

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

MÁSTER EN PRODUCCIÓN VEGETAL Y ECOSISTEMAS AGROFORESTALES



**Evaluación y preselección de mutantes de
maduración tardía obtenidos por irradiación de
mandarina Clementina (*Citrus clementina* Hort.
ex Tanaka)**

Trabajo Final de Máster

Directores experimental: Manuel Talón Cubillo

Director académico: Carlos Mesejo Conejos

Alejandro Meliá Ballester

Septiembre, 2013

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría expresar mi agradecimiento a los directores del presente trabajo. A Manuel Talón, por darme la oportunidad de conocer en que se basa un programa de mejora genética en cítricos y por su ayuda desinteresada durante mi estancia en el IVIA y a Carlos Mesejo, por su ayuda a nivel académico, por sus enseñanzas a nivel educativo y por su ayuda en la corrección y redacción del presente trabajo.

También me gustaría agradecer a Antonio López García su ayuda desinteresada tanto en el trabajo de campo, donde hemos pasado muchas horas juntos y he aprendido multitud de cosas sobre variedades de cítricos, como en la redacción del presente trabajo.

Agradecer además la ayuda prestada por las chicas del laboratorio de Genómica del IVIA, porque sin ellas no se habrían podido evaluar muchas de las muestras recogidas.

Finalmente les dedico mi mayor agradecimiento a mis padres, a mi hermano y a mi pareja, porque a pesar de los duros momentos que hemos pasado, son los que me han dado fuerzas y me han animado a sacar este trabajo hacia delante.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Necesidades de la mejora genética en los cítricos	1
1.2. Características de las mandarinas del grupo Clementina	4
1.2.1. Características principales de Clemenules	5
1.2.2. Objetivos de mejora	6
1.3. La maduración del fruto	9
1.3.1. La maduración externa de los cítricos	10
1.3.2. La maduración interna de los cítricos	11
1.3.2.1. Sólidos solubles totales	12
1.3.2.2. Ácidos	12
1.3.2.3. Índice de madurez	14
1.4. El proceso de senescencia	15

2. OBJETIVOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal	18
3.2. Determinación de la calidad del fruto	21
3.2.1. Características de la corteza	21
3.2.2. Características de la calidad interna	23

3.3. Estudio estadístico	24
--------------------------	----

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evolución de la maduración de mandarina “Clemenules”	25
---	----

4.1.1. Características de la corteza	25
--------------------------------------	----

4.1.2. Maduración interna	25
---------------------------	----

4.2. Características de maduración de la población mutante en Febrero	28
---	----

4.2.1. Características de la corteza	28
--------------------------------------	----

4.2.2. Maduración interna	35
---------------------------	----

4.3. Preselección de posibles mutantes con características de mandarino Clementino tardío	43
---	----

5. CONCLUSIONES	48
------------------------	-----------

6. BIBLIOGRAFÍA	49
------------------------	-----------

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Necesidades de la mejora genética en los cítricos

Las necesidades de los programas de mejora genética pueden variar considerablemente dependiendo de las necesidades de cada zona de cultivo. En general, se busca mejorar desde aspectos relacionados con la producción y con las características cualitativas de los frutos, a aspectos relacionados con los estreses bióticos y abióticos que afectan a las plantas.

La citricultura mundial ha estado condicionada por algunas enfermedades distribuidas en la mayor parte de zonas cítricas, que han causado grandes pérdidas económicas y limitado el uso de algunas variedades y patrones; tal es el caso de la gomosis, producida por el hongo *Phytophthora spp.* y del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) (Moreno *et al.*, 2008). Por esto, actualmente, el uso del naranjo amargo está restringido a las escasas zonas donde no se ha detectado el virus. Otras enfermedades están restringidas a algunas áreas productoras, como por ejemplo el *Huanglongbing* ("greening"), producido por la bacteria *Candidatus Liberibacter spp.* y transmitido por los psílicos *Diaphorina citri* y *Trioza erytrae*. Es endémica de las zonas de Asia y África. Recientemente se ha descubierto esta enfermedad también en Brasil (en el año 2004) y Florida (en el año 2005), donde está causando daños muy graves que amenazan la supervivencia de las dos zonas de mayor producción en el mundo (Bové, 2006).

El cultivo de los cítricos está limitado también por la presencia de estreses abióticos que pueden influir de manera determinante sobre la productividad de las plantaciones. Los daños que sufren los cítricos por la acción de agentes abióticos pueden ser en gran parte controlados a través del uso de patrones adecuados. Entre las principales funciones de los patrones está la de facilitar la adaptación de las variedades a las diferentes condiciones ambientales en cada zona de cultivo. Por esto, resulta de gran importancia la selección de genotipos que permitan cultivar cítricos en suelos salinos o alcalinos, ácidos, inundados, secos, y, sobre todo, con elevadas concentraciones de caliza (siendo estos los principales

estreses abióticos en la zona de cultivo del Mediterráneo). Actualmente, la mejora de patrones está orientada a la obtención de nuevos genotipos que permitan una rápida entrada en producción y una elevada productividad. La tolerancia a enfermedades como la tristeza y al hongo *Phytophthora spp.* son características imprescindibles que deben presentar los nuevos patrones.

En los últimos años se está desarrollando un interés hacia los patrones tetraploides por su tolerancia a diferentes tipos de estreses y por su capacidad de controlar el crecimiento de las plantas. En la citricultura moderna, se utilizan muy pocos patrones por falta de genotipos que reúnan las características necesarias para su empleo en producción comercial. En España, por ejemplo, la mayoría de plantas están injertadas sobre el patrón citrange "Carrizo" (*C. sinensis* x *P. trifoliata*). Esto representa un gran riesgo para toda la citricultura ya que la hipotética aparición de una enfermedad específica provocaría daños parecidos a los sufridos con la aparición del virus de la tristeza.

Los objetivos de mejora de variedades también varían mucho dependiendo de la zona de producción y de la utilización que se da al producto. Para la fruta destinada al consumo en fresco de calidad interesan características cualitativas como son la ausencia de semillas, época de maduración adecuada, tamaño relativamente grande (particularmente en mandarinos), facilidad de pelado, fácil separación de los segmentos, color de corteza atractivo, sabor y textura agradable y una buena aptitud para la manipulación y el transporte.

En el grupo de los naranjos la estructura de variedades está razonablemente bien resuelta, ya que existen variedades de calidad que permiten la recolección desde la segunda quincena de octubre hasta principios de junio (en el hemisferio norte); se basa fundamentalmente en las variedades de los grupos Navel y Valencia.

En el grupo de las mandarinas existen importantes lagunas en la estructura varietal. Durante la primera parte de la campaña existen diversas variedades de satsumas y de clementinas que permiten una producción de aceptable calidad y sin semilla, aunque las clementinas tempranas podrían ser mejoradas sobre todo en lo que respecta a la calidad organoléptica y al tamaño de la fruta. Las clementinas de media estación (que se recolectan entre principios de noviembre y finales de enero) son de excelente calidad, son autoincompatibles por lo cual no se polinizan entre ellas y la fruta no tiene semillas. No obstante tanto el polen como los óvulos son viables y pueden producirse polinizaciones cruzadas con otras especies (Pensabene, 2009).

Los híbridos tipo mandarino son las variedades introducidas en respuesta a la demanda de fruta tardía por los mercados internacionales. Las principales variedades cultivadas son “Fortune” (*C. clementina* x *C. tangerina*), “Nova” (*C. clementina* x (*C. paradisi* x *C. tangerina*)), “Ortanique” (*C. reticulata* x *C. sinensis*) y “Ellendale” (*C. reticulata* x *C. sinensis*). Estas variedades tardías presentan calidades organolépticas inferiores a las de las clementinas y además son más difíciles de pelar. Aunque estos mandarinos son, al igual que las clementinas, autoincompatibles, tienen el grave inconveniente de permitir la polinización cruzada con las clementinas, provocando la formación de semillas en ambos grupos. Esto produce un gran problema comercial ya que los consumidores no aceptan frutos con semillas (Navarro, 2005).

Por último la llegada a España del hongo *Alternaria alternata* ha producido graves daños a los cultivos de “Fortune” y ha obligado a los agricultores a arrancar o sobreinjertar las plantaciones. Las nuevas variedades de mandarinos híbridos “Nadorcott” (“Afourer”) y “Moncada” han sido introducidas en España en los últimos años para sustituir a “Fortune”. Estas también inducen la formación de semillas, aunque presentan una mejor calidad de fruto. Por todo ello la estructura varietal de los mandarinos no está resuelta y se hace necesaria la aplicación de programas de mejora adecuados (Navarro, 2005).

1.2. Características de las mandarinas del grupo Clementina

Los árboles del grupo Clementina son de buen vigor y desarrollo, con hábito de crecimiento abierto, aunque existen algunas variedades con tendencia al crecimiento vertical. Las ramas normalmente no presentan espinas. Las hojas típicas de clementino, presentan una base redondeada y el ápice agudo, lanceoladas y estrechas, con peciolo corto y sin alas. Las flores son muy pequeñas, con el pedicelo corto. Las anteras amarillas y con abundantes granos de polen viable. El ovario es, en general, achatado. Los frutos son de color naranja a naranja intenso, de forma esférica o ligeramente achatada, de tamaño pequeño a grande, sin semillas (autoincompatibles), aunque se polinizan con variedades compatibles (híbridos), produciendo semillas. La pulpa es de color naranja, tierna y fundente, con gran porcentaje de zumo y una excelente calidad por su buena compensación entre sólidos disueltos y ácidos totales. En general, todas las variedades de este grupo, con frecuencia presentan tendencia a la alternancia, el cuajado del fruto es problemático en algunas variedades. La mayoría de ellas no presenta desprendimiento de frutos en su maduración y son propensas al bufado de la corteza, cuando alcanzan la madurez natural (Soler, 2006). El grupo se caracteriza por agrupar un amplio número de variedades autóctonas españolas, aparecidas sobretodo, por mutación espontánea unas de otras y cuyo origen inicial es Clementina Fina (*Citrus clementina* Hort. ex. Tanaka) (Figura 1.1).

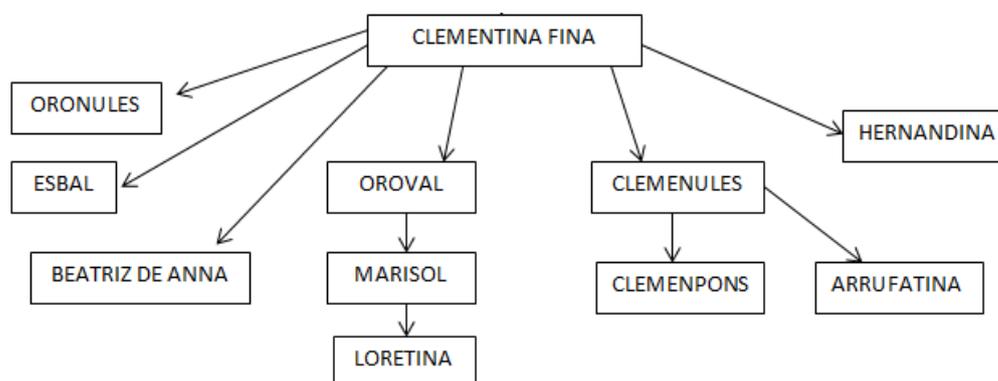


Figura 1.1. Principales mutaciones espontáneas de mandarina Clementina. Fuente: Agustí, 2000.

1.2.1. Características principales de Clemenules

Variedad originada por mutación espontánea de yema en un árbol de clementina Fina, detectada en 1953 en Nules (Castellón de la Plana). También se le conoce con los nombres de Clementina de Nules, Nulesina, clementina Reina y clementina Victoria (Soler, 2006). El árbol tiene buen vigor y desarrollo, con hábito de crecimiento abierto, estructura globosa y follaje denso, observando muy poca espinosidad en las ramas. A veces, aparecen abultamientos o verrugas a lo largo del tronco que son yemas latentes. El fruto es de buen tamaño, de color naranja intenso. Posee un adecuado contenido en zumo de alta calidad, con adecuados niveles de sólidos disueltos y ácidos totales. La pulpa es tierna y fundente. Sin semillas, aunque puede polinizar y polinizarse con variedades compatibles (Figura 1.2).

