 6: 1-24.
- Baldwin EA, Nisperos-Carriedo MO, Baker RA. 1995. Edible coatings for lightly processed fruits and vegetables. *HortScience*. 30 (1): 35-38.
- Bósquez E. 2003. Elaboración de recubrimientos comestibles formulados con goma de mezquite y cera de candelilla para reducir la cinética de deterioro en fresco del limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka). Tesis Doctoral. Mexico D.F. Universidad Autónoma Metropolitana. 133p.
- Bremner JM, Mulvaney CS. 1982. Nitrogen-Total. En Page A.L. et al. (Eds.) *Methods of soil analyses. Part 2. Chemical and microbiological properties*. 2nd ed. Madison, WI: ASA and SSSA. 9: 595-624.
- Browning HW, McGovern RJ, Jackson LK, Calvert DV, Wardowski WF. 1995. *Florida citrus diagnostic guide*. Florida, USA. Florida Science Source. Inc. pp. 162-244.
- Cajuste JF, Lafuente MT. 2007. Ethylene-induced tolerance to non-chilling peel pitting as related to phenolic metabolism and lignin content in 'Navelate' fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 45: 193-203.
- Cohen E, Shapiro B, Shalom Y, Klein JD. 1994. Water loss: A non-destructive indicator of enhanced cell membrane permeability of chilling-injured citrus fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 119: 983-986.

- Cohen E, Shalom Y, Rosenberger I. 1990. Postharvest behavior of Ortanique (Topaz) tangor citrus fruit during long term storage at various temperatures. *Scientia Horticulturae*. 44(3): 235-240.
- Conesa E. 2004. Encerado de los cítricos. En: Universidad Politécnica de Valencia (España). Tratamiento y manipulación de los frutos cítricos en postcosecha. Murcia, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.
- Cronje PJR, Barry GH, Huysamer M. 2011 Postharvest rind breakdown of 'Nules Clementine' mandarin is influenced by ethylene application, storage temperature and storage duration. *Postharvest Biology and Technology*. 60: 192–201.
- Da Luz C, Speroni, G, Gambetta G, Zócalo P. 2014. Caracterización anatómica del manchado postcosecha de la mandarina Satsuma 'Okitsu'. En: Congreso Latinoamericano. Simposio Nacional Investigación y Desarrollo Tecnológico en Citrus. (5º, 2014, Salto, Uruguay). 5 p.
- Dou H. 2004. Effect of coating application on chilling injury of grapefruit cultivars. *HortScience*. 39(3): 558-561.
- Dou H, Jiuxu Z, Mohamed AI. 2001. Postharvest factors influencing stem-end rind breakdown (SERB) of 'Valencia' oranges. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 114: 162-169.
- Eaks IL. 1970. Respiratory response, ethylene production, and response to ethylene on citrus fruit during ontogeny. *Plant Physiology*. 45(3): 334-338.

- Eaks IL. 1969. Rind disorders of oranges and lemons in California. En: International Citrus Symposium (1<sup>st</sup>, 1969. California, USA). Proceedings. University of California. 3: 1343-1354.
- Eckert JW, Eaks IL. 1989. Postharvest disorders and diseases of Citrus fruits. En: Reuther W, Calavan EC, Carman GE. (eds.). The Citrus Industry, Volume 5. Berkeley, California, USA. University of California, Division of Agricultural Sciences.
- Embleton TW, Reitz HJ, Jones WW. 1973. Citrus fertilization. En: W. Reuther (Ed). The Citrus Industry. California, USA. University of California. 3: 122-181.
- Establés B. 2008. Estudio transcriptómico de los mecanismos implicados en la tolerancia inducida por el curado al daño de frío y por el etileno al colapso de la corteza en los frutos cítricos. Tesis doctoral. Valencia, España. Universitat Politècnica de València. 346 p.
- Fahn A. 1978. Anatomía Vegetal. Madrid, España. Blume. pp: 181-215.
- Fichet T, Chamorro J, Riquelme A. 2012. Peteca rind pitting as influenced by proline content in winter lemon albedo. Ciencia e Investigación Agraria. 39 (1): 201-209.
- Gennadios A, Weller CL. 1990. Edible films and coatings from wheat and corn proteins. Food Technology. 44 (10): 63-69.
- Goldschmidt EE, Huberman M, Goren R. 1993. Probing the role of endogenous ethylene in the degreening of citrus fruit with ethylene antagonist. Plant Growth Regulation. 12 (3): 325-329.

- Gosalbes MJ, Zacarías L, Lafuente MT. 2004. Characterization of the expression of an oxygenase involved in chilling-induced damage in Citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 33 (3): 219-228.
- Grierson, W. 1986. Physiological disorders. en: Wardowski W, Nagy S, Grierson W. (Eds.), *Fresh Citrus Fruit*. Westport, CN. Avi Publishing Company. pp. 361-378.
- Hagenmaier RD, Baker RA. 1995. Layered coatings to control weight loss and preserve gloss of Citrus fruits. *HortScience*. 30 (2): 296-298.
- Hagenmaier RD, Baker RA. 1994. Wax microemulsions and emulsions as Citrus coatings. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*. 42 (4): 899-902.
- Isaac RA, Kerber JD. 1971. Atomic absorption and flame photometry: techniques and uses in soil, plant and water analysis. En: *Instrumental Methods for Analysis of Soil and Plant Tissues*. Madison, WI, USA. Soil Science Society of America. 17-37.
- Johansen D. 1940. *Plant microtechnique*. New York . Mc Graw-Hill Book Company. 1st. ed.
- Jones WW, Embleton TW. 1969. Development and current status of citrus leaf analysis as a guide to fertilization in California. En: *International Citrus Symposium (1<sup>st</sup>, 1969. California, USA)*. Proceedings. University of California, 1669-1671.
- Jones WW, Embleton TW, Garber MJ, Cree CB. 1967. Creasing of orange fruit. *Hilgardia*. 38: 231-234.

- Kaplan HJ. 1986. Washing, waxing and color adding. En: Wardowski WF, Nagy S, Grierson W (Eds) Fresh Citrus Fruits. Westport, CT: AVI Publishing Co., 379-395.
- Katz E, Martínez-Lagunes P, Riov J, Weiss D, Goldschmidt EE. 2004. Molecular and physiological evidence suggests the existence of a system II-like pathway of ethylene production in non-climacteric Citrus fruit. *Planta*. 219: 243 - 252.
- Kruger FJ, Penter M, Masheve R, Combrink, NK. 2004. The use of fruit mineral content as a tool to investigate the epidemiology of citrus rind disorders. ARC-ITSC, Nelspruit, South Africa. *South Africa Fruit Journal*. 4 (2): 54-59.
- Kuraoka T, Iwasaki K, Ishii T. 1977. Effects of GA<sub>3</sub> on puffing and levels of GA<sub>3</sub>-like substances and ABA in the peel of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 102 (5): 651-654.
- Lado J, Rodrigo MJ, Zacarías L. 2015. Analysis of ethylene biosynthesis and perception during postharvest cold storage of Marsh and Star Ruby grapefruits. *Food Science and Technology International*. 21 (7): 537-546.
- Lafuente MT, Sala JM. 2002. Abscisic acid and the influence of ethylene, humidity and temperature on the incidence of postharvest rindstaining of Navelina oranges (*Citrus sinensis* L.Osbeck) fruits. *Postharvest Biology and Technology*. 25: 49-57.
- Lafuente MT, Zacarías L. 2006. Postharvest physiological disorders in citrus fruit. *Stewart Postharvest Review*. 1(2): 1-9.

- Lafuente MT, Zacarías L, Sala JM, Sánchez-Ballesta MT, Lluch Y, Gosalbes MJ, Granell A, Marcos JF and González-Candelas L. 2005. Understanding the basis of chilling injury in citrus fruit. *Acta Horticulturae*. 682: 831-842.
- Lafuente MT, Sala JM, Zacarías L. 2004. Active oxygen detoxifying enzymes and phenylalanine ammonia-lyase in the ethylene-induced chilling tolerance in Citrus fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 (11): 3606-3611.
- Lafuente MT, Zacarías L, MA Martínez-Téllez MA, Sánchez-Ballesta MT, Dupille M. 2001. Phenylalanine Ammonia-lyase as related to ethylene in the development of chilling symptoms during cold storage of Citrus fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49 (12): 6020-6025.
- Legaz F, Serna MD, Ferrer P, Cebolla V, Primo Millo E. 1995. Análisis de hojas, suelos y aguas para el diagnóstico nutricional de plantaciones de cítricos. Procedimiento de toma de muestras. Valencia, España. Generalitat Valenciana Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació. 23p
- Le Roux JC, Crous PA. 1938. Effect of fertilizer on creasing of Mediterranean sweet oranges. *Farming in South Africa*. 13: 66-68.
- Locquin M, Langeron M. 1985. Manual de microscopía. España. Ed.Labor., 373 p.
- Lurie S. 1998. Postharvest heat treatments. *Postharvest Biology and Technology*. 14:257-269.
- Mara H, Goñi C, Doti R, Secondi A. 1980a. Determinación de la variación estacional de los niveles de macronutrientes N, P y K en montes de naranja Valencia sobre pie Trifolia en hoja fructífera y hoja no fructífera. En: Fertilización de Citrus en base a análisis foliar. ROU-MAP (República Oriental

del Uruguay- Ministerio de Agricultura y Pesca) Dirección de Suelos y Dirección General de Investigación Agropecuaria. Boletín Técnico N°6, 11-17.

Mara H, Goñi C, Doti R, Secondi A. 1980b. Análisis foliar. Muestreo de hoja fructífera vs hoja no fructífera. En: Fertilización de Citrus en base a análisis foliar. ROU-MAP (República Oriental del Uruguay- Ministerio de Agricultura y Pesca) Dirección de Suelos y Dirección General de Investigación Agropecuaria. Boletín Técnico N°6, 57-62.

Martínez-Jávega JM, Del Río MA, Mateos M, Saucedo-Veloz C. 1992. Influence of storage temperature and coating on the keeping quality of «Fortune» mandarins. En: International Citrus Congress (VII, 1992, Acireale, Italy). Proceedings. International Society of Citriculture. 3: 1102-1103.

Matile P. 1984. Das toxische Kompartiment der Pflanzenzelle. Naturwissenschaften. 71: 18-24.

Mayuoni L, Tietel Z, Patil BS, Porat R. 2011. Does ethylene degreening affect internal quality of citrus fruit?. Postharvest Biology and Technology. 62 (1): 50-58.

