

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



SENSIBILIDAD AL 'CREASING' DE LAS NUEVAS VARIETADES DE NARANJO NAVEL. INFLUENCIA DEL PATRÓN Y LAS CONDICIONES AMBIENTALES

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERIA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO RURAL

ALUMNA: MARÍA NAVARRO CONSUELO

TUTOR: CARLOS MESEJO CONEJOS

Curso Académico: 2014/2015

VALENCIA, 1 DE SEPTIEMBRE DE 2015

RESUMEN:

El *creasing* o *clareta* de los cítricos es un desorden fisiológico caracterizado por la presencia de depresiones en el exocarpo correspondientes con adelgazamientos y/o rupturas del mesocarpo subyacente; las zonas sanas de la corteza se desarrollan con normalidad. Como consecuencia de todo ello, la corteza presenta bultos y zonas sensibles al manipulado que deprecian la calidad del fruto. El inicio de la alteración se localiza en las primeras fases del desarrollo del fruto, aunque no se ha determinado con precisión. Tampoco se conoce con precisión la razón por la cual se origina; la degradación enzimática de las pectinas de la lámina media o una incapacidad para su síntesis se han sugerido como posibles causas. La intensidad del '*creasing*' varía entre años, entre parcelas, y entre árboles, lo que indica la existencia de factores exógenos, (ambientales y culturales) y endógenos envueltos en su manifestación: variaciones de la humedad, el patrón, la posición del fruto en el árbol, factores nutricionales (el calcio) y factores hormonales (giberelinas, poliaminas y etileno) se han relacionado de algún modo con la intensidad del *creasing*. Entre ellos, la variedad resulta decisiva en el porcentaje de frutos afectados. Las naranjas del grupo Navel son sensibles a la alteración, con especial incidencia en las variedades 'Navelina' y 'Washington navel'. Se desconoce, sin embargo, la incidencia que presentan las nuevas variedades de reciente introducción en España procedentes de mutaciones de 'Washington navel' en Australia.

Por ello, los objetivos de este trabajo son 1) determinar la sensibilidad al '*creasing*' de las variedades de naranja navel 'Barnfield Late', 'Chislett Summer', 'Lane Late', 'Powell Summer' y 'Rohde Summer', y diferencias histológicas relacionadas con la alteración, y 2) relacionar el patrón y las condiciones ambientales durante la floración con la intensidad de la alteración.

Los experimentos se llevaron a cabo en una parcela experimental de la Conselleria de Agricultura, situada en Lliria (Valencia). Las cinco variedades de naranja dulce navel se encuentran injertadas sobre los patrones 'citrange Carrizo', 'citrange C35', mandarino 'Cleopatra' y 'Forner-Alcaide nº5', con un total de 14 árboles por combinación repartidos en 4 bloques al azar.

Las conclusiones de este trabajo son:

- La variedad de naranja dulce 'Rodhe Summer' presenta el mayor porcentaje de frutos afectados de *creasing* mientras que 'Chislett' presenta el menor. 'Barnfield', 'Powell' y 'Lanelate' presentan un porcentaje de afección intermedio.

- Las células del mesocarpo de ‘Rodhe Summer’ presentan menos amiloplastos que las de ‘Chislett’ y no difieren en el grosor de la pared celular entre los estados fenológicos flor cerrada-caída de pétalos.
- Los árboles injertados sobre ‘citrange Carrizo’ presentan menor porcentaje de frutos con *creasing* que los injertados en ‘citrange C-35’, mandarino ‘Cleopatra’ y ‘Forner-Alcaide-5’.
- El año con mayor intensidad de *creasing* presentó una primavera más húmeda y más fría durante la floración y hasta la caída fisiológica de frutos.

María Navarro Consuelo.
Valencia, Septiembre de 2015.

Palabras clave:

- Alteraciones fisiológicas
- Calidad del fruto
- Cítricos
- Pared celular

ABSTRACT:

Creasing is a physiological disorder of *Citrus* fruit rind that occurs as the fruit reaches maturity and is characterized by irregular grooves running over the surface of the fruit. These grooves are caused by gaps in the inner, spongy portion of the albedo and the sinking of the overlying layer (flavedo). As a result, the rind presents bumps and areas sensitive to manipulation than depreciate fruit quality. *Creasing* begins during the first stage of the fruit development, although it has not been determined with precision. Besides, it is not known why it originates; enzymatic degradation of the pectin from the middle lamella or an inability to synthesize it have been suggested as possible causes.