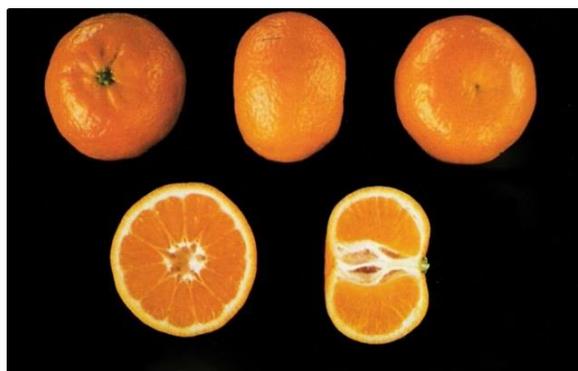


Figura 1.2. Fruto de mandarino clementino "Clemenules". Fuente: Soler, 2006.

Es productiva aunque requiere tratamientos fitoreguladores adecuados para mejorar el cuajado del fruto, no necesiéndolo para mejorar el tamaño del fruto. Su cultivo puede efectuarse en la práctica totalidad de las áreas productoras, aunque está especialmente indicado en las de media y tardía recolección. La recolección puede iniciarse a principios de Noviembre, pudiéndose recolectar hasta Enero inclusive. Presenta una floración escalonada y por consiguiente la maduración y recolección de la fruta se realiza en 2-3 veces. La fruta, también sufre las alteraciones de corteza típicas de las clementinas como es el bufado de la corteza y el "pixat".

1.2.2. Objetivos de mejora

Uno de los objetivos de mejora referentes al grupo clementino es la búsqueda de variedades de maduración tardía, es decir, con período de recolección posterior al de la variedad referencia Clemenules, y que mantengan una elevada calidad externa del exocarpo. Las variedades tradicionales que se cultivan hasta el momento han sido seleccionadas por los propios agricultores, originadas por las mutaciones espontáneas, poseen una alta calidad intrínseca. Pero su período de recolección es, en la mayoría de los casos, anterior a la Clemenules. Además, éste se solapa en poco tiempo, lo cual favorece el abastecimiento de los mercados, pero si por un problema puntual alguna de estas variedades no encuentra salida, provoca un efecto dominó, perjudicando a las variedades sucesivas hasta que este producto desaparece de los mercados (López-García, 2010) (Figura 1.3). Por otra parte, la elevada producción de mandarina Clemenules, casi 800.000 t, junto con el mal comportamiento de su corteza en el árbol, obliga a una rápida recolección y a un exceso de oferta que dificulta su comercialización.

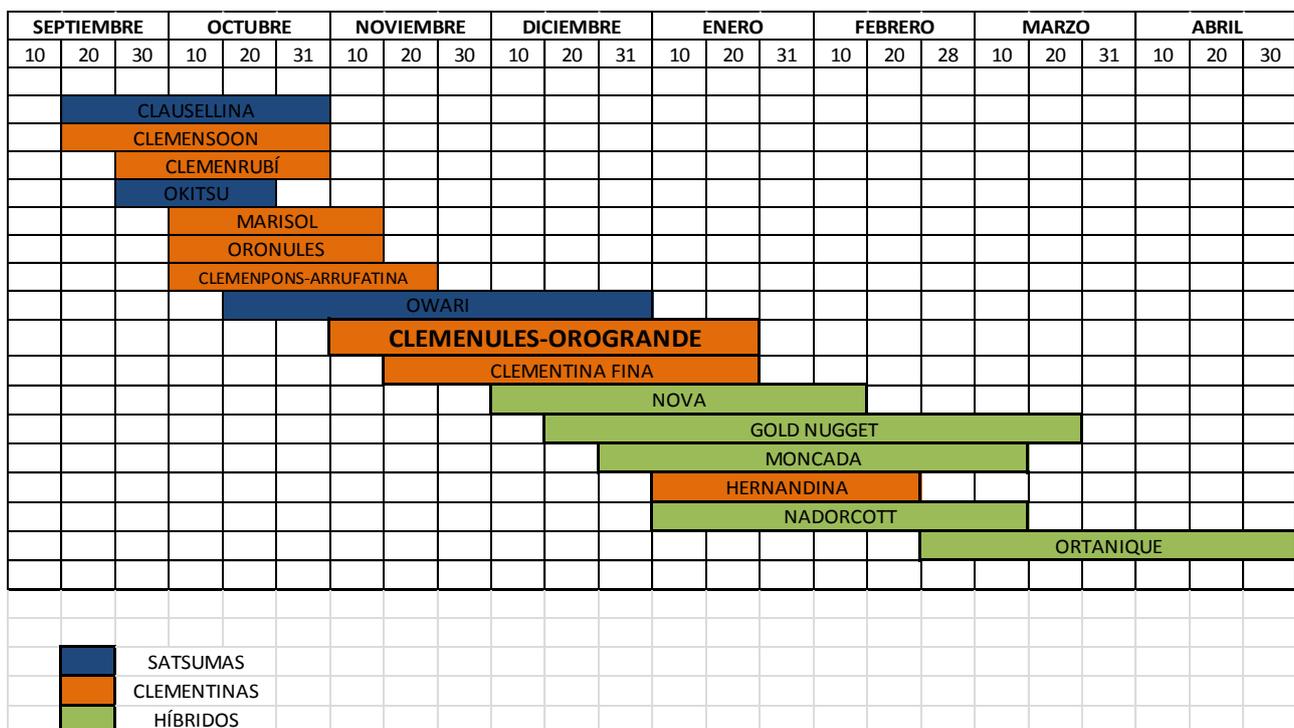


Figura 1.3. Períodos recolección clementinas, satsumas e híbridos más cultivados. *Elaboración propia.*

La solución a este problema pasa por una reestructuración varietal y en este sentido la innovación tecnológica aplicada a las variedades de cítricos tradicionales, con el objetivo de obtener nuevas variedades que desestacionalicen la oferta y amplíen el periodo óptimo de recolección de la fruta, se convierte en una necesidad (López-García, 2010).

El periodo de recolección anterior a la Clemenules, se encontraría ya prácticamente definido con variedades como Oronules, Clemenrubí, Arrufatina o Nero, entre otras. Pero tras la recolección de la Clemenules, a mediados de Enero, se observa un vacío de producción de mandarinas, suplido en parte por la Hernandina, variedad parecida a la Clemenules, pero por diversos problemas de cultivo, como la alternancia de cosechas, y la elevada producción de semillas ha caído en desuso. Por ello, muchos de los esfuerzos de los investigadores, van encaminados hacia la búsqueda de variedades, que con las características organolépticas de la Clemenules, tengan un periodo de recolección que vaya desde mitad de Enero hasta finales de Marzo e inclusive Abril. Fruto de esta búsqueda en el IVIA ya se están testando e incluso los viveros comercializando, variedades con el periodo de recolección anteriormente mencionado, ya sea con híbridos como Gold Nugget, Moncada, Safor, o Garbí, o mediante irradiaciones como Clemenverd, Neufina, Moncalina o Murta. (Figura 1.4).

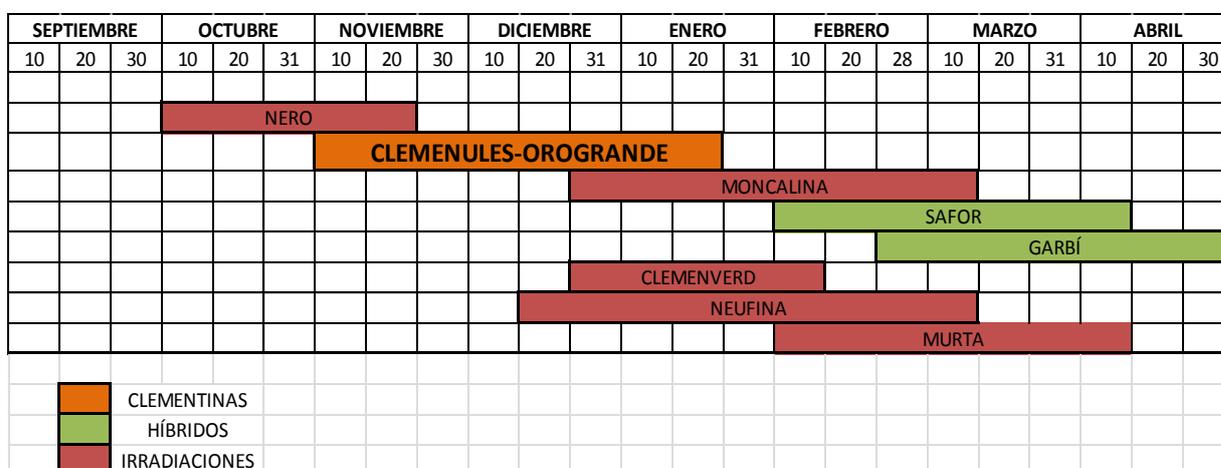


Figura 1.4. Periodos recolección nuevas variedades IVIA. *Elaboración propia. Fuente: www.ivia.es.*

Otro de los objetivos de mejora es la búsqueda de variedades que no presenten autopolinización o polinización cruzada, produciendo frutos sin semillas, característica muy apreciada en los mercados internacionales. Además de la facilidad de pelado y jugosidad de la pulpa, características que ya reúne la Clemenules.

La esterilidad gamética y la influencia de factores medioambientales sobre la formación de las semillas en los frutos, viene siendo objeto de interés no sólo en cítricos, sino también en muchas otras frutas de consumo en fresco. En los últimos tiempos, la notable presencia de variedades con polen compatible (“Fortune”, “Nova”, “Ortanique” y otros híbridos), así como la abundancia de colmenas durante el periodo de floración, han favorecido que variedades tradicionalmente sin semillas, fueran polinizadas y fecundadas con esos pólenes fértiles, capaces de inducir la formación de semillas.

La radiación de yemas con partículas gamma es uno de los procedimientos más empleados, puesto que es un método rápido de obtener variedades de cítricos sin semillas, garantiza la eliminación de caracteres juveniles y permite mejorar aspectos concretos de una determinada variedad, sin prescindir de los caracteres generales de la misma. Fruto de estos trabajos se han obtenido variedades como la Nero (prácticamente con cero semillas) u otras variedades como la Nulessin (reduce un 68% la producción de semillas respecto a la Clemenules) o la Neufina (con una reducción del 50% respecto Clemenules).

1.3. La maduración del fruto

La maduración se define como el conjunto de cambios externos, de sabor y de textura que un fruto experimenta cuando completa su crecimiento. Esta fase de su desarrollo incluye procesos como la coloración de la corteza, el descenso en el contenido en almidón, incremento de la concentración de azúcares, reducción de la concentración de ácidos, pérdida de firmeza, y otros cambios físicos y químicos. Superada esta fase, el fruto pierde turgencia, aumenta su sensibilidad a las condiciones del medio, pierde el control metabólico e inicia su senescencia.

El proceso de la maduración varía con los frutos, de modo que a este respecto es posible clasificarlos en dos grandes grupos, según su comportamiento fisiológico. Unos acumulan almidón durante su crecimiento y en la maduración lo hidrolizan. Ello exige una gran cantidad de energía, por lo que en estos frutos la maduración se caracteriza por un aumento de la respiración. Este incremento de la respiración recibe el nombre de climaterio y viene precedido por un aumento en la concentración activa de etileno. El otro grupo de frutos se caracteriza por acumular directamente monosacáridos durante su crecimiento y, por tanto, durante la maduración no experimentan incrementos significativos de su tasa respiratoria; son frutos no climatéricos. En los primeros el aumento en la producción de etileno que tiene lugar durante la maduración, o precediéndola, es responsable de los cambios bioquímicos que conducen irreversiblemente a ella. En los segundos los cambios que se producen son similares, pero menos intensos y más lentos, en general, y no están relacionados con la síntesis de etileno. Los cítricos pertenecen a este grupo (Agustí, 2000).