Mazzuz CF. 1996. Calidad de frutos cítricos; manual para su gestión desde la recolección hasta la expedición. Barcelona, Ediciones de Horticultura. 317 p.

McCornack AA. 1970. Peel injury of Florida navel oranges. Florida State Horticultural Society. 83: 267-270.

Medeira MC, Maia MI, Vitor RF. 1999. The first stage of pre-harvest 'peel pitting' in 'Encore' mandarin. An histological and ultrastructural study. Annals of Botany. 83: 667-673.

- Meier RG. 2005. Control de manchado en naranjas de ombligo de maduración temprana. Avances en el control de la alteración. En: Seminario Internacional (2°), Jornada de Poscosecha de Cítricos (4a., 2005, Concordia). Actas. Concordia, INTA. 87-88.
- Menino R. 2012. Leaf analysis in citrus: interpretation tools. En: Srivastava AK (ed), Advances in Citrus Nutrition. Londres, Inglaterra. Springer. 59-79.
- MGAP-DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca-Dirección de Investigaciones Económicas Agropecuarias). 2015. Anuario Estadístico 2015. Montevideo, Uruguay. 99-101.
- MGAP-DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca-Dirección de Investigaciones Económicas Agropecuarias). 2012. Encuesta citrícola primavera 2012. Montevideo, Uruguay 26 p.
- MGAP-DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca-Dirección de Investigaciones Económicas Agropecuarias). 2006. La citricultura en Uruguay contribución a su conocimiento. Montevideo, Uruguay. 31 p.
- MGAP-DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca-Dirección de Investigaciones Económicas Agropecuarias). 2003. Encuesta citrícola otoño 2003. Montevideo, Uruguay. 26 p.
- Monselise SP. 1977. Citrus fruit development, endogenous system, and external regulation. En: International Citrus Congress (2°, 1977, Orlando, Florida). International Society of Citriculture. 2: 664 - 668.
- Murphy J, Riley JP. 1962. A modified single solution methods for determination of phosphate in natural waters. Analytical Chemistry Actas. 27:31-36.

- Namesny C, Urriaga J. 1985. Evaluación de diferentes ceras comerciales en el proceso de packing de fruta cítrica sobre dos especies: *Citrus sinensis* variedad Valencia y *Citrus limon*. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 89 p.
- Obreza T. 2003. Importance of potassium in a Florida citrus nutrition program. *Better Crops* 87 (1): 19-22.
- Pantastico EB, Soule J, Grierson W. 1968. Chilling injury in tropical and subtropical fruits: Limes and grapefruit. *Tropical Regular American Society Horticultural Science*. 12: 171-183.
- Petracek PD., Dou H, Pao S. 1998. The influence of applied waxes on postharvest physiological behavior and pitting of grapefruit. *Postharvest Biology and Technology*, 14(1): 99-106.
- Petracek PD, Wardowski WF, Brown GE. 1995. Pitting of grapefruit that resembles chilling injury. *HortScience* 30 (7): 1422-1426.
- Plaza P, Sanbruno A, Usall J, Lamarca N, Torres R, Pons J, Viñas I. 2004. Integration of curing treatments with degreening to control the main postharvest diseases of Clementine mandarins. *Postharvest Biology and Technology*. 34(1): 29-37.
- Pons J, Almela V, Juan M, Agustí M. 1992. Use of ethephon to promote colour development in early ripening Clementine cultivars. En: *International Citrus Congress (VII, 1992, Acireale, Italy)*. Proceedings. International Society of Citriculture. 1: 459-462.
- Porat R., 2008. Degreening of citrus. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*. 2: 71-76.

- Porat R, Weiss B, Cohen L, Daus A, Aharoni N. 2004. Reduction of postharvest rind disorder in citrus fruit by modified atmosphere packing. *Postharvest Biology and Technology*. 33(1): 35-43.
- Porat R, Pavoncello D, Peretz J, Ben-Yehoshua S, Lurie S. 2000. Effects of various heat treatments on the induction of cold tolerance and on the postharvest qualities of 'Star Ruby' grapefruit. *Postharvest Biology and Technology* 18: 159–165.
- Porat R, Weiss B, Cohen L, Daus A, Goren R, Droby S. 1999. Effect of ethylene and 1-methylcyclopropene on the postharvest qualities of Shamouti oranges. *Postharvest Biology and Technology*. 15: 155-153.
- Ritenour, M.A. 2005. Effect of fruit coating on chilling injury of citrus. University of Florida. *Packinghouse Newsletter*. 202: 1-5.
- Rodrigo MJ, Zacarías L. 2007. Effect of postharvest ethylene treatment on carotenoid accumulation and the expression of carotenoid biosynthetic genes in the flavedo of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 43: 14-22.
- Roger S. 1988. Defectos y alteraciones de los frutos cítricos en su comercialización. Bilbao, Comité de Gestión para la Exportación de Frutos Cítricos. 153 p.
- Sala JM, Lafuente MT. 2004. Antioxidant enzymes activities and rindstaining in 'Navelina' oranges as affected by storage relative humidity and ethylene conditioning. *Postharvest Biology and Technology*. 31: 277–285.
- Sala JM, Lafuente MT. 1999. Catalase in the heat-induced chilling tolerance of cold-stored hybrid Fortune mandarin fruits. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 47(6): 2410–2414.

- Salvador A, Navarro P, Martínez-Jávega JM. 2007. Tecnología postcosecha de cítricos. En: Simposio Internacional de Citricultura (11°, 2007, Victoria Tamaulipas). La citricultura mexicana en el Siglo XXI. Actas. Valencia, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.
- Schirra M. 1992. Behaviour of 'Star Ruby' grapefruit under chilling and non-chilling storage temperature. *Postharvest Biology and Technology* . 2 (4): 315-327.
- Shimokawa K, Shimada S, Yaeo K. 1978. Ethylene-enhanced chlorophyllase activity during degreening of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Scientia Horticulturae* 8: 129-135.
- Storey R, Treeby MT. 2002. Cryo-SEM study of the early symptoms of peteca in 'Lisbon' lemons. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 77 (2002): 551-556.
- Undurraga P, Olaeta JA, Retamales JB, Escobar J, Toso AM. 2009. Effect of maturity and storage temperature on the development of peteca in lemons (*Citrus limon* (L.) Burm. F.) cv. Eureka. *Scientia Horticulturae*: 122 (1): 56-61.
- Undurraga P, Olaeta JA, Retamales JB, Escobar J, Toso AM. 2007. Manifestation of peteca and fruit quality loss in eureka lemon under different cold storage conditions. *Agrociencia*. 41: 133-139.
- Van Rensburg PJJ, Cronje PJR, Joubert J, Gambetta G, Bruwer M. 2004. Factors influencing rind breakdown in Citrus fruit. En: International Citrus Congress (X, 2004, Agadir, Morocco) Proceedings. International Society of Citriculture. 3: 1051-1061.

- Vázquez, D. 2005. Manejo poscosecha de naranjas y mandarinas producidas en noreste argentino. En: Seminario Internacional (2°), Jornada de Poscosecha de Cítricos (4a., 2005, Concordia). Actas. Concordia, INTA. 59-64.
- Vercher R, Taedo FR, Almela V, Zaragoza S, Primo-Millo E, Agustí M. 1994. Rind structure, epicuticular wax morphology and water permeability of 'Fortune' mandarin fruits affected by peel pitting. *Annals of Botany*. 74: 619-625.
- Wardowski WF, Steven N, Grierson W. 1986 Fresh citrus fruits. New York, Van Nostrand Reinhold. 547 p.
- Wild BL. 1991. Postharvest factors governing the development of peteca rind pitting on 'Meyer' lemons. *HortScience*. 26 (3) 287-289.
- Whiteside JO, Garnsey SM, Timmer LW. 1988. Compendium of Citrus Diseases St. Paul MN. The American Phytopathological Society. 80 p.
- Yang SF, Hoffmann NE. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annals Review of Plant Physiology*. 35: 155-189.
- Yuen CM, Tridjaja NO, Wills RB, Wild BL. 1995. Chilling injury development of 'Tahitian' lime, 'Emperor' mandarin, 'Marsh' grapefruit and 'Valencia' orange. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 68 (2): 335-339.
- Zócalo P. 2009. Incidencia en el nivel de manchado en poscosecha de mandarinas Satsumas según posición en la planta, tiempo de desverdizado y diferentes recubrimientos. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía, Universidad de la República. 81p.

## **7. ANEXOS**

### **7.1 ANEXO 1**

**Manchado postcosecha de mandarina Satsuma ‘Okitsu’: caracterización anatómica, efecto de factores ambientales y manejo postcosecha**

**Zócalo, Pablo<sup>1</sup>; Gambetta, Giuliana<sup>2</sup>; Rey, Florencia<sup>2</sup>; Gravina, Alfredo<sup>2</sup>; Alejandra Borges<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>San Miguel Uruguay

<sup>2</sup>Departamento de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía, UDELAR. Garzón 780 Montevideo

<sup>2</sup>Departamento de Biometría, Estadística y Computación, Facultad de Agronomía, UDELAR. Garzón 780 Montevideo

**Autor de correspondencia: Pablo Zócalo**

**Dirección postal: Rincón y Oribe 1409, Young, Uruguay**

**Correo electrónico: pzocalo@vera.com.uy**

**El siguiente artículo se enviará a la revista *Agrociencia Uruguay***

**Manchado postcosecha de mandarina Satsuma ‘Okitsu’: caracterización anatómica, efecto de factores ambientales y manejo postcosecha**

**Zócalo, Pablo<sup>1</sup>; Gambetta, Giuliana<sup>2</sup>; Rey, Florencia<sup>2</sup>; Gravina, Alfredo<sup>2</sup>; Alejandra Borges<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>San Miguel Uruguay

<sup>2</sup>Departamento de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía, UDELAR. Garzón 780 Montevideo

<sup>2</sup>Departamento de Biometría, Estadística y Computación, Facultad de Agronomía, UDELAR. Garzón 780 Montevideo

**Resumen**

En Uruguay, en los últimos años se ha detectado durante la etapa de postcosecha de mandarina Satsuma ‘Okitsu’, un manchado de la cáscara de los frutos, de bordes difusos, que en algunos años ha ocasionado importantes pérdidas. La incidencia del manchado varía entre años y entre establecimientos. Durante 2 años, se estudió el daño a nivel micro y macroscópico, su asociación con los factores ambientales previos a la cosecha y el efecto del desverdizado y encerado de frutos en su incidencia. A los 15 días de almacenamiento comenzó a visualizarse entre las glándulas de aceite, una zona irregular de color pardo, avanzando en superficie y oscureciéndose a los 30 días de almacenamiento. Luego de la vida de mostrador, en los casos más severos, dicha zona del tejido se deprimió y a nivel microscópico se observó colapso celular en la zona subepidérmica, avanzando hacia el parénquima subyacente y en algunos casos hacia la epidermis, pero la cutícula no se vio afectada. La mayor incidencia del desorden (17 % de los frutos desverdizados y encerados), determinada el primer año, se asoció a un período de mayor temperatura, menor humedad relativa y precipitaciones, durante las 2 semanas previas a la cosecha, en comparación con el segundo año (7 % de incidencia en frutos desverdizados y encerados). El tratamiento de desverdizado no afectó la incidencia a los 30 días de

almacenamiento + 15 días de vida de mostrador, mientras que el encerado de frutos (polietileno y goma laca, 18 % SST) la disminuyó significativamente desde 15 % a menos del 6 %. Los resultados sugieren que condiciones pre o postcosecha favorables a la deshidratación de los frutos, promueven el manchado postcosecha de la mandarina Satsuma ‘Okitsu’.