The intensity of *creasing* varies between years, plots and trees, indicating the existence of endogenous and exogenous factors involved in its manifestation: changes in humidity, rootstocks, fruit position in the tree, nutritional factors (calcium) and hormonal factors (gibberellins, ethylene and polyamines), have also been associated to *creasing*.

Among them, the genotype is critical. Navel oranges are sensitive to *creasing*, with special emphasis on the varieties 'Navelina' and 'Washington Navel'. It is unknown, however, the sensitivity of Navel varieties newly introduced in Spain, coming from mutations of 'Washington Navel' in Australia.

The objectives of this study were 1) To determine the sensitivity to 'creasing' of sweet oranges 'Barnfield Late', 'Chislett Summer', 'Lane Late', 'Powell Summer' and 'Rodhe Summer' and histological differences related to the alteration, and 2) relate the rootstock and environmental conditions during the flowering to physiological fruit drop period to the percentage of creased fruits.

The experiments were carried out in an experimental orchard located in Llíria (Valencia). The five varieties are grafted on the rootstocks 'Carrizo' citrange, 'C35' citrange, 'Cleopatra' mandarin and 'Forner-Alcaide nº 5' using 4 plots of 4 trees each.

The conclusions of this work are:

- The sweet orange 'Rhode Summer' had the highest percentage of affected fruits while 'Chislett' had the lowest. 'Barnfield', 'Powell' and 'Lanelate' had an intermediate percentage of *creasing*.
- Mesocarp cells of 'Rhode Summer' had less amyloplasts than those of 'Chislett', and did not differ on the thickness of the cell wall.
- The trees grafted on 'Carrizo citrange' have a lower percentage of *creasing* compared to 'C -35 citrange', 'Cleopatra' mandarin and 'Forner -Alcaide nº -5'.

- Creasing intensity was related to a moist and cold spring, from flowering to the end of the physiological fruit drop.

María Navarro Consuelo.
Valencia, September 2015.

Key words:

- Physiological alterations
- Quality of fruits
- Citrus
- Cell wall

RESUM:

El 'creasing' o 'clareta' dels cítrics és un desordre fisiològic caracteritzat per la presència de depressions en l'exocarp corresponents amb aprimaments y/o ruptures del mesocarp subjacent; les zones sanes de la corfa es desenrotllen amb normalitat. Com a conseqüència de tot això, la corfa presenta embalums i zones sensibles al manipulat que deprecien la qualitat del fruit. L'inici de l'alteració es localitza en les primeres fases del desenrotllament del fruit, encara que no s'ha determinat amb precisió. Tampoc es coneix amb precisió la raó per la qual s'origina; la degradació enzimàtica de les pectines de la làmina mitjana o una incapacitat per a la seua síntesi s'han suggerit com a possibles causes. La intensitat del 'creasing' varia entre anys, entre parcel·les, i entre arbres, la qual cosa indica l'existència de factors exògens, (ambientals i culturals) i endògens embolicats en la seua manifestació: variacions de la humitat, el patró, la posició del fruit en l'arbre, factors nutricionals (el calci) i factors hormonals (giberelines, poliamines i etilé) s'han relacionat d'alguna manera amb la intensitat del 'creasing'. Entre ells, la varietat resulta decisiva en el percentatge de fruits afectats. Les taronges del grup Navel són sensibles a l'alteració, amb especial incidència en les varietats 'Navelina' i 'Washington navel'. Es desconeix, no obstant això, la incidència que presenten les noves varietats de recent introducció a Espanya procedents de mutacions de 'Washington navel' a Austràlia.

Per això, els objectius d'este treball són 1) determinar la sensibilitat al 'creasing' de les varietats de taronger navel 'Barnfield Late', 'Chislett Summer', 'Lane Late', 'Powell Summer' i 'Rohde Summer', i diferències histològiques relacionades amb l'alteració, i 2) relacionar el patró i les condicions ambientals durant la floració amb la intensitat de l'alteració.

Els experiments es van dur a terme en una parcel·la experimental de la Conselleria d'Agricultura, situada a Lliria (València) . Les cinc varietats de taronger dolç navel es troben empeltades sobre els patrons 'citrangle Carrizo', 'citrangle C35', mandariner 'Cleopatra' i 'Forner-Alcaide nº5', amb un total de 14 arbres per combinació repartits en 4 blocs a l'atzar.