1.3.1. La maduración externa de los cítricos

Los frutos cítricos inmaduros son de color verde. Durante la maduración, las clorofilas se degradan y los pigmentos naranja o amarillos de la piel comienzan a aumentar su presencia. Esta misma tendencia se observa en el color del zumo de naranja. Por tanto, el contenido total en carotenoides, tanto de la corteza como del zumo, aumenta a medida que madura el fruto.

La desverdización natural del fruto o su reverdecimiento son consecuencias de la transformación de los cloroplastos del exocarpo en cromoplastos. La acumulación de azúcares en este tejido durante la maduración es el principal factor regulador de la coloración del fruto. Por tanto, la disponibilidad por fotoasimilados del fruto puede ser un factor de maduración. De hecho, concentraciones elevadas de azúcares (sacarosa) provocan la formación de cromoplastos en el exocarpo de naranja cultivado *in vitro*, y este tejido aumenta su contenido en sacarosa a medida que lo hace la concentración de ésta en el medio de cultivo (Huff, 1984).

Las condiciones ambientales como la temperatura, la humedad y la luminosidad, son factores esenciales en la determinación del color. El tipo de suelo y el patrón, contribuyen también a su manifestación (Agustí, 2000).

El etileno aplicado en cámara (10 ppm; 48 h; 20°C, 95% HR) a los frutos cítricos reduce rápidamente el tamaño de los cloroplastos y promueve su desaparición. Ello sugiere que el etileno activa algunos enzimas responsables de la degradación de las membranas tilacoidales (Agustí, 2000).

El contenido en nitrógeno de la corteza, en interacción con los azúcares, es otro de los factores endógenos que controlan la coloración del fruto. El nitrógeno inhibe la degradación de las clorofilas mientras que la sacarosa inhibe su síntesis y promueve su degradación. Por la relación entre los factores endógenos y exógenos se considera que el

inicio del cambio de color de los frutos cítricos es consecuencia del descenso de la temperatura del suelo, mediada por la temperatura del aire, que provoca el cese del desarrollo vegetativo y de la raíz. Como consecuencia de ello, se reduce la síntesis y el transporte de giberelinas desde las raíces, al mismo tiempo que se inicia su exportación desde los frutos. Adicionalmente, disminuye la absorción de N y su concentración y aumenta la de azúcares reductores y de ABA en el flavedo (Gambetta, 2009).

La aplicación de ácido giberélico antes de que el fruto cambie de color, retrasa la degradación de las clorofilas y la acumulación de carotenoides de su corteza. Este efecto se halla asociado a un retardo de la senescencia, lo que permite retrasar la recolección del fruto sin pérdidas apreciables de su calidad (Agustí, 2000). La aplicación de AG₃ no solo retarda la pérdida de clorofilas, sino que reduce la concentración de pigmentos carotenoides coloreados (β -criptoxantina, cis-violaxantina y β -citraurina) y aumenta la de pigmentos propios de los frutos verdes (β -caroteno y luteína) a lo largo de todo el periodo de maduración (Gambetta, 2009).

1.3.2. La maduración interna de los cítricos

El zumo, con una proporción de 40-55%, está contenido en el interior de las vesículas que se encuentran, a su vez, en el interior de segmentos. El zumo incluye, fundamentalmente, azúcares, ácidos y compuestos aromáticos volátiles que brindan una gran parte del sabor y del gusto que lo caracterizan. El porcentaje de zumo disminuye conforme avanza la maduración del fruto, determinando el momento hasta el cual se puede mantener el fruto en el árbol antes de su recolección.

1.3.2.1. Sólidos solubles

Del 75 al 85% de los sólidos solubles totales del zumo de naranjas, mandarinas, pomelos y limones son azúcares. De entre ellos, la sacarosa, glucosa y fructosa son los más abundantes y se encuentran en proporciones 2:1:1. En las variedades de primera y media campaña el contenido en azúcares aumenta rápidamente a medida que el fruto madura, debido sobre todo a la acumulación de sacarosa. Estos frutos continúan su maduración cuando la temperatura desciende. Pero en variedades tardías la maduración se da cuando la temperatura tiende a elevarse, y la sacarosa aumenta su contenido en el fruto relativamente poco. Esta cinética no parece clara en el caso de los pomelos. La influencia de la temperatura sobre los SST no está tan clara. Así, se ha indicado que, en la naranja 'Valencia', los contenidos más elevados en SST se obtienen en frutos de áreas subtropicales, pero la conclusión de muchos estudios, combinando regímenes térmicos, climas y zonas de cultivo en diferentes estados del desarrollo del fruto, es la falta de respuesta sistemática del contenido en SST a las variaciones térmicas (Nii et al., 1970; Reuther, 1973; Yamanishi, 1994). La concentración de SST en el zumo también se ha relacionado con la temperatura de las raíces. En las naranjas 'Valencia', 'Washington navel' y 'Navelina' (Cutore et al., 1988), una temperatura del suelo de alrededor de 25°C da lugar a contenidos más bajos de SST que una temperatura de 19°C. Estos resultados coinciden con el menor contenido en SST de los frutos de árboles cultivados en suelos arenosos (González-Sicilia, 1968). Estos suelos tienen un calor específico más bajo que los arcillosos y, por consiguiente, se calientan más fácilmente.

1.3.2.2. Ácidos

Los frutos cítricos presentan una alta concentración de ácidos antes de la maduración. El ácido cítrico, es el más abundante en la mayoría de la pulpa de los cítricos, seguido por el ácido málico (Sinclair et al., 1945). Estos ácidos se sintetizan en el fruto y no son transportados desde las hojas, como demostró Koch en 1984, al injertar frutos de

variedades más ácidas en ramas de variedades menos ácidas y viceversa y comprobar que la acidez de los frutos no variaba. Sinclair y Ramsey, en 1944, observaron que las naranjas presentan una rápida acumulación de ácido cítricos en los frutos jóvenes, con un máximo alrededor de los 100 días después de la polinización. La concentración se reduce después notablemente durante las fases II y III del desarrollo del fruto (Bain, 1958). El hecho de que el máximo de acidez se produzca cuando el volumen del fruto es del 50% del volumen final, sugiere que la reducción de la acidez no se debe únicamente a la dilución producida por la acumulación de agua durante la expansión del fruto (Soler, 2009).

La acumulación de ácido en los frutos cítricos no es homogénea dentro del árbol, de modo que se produce mayor acumulación de ácidos en los frutos con orientación sureste y suroeste, siendo el interior de la copa donde los frutos acumulan menos ácidos (Soler, 2009). Así mismo, se ha observado que la acumulación de ácidos es mayor en la zona central del fruto que en las zonas periféricas (Sites y Reitz, 1950). Las condiciones ambientales también afectan a la acumulación de ácidos, pudiéndose destacar que en zonas áridas y con poca pluviometría se produce una mayor acumulación de ácidos (Erickson, 1968). La temperatura, a su vez, es el factor más influyente en la acidez, de modo que cuanto más alto es el régimen térmico día/noche, más baja es la concentración de ácidos (Reuther y Rios-Castaño, 1969). El descenso en la acidez se ha atribuido a la rápida respiración de ácidos orgánicos que tiene lugar a estas temperaturas (Davies y Albrigo, 1994).

Tanto en naranjas y pomelos como en mandarinas, los ácidos libres aumentan en el fruto durante los primeros estados de desarrollo y permanecen, aproximadamente, constantes en su concentración hasta la maduración en que descienden como consecuencia, fundamentalmente, de la dilución provocada por el aumento de tamaño del fruto.

1.3.2.3. Índice de madurez

El índice de madurez (IM) determina la maduración interna y es la relación entre el extracto seco correspondiente a los sólidos solubles del zumo, medido por el índice refractométrico, expresado en °Brix y la acidez, expresada en porcentaje. Entre un 75% y un 85% de los grados Brix del zumo son azúcares, de los cuales, fructosa, glucosa y sacarosa son los más abundantes (Agustí, 2000).

El balance entre los dos componentes del índice de madurez configura el sabor del fruto, característica organoléptica muy valorada por parte del consumidor y que configura la calidad interna del fruto. Esta viene determinada por la “lengua de Pritchett” (figura 1.5), que indica la calidad del fruto en función de los °Brix y el IM siendo frutos con características organolépticas adecuadas para el consumo aquellos que se encuentren dentro del recinto (Soule y Grierson, 1986). Para la comercialización en fresco de los frutos cítricos en España, están determinadas las condiciones mínimas de calidad que deben ser aplicadas (DOGV: orden del 14-septiembre-2006. Conselleria de Agricultura, Pesca i Alimentació). Para determinar si un fruto cítrico puede ser recolectado y comercializado, deben tener los siguientes valores mínimos de índice de madurez: Satsumas 6,5, Clementinas y otras mandarinas 7,0, Mandarina Fortune 8,0 y Ortanique 7,5.

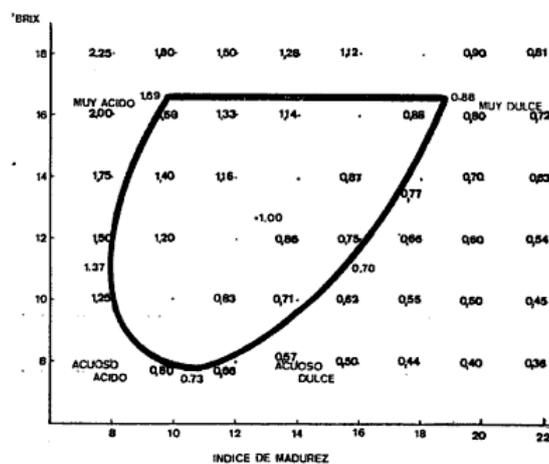


Figura 1.5. Lengua de Pritchett. Fuente (Soule, 1986).

1.4. El proceso de senescencia

Superada la fase II del crecimiento lineal del fruto, este cambia de color, madura e inicia su senescencia. Su conservación en el árbol hasta etapas avanzadas de esta fase lleva aparejadas la aparición de alteraciones en su corteza (Agustí, 2000). Se entiende por fisiopatías o desordenes fisiológicos, alteraciones de origen no parasitario, desordenes fisiológicos o enfermedades fisiogénicas que no son causadas por ningún agente patógeno sino por ciertas condiciones agroecológicas, intrínsecas o tecnológicas favorables para su aparición (Soler, 2006).

En las mandarinas Clementinas las fisiopatías más comunes son:

- “Pixat”

Se conoce como “pixat” a una serie de alteraciones de la corteza que afectan a las clementinas y en especial a la variedad Clemenules. El inicio de la alteración se caracteriza por la pérdida de turgencia del fruto y la aparición de decoloraciones. Poco tiempo después, aparecen pequeñas fisuras sobre la superficie de la corteza y finalmente aparecen manchas de color pardo-marrón, cuyo tejido se reblandece y finalmente se colapsa. La fisiopatía es provocada por el proceso de senescencia en sí mismo, aunque se acelera por las condiciones climáticas, como la lluvia, el rocío o la humedad ambiental, acompañadas de temperaturas altas (Soler, 2006).

- Bufado

Alteración caracterizada por la separación de la corteza y la pulpa y que se da con frecuencia en las mandarinas. El origen es la aparición de grandes espacios intercelulares en las capas más profundas del albedo después de que el fruto supera la fase de división celular. En la mandarina Clemenules, la pérdida de zumo provoca la contracción de la pulpa y esta se separa de la corteza, provocando el bufado (Agustí, 2000). La humedad

durante el cambio de color del fruto, la preponderación del calcio y la escasez de potasio, favorecen la aparición de esta alteración fisiológica (Soler, 2006).