Palabras clave: calidad de frutos, daño celular, desverdizado de frutos, desorden fisiológico, encerado de frutos

**Satsuma ‘Okitsu’ postharvest rind breakdown: anatomical characterization, environmental conditions effects and postharvest practices**

**Zócalo, Pablo<sup>1</sup>; Gambetta, Giuliana<sup>2</sup>; Rey, Florencia<sup>2</sup>; Gravina, Alfredo<sup>2</sup>; Alejandra Borges<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>San Miguel Uruguay

<sup>2</sup>Departamento de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía, UDELAR. Garzón 780 Montevideo

<sup>2</sup>Departamento de Biometría, Estadística y Computación, Facultad de Agronomía, UDELAR. Garzón 780 Montevideo

**Summary**

In the last years, during postharvest of Satsuma ‘Okitsu’ mandarin it has been detected in Uruguay, a fuzzy edge rind breakdown, which causes important losses. The disorder incidence varies among years and orchards. In a 2-year-research we studied microscopic and macroscopic damage, its association to environmental pre-harvest conditions, and the effect of postharvest fruit degreening and waxing on its incidence. After 15 days of storage, irregular brownish areas boarding oil glands,

started to appear in the peel, increasing in surface and darkening at 30 days of storage. After shelf life, more severe symptoms depress and cell collapse could be microscopically detected at sub-epidermis, advancing to subjacent parenchyma and occasionally to epidermis, but cuticle was not affected. In the first year, the highest rind breakdown incidence (17 % of degreening and waxed fruit) was associated to higher maximum temperature, lower relative humidity and less precipitation during the last 2 weeks before harvest, compared to the second year studied (7 % of degreening and waxed damaged fruit). Fruit degreening did not affect rind breakdown incidence after 30 days of cold storage + 15 days of shelf life, while fruit waxing (polyethylene and shellac, 18 % TSS) significantly diminished damaged fruit from 15 % to less than 6 %. Results suggest that pre and postharvest dehydration conditions promote this rind breakdown of 'Okitsu' Satsuma mandarin.

Key words: fruit quality, cell damage, fruit degreening, physiological disorder fruit waxing

## **Introducción**

La citricultura en el Uruguay tiene un enfoque exportador, que se ha consolidado en los últimos 25 años. El grupo de las mandarinas ha presentado el mayor aumento en los últimos años, tanto en superficie cultivada, como en producción de fruta. Las Satsumas tuvieron una fuerte expansión en la década de 1990 y principios de 2000, pasando de 8.668 toneladas exportadas en 1999 a 13.398 en 2006 (MGAP-DIEA, 2003 y 2006). Son las de maduración más temprana y alcanzan la madurez fisiológica, cuando aún su cáscara está de color verde. Por tanto, para su exportación es imprescindible desverdizarlas con etileno (Pons *et al.*, 1992; Goldschmidt *et al.*, 1993). Esta técnica acelera la pérdida de clorofilas (Shimokawa *et al.*, 1978; Katz *et al.*, 2004) y la síntesis de carotenoides coloreados (Rodrigo y Zacarías, 2007) en la cáscara, sin afectar la maduración interna (Mayuoni *et al.*, 2011). Su aplicación también promueve la senescencia, con la consecuente aparición de desórdenes fisiológicos y podredumbres causadas por hongos (Eckert y Eaks, 1989; Porat *et al.*, 1999; Plaza *et al.*, 2004; Cronje *et al.*, 2011). Sin embargo, se ha

propuesto un efecto protector de esta hormona frente al estrés (Yang y Hoffman, 1984), disminuyendo la incidencia de daños causados por frío en naranja ‘Navelate’ (Lafuente et al., 2004) y el colapso de la corteza en naranjas ‘Navelina’ y ‘Navelate’ (Lafuente y Sala, 2002; Cajuste y Lafuente, 2007). La mayoría de los desórdenes fisiológicos que afectan la cáscara de los cítricos se asocia a aspectos genéticos, nutricionales y hormonales, así como a las condiciones ambientales ocurridas durante el desarrollo y maduración de los frutos y/o durante su almacenamiento (Agustí 1999, Agustí et al. 2004, Kruger et al. 2004, Porat et al. 2004). Un mismo factor puede afectar de manera diferente a los frutos, así como diferentes factores pueden inducir una sintomatología similar en éstos, por lo que no es posible asignar una causa específica a cada desorden. En términos generales, estas alteraciones involucran desequilibrios hídricos y nutricionales relacionados a las condiciones ambientales, lo que determina la susceptibilidad de los frutos al momento de la cosecha (Agustí et al., 2004).

El ‘colapso de la corteza’ no relacionado al frío (non-chilling rind breakdown), que afecta principalmente a las mandarinas Clementinas y en menor medida a las Satsumas, se manifiesta como manchas de color marrón distribuidas en el flavedo, y se asocia a largos períodos de almacenamiento. El daño celular se hace evidente en las capas subepidérmicas del flavedo y en el área adyacente a las glándulas de aceite, lo que puede provocar su colapso, con la consecuente fitotoxicidad del tejido, mientras que la epidermis permanece inalterada. El desorden se relaciona con las condiciones ambientales durante la precosecha y particularmente con la posición del fruto en el árbol, siendo los más afectados los ubicados en el interior (van Rensburg et al., 2004, Cronje et al. 2011). Sin embargo, un manchado similar fue descrito en mandarina Satsumas por (Zócalo 2009), con una mayor incidencia en los frutos ubicados en el exterior de la copa. Las naranjas del grupo navel son propensas a desarrollar otro tipo de colapso de la corteza (*rind breakdown* o *rind staining*), que puede manifestarse a partir del cambio de color (Agustí et al., 2001), o durante el almacenamiento (Lafuente y Sala, 2002). Se asocia a la pérdida de agua de las células situadas en la zona de coexistencia del flavedo con el albedo, que avanza

hacia el exterior, alcanzando la epidermis y hacia el interior, afectando las capas más profundas del albedo. La morfología de las ceras, el grosor y la permeabilidad de la cutícula no son afectadas en este caso (Agustí et al., 2001). La manifestación del desorden coincide con días de alta temperatura, baja HR y alta tasa de evapotranspiración, seguido de un período de baja temperatura, alta HR y baja evapotranspiración (Agustí et al., 2001). A diferencia de lo que ocurre con las Clementinas, la mayor proporción de frutos afectados se ubica en el exterior del árbol y en la cara externa del fruto (Agustí et al., 2004).

En Uruguay, en los últimos años se ha detectado durante la etapa de postcosecha de mandarina Satsuma ‘Okitsu’, un manchado con características diferentes a los mencionados anteriormente, que en algunos años ha ocasionado importantes pérdidas. En este tipo de manchas, estudios anatómicos han mostrado que incluso dos meses antes de la cosecha, se observan en el parénquima subepidérmico los primeros síntomas microscópicos, a través de células que pierden su turgencia debido al colapso del citoplasma. En etapas más avanzadas de la afección, las células epidérmicas presentan el contenido citoplasmático contraído, pero la cutícula no se afecta (Da Luz et al., 2014). Su incidencia es variable entre plantaciones y años, y se desconocen las principales causas que lo provocan. Considerando dichos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue estudiar factores pre y postcosecha asociados al desarrollo del manchado postcosecha de frutos de mandarina Satsuma ‘Okitsu’ en las condiciones de Uruguay durante dos años consecutivos.

### **Materiales y Métodos**

Los experimentos se realizaron durante dos años en un establecimiento comercial ubicado en la zona de Chapicuy (Uruguay, 31° 40’ S, 57° 52’ W). Se seleccionó un cuadro de mandarina Satsuma ‘Okitsu’ (*Citrus unshiu* Marc.), injertada sobre ‘Trifolia’ (*P. trifoliata* (L) Raf.), en condiciones de fertirriego, con historia de alta incidencia de frutos manchados. Al alcanzar la madurez comercial

(9/03 y 14/03, año 1 y 2 respectivamente), se cosecharon frutos de color y tamaño homogéneo, proveniente de 4 parcelas de 5 plantas.

#### *Caracterización anatómica del manchado*

La caracterización anatómica del desorden se realizó seleccionando frutos manchadas luego de desverdizadas durante 96 horas (1-5 mg L<sup>-1</sup> de etileno, CO<sub>2</sub><0,2 %, 18-22 °C de temperatura (T) y 90-95 % HR), enceradas, almacenadas en frío durante 30 días (T: 4,5-8 °C, HR > 90 %, CO<sub>2</sub> < 0,5 %) y luego de 15 días de vida de mostrador (T media 15 °C, HR media 82 %). Se realizaron cortes de cáscara de zonas sanas y manchadas de 4 frutos por parcela. Se seccionaron trozos de 1-2 cm x 1-3 cm que se fijaron en FAA (formol, ácido acético y alcohol 70 %, 5:5:90) hasta el procesamiento del material, de acuerdo a (Da Luz et al. 2014). Se realizaron cortes a mano alzada de trozos de aproximadamente 0,5 cm x 0,5 cm del material fijado en FAA, se incluyeron en parafina mediante la técnica clásica, utilizando vaselina como intermediario (Johansen, 1940; Locquin y Langeron, 1985).