- Clareta (Creasing)

La alteración se caracteriza por la presencia de pequeñas grietas y roturas en la zona del albedo, que se corresponden con áreas de depresión del tejido epidérmico; las zonas no agrietadas crecen con normalidad, pero a modo de bultos sobresaliendo de la corteza, depreciando comercialmente al fruto y haciéndolo muy frágil al manipulado. Las condiciones climáticas, el suelo, períodos de sequía, cosechas elevadas, elevado abonado nitrogenado y el patrón, influyen en la aparición de esta fisiopatía (Agustí, 2000).

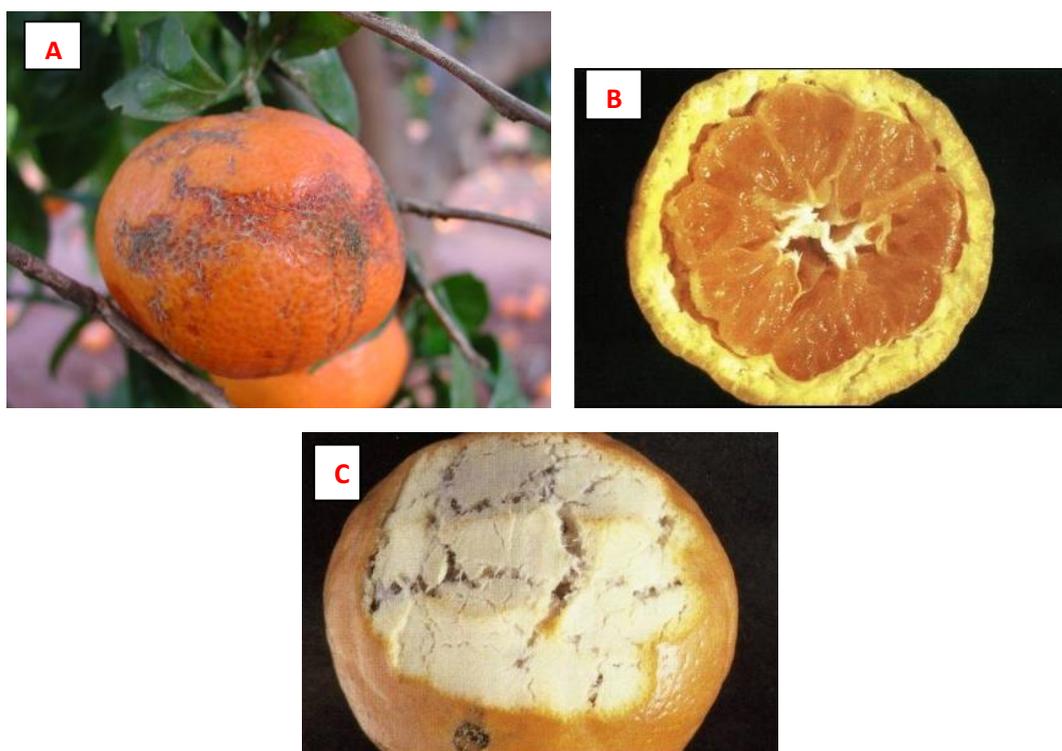


Figura 1.6. Alteraciones fisiológicas más comunes en Mandarinas Clementinas (A: "Pixat"; B: Bufado; C: Clareta). Fuente: IVIA y www.fomesa.net)

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo consiste en preseleccionar nuevas variedades de maduración tardía de una población de 12.000 mutantes obtenidos por irradiación de yemas de mandarina Clemenules. Para ello se definen los siguientes objetivos parciales:

- 1- Determinar las características de maduración interna, porcentaje de zumo, sólidos solubles totales, acidez e índice de madurez, de los mutantes en el mes de Febrero.

- 2- Determinar la presencia de alteraciones fisiológicas relacionadas con la senescencia de la corteza de los mutantes en el mes de Febrero.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

El material vegetal empleado en este trabajo procede de una colección de nuevos genotipos de mandarina Clementina generada mediante mutagénesis física de varetas de mandarina ‘Clemenules’ entre los años 2000 y 2002. Las dosis empleadas fueron de 50 Gy y 75 Gy con el ^{60}Co . El mutágeno empleado en la generación de la colección fue de tipo físico, rayos gamma; empleándose el Cobalto 60 (^{60}Co). Este mutágeno es una radiación ionizante que provoca el reordenamiento cromosómico de todo tipo, deleciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones (Yost, 1954) y tiene una gran capacidad de penetración en los tejidos, característica muy deseable si se trabaja con yemas, que fue el material empleado. Además, tanto los rayos gamma como los neutrones rápidos han sido los más usados en frutales (Walther y Sauer, 1985; Pedrieri y Fasolo, 1989) y son los que han tenido mayor efectividad (Pedrieri, 2001). En el caso de los cítricos, la irradiación aumenta la frecuencia de mutación hasta 300 veces más que la frecuencia de mutación natural (Zhang *et al.*, 1988).

El material irradiado (Año 0) fue previamente trasplantado mediante injerto de chip en un vivero (Año 1), donde se desarrolló la primera generación o M1. Las yemas procedentes de la generación M1 se injertaron en el año 2002, mediante injerto de chapa, en árboles adultos de mandarino ‘Clemenules’ con madera intermedia de naranjo dulce ‘Navelate’ y patrón citrange Carrizo, originando la generación M2. Esta generación M2, fue la que se evaluó en el presente trabajo (Año 2 y siguientes).

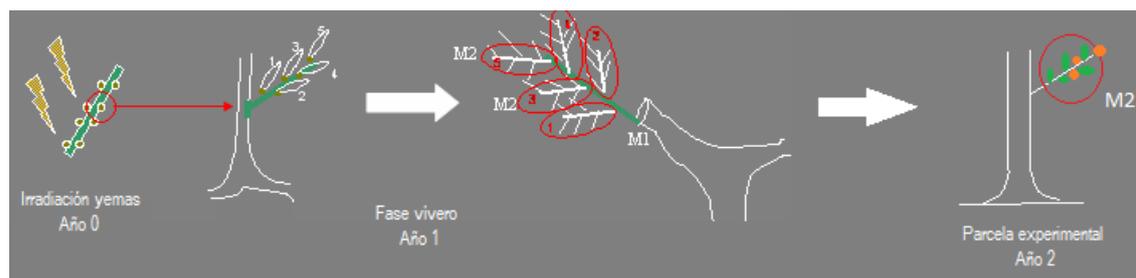


Figura 3.1. Proceso de irradiación e injerto de las estaquillas irradiadas, donde se generaron las generaciones M1 y M2.

La finca donde se realizaron los experimentos se encuentra en Chiva (Valencia), polígono 27, parcela 141, recinto 9 (*Sigpac*). La superficie total de la finca es de 55,38 ha., mientras que la superficie de la parcela estudiada es de 2,79 ha (Figura 3.2). La finca está destinada al cultivo de naranjas del grupo Navel y de mandarino clementino ‘Clemenules’, injertados sobre citrange Carrizo. En cada árbol de mandarino ‘Clemenules’ se sobreinjertaron entre 4 y 6 yemas mutantes (Figura 3.3). Se injertaron un total de 12000 yemas en 1536 árboles.



Figura 3.2. Situación de la parcela muestreada.



Figura 3.3. Sobreinjerto de los mutantes (en cada rama se halla injertado un mutante).

Para la identificación de los mutantes, se utilizó un código de letras, números y colores, para saber su situación dentro de la parcela y del árbol. Así, se designó una letra, o dos, para cada fila de la parcela, desde la A hasta la AE, identificando así la situación dentro de la parcela. A estas letras, le sigue un número, el cual indicaba el número de árbol dentro de la fila a la que hacía referencia la letra. Finalmente, en las ramas, se realizó una marca con pintura en distintos colores, para poder identificar la rama de donde salía el mutante (Figura 3.4).

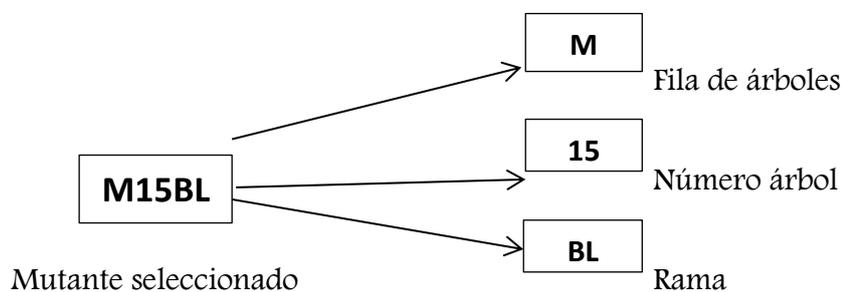


Figura 3.4. Nomenclatura de los mutantes.

Los frutos de mandarina ‘Clemenules’ se muestrearon entre octubre de 2011 y febrero de 2012. En cada fecha de muestreo se recolectaron, al azar, 50 frutos procedentes de 10 árboles. Los frutos de los mandarinos mutantes M2 se muestrearon entre el 8 y el 28 de Febrero del 2012. Solamente se muestrearon aquellos mutantes que tenían una producción mayor de 5 frutos por rama y que, visualmente, reunía las características de la corteza adecuadas para su comercialización. La fruta seleccionada se llevó al laboratorio en una nevera a 4°C hasta su procesamiento.

3.2. Determinación de la calidad del fruto

3.2.1. Características de la corteza

Se determinó la presencia de alteraciones asociadas a la senescencia de la corteza (*pixat*) en una escala cualitativa de incidencia, de 0 a 3, en comparación con la mandarina ‘Clemenules’, a la que se le asignó el máximo valor (3) en el mes de febrero.

- 0: frutos prácticamente exentos de afecciones de la piel o, en todo caso, ligera aparición de defectos en la piel en menos del 5% de su superficie, como se muestra el aspecto externo de la Clementina de Nules en noviembre.
- 1: frutos con ligera aparición de defectos en la piel en menos del 30% de su superficie, como se muestra el aspecto externo de la clementina de Nules en diciembre.
- 2: las alteraciones en la piel ocupan gran parte de la superficie del fruto, como se muestra el aspecto externo de la Clementina de Nules en enero.
- 3: la senescencia de la corteza es manifiesta observándose, además, aparición de pudriciones en los frutos.

Por otra parte, se observó la presencia de otras alteraciones y daños (bufado, pitting, etc) que quedaron reflejados a modo de observación.

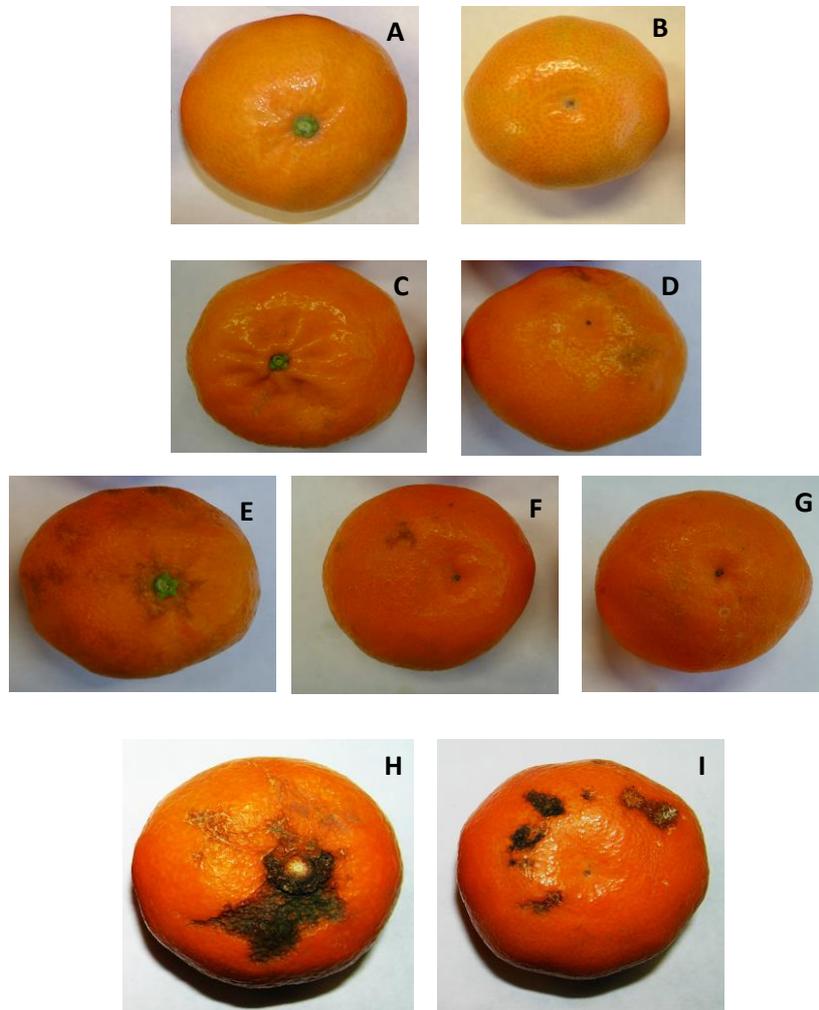


Figura 3.5. Escala cualitativa de incidencia de alteraciones asociadas a la senescencia de la corteza. A-B: nivel 0; C-D: nivel 1; E-G: nivel 2; H-I: nivel 3.

3.2.2. Características de calidad interna

Para la evaluación de la calidad se analizaron los siguientes parámetros:

1. Contenido en zumo: Los frutos se pesaron y su zumo se extrajo mediante un exprimidor rotatorio. El zumo se pesó y se calculó su porcentaje en relación al peso del fruto.
2. Sólidos solubles totales (SST): el contenido en SST se evaluó en cada muestra mediante un refractómetro digital Atago PR1 (Japón) que establece la concentración de azúcares mediante la determinación de su índice de refracción en grados Brix ($^{\circ}$ Brix). Se realizaron dos repeticiones analíticas a temperatura constante (20°C) por cada muestra.
3. Acidez: el contenido en ácidos del fruto se determinó por neutralización de 5 ml de zumo con NaOH 0.1 N, utilizando fenolftaleína como indicador de pH, y se expresó en porcentaje total de ácidos. Para la valoración se utilizó una bureta digital (Bibby Digital Burette) de 50 mL y un agitador mediante imán (P-Selecta Agimatic-E). Se realizaron dos repeticiones analíticas a temperatura constante (20°C) por cada muestra.
4. Índice de madurez (IM): El índice de madurez se calculó como el cociente entre los SST y el porcentaje de acidez.

3.3. Estudio estadístico

El estudio estadístico ha servido para poder seleccionar los mutantes interesantes, considerando interesantes aquellos que en algún o varios valores parámetros, han obtenido valores muy diferentes al resto de mutantes. Para ello se consideraron todos los mutantes como una población y se comprobó que los parámetros que se querían estudiar (°Brix, acidez e IM) seguían una distribución normal. Además, se calcularon todos los parámetros característicos de una distribución normal, como son la media, la moda, la mediana, el coeficiente de asimetría y el coeficiente de Curtosis.

Al conocer en cuantas desviaciones típicas se aparta una observación cualquiera de la media μ , podemos conocer la probabilidad que tiene de ocurrir o el intervalo de confianza. Así, tenemos:

- $P(\mu - \sigma < X \leq \mu + \sigma) = 68,26\%$
- $P(\mu - 2\sigma < X \leq \mu + 2\sigma) = 95,4\%$
- $P(\mu - 3\sigma < X \leq \mu + 3\sigma) = 99,7\%$

Para escoger los mutantes diferentes al resto, se calcularon los intervalos de confianza para el 95%, el 97% y el 99% mediante la fórmula $(\mu \pm z_{\alpha/2} \cdot \sigma)$, utilizando en cada caso como valor $z_{\alpha/2}$ 1,96 para el 95%, 2,17 para el 97% y 2,58 para un intervalo de confianza del 99%. Así se compararon los datos obtenidos en la parte experimental con los diferentes intervalos de confianza, escogiendo aquellos que por exceso o defecto se alejaban de la media de la población, es decir, estaban situados fuera del intervalo de confianza.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evolución de la maduración de la mandarina ‘Clemenules’

4.1.1. Características de la corteza

Los frutos de mandarino ‘Clemenules’ alcanzaron la plena madurez de la corteza a mediados de Diciembre (ICC=12,5). A finales de este mismo mes, los frutos mostraron una tendencia a la pérdida de la consistencia de la corteza, unida en parte a la presencia de bufado en el fruto, y grietas y manchas de color marrón en, aproximadamente, el 30 % de la corteza del fruto, con mayor intensidad en la zona cercana al cáliz. La mandarina ‘Clemenules’ presenta una elevada predisposición genética a mostrar estas alteraciones asociadas al envejecimiento de la corteza, aunque su intensidad es variable y se relaciona con las condiciones ambientales del año, especialmente altas temperaturas y humedad relativa (Agustí *et al.*, 1988). El porcentaje de frutos afectados así como su intensidad se incrementó significativamente en el mes de febrero (datos no mostrados), provocando incluso la abscisión de los frutos más afectados.

4.1.2. Maduración interna

El porcentaje de zumo de los frutos de mandarino ‘Clemenules’ se incrementó significativamente del 46% al 56% desde el 3 de octubre hasta el 8 de noviembre, respectivamente. A partir de ese momento, el porcentaje de zumo disminuyó significativamente hasta el 38% a finales de enero y el 23% a finales de febrero (figura 4.1). Los frutos de mandarina Clementina cuyo porcentaje de zumo en peso es inferior al 40% no se consideran aptos para su comercialización (Agustí, 2000.; DOGV nº 5346), por lo que en las condiciones de este experimento la mandarina ‘Clemenules’ perdió la calidad interna para ser comercializada durante el mes de enero, como ocurre habitualmente con esta mandarina (Agustí *et al.*, 1988). A pesar de que la

mandarina ‘Clemenules’ presenta una elevada predisposición genética a la pérdida de zumo durante su maduración, la velocidad a la que ésta se produce también depende de las condiciones ambientales, especialmente, la elevada temperatura (Agustí *et al.*, 1988).

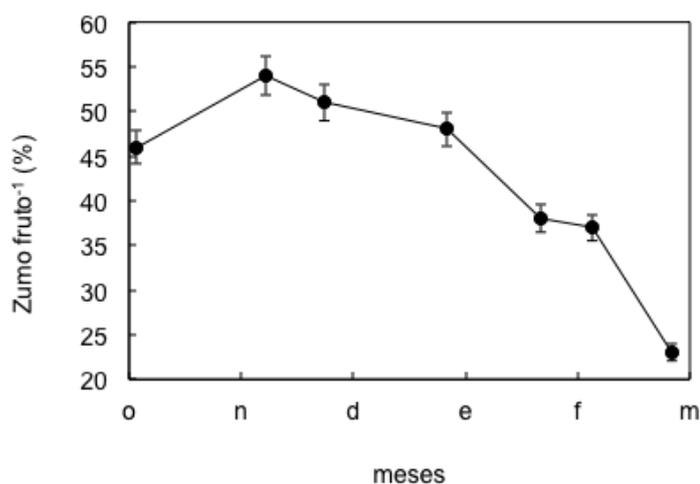


Figura 4.1. Evolución del porcentaje de zumo de la mandarina ‘Clemenules’. Valores expresados como media \pm ES. N = 10.

El contenido en SST se incrementó significativamente de 9,5 a 13,5 °Brix desde el 3 de octubre hasta el 23 de enero, mientras que la acidez se redujo significativamente de 1,95 a 0,73% desde el 3 de octubre hasta el 28 de diciembre (Figuras 4.2 y 4.3).

La pérdida de acidez y de zumo de la mandarina ‘Clemenules’ contrasta con la capacidad de algunos mandarinos híbridos, de maduración tardía, para mantener ambos parámetros en un nivel elevado en el mes de enero (Agustí, 2000). Así, a mediados del mes de enero de la misma campaña, los híbridos Ortanique, Moncada y Nadorcott presentaron una acidez promedio del 1,5%, mientras que el mandarino Fortune 2,2 %, y un porcentaje de zumo promedio del 55 % (IVIA, 2012). Por otra parte, las diferencias en cuanto a la acumulación de SST entre la mandarina ‘Clemenules’ y los mandarinos híbridos no son, en general, tan importantes. Así, a mediados de enero, el mandarino Fortune promedió 13,6 °Brix mientras que

Ortanique y Nadorcott presentaron un valor similar al del mandarino Clemenules de nuestro experimento, esto es, 12,5 °Brix. Tan solo la mandarina Moncada presentó un valor significativamente inferior, 11.2 (IVIA, 2012).

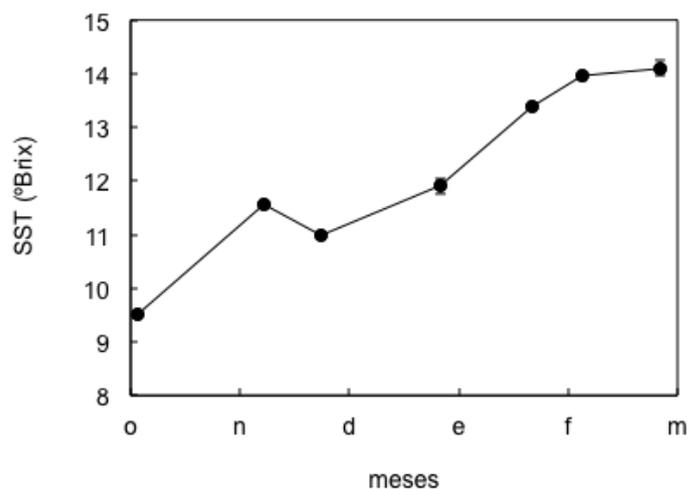


Figura 4.2. Evolución del contenido en SST de la mandarina 'Clemenules'. Valores expresados como media \pm ES. N = 10.

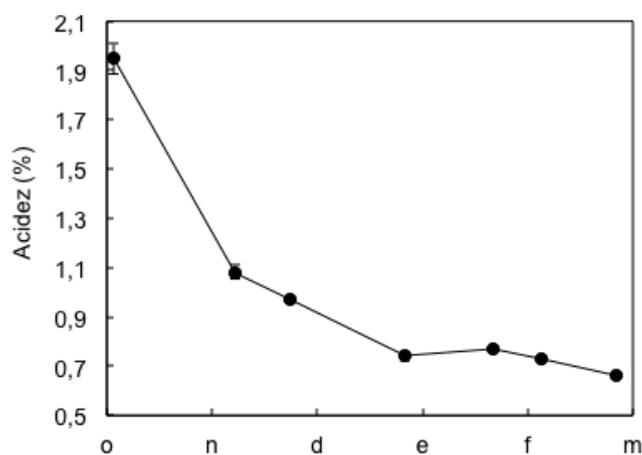


Figura 4.3. Evolución del porcentaje de acidez de la mandarina 'Clemenules'. Valores expresados como media \pm ES. N = 10.

Finalmente, el índice de madurez aumentó desde 5 a 21 como consecuencia del aumento de los SST (E) y el descenso de la acidez (A) (Figura 4.4).

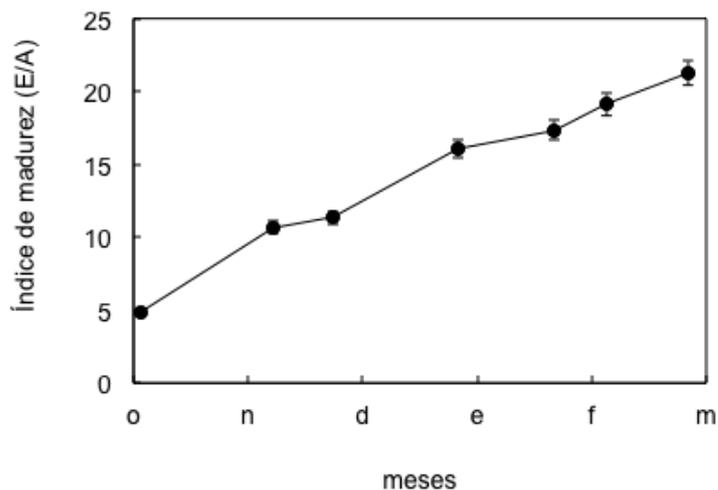


Figura 4.4. Evolución del índice de madurez de la mandarina 'Clemenules'. Valores expresados como media \pm ES. N = 10.