Los cortes se realizaron en micrótopo de rotación (American Optical Corp. Spencer 820 Microtone, USA) y se hizo el pegado con adhesivo de Haupt en estufa a 30 °C durante, 2 h. El desparafinado se realizó con xilol I 5 min, xilol II 5 min. Las muestras se colorearon con la doble coloración de safranina-fast green (EtOH 100° 5 min, EtOH 70° 5 min, EtOH 30° 5 min, agua destilada 5 min, Safranina 10 min, agua destilada I 5 min, agua destilada II 5 min, EtOH 50° 5 min, EtOH 95° 5 min, EtOH I 100° 5 min, EtOH II 100° 5 min, Fast green 4 seg, aceite de clavo 10 seg, mezcla aclarante 20 seg., xilol I 5 min, xilol II 5 min) y se montaron en Bálsamo de Canadá. La observación de los preparados se realizó en microscopio (Nikon E100, Japón) y se capturaron imágenes con máquina digital (Nikon Coolpix P5100, Japón).

### *Zona de manifestación del daño y grosor de cáscara*

A los 15 y 30 días de almacenamiento y luego de 15 días de vida de mostrador se seleccionaron tres frutos por parcela y por tratamiento y se midió con calibre digital (Mitutoyo Sul America Ltd, Brasil) el grosor de la cáscara en la zona del ecuador de frutos sanos y de zonas sanas y manchadas de frutos manchados. El segundo año a los 30 días de almacenamiento en frío y luego de 15 días de vida de mostrador se evaluó la zona de aparición del daño en 180 frutos, definiendo las siguientes ubicaciones: cáliz, superior, ecuador, inferior y estilar.

### *Efecto del desverdizado y encerado de frutos*

Los frutos provenientes de cada parcela se dividieron en cuatro tratamientos tras la cosecha: Control (C: sin desverdizar, ni encerar), Encerado (E), Desverdizado (D), Desverdizado + Encerado (D+E). Se colocaron 100 frutos por caja (parcela de campo), totalizando 400 frutos por tratamiento.

El desverdizado se realizó en cámara, con las siguientes condiciones: 1-5 mg L<sup>-1</sup> de etileno, CO<sub>2</sub> < 0,2 %, 18-22 °C de T y 90-95 % de HR, durante 72 horas en el año 1 y 96 horas en el año 2. El primer año, los frutos no desverdizados permanecieron a T y HR ambiente durante las 72 horas que tardó el desverdizado de los demás tratamientos (T-HR ambiente y T-HR controlada, respectivamente), mientras que el segundo año, los frutos no desverdizados se almacenaron en una cámara con la misma T y HR que los desverdizados.

El encerado se realizó con cera comercial (18 % de sólidos solubles totales en base a 86 g l<sup>-1</sup> de cera de polietileno y 56 g l<sup>-1</sup> de goma laca) y se aplicó en línea de empaque convencional, mediante pulverización sobre rodillos de cerda y nylon.

El almacenamiento se realizó durante 30 días a 4-7 °C, HR > 85 % y CO<sub>2</sub> < 0,5 %; posteriormente los frutos se mantuvieron a temperatura ambiente simulando la

vida de mostrador durante 7 días en el año 1 (T media 18,8 °C, HR media 84 %) y 15 días en el año 2 (T media 15 °C, HR media 82 %).

El porcentaje de frutos manchados (incidencia) se evaluó a los 15 y 30 días de almacenamiento y luego del periodo vida de mostrador.

#### *Efecto de las condiciones ambientales*

Durante los dos años se registraron las precipitaciones diarias con pluviómetro y la temperatura y humedad relativa desde la última semana de diciembre hasta la cosecha, con sensores Hygrochron™ (iButton DS-1923G-F5, Dallas Semiconductors, USA), colocados en el interior de la copa de dos plantas y programados para el registro horario.

#### *Diseño estadístico*

El diseño experimental fue de bloques completos al azar con 4 repeticiones de 5 árboles en el campo y 100 frutos por repetición y fecha de evaluación por tratamiento, en postcosecha. El porcentaje de frutos afectados (incidencia) se analizó ajustando modelos lineales generalizados, asumiendo distribución binomial con función de enlace logit ( $\text{Ln} [p/(1-p)]$ ) y pruebas de tipo Wald para los efectos fijos, con separación de medias por Tukey-Kramer. El número de frutos manchados en cada zona se analizó ajustando modelos lineales generalizados, asumiendo distribución Poisson con función de enlace logaritmo natural [ $\text{Ln} (\mu)$ ] y separación de medias Tukey-Kramer ( $p \leq 0,05$ ). El efecto del tratamiento en la zona de aparición del desorden se analizó con la prueba Mantel-Haenszel Chi-Cuadrado, comparando perfiles de distribución de frecuencias. El grosor de cáscara se analizó mediante modelos lineales generales y la separación de medias se realizó mediante prueba Tukey-Kramer ( $p \leq 0,05$ ).

El primer año, atendiendo las diferencias en T y HR de frutos desverdizados y no desverdizados, el efecto del encerado se analizó anidado dentro de cada nivel de desverdizado. El segundo año, se realizó un análisis con arreglo factorial de ambos factores (desverdizado y encerado) en cada fecha de evaluación.

## Resultados

### *Caracterización anatómica del desarrollo del manchado*

A los 15 días de almacenamiento comenzó a visualizarse el daño en la cáscara de algunos frutos (Figura 1 A). Inicialmente se observó, entre las glándulas de aceite, una zona irregular de color pardo, que con el paso del tiempo, avanzó en superficie y se oscureció adquiriendo color marrón (Figura 1A-C). Finalmente, luego de la vida de mostrador, en los casos más severos, dicha zona del tejido se deprimió (Figura 1C).



Figura 1. Frutos manchados de mandarina Satsuma ‘Okitsu’ a los 15 (A) y 30 (B) días de almacenamiento y luego de 7 (C) días de vida de mostrador, año 1.

Al observar microscópicamente el tejido en la zona manchada, luego de 30 días de almacenamiento y 15 de vida de mostrador, se detectó que el desorden celular se ubica fundamentalmente en la zona subepidérmica (Figura 2). Se observaron células con el contenido citoplasmático colapsado o retraído, teñidas intensamente de rojo con safranina, indicando la presencia de compuestos lipídicos (cutina, suberina, lignina, quitina). En las zonas más afectadas, las células parenquimáticas subyacentes, presentaron el mismo deterioro que las células subepidérmicas y las

células de la epidermis también colapsaron, pero la cutícula permaneció intacta. También se observó una pérdida en la integridad del tejido parenquimático, con un menor volumen celular y compactación del tejido ya desde etapas tempranas de daño (Figura 2B y C). Las células del albedo no fueron afectadas.

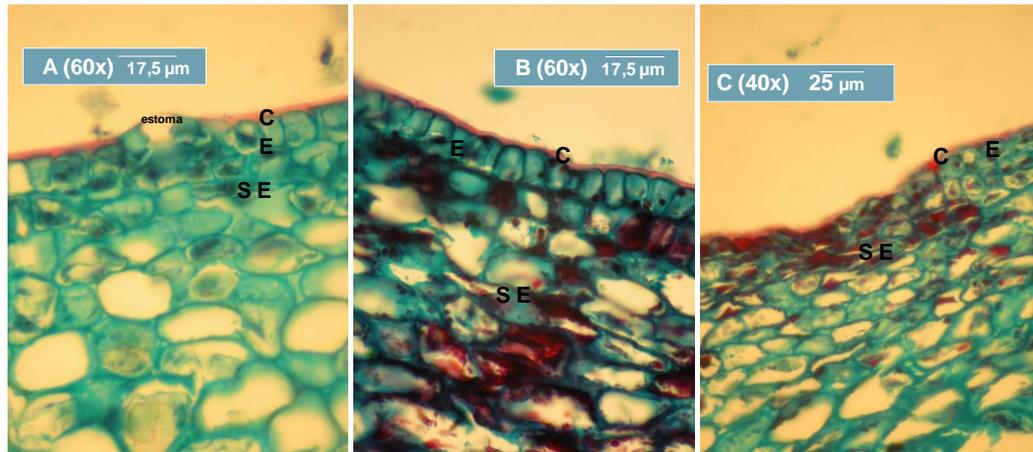


Figura 2: Corte transversal de la cáscara de mandarina Satsuma ‘Okitsu’ a los 30 días de almacenamiento y 15 días de vida de mostrador, donde se observa tejido sano (A), tejido levemente dañado: células colapsadas con pérdida de contenido celular por debajo de la epidermis (B) y tejido con daño severo: células de la epidermis y zona sub-epidérmica colapsadas, con células aplastadas por pérdida de turgencia (C). C: cutícula, E: epidermis SE: parénquima subepidérmico.

#### *Zona del fruto afectada*

El daño cuantificado a los 30 días de almacenamiento y luego de 15 días de vida mostrador, se manifestó en diferentes zonas del fruto, pudiendo aparecer en más de una de las zonas evaluadas. En más del 40 % de los frutos la mancha se localizó en la zona ecuatorial y en segundo lugar en la zona la inferior, alcanzando casi al 30 % de los frutos (Cuadro 1, Figura 3). La zona del cáliz fue la menos afectada.

Cuadro 1. Media de frutos con manchas según zona del fruto afectada y porcentaje.

| Momento de muestreo                        | <b>Media y porcentaje de frutos con manchas por zona</b> |                       |                      |                       |                      |
|--|--|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
|  | Cáliz (porcentaje)                                       | Superior (porcentaje) | Ecuador (porcentaje) | Inferior (porcentaje) | Estilar (porcentaje) |
| 30 días almacenamiento                     | 0,1 c <sup>z</sup> ; (1)                                 | 1,8 b; (19)           | 3,7 a; (44)          | 1,8 ab; (29)          | 1,1 b; (7)           |
| 30 días almacenamiento + 15 días mostrador | 0,1 c; (1)   | 2,6 b; (17)           | 5,5 a; (47)          | 3,0 b; (28)           | 1,4 b; (7)           |

<sup>z</sup>Letras diferentes en filas indican diferencias significativas, Tukey-Kramer ( $P \leq 0,05$ )

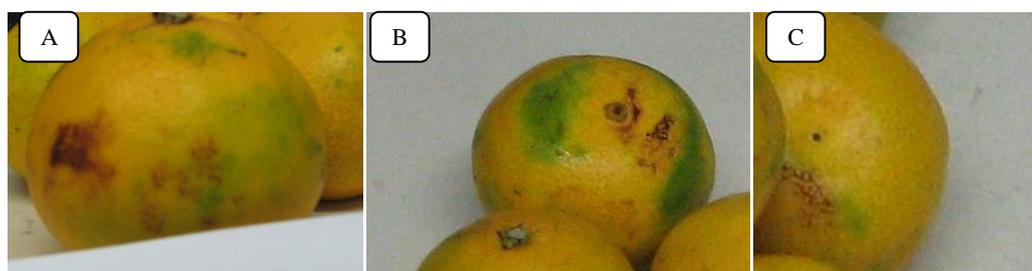


Figura 3. Frutos de mandarina Satsuma 'Okitsu' manchados en la zona ecuatorial y superior (A), caliz y superior (B) e inferior y estilar (C).

#### *Grosor de Cáscara*

En términos generales, en los dos años los frutos manchados presentaron la cáscara más delgada que los sanos. Al comparar zonas sanas de frutos con y sin mancha, los frutos afectados tuvieron menor grosor de cáscara que los sanos, alcanzando significancia estadística el segundo año (Cuadro 2). Adicionalmente, al contrastar la zona sana de la cáscara de un fruto manchado con la dañada, esta última siempre fue más fina.

Cuadro 2. Grosor de cáscara en frutos sanos y manchados de mandarina Satsuma ‘Okitsu’ a los 30 días en cámara de frío y 7 días (año 1) o 15 días (año 2) de vida de mostrador.

|                |          | Grosor de Cáscara (mm) |        |
|----------------|----------|------------------------|--------|
|                |          | Año 1                  | Año 2  |
| Fruto sano     | Sana     | 1,93 a <sup>z</sup>    | 2,01 a |
| Fruto manchado | Sana     | 1,80 a                 | 1,61 b |
|                | Manchada | 1,58 b                 | 1,42 c |

<sup>z</sup>Letras distintas en columnas indican diferencias significativas, Tukey-Kramer ( $P \leq 0,05$ ).

#### *Efecto de las condiciones ambientales en la incidencia de frutos manchados*

La incidencia de frutos manchados varió entre años, alcanzando a los 30 días de almacenamiento, el 17 % de los frutos desverdizados y encerados el primer año y solo el 7 % el segundo año.

Las precipitaciones ocurridas durante cada ciclo productivo, desde el mes de setiembre hasta el momento de la cosecha en el mes de marzo presentaron diferencias entre las temporadas. En el primer año las precipitaciones fueron menores que en el segundo, alcanzando, respectivamente, 420 mm y 857 mm en el período. Adicionalmente, durante los 15 días previos a la cosecha, el primer año prácticamente no se registraron precipitaciones, mientras que el segundo año alcanzaron 48 mm en 4 días (Figura 4).

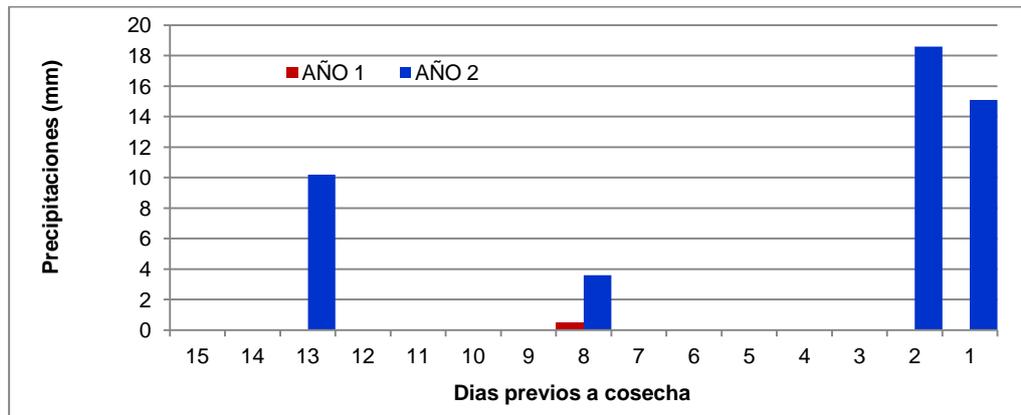


Figura 4. Precipitaciones (mm) registradas durante los 15 días previos a la cosecha en las dos temporadas.

La temperatura media y mínima prácticamente no varió entre temporadas. Sin embargo, la temperatura máxima en las últimas dos semanas del ciclo, fue superior el primer año, superando en algunos días los 40 °C; este período coincide con la Fase III de crecimiento de los frutos (Figura 5).

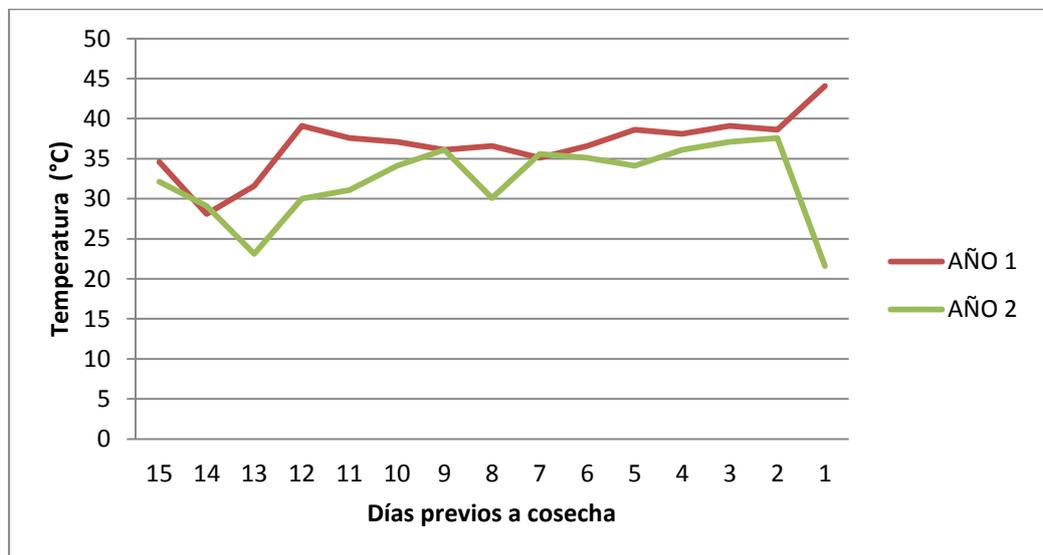


Figura 5. Temperatura máxima durante los 15 días previos a cosecha en las dos temporadas.

La humedad relativa media diaria durante la primera temporada, fue menor en comparación a la segunda. Esta tendencia se acentuó en los últimos días previos a la cosecha, cuando en la mayoría de los días la HR apenas sobrepasó el 50 %. El día previo a la cosecha, en la segunda temporada, la HR prácticamente duplicó los valores registrados en la primera (Figura 6).

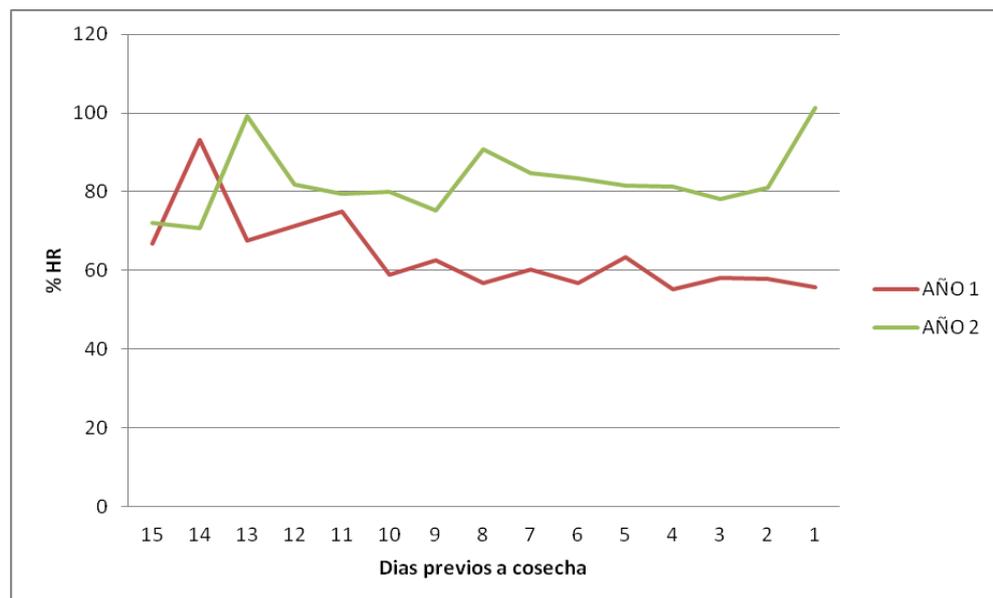


Figura 6. Humedad relativa media diaria (%) en las dos semanas previas a la cosecha, por temporada.

#### *Efecto del desverdizado y encerado de frutos*

*Año 1.* Al momento de la cosecha y luego del desverdizado no se observaron frutos manchados. La aparición del desorden recién se hizo evidente a partir de los 15 días de almacenamiento. El manchado se incrementó con el tiempo de almacenamiento y luego de 7 días de vida de mostrador. Los tratamientos sin desverdizar, cuyos frutos permanecieron a T y HR ambiente durante las 72 horas que duró el desverdizado de los demás tratamientos (T-HR ambiente y T-HR controlada,

respectivamente), presentaron desde los 15 días de almacenamiento, significativamente mayor porcentaje de frutos manchados que los no desverdizados ( $P \leq 0,05$ ). Esta diferencia se mantuvo durante toda la vida postcosecha (Figura 7).