4.2. Características de maduración de la población mutante en Febrero

4.2.1. Características de la corteza

De los 12.000 mutantes injertados, algunos mostraron frutos con mutaciones extravagantes (datos no mostrados), otros no mostraron frutos y otros mostraron un nivel de senescencia de la corteza similar o mayor al de la mandarina 'Clemenules', cultivada en las mismas condiciones ambientales. Así, solamente 431 mutantes (3,6 %) fueron considerados para el estudio de la maduración interna, por presentar una corteza con mejores características que la corteza de la mandarina 'Clemenules' en el mes de febrero. En la tabla 4.1 se presentan la incidencia de *pixat* de los 26 mutantes más interesantes preseleccionados en este estudio.

Tabla 4.1. Incidencia de *pixat* de mutantes de mandarina ‘Clemenules’ en el mes de febrero. *Escala de incidencia (0: frutos prácticamente exentos de afecciones de la piel o, en todo caso, ligera aparición de defectos en la piel en menos del 5% de su superficie, como se muestra el aspecto externo de la Clementina de Nules en noviembre. 1: frutos con ligera aparición de defectos en la piel en menos del 30% de su superficie, como se muestra el aspecto externo de la clementina de Nules en diciembre. 2: las alteraciones en la piel ocupan gran parte de la superficie del fruto, como se muestra el aspecto externo de la Clementina de Nules en enero. 3: la senescencia de la corteza es manifiesta observándose, además, aparición de pudriciones en los frutos).*

MUTANTE	Incidencia de <i>PIXAT</i>	FOTO
A03RO	0	
A14VE	0	
A22MO	0	
A31BL	0	
A45AM	0	
A52BL	0	

A69AM	0	
C03BL	0	
D04FU	0	
D04RO	0	
D04VI	0	
A05RO	1	
A22AM	1	
A28RO	1	
A29RO	1	

A36AZ	1	
A55BL	1	
A64BL	1	
B02RO	1	
T33AZ	1	
A07BL	2	
A28VE	2	
A58RO	2	
A62VE	2	

E03AM	2	
P05AM	2	
S23AM	2	
W09RO	2	
A11BL	3	
A30RO	3	
Q23RO	3	
W03AM	3	

De los 26 mutantes preseleccionados, 11 mostraron *pixat*, aunque algunos en menor incidencia que la 'Clemenules', y 15 mostraron un nivel muy bajo de *pixat* o nulo (Tabla 4.1). De entre éstos, destacaron por el buen aspecto de su corteza los mutantes A45AM, A03RO, A22AM, A69AM, C03BL y A05RO. Además, el mutante A69AM destacó por el color amarillento de su exocarpo, debido, probablemente, a una modificación en la ruta de síntesis de carotenoides (Figura 4.5.). El color del exocarpo de A69AM es similar al del naranjo dulce 'Pinalate', mutante natural de naranjo dulce 'Navelate', caracterizado por presentar un incremento significativo de los carotenoides incoloros fitoeno y fitoflueno en estados de madurez avanzados (Rodrigo *et al.*, 2003). La calidad del exocarpo del mutante A69AM, en relación a la ausencia de *pixat* y el color del fruto, presenta características similares al mutante 'Neufina' obtenido por irradiación de mandarina Clemenules y descrito con anterioridad (García-Ballester *et al.*, 2010).



Figura 4.5. Aspecto externo de frutos de mandarina 'Clemenules' (A-C) y de los mutantes A03RO (D-F) y A69AM (G-I) de mandarina 'Clemenules' mostrando el color de su exocarpo y la ausencia de senescencia de la corteza (pixat) en el mes de febrero.

4.2.2. Maduración interna

La población de mutantes atendiendo al contenido en zumo del fruto en el mes de febrero sigue una distribución normal, simétrica (coeficiente de asimetría de $-0,05$), con mediana $29,6$ (%), moda $29,6$ (%) y coeficiente de curtosis $0,35$, que al ser mayor que 0 podemos decir que la distribución es leptocúrtica. El valor promedio de la población fue de $29,5 \pm 14,37$, con un nivel de confianza del 95% (Figura 4.6). En comparación, los frutos de mandarina ‘Clemenules’ presentaron un 37% de zumo el 6 de febrero y un 23% de zumo el 26 de febrero (figura 4.1).

De los 431 mutantes, 12 mostraron un porcentaje de zumo significativamente menor a la media de la población, entre el $0,4\%$ y el $14,8\%$ de zumo. Por otra parte, y lo que resulta de mayor interés, 7 de los mutantes mostraron un valor significativamente mayor a la media de la población, entre $44,4\%$ y 61% (tabla 4.2). Tres de los 7 mutantes con un porcentaje de zumo mayor a la media de la población, A45AM ($46,7\%$), A31BL ($47,3\%$) y A14VE (54%), presentaron además un buen aspecto de la corteza sin *pixat*. Los otros 4, sin embargo, presentaron *pixat* y bufado.

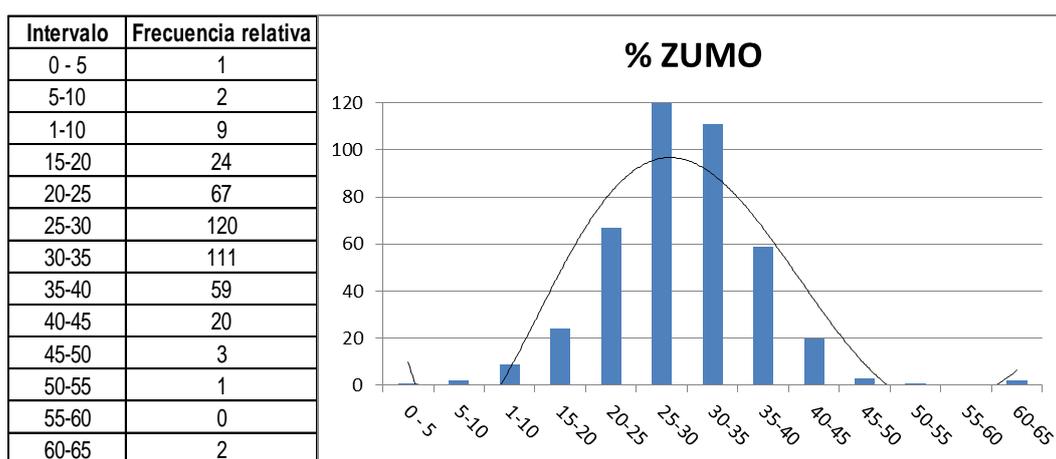


Figura 4.6. Distribución de frecuencias en la población de mandarineros clementinos mutantes según el contenido de zumo de sus frutos. La población está formada por 431 mutantes de los que se analizaron todos sus frutos (entre 5 y 8) en el mes de febrero.

Tabla 4.2. Mutantes de mandarino ‘Clemenules’ que difirieron significativamente, por defecto (azul) o por exceso (verde), de la media de la población según el contenido de zumo de sus frutos. (*: $P > 95\%$; **: $P > 97\%$; ***: $P > 99\%$).

Mutante	Zumo (%)	Diferencia respecto media
A17VE	0,4	-29,1***
B02AM	7,0	-22,5***
B02RO	8,8	-20,7***
A02AM	11,6	-17,9**
B02GR	12,0	-17,5**
A07VE	12,3	-17,2**
B02VE	12,7	-16,8**
A45AZ	13,1	-16,4**
C08RO	14,6	-14,9*
D05FU	14,7	-14,8*
A02NE	14,7	-14,8*
D08AZ	14,8	-14,7*
P05AM	44,4	14,9*
Q23RO	46,4	16,9**
A45AM	46,7	17,2**
A31BL	47,3	17,8**
A14VE	54,9	25,4***
A11BL	60,2	30,7***
A62VE	61,0	31,5***
Media	29,5	-

La población de mutantes atendiendo al contenido en SST sigue una distribución normal, simétrica (coeficiente de asimetría de 0,005), con mediana 14,48 °Brix, moda 15,4 ° Brix y coeficiente de curtosis -0,4, que al ser menor que 0 podemos decir que la distribución es platicúrtica (figura 4.7). El valor medio de la población fue $14,43 \pm 3,36$ °Brix con un nivel de confianza del 95%. Los frutos de mandarina ‘Clemenules’ presentaron un valor de SST prácticamente constante durante todo el mes de febrero, 13,95 el 6 de febrero y un 14,1 el 26 de febrero (figura 4.2). En las variedades tempranas y de media campaña, como la mandarina ‘Clemenules’ el contenido en azúcares aumenta rápidamente a medida que el fruto madura, fundamentalmente por la acumulación de sacarosa. En las variedades tardías, la maduración se da cuando la temperatura empieza a elevarse, pero el contenido en sacarosa se modifica relativamente poco (Agustí, 2000). Es por esta razón, que el valor alcanzado de SST por los mutantes en estudio en el mes de febrero puede considerarse, prácticamente, como su valor máximo final. De los 431 mutantes estudiados, 5 presentaron un valor de SST significativamente menor al de la media de la población, oscilando entre 9,4° Brix y 10,9° Brix. Por otra parte, 10 mutantes presentaron un valor significativamente mayor a la media de la población, oscilando entre 18° Brix y 19,5° Brix (tabla 4.3). Estos valores se muestran llamativamente altos en comparación con la acumulación de SST habitual en las mandarinas, bien Clementinas, bien de origen híbrido.

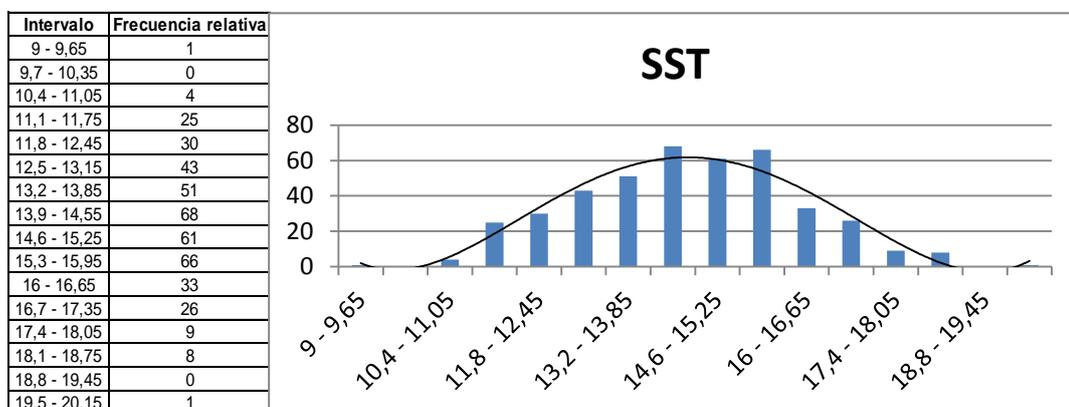


Figura 4.7. Distribución de frecuencias en la población de mutantes de mandarina ‘Clemenules’ según los SST del zumo de sus frutos. La población está formada por 431 mutantes de los que se analizaron todos sus frutos (entre 5 y 8) en el mes de febrero.

Tabla 4.3. Mutantes de mandarina ‘Clemenules’ que difirieron significativamente, por defecto (azul) o por exceso (verde), de la media de la población según los SST del zumo de sus frutos. (*: $P > 95\%$; **: $P > 97\%$; ***: $P > 99\%$).