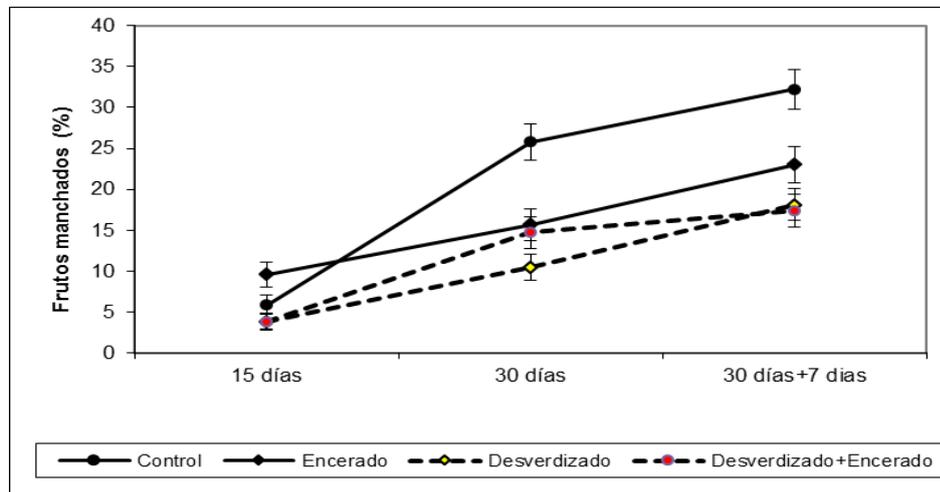


Figura 7. Evolución del manchado de mandarina Satsuma ‘Okitsu’ durante el almacenamiento (15 y 30 días) y luego de 7 días de vida de mostrador (30+7), expresado en porcentaje de frutos manchados, de acuerdo a los tratamientos de desverdizado y encerado.

En los frutos no desverdizados (T-HR ambiente), la aplicación de cera disminuyó significativamente la incidencia del manchado a los 30 días de almacenamiento ( $P \leq 0,05$ ), manteniéndose esa tendencia a los 7 días de vida de mostrador. Por el contrario, en los frutos desverdizados (T-HR controlada), la aplicación de ceras no provocó diferencias significativas en la incidencia durante todo el período de estudio.

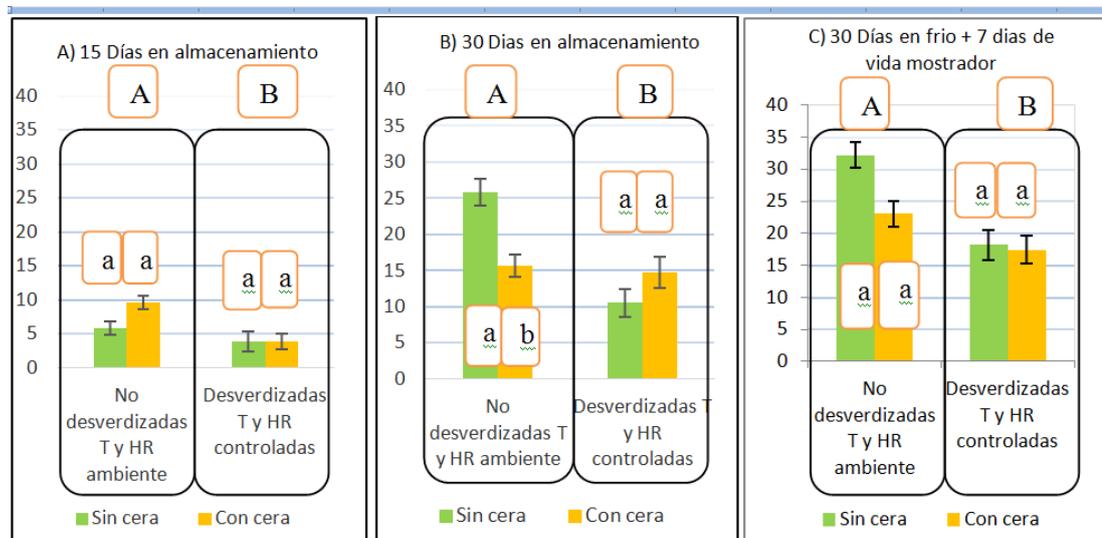


Figura 8. Porcentaje de frutos manchados de mandarina Satsuma ‘Okitsu’. Efecto del encerado según condición previa a la entrada a cámara: no desverdzado: T y HR ambiente y desverdzado: T y HR controlada. Letras diferentes indican diferencias significativas, Tukey-Kramer ( $P \leq 0,05$ ); letras mayúsculas: efecto desverdzado, letras minúsculas: efecto encerado anidado dentro de cada nivel de desverdzado.

*Año 2.* La evolución de la incidencia presentó un comportamiento similar a la del primer año, aunque con valores menores en todos los tratamientos (Figura 9). Sin embargo, este año, controladas las condiciones ambientales previas a la entrada a cámara, no hubo interacción entre tratamientos de encerados y desverdzados en ninguna de las fechas evaluada. A los 15 días de vida de mostrador, el tratamiento de desverdzado no afectó la incidencia de frutos manchados, mientras que el encerado la redujo significativamente ( $P \leq 0,05$ ), (Figura 10).

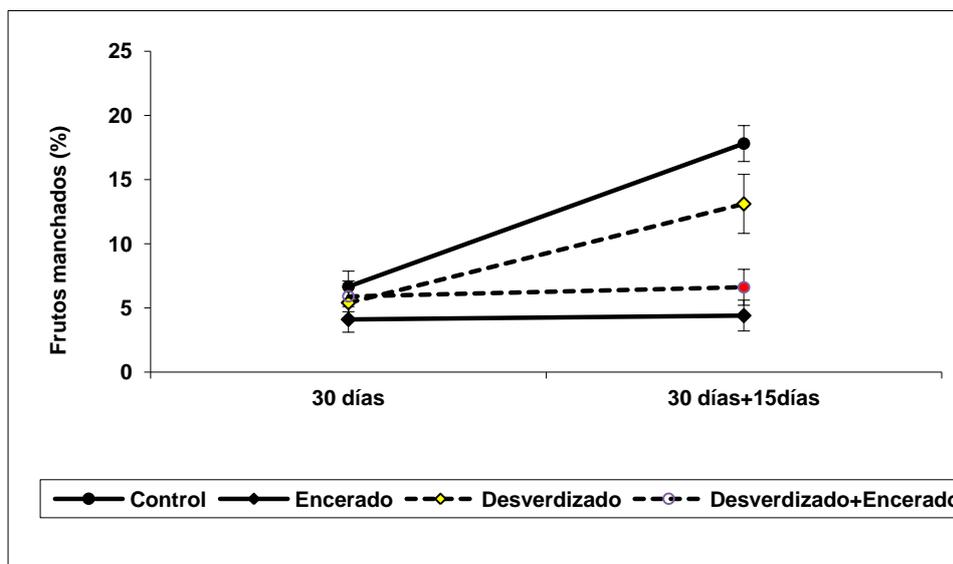


Figura 9. Evolución del manchado de frutos de mandarina Satsuma ‘Okitsu’, durante el almacenamiento (30 días) y luego de 15 días de vida de mostrador (30+15), expresado en porcentaje de frutos manchados, de acuerdo a los tratamientos de desverdizado y encerado.

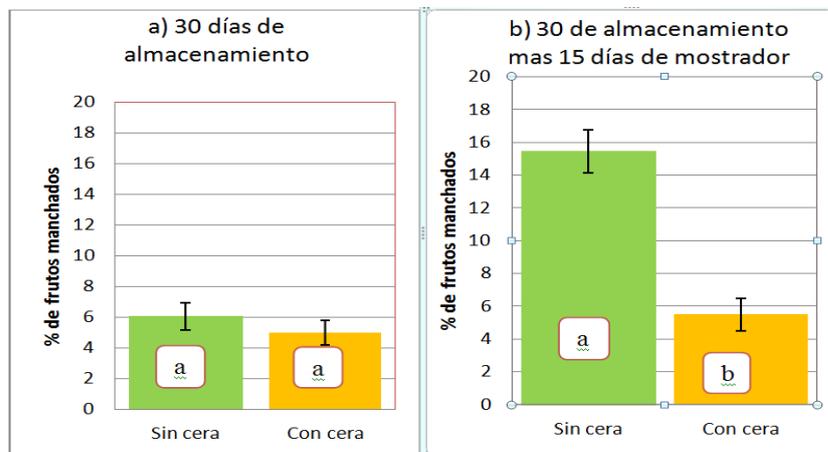


Figura10. Efecto del encerado de frutos en la incidencia del manchado de mandarina Satsuma ‘Okitsu’, año 2. Letras diferentes en el grafico indican diferencias significativas, Tukey-Kramer ( $P \leq 0,05$ ).

## **Discusión**

El manchado de mandarina Satsuma ‘Okitsu’ comenzó a manifestarse externamente a los 15 días de almacenamiento. Al inicio se observó una zona irregular de color marrón entre las glándulas de aceite, que se fue incrementando y oscureciendo con el tiempo. Finalmente, después de 30 días de almacenamiento y 15 de vida de mostrador, en los casos más severos dicha zona se deprimió. A nivel microscópico, después de un período mayor a 45 días de la cosecha, el daño se localizó fundamentalmente en el tejido subepidérmico, similar a lo encontrado en etapas más tempranas por Da Luz et al. (2014). Estos autores reportaron para este mismo desorden fisiológico, que la afección se inicia dos meses antes de la cosecha en la zona subepidérmica y que el daño avanza hacia las células parenquimáticas subyacentes, aunque no más de un tercio de su espesor. En nuestro trabajo también se observó la disgregación celular, con el deterioro parcial de sus paredes cuando el daño es leve y con la consiguiente pérdida de turgencia provocando aplastamiento en las zonas con daño más severo. La epidermis mantuvo las características normales en las primeras etapas de la afección, pero en estados avanzados las células modificaron su citoplasma, tiñendo intensamente de rojo con safranina. Sin embargo, la cutícula permaneció intacta, aún en los frutos con mayores daños, luego de 30 días de almacenamiento y 15 días de vida de mostrador. El deterioro celular y la consiguiente oxidación enzimática del contenido vacuolar, rico en sustancias fenólicas, podría estar explicando la coloración marrón que se observa a simple vista cuando se manifiesta este desorden (Matile, 1984).

El ‘colapso de la corteza’, reportado en mandarinas Satsumas y Clementinas en las condiciones productivas de Sudáfrica, también presenta el daño celular en las capas subepidérmicas del flavedo y en el área adyacente a las glándulas de aceite. La epidermis permanece inalterada, tanto en los frutos afectados como en los sanos (van Rensburg et al., 2004, Cronje et al., 2011). Los daños encontrados en nuestro experimento son muy similares a los descritos anteriormente, con la diferencia que en zonas de daño muy severo, las células de la epidermis colapsaron. Por otro lado, a

diferencia del desorden en estudio, los frutos de naranjas ‘Navelina’ y ‘Navelate’ afectados por el colapso de la corteza en las condiciones de España, se caracterizan por una depresión inicial del flavedo, que posteriormente se vuelve de color marrón rojizo (Agustí et al., 2001). Esta alteración está asociada a la pérdida de agua de las células situadas en la zona de coexistencia del flavedo con el albedo, avanzando hacia el exterior alcanzando la epidermis y hacia el interior afectando las capas más profundas del albedo. En forma similar a nuestros resultados, al inicio la epidermis de los frutos de naranja ‘Navelate’ aparece intacta y tanto la composición de la cera de la superficie como la cutícula, son similares en zonas sanas y dañadas (Agustí et al., 2004). En términos generales nuestros resultados concuerdan parcialmente con descripciones realizadas para los diferentes desórdenes fisiológicos mencionados previamente. Sin embargo, el manchado de la mandarina Satsuma ‘Okitsu’ causado por el frío, difiere de lo descrito para otras especies cítricas en respuesta a este factor. En estos frutos, desde el inicio las células epidérmicas colapsan como consecuencia de la ruptura del tonoplasto y el deterioro del citoplasma altera la estructura y el metabolismo de las ceras que protegen la epidermis (Cohen et al., 1990, Almela et al., 1992, Vercher et al., 1994, Agustí et al., 2004). Por lo que el daño puede asociarse a una mayor permeabilidad de la cutícula en las zonas afectadas del fruto, lo que favorece la pérdida de agua hacia la atmósfera y altera el balance hídrico de dichas zonas (Vercher et al., 1994). El manchado en estudio tampoco parece asociarse al picado de la corteza descrito en frutos de pomelo ‘Marsh’ y mandarina ‘Fallglo’, que se asocia al colapso de las glándulas de aceite, provocando leves depresiones en las regiones por encima de éstas. En el tejido epidérmico, subepidérmico y en el albedo subyacente a las glándulas, se observa colapso celular y células con pérdida de la orientación característica (Petraceck et al., 1995, 1998).

El porcentaje de frutos manchados varió entre años y se incrementó con el tiempo de almacenamiento y la vida de mostrador. La incidencia de frutos manchados luego del desverdizado y encerado y tras 30 días de almacenamiento, fue de un 17 % el primer año y de 7 % el segundo. Las condiciones ambientales previas a la cosecha, pueden afectar la manifestación de desórdenes fisiológicos, ya que

estarían generando una mayor o menor sensibilidad de los frutos al manchado. En este experimento, en el primer año desde la floración hasta la cosecha las precipitaciones fueron muy bajas y durante los 15 días previos a la misma no alcanzaron a 1 mm. Por el contrario, en el segundo año las precipitaciones se duplicaron durante el ciclo de crecimiento y en 4 de los últimos 15 días, alcanzaron a 48 mm. Adicionalmente, la temperatura en los días previos a la cosecha en el primer año fue siempre superior a la registrada en el segundo. Con respecto a la HR, esta fue en promedio menor el primer año de investigación, presentado valores que no alcanzaron el 60 %, mientras que en el segundo año los valores promedio superaron el 80 % en el mismo periodo. Considerando en conjunto las variables ambientales, la incidencia del daño se asoció con bajas precipitaciones y HR y alta temperatura ambiental durante los días previos a la cosecha. Probablemente el estrés ocasionado por la deshidratación de la planta, determina una mayor sensibilidad de los frutos a manifestar el manchado en estudio. El ‘colapso de la corteza’ de naranja ‘Navelate’ se ha asociado con la presencia de viento y baja HR (40-45 %), lo que provoca alta evapotranspiración (Almela et al., 1992) y también con cambios bruscos de la HR durante el desarrollo del fruto (Agustí et al., 2001, 2004).

Parecería también que la sensibilidad al desarrollo de esta fisiopatía no es homogénea en la superficie de la fruta, sino que los síntomas se desarrollan preferentemente en la zona ecuatorial, con más del 40% de los frutos afectados, mientras que en la zona del cáliz la incidencia fue despreciable. Según Roger (1988), este tipo de daño en esta zona del fruto puede estar asociado con el pasaje de la fruta por las líneas de empaque (rodillos, cepillos etc.), por lo que se esperaría que la zona del ecuador sufra mayores golpes y por lo tanto mayor incidencia de síntomas. En nuestra investigación, los frutos únicamente se trasladaron por la enceradora y lo hicieron durante el mismo tiempo los dos años, mientras que la incidencia de frutos manchados varió notablemente entre años, por lo que consideramos que la zona ecuatorial es más sensible, independientemente del tipo de rodamiento que realicen los frutos por la línea de empaque.

El tratamiento de desverdizado con etileno para acelerar el cambio de color de los frutos no afectó el porcentaje de frutos manchados (Figura 7). Este tratamiento se ha reportado como promotor de varios desórdenes en la cáscara, tales como el daño por frío y la podredumbre de cáliz en naranja ‘Shamouti’ (Porat et al., 1999), también se encontró un mayor ennegrecimiento del cáliz y frutos de mandarinas Satsumas con manchas cuando se prolonga el tratamiento (Vázquez, 2005). Sin embargo, se ha propuesto por otro lado un efecto protector de esta hormona frente al estrés (Yang y Hoffmann, 1984), disminuyendo la sensibilidad al daño por frío en naranjas ‘Navelate’ (Lafuente et al. 2004), la incidencia de peteca en limones (Wild, 1991) y el ‘colapso de la corteza’ en naranjas ‘Navelina’ y ‘Navelate’ (Lafuente y Sala, 2002; Cajuste y Lafuente, 2007). Uno de los efectos positivos del tratamiento con etileno consiste en estimular el metabolismo fenólico en la cáscara de los frutos y probablemente active mecanismos adicionales de defensa (Cajuste y Lafuente, 2007).

El encerado de los frutos disminuyó la incidencia y severidad del manchado en ambas temporadas. La disminución del daño puede deberse a que las ceras (goma laca y polietileno) aplicadas en postcosecha, reducen la pérdida de agua, al proporcionar una barrera que limita el intercambio gaseoso, logrando una menor deshidratación, como se ha citado en mandarinas y pomelos (Kaplan, 1986; Wardowski et al., 1986; Hagenmaier y Baker, 1994, 1995; Conesa, 2004; Dou, 2004; Zócalo 2009). Por otro lado, el tiempo de almacenamiento en cámara incrementó la incidencia y severidad del manchado, acelerándose en el periodo de vida de mostrador con una temperatura media entre 15 y 19 °C. Esta intensificación del daño es esperable, ya que una vez colapsadas las células, la pérdida del contenido celular, su degradación y oxidación es un proceso gradual que está asociado a la respiración y evaporación y la activación de enzimas vinculadas a estos procesos a temperaturas más altas. Dou et al. (2001) en sus investigaciones sobre el colapso de la corteza encontraron patrones de comportamiento similares, determinando la importancia de la temperatura en el nivel de daño; naranjas ‘Valencia’ almacenadas a 21 °C manifestaron mayor daño que las almacenadas a 4 °C. El encerado de los frutos logró disminuir estos efectos negativos durante el almacenamiento y su vida

postcosecha; en forma similar, nuestros resultados demostraron el efecto protector de las ceras, reduciendo la incidencia de frutos manchados durante el almacenamiento y la vida de mostrador.

En síntesis, el manchado de mandarina Satsuma ‘Okitsu’ comenzó a manifestarse, principalmente en la zona ecuatorial, luego de 15 días de conservación. La zona manchada presentó distorsión del tejido subepidérmico, con colapso celular sin daños en la cutícula. La incidencia y severidad del manchado fue variable entre años, incrementándose con el tiempo de almacenamiento y durante la vida de mostrador. La mayor incidencia se asoció a condiciones de menor humedad relativa, mayor temperatura y menores precipitaciones durante los 15 días previos a la cosecha. El tratamiento de desverdizado con etileno no afectó el nivel de manchado, mientras que el encerado de los frutos disminuyó la incidencia y severidad del mismo.

*Agradecimientos.* A Claudia Da Luz y Gabriela Speroni (Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, UDELAR) por el entrenamiento en las técnicas histológicas. Trabajo financiado por UPEFRUY, Uruguay.

### **Referencias bibliográficas**

Agustí M. 1999. Preharvest factors affecting postharvest quality of citrus fruit. En: Schirra M (Ed). Advances in postharvest diseases and disorders control of Citrus fruit. Trivandrum, India. Research Signpost. 1-34.

Agustí M, Almela V, Juan M. 2004. Alteraciones fisiológicas de los frutos cítricos. Madrid, España Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. 126 p.

Agustí M, Almela V, Alférez F, Juan M, Taedos FR, Zacarías L. 2001. Histological and physiological characterization of rind breakdown of “Navelate” sweet Orange. *Annals of Botany*. 88 (3): 415-422.

Almela V, Agustí M, Juan M. 1992. El picado del fruto de la mandarina Fortune. Descripción de la alteración y factores que lo influyen. *Levante Agrícola*. 31 (319): 80-86.

Cajuste JF, Lafuente MT. 2007. Ethylene-induced tolerance to non-chilling peel pitting as related to phenolic metabolism and lignin content in ‘Navelate’ fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 45: 193-203.

Cohen E, Shalom Y, Rosenberger I. 1990. Postharvest behavior of Ortanique (Topaz) tangor citrus fruit during long term storage at various temperatures. *Scientia Horticulturae*. 44(3): 235-240.

Conesa E. 2004. Encerado de los cítricos. En: Universidad Politécnica de Valencia (España). Tratamiento y manipulación de los frutos cítricos en postcosecha. Murcia, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.

Cronje PJR, Barry GH, Huysamer M. 2011 Postharvest rind breakdown of ‘Nules Clementine’ mandarin is influenced by ethylene application, storage temperature and storage duration. *Postharvest Biology and Technology*. 60: 192–201.

Da Luz C, Speroni, G, Gambetta G, Zócalo P. 2014. Caracterización anatómica del manchado postcosecha de la mandarina Satsuma ‘Okitsu’. En: Congreso Latinoamericano. Simposio Nacional Investigación y Desarrollo Tecnológico en Citrus. (5º, 2014, Salto, Uruguay). 5 p.

Dou H. 2004. Effect of coating application on chilling injury of grapefruit cultivars. *HortScience*. 39(3): 558-561.

Dou H, Jiuxu Z, Mohamed AI. 2001. Postharvest factors influencing stem-end rind breakdown (SERB) of 'Valencia' oranges. Proceedings of the Florida State Horticultural Society. 114: 162-169.

Eckert JW, Eaks IL. 1989. Postharvest Disorders and Diseases of Citrus Fruits. En: Reuther W, Calavan EC, Carman GE. (eds.). The Citrus Industry, Volume 5. Berkeley, California, USA. University of California, Division of Agricultural Sciences.