Mutante	SST (°Brix)	Diferencia respecto media
B02RO	9,4	-5,03***
A55BL	10,45	-3,98**
A52BL	10,75	-3,68*
A07BL	10,95	-3,48*
A03RO	10,9	-3,53*
A22MO	18	3,57*
D06RO	18,1	3,67*
T33AZ	18,1	3,67*
A36AZ	18,1	3,67*
D05AM	18,15	3,72**
W09RO	18,15	3,72**
D03AZ	18,2	3,77**
P01AM	18,2	3,77**
A28BL	18,65	4,22**
W03AM	19,5	5,07***
Media	14,43	-

La población de mutantes atendiendo a la acidez de su zumo sigue una distribución normal, con asimetría positiva (coeficiente de asimetría de 1,84), con mediana 0,44 (%), moda 0,403 (%) y coeficiente de curtosis 7,4, que al ser mayor que 0 podemos decir que la distribución es leptocúrtica (figura 4.8). El valor de la población fue de $0,46 \pm 0,24$ con un nivel de confianza del 95%. En este caso, no se encontraron mutantes que mostraran una acidez significativamente menor a la de la media de la población. Sin embargo, 19 de los 431 mutantes presentaron una acidez significativamente mayor a la de la media de la población, oscilando entre 0,71 y 1,25 % (tabla 4.4). Los frutos de mandarina ‘Clemenules’ presentaron un porcentaje de acidez de 0,71 a 0,66 entre principios y finales de febrero, respectivamente (figura 4.3). De entre los mutantes, destacan los 4 que presentaron un valor de acidez por encima de 0,9 %, D04RO, A69AM, D04VI y A36AZ, que también destacaron por el buen aspecto de su corteza y la ausencia de *pixat*, y no difirieron significativamente del valor promedio de la población de porcentaje de zumo del fruto (tabla 4.2).

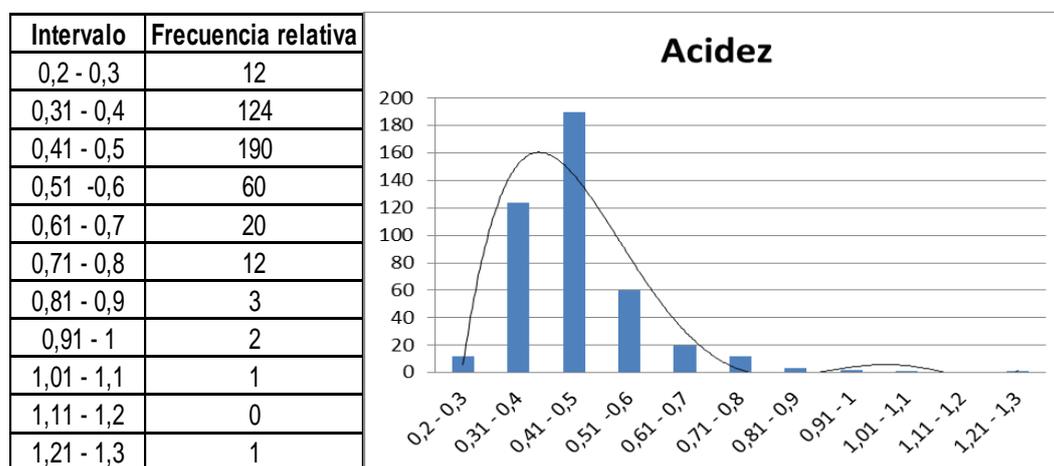


Figura 4.8. Distribución de frecuencias en la población de mutantes de mandarina ‘Clemenules’ según la acidez del zumo de sus frutos. La población está formada por 431 mutantes de los que se analizaron todos sus frutos (entre 5 y 8) en el mes de febrero.

Tabla 4.4. Mutantes de mandarino ‘Clemenules’ que difirieron significativamente por exceso de la media de la población según la acidez del zumo de sus frutos. (*: $P > 95\%$; **: $P > 97\%$; ***: $P > 99\%$).

Mutante	Valor Acidez	Diferencia respecto media
A22AM	0,71	0,25*
W03AM	0,73	0,27**
A58RO	0,73	0,27**
S23AM	0,73	0,27**
W09RO	0,74	0,28**
A28VE	0,75	0,29**
A30RO	0,76	0,30**
P05AM	0,78	0,32***
A64BL	0,78	0,32***
A29RO	0,78	0,32***
A28RO	0,78	0,32***
E03AM	0,80	0,34***
T33AZ	0,83	0,37***
D04FU	0,86	0,40***
D04VI	0,90	0,44***
A36AZ	0,91	0,45***
D04RO	0,98	0,52***
A69AM	1,07	0,61***
A22MO	1,25	0,79***
Media	0,46	-

La población de mutantes atendiendo al índice de madurez del zumo del fruto sigue una distribución normal, simétrica (coeficiente de asimetría de $-0,05$), con mediana $32,31$, moda $29,02$ y coeficiente de curtosis $0,35$, que al ser mayor que 0 podemos decir que la distribución es leptocúrtica (figura 4.9). El valor medio para el índice de madurez en la población es $32,42 \pm 11,3$ con un nivel de confianza del 95% . En comparación, los frutos de mandarina ‘Clemenules’ presentaron un índice de madurez menor, oscilando entre 19 y 21 desde el 6 de febrero hasta el 26 de febrero (figura 4.4). De los 431 mutantes, 15 mostraron un índice de madurez significativamente menor al de la media de la población, cuyos valores oscilaron entre $14,4$ y $20,8$ (tabla 4.5).

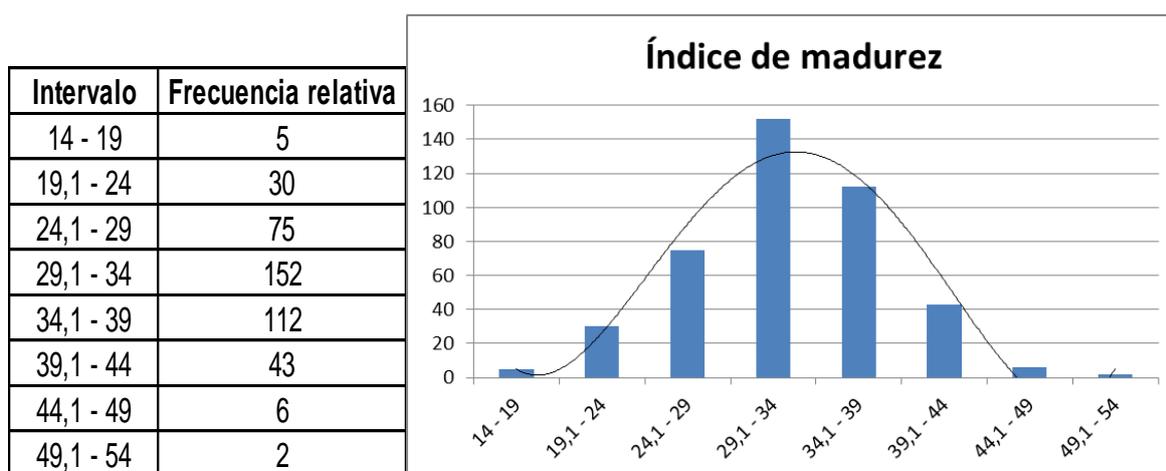


Figura 4.9. Distribución de frecuencias en la población de mutantes de mandarina ‘Clemenules’ según el índice de madurez del zumo de sus frutos. La población está formada por 431 mutantes de los que se analizaron todos sus frutos (entre 5 y 8) en el mes de febrero.

Tabla 4.5. Mutantes de mandarino ‘Clemenules’ que difirieron significativamente, por defecto (azul) o por exceso (verde), de la media de la población según el índice de madurez del zumo de sus frutos. (*: $P > 95\%$; **: $P > 97\%$; ***: $P > 99\%$).

Mutante	Valor Índice Madurez	Diferencia respecto media
A22MO	14,42	-18,00***
A69AM	15,75	-16,67***
S23AM	17,82	-14,60**
D04RO	18,03	-14,39**
A58RO	19,03	13,39**
D04VI	19,32	-13,10**
A64BL	19,39	-13,03**
A03RO	19,49	-12,93**
A30RO	19,91	-12,51**
P05AM	19,98	-12,44*
A36AZ	19,99	-12,43*
D04FU	20,09	-12,33*
E03AM	20,65	-11,77*
C03BL	20,74	-11,68*
A05RO	20,78	-11,64*
B03AM	45,62	13,20**
B02AZ	45,70	13,28**
A10RO	46,41	13,99**
B02GR	46,88	14,46**
B02VE	47,23	14,81**
A20AZ	48,49	16,07***
A36NE	49,59	17,17***
B02AM	52,22	19,80***
Media	32,42	-

4.3. Preselección de posibles mutantes con características de mandarino

Clementino tardío

En este trabajo, se pretende encontrar mutantes de mandarino con maduración tardía, es decir, con maduración retrasada respecto a la mandarina ‘Clemenules’, variedad de referencia. Las características que debe reunir un mutante con maduración retrasada en la época de muestreo, febrero, son una acidez elevada ($\cong 1\%$) y un bajo o medio contenido en azúcares ($^{\circ}\text{Brix}$) que le permita mantener una buena relación azúcares-ácidos, un alto contenido en zumo ($> 40\%$) y no presentar alteraciones fisiológicas de la corteza, fundamentalmente *pixat*. La tabla 4.6 destaca las características de los mutantes más interesantes. Al estar todos ellos bajo las mismas condiciones ambientales, los resultados obtenidos podrían atribuirse a diferencias genéticas originadas por la irradiación. Sin embargo, aunque de cada mutante se analizó la totalidad de la población, el escaso número de frutos estudiados (6-8) y el disponer únicamente de datos de un año, obliga a entender estos resultados como una preselección fenotípica que debería ser estudiada con mayor profundidad, sobreinjertando los mutantes en otras zonas de cultivo para obtener, de este modo, una población mayor. No obstante, la caracterización sí que sirve, al menos, para descartar un gran número de genotipos de características indeseables.

La mejora de las mandarinas Clementinas por irradiación de la mandarina ‘Clemenules’ ha permitido obtener, en los últimos años, algunos genotipos interesantes. En concreto, la variedad ‘Nero’, obtenida en 2006, es autoincompatible y presenta menos de 2 semillas, en promedio, en condiciones de polinización cruzada. Nero presenta esterilidad gamética masculina y femenina debido a una delección de 2MB en el cromosoma 3 (Terol *et al.*, 2013). Esta variedad, sin embargo, madura con anterioridad a la mandarina ‘Clemenules’, octubre-noviembre, época en la que existe un exceso de oferta de mandarinas clementinas. Por otra parte, de momento, no se ha

conseguido obtener una mandarina clementina tardía que mejore significativamente las existentes. Así, la mandarina ‘Clemenverd’, obtenida en 2006, retrasa la coloración del exocarpo entre 15 y 30 días en comparación con la mandarina ‘Clemenules’ aunque su maduración interna es similar, reduciendo significativamente su calidad organoléptica por un descenso en la acidez del zumo. ‘Clemenverd’ presenta unas características semejantes a la mandarina ‘Hernandina’, sin mejorarla significativamente (López-García *et al.*, 2010). Finalmente, la mandarina ‘Neufina’, obtenida en 2009, se caracteriza por presentar un mejor comportamiento de la piel en el árbol que la mandarina ‘Clemenules’ manteniendo, a su vez, un adecuado porcentaje de zumo (>40%). Por ello, aunque no se conocen datos en condiciones de cultivo, su recolección podría ampliarse a finales de febrero. Sin embargo, la mandarina ‘Neufina’ también presenta una rápida caída del porcentaje de acidez que reduce su calidad organoléptica (López-García *et al.*, 2010).