Goldschmidt EE, Huberman M, Goren R. 1993. Probing the role of endogenous ethylene in the degreening of citrus fruit with ethylene antagonist. Plant Growth Regulation. 12 (3): 325-329.

Hagenmaier RD, Baker RA. 1995. Layered coatings to control weight loss and preserve gloss of Citrus fruits. HortScience. 30 (2): 296-298.

Hagenmaier RD, Baker RA. 1994. Wax microemulsions and emulsions as Citrus coatings. Journal of the Agricultural and Food Chemistry. 42 (4): 899-902.

Johansen D. 1940. Plant microtechnique. New York . Mc Graw-Hill Book Company. 1st. ed.

Kaplan HJ. 1986. Washing, waxing and color adding. En: Wardowski WF, Nagy S, Grierson W (Eds) Fresh Citrus Fruits. Westport, CT: AVI Publishing Co. 379-395.

Katz E, Martínez-Lagunes P, Riov J, Weiss D, Goldschmidt EE. 2004. Molecular and physiological evidence suggests the existence of a system II-like pathway of ethylene production in non-climacteric Citrus fruit. Planta. 219: 243 - 252.

Kruger FJ, Penter M, Masheve R, Combrink, NK. 2004. The use of fruit mineral content as a tool to investigate the epidemiology of citrus rind disorders. ARC-ITSC, Nelspruit, South Africa. South Africa Fruit Journal. 4 (2): 54-59.

Lafuente MT, Sala JM. 2002. Abscisic acid and the influence of ethylene, humidity and temperature on the incidence of postharvest rindstaining of Navelina oranges (*Citrus sinensis* L. Osbeck) fruits. Postharvest Biology and Technology. 25: 49-57.

Lafuente MT, Sala JM, Zacarías L. 2004. Active oxygen detoxifying enzymes and phenylalanine ammonia-lyase in the ethylene-induced chilling tolerance in Citrus fruit. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52(11): 3606-3611.

Locquin M, Langeron M. 1985. Manual de microscopía. España. Ed.Labor., 373 p.

Matile P. 1984. Das toxische Kompartiment der Pflanzenzelle. Naturwissenschaften. 71: 18-24.

Mayuoni L, Tietel Z, Patil BS, Porat R. 2011. Does ethylene degreening affect internal quality of citrus fruit? Postharvest Biology and Technology. 62 (1): 50-58.

MGAP-DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca-Dirección de Investigaciones Económicas Agropecuarias). 2006. La citricultura en Uruguay contribución a su conocimiento. Montevideo, Uruguay. 31 p.

MGAP-DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca-Dirección de Investigaciones Económicas Agropecuarias). 2003. Encuesta citrícola otoño 2003. Montevideo, Uruguay. 26 p.

Petraceck PD., Dou H, Pao S. 1998. The influence of applied waxes on postharvest physiological behavior and pitting of grapefruit. Postharvest Biology and Technology, 14(1): 99-106.

Petraceck PD, Wardowski WF, Brown GE. 1995. Pitting of grapefruit that resembles chilling injury. *HortScience* 30 (7):1422-1426.

Plaza P, Sanbruno A, Usall J, Lamarca N, Torres R, Pons J, Viñas I. 2004. Integration of curing treatments with degreening to control the main postharvest diseases of Clementine mandarins. *Postharvest Biology and Technology*. 34(1): 29-37.

Pons J, Almela V, Juan M, Agustí M. 1992. Use of ethephon to promote colour development in early ripening Clementine cultivars. En: *International Citrus Congress (VII, 1992, Acireale, Italy)*. Proceedings. International Society of Citriculture. 1: 459-462.

Porat R, Weiss B, Cohen L, Daus A, Aharoni N. 2004. Reduction of postharvest rind disorder in citrus fruit by modified atmosphere packing. *Postharvest Biology and Technology*. 33(1): 35-43.

Porat R, Weiss B, Cohen L, Daus A, Goren R, Droby S. 1999. Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene on the postharvest qualities of 'Shamouti' oranges. *Postharvest Biology and Technology*. 15 (2): 155-163.

Rodrigo MJ, Zacarías L. 2007. Effect of postharvest ethylene treatment on carotenoid accumulation and the expression of carotenoid biosynthetic genes in the flavedo of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 43: 14-22.

Roger S. 1988. Defectos y alteraciones de los frutos cítricos en su comercialización. Bilbao, Comité de Gestión para la Exportación de Frutos Cítricos. 153 p.

Shimokawa K, Shimada S, Yaeo K. 1978. Ethylene-enhanced chlorophyllase activity during degreening of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Scientia Horticulturae* 8: 129-135.

Van Rensburg PJJ, Cronje PJR, Joubert J, Gambetta G, Bruwer M. 2004. Factors influencing rind breakdown in Citrus fruit. En: International Citrus Congress (X, 2004, Agadir, Morocco) Proceedings. *International Society of Citriculture*. 3: 1051-1061.

Vázquez, D. 2005. Manejo poscosecha de naranjas y mandarinas producidas en noreste argentino. En: Seminario Internacional (2°), Jornada de Poscosecha de Cítricos (4a., 2005, Concordia). *Actas. Concordia, INTA*. 59-64.

Vercher R, Taedo FR, Almela V, Zaragoza S, Primo-Millo E, Agustí M. 1994. Rind structure, epicuticular wax morphology and water permeability of “Fortune” mandarin fruits affected by peel pitting. *Annals of Botany*. 74: 619-625.

Wardowski WF, Steven N, Grierson W. 1986 *Fresh citrus fruits*. New York, Van Nostrand Reinhold. 547 p.

Wild BL. 1991. Postharvest factors governing the development of peteca rind pitting on ‘Meyer’ lemons. *HortScience*. 26 (3) 287-289.

Yang SF, Hoffmann NE. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annals Review Plant Physiology*. 35: 155-189.

Zócalo P. 2009. Incidencia en el nivel de manchado en poscosecha de mandarinas Satsumas según posición en la planta, tiempo de desverdizado y diferentes recubrimientos. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía, Universidad de la República. 81p.

## 7.2. Diferentes tipos de daños de cáscara.



Figura 1: Daño por frío en pomelo ‘Star Ruby’ luego de 20 días de almacenamiento (5-6 °C).



Figura 2. Colapso de la corteza en mandarina Satsuma ‘Okitsu’.



Figura 3: Peteca en limón Criollo, tipo ‘Lisbon’.



Figura 4: Oleocelosis en naranja ‘Navelate’



Figura 5. Manchado postcosecha de la mandarina Satsuma ‘Okitsu’

**7.3. Condiciones ambientales no controladas (fuera de cámara de desverdizado), año 1.**

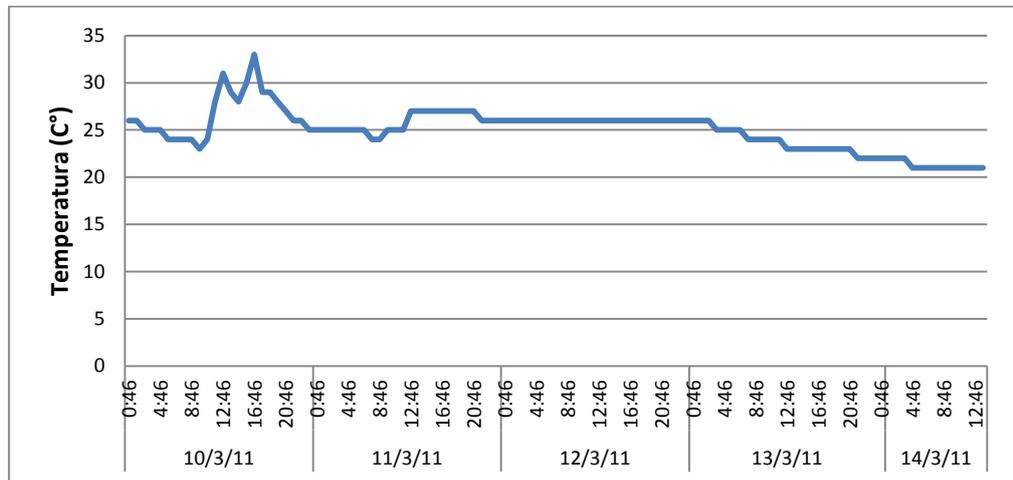


Figura 1. Temperatura (°C) en condiciones no controladas (fuera de cámara de desverdizado), año 1.

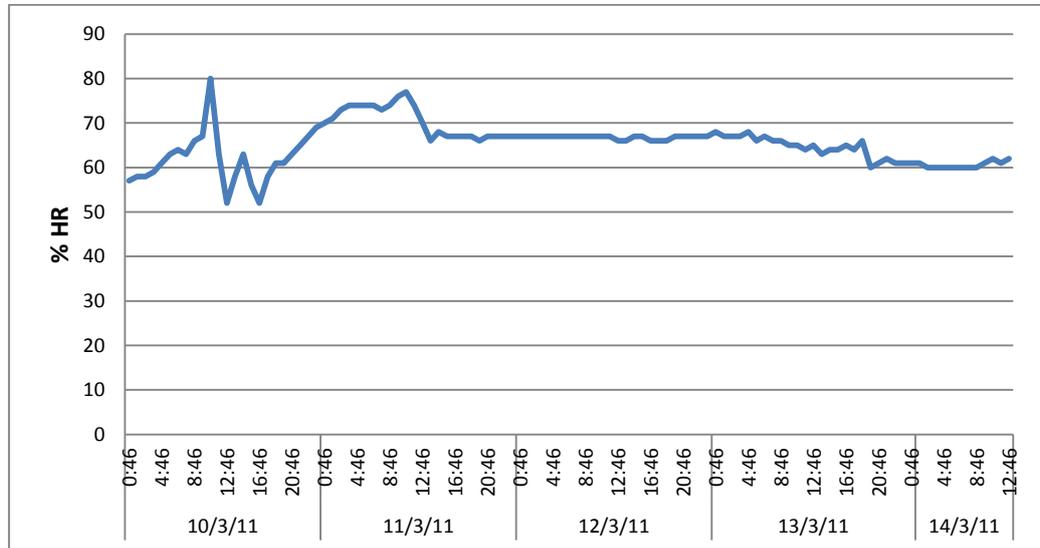


Figura 2. Humedad relativa (%) en condiciones no controladas (fuera de la cámara de desverdizado), año 1.