A la vista de todo ello, la obtención de una mandarina clementina que mantenga la acidez en el mes de febrero presenta un elevado interés. En la evaluación realizada en el presente trabajo, 19 mutantes (A22AM, A22MO, A28RO, A28VE, A29RO, A30RO, A36AZ, A58RO, A64BL, A69AM, D04FU, D04RO, D04VI, E03AM, P05AM, S23AM, T33AZ, W03AM y W09RO) presentaron una acidez significativamente mayor a la media de la población (0,46%) pero no todos superaron la acidez de la mandarina ‘Clemenules’ (0,66%). Entre ellos, destacan tres: 1) A36AZ (0,91%), por presentar un buen aspecto de la piel y un porcentaje de zumo mayor al 40%; 2) A22MO (1,25%), aunque éste presentó un porcentaje de zumo bajo (33,5%) y bufado; 3) D04RO destacó por su alta acidez (0,98%), por su alto contenido en zumo (42,5%) y por su bajo índice de madurez (18,06). Sin embargo, pese a no presentar *pixat*, la corteza mostró bufado y escasa consistencia. Finalmente, el mutante A69AM se caracterizó por diferir en numerosos caracteres del resto de la población. Sus frutos presentaron un

exocarpo de excelentes condiciones (ausencia de *pixat*, buena consistencia de la corteza) y de color amarillo. Internamente, su acidez y contenido en zumo fueron significativamente mayor a la media, 1,07% y 42,1%, respectivamente, y su índice de madurez fue significativamente menor a la media (15,75). Pero los frutos, además, mostraron un calibre muy pequeño (~40 mm).

En conclusión, se han preseleccionado 26 mutantes por presentar alguna característica de interés como mandarina clementina tardía. Con el fin de confirmar las características de madurez de sus frutos, así como su comportamiento agronómico en condiciones de campo, resulta necesario sobreinjertar las yemas de estos mutantes formando plantaciones en diferentes zonas de cultivo.

Tabla 4.6. Mutantes preseleccionados y sus características. En rojo se muestran los parámetros por los que destacan. (*: nivel significación 95%; **: nivel significación 97%; ***: nivel significación 99%).

	<i>Pixat</i>	Zumo (%)	STT (°Brix)	Acidez (%)	Índice madurez
‘Clemenules’	3	37-23	13,9-14,1	0,73-0,66	19,1-21,3
Media población de mutantes	-	29,5	14,43	0,46	32,42
A03RO	0	23,9	10,9*	0,56	19,46**
A05RO	1	35,4	11,45	0,55	20,78*
A07BL	2	40,9	10,95*	0,41	26,7
A11BL	3	60,2***	15,7	0,42	37
A14VE	0	54,9**	15,35	0,39	39,45
A22AM	1	38,8	17,15	0,71*	24,15
A22MO	0	33,5	18	1,25***	15,75***
A28RO	1	35,7	17,7	0,78***	22,56
A28VE	2	29,9	17,6	0,75**	23,54
A29RO	1	34,5	17,65	0,78***	22,51
A30RO	3	40,6	15,2	0,76**	19,1***
A31BL	0	47,3**	11,45	0,55	20,78
A36AZ	1	42,1	18,1	0,91***	19,9*
A45AM	0	46,7**	11,85	0,5	23,74
A52BL	0	31,8	10,75*	0,4	26,87
A55BL	1	24,5	10,45**	0,29	36,03
A58RO	2	31,6	13,9	0,73**	19,04**
A62VE	2	61,0***	13,55	0,5	26,87
A64BL	1	32,2	15,05	0,78***	19,29**
A69AM	0	42,1	16,85	1,07***	15,75***
B02RO	1	8,8	9,4***	0,25	37,6
C03BL	0	34,2	13,1	0,63	20,74*
D04FU	0	38,3	17,2	0,86***	20,09*
D04RO	0	42,5	17,7	0,98***	18,03**
D04VI	0	39,1	17,45	0,90***	19,32**
E03AM	2	38,1	16,6	0,80***	20,65*
P05AM	2	44,4	15,5	0,78***	19,87*
Q23RO	3	46,4**	13,55	0,58	23,24
S23AM	2	39,1	13,00	0,73**	17,8**
T33AZ	1	35,1	18,10	0,83***	21,69
W03AM	3	40,8	19,5	0,73**	26,84
W09RO	2	29,4	18,15	0,74**	24,52



Figura 4.10. Aspecto externo e interno de los mutantes A22MO (A-C), A45AM (D-F), A69AM (G-I) y D04RO (J-L) de mandarina 'Clemenules' mostrando el color de su exocarpo y la ausencia de senescencia de la corteza (*pixat*) en el mes de febrero.

5. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos en este TFM se concluye:

1. De las 12.000 yemas de mandarina 'Clemenules' irradiadas e injertadas, 431(3,6 %) formaron frutos cuya corteza presentó mejores condiciones que la mandarina 'Clemenules' en el mes de febrero. De éstos, 22 (0.18%) formaron frutos con una incidencia de *pixat* menor al de la 'Clemenules'.
2. De los 431 mutantes estudiados, 7 presentaron un contenido de zumo significativamente mayor al 40% y 6 presentaron un porcentaje de acidez significativamente mayor al 0,7%, mejorando de este modo las características de la mandarina 'Clemenules' en el mes de febrero.
3. Se preseleccionaron 26 mutantes por presentar alguna característica de interés como mandarina clementina tardía. Ninguno de éstos mutantes reunió todas las características deseadas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Agustí, M. 2000. *Citricultura*. Ed. Mundi Prensa. Madrid, España.
- Agustí, M., Almela, V. y Guardiola, J.L. 1988. *Aplicación de ácido giberélico para el control de alteraciones de la corteza de las mandarinas asociadas a la maduración*. Invest. Agr. Prod. Prot. Veg., 3: 125-137.
- Bain, J.M. 1958. "Morphological, anatomical and physiological changes in the developing fruit of the Valencia orange, *Citrus sinensis* L". Australian Jour. Bot. 6:1-24.
- Bové, J.M. 2006. "Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus". Journal of Plant Pathology. Vol. 88, no. 1, pp. 7-37.
- Cutore, L., Licata, R., Parrini, F. y Sardo, V. 1988. *Effects of soil heating on 'Navelina' orange*. Proc. 6th Int. Citrus Congress, 2: 723-729.
- Davies, F. y Albrigo, L. 1994. *Citrus*. CAB International, Wallingford, UK.
- Erickson, L.C. 1968. "The general physiology of citrus". In, Reuther et al. The citrus industry. University of California, Oakland. pp.86-126.
- Gambetta, G. 2009. *Control endógeno y exógeno de la maduración externa de los frutos cítricos*. Tesis Doctoral Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.
- González-Sicilia, E. 1968. *El cultivo de los agrios*. Ed. Bello, Valencia, España.
- Huff, A. 1983. "Nutritional control of regreening and degreening in citrus peel segments". Plant Physiol., 73: 243-249.
- Huff, A. 1984. "Sugar regulation of plastid interconversions in epicarp of citrus fruit". Plant Physiol., 76: 307-312.
- Ibáñez Gonzalez, V. 2011. *Selección y caracterización de mutantes de clementina. Cambios del transcriptoma asociados a la maduración del fruto de los cítricos y análisis de la expresión del gen fosfoenolpiruvato carboxiquinasa*. Tesis doctoral Universidad Politécnica Valencia. Valencia, España.
- IVIA. 2012. *Seguimiento del control de la maduración de cítricos 2012-2013*. Servicio de desarrollo tecnológico. Página web IVIA.

- Koch, K.E. 1984. "*Translocation of photosynthetic products from source leaves to aligned juice segments in citrus fruits*". HortScience 19:260-261.
- López-García, A., Muñoz, J.V., Boix, A., Iglesias, D., Talón, M. 2010. *Obtención de nuevas variedades de clementinas mediante irradiación*. IX Congrés citrícola l'Horta Sud. 21-22 Octubre 2010. Picassent, Valencia, España.
- Moreno, P., Ambros, S., Biach-Martí, M.R., Guerri, J. y Pena, L. 2008. "*Plant diseases that changed the world - Citrus tristeza virus : a pathogen that changed the course of the citrus industry*". Molecular Plant Pathology. Vol. 9, no. 2, pp. 251-268.
- Navarro, L. 2005. "*Necesidades y problemáticas de la mejora sanitaria y genética de los cítricos en España*". Phytoma. 170: 2-5.
- Nii, N., Harada, K. y Kadowaki, K. 1970. *Effects of temperature on the fruit growth and quality of Satsuma oranges*. Japan Soc. Hortic. Sci., 39: 309-317.
- Pardo, J. y Zaragoza, S. 2010. *Nuevas variedades de mandarinas tardías irradiadas*. IX Congrés citrícola l'Horta Sud. 21-22 Octubre 2010. Picassent, Valencia, España.
- Pedrieri, S. y Fasolo, F. 1989. "*High-frequency shoot regeneration from leaves of the apple rootstock M26 (Malus pumila Mill)*". Plant Cell Tiss. Org. Cult. 17: 133-142.
- Pedrieri, S. 2001. "*Mutation induction and tissue culture in improving fruits*". Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64:185-210.
- Pensabene, G. 2009. *Aplicación de la hibridación somática a la mejora de la citricultura española*. Tesis doctoral Universidad Politécnica Valencia. Valencia, España.
- Reuther, W. 1973. *Climate and citrus behavior*. En: *The citrus industry*, Vol. III. Univ. California, Div. Agricultural Science, Berkeley, USA, pp 280-337.
- Reuther, W., y Rios-Castaño, D. 1969. "*Comparison of growth, maturation and composition of citrus fruits in subtropical California and tropical Colombia*". Proc. 1st Int. Citrus Symp., 1: 277-300.

Rodrigo, MJ., Marcos, JF., Alférez, F., Mallent, MD., Zacarías, L. 2003. *Characterization of Pinalate, a novel Citrus sinensis mutant with a fruit-specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content*. J. Exp. Bot. 54, 727-738.

Sansaloni, E. 2001. *Evaluación de los parámetros de maduración de una colección de mutantes de naranja navel (Citrus sinensis L. Osbeck)*. Trabajo final de carrera Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.

Sinclair, WB. y Ramsey, RC. 1944. "*Changes in the organic acid content of Valencia oranges during development*". Bot. Gaz. 106: 140-148.

Sinclair WB., Bartholomew, ET. Y Ramsey RC. 1945. "*Analysis of the organic acids of orange juice. Plant Physiology*". 20: 3-18.

Sites, J.W. y Reitz, H.J. 1950. "*The variation in individual Valencia oranges from different locations of the trees as a guide to sampling and spot-picking for quality. Part I. Titratable acid and soluble solids / titratable acid ratio of the juice*". Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 55: 73-88.

Soler, G. 2009. *Cambios en la expresión génica asociados a la maduración interna del fruto de los cítricos: identificación de rutas metabólicas implicadas en la acumulación y eliminación de ácidos*. Tesis doctoral Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.

Soler, J. y Soler, G. 2006. *Cítricos: Variedades y técnicas de cultivo*. Fundación Ruralcaja. Ed. Mundi Prensa. Madrid, España.

Terol, J., Licciardello, C., Ibáñez, V., Hueso, L., Carbonell, J., Alonso, R., Conesa, A., Dopazo, J., Talón, M. .2013. *Genomic Analysis Of Two Early Clementine Varieties, Derived From Spontaneous and Induced Mutations, Reveals a Common 2MB Deletion On Chromosome 3*. In XXI Plant and animal Genome congress, abstract, 12-16 2013, San Diego, EEUU.

Walther, F. y Sauer, A. 1985. "*Analysis of radiosensitivity: a basic requirement for in vitro somatic mutagenesis. I. Prunus avium L*". Acta Hort. 169:97-104.

Yamanishi, O. 1994. "*Effect of spring day/night temperatures on flower development. Fruit set and fruit quality on strangulated pummelo trees*". Japan Soc. Hortic. Sci., 63: 493-504.

Yost, HT., Cummings, J. y Blakeslee, AF. 1954. "*The effects of fastneutron radiation from a nuclear detonation on chromosome aberration in datura*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Jun. 40: 447-51.

Zhang, WC., Shao, ZY., Lo, JH., Deng, CH., Deng, SS. y Wang, F. 1988. "*Investigation and utilization of citrus varietal resources in China*". In: Proc. 6th Int. Citrus Cong., 1: 291-4.