Les conclusions d'este treball són:

- La varietat de taronger dolç 'Rodhe Summer' presenta el major percentatge de fruits afectats de creasing mentre que 'Chislett' presenta el menor. 'Barnfield', 'Powell' i 'Lanelate' presenten un percentatge d'afecció intermedi.

- Les cèl·lules del mesocarp de 'Rodhe Summer' presenten menys amiloplastos que les de 'Chislett' i no difereixen en el grossor de la paret cel·lular entre els estats fenològics flor tancada-caiguda de pètals.
- Els arbres empeltats sobre citrange Carrizo presenten menor percentatge de fruits amb creasing que els empeltats en citrange C-35, mandariner Cleòpatra i Forner-Alcaide-5.
- L'any de major intensitat de l'alteració va presentar una primavera més humida i més freda durant la floració i fins a la caiguda fisiològica de fruits.

María Navarro Consuelo.
València, Setembre de 2015.

Paraules clau:

- Alteracions fisiològiques
- Qualitat del fruit
- Cítrics
- Paret cel·lular

Agradecimientos

En primer lugar a Carlos, mi maestro y tutor, mi guía durante todo el trabajo, por transmitirme su pasión por la Citricultura, por haberme ayudado en todo y haberme transmitido su entusiasmo y dedicación para que todo saliese a la perfección. Por toda la confianza que depositaste en mí desde el minuto uno en que empezó esta magnífica aventura, mi más sincero agradecimiento.

Por todo lo que he aprendido de él, su capacidad de transmitir al alumno su mayor devoción, la Fruticultura, y haberme ayudado siempre que lo he necesitado, a ti Manuel Agustí.

A Carmina y Amparo por todo el entusiasmo y ánimos que me habéis regalado durante mi estancia en el IAM.

A todos los miembros del IAM, en especial a ti Natalia, has sido la hermana mayor de todos durante este tiempo, tu cariño ha sido de gran ayuda.

A Vicent, por su ayuda incondicional en campo.

A todos mis compañeros que pasaron como yo la estancia en la sala de becarios.

A toda mi familia y amigos, gracias de corazón por la paciencia que habéis demostrado y los continuos ánimos.

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción.....	1
1. El Creasing.....	3
1.1. Descripción.....	3
1.2. Causas.....	4
2. Hipótesis de trabajo y objetivos.	9
3. Material y métodos.....	10
1. Material Vegetal.....	10
2. Métodos.....	10
2.1. Valoración de la incidencia de creasing.....	10
2.2. Registro de datos climáticos.....	10
2.3. Estudio histológico.....	11
3. Análisis estadístico de los resultados.....	11
4. Resultados.....	12
1. Influencia de la variedad, el patrón y el año.....	12
2. Estudio histológico de la alteración.....	15
3. Influencia de las condiciones ambientales.....	23
5. Discusión.....	26
6. Conclusiones.....	28
7. Bibliografía.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la producción de cítricos en España en 2012. Fuente: Anuario estadística MAGRAMA	2
Figura 2. Fruto de naranjo dulce, cv. ‘Washington navel’, mostrando el fruto secundario englobado por el fruto principal y la ausencia de semillas	2
Figura 3. Influencia de la variedad (A) del patrón (B) y del año (C) en la incidencia de creasing del naranjo dulce. Cada valor en (A) y (B) es el promedio de los 2 años y de 16 y 20 árboles, respectivamente. En (C), el valor de cada año es del total de los 80 árboles. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$)	13
Figura 4. Influencia de la combinación variedad-patrón sobre la incidencia de creasing en el naranjo dulce, en los ciclos productivos 2013-2014 (A) y 2014-2015 (B). Cada valor es la media de 4 árboles. Las barras verticales indican el error estándar	13
Figura 5. Porcentaje de creasing de árboles individuales de naranjo dulce de las combinaciones variedad-patrón Chislett/citrango Carrizo (CH/CC) y Rodhe summer/Mandarino Cleopatra (R/CL).....	15
Figura 6. Mesocarpo de fruto maduro de naranjo dulce afectado de creasing. B y C son ampliaciones de zonas del mesocarpo en A que ilustran la separación del tejido.....	16
Figura 7. Frutos de naranjo dulce ‘Rodhe summer’ con el mesocarpo afectado de grietas (A y B) y con el mesocarpo sano (C y D) en el mes de Julio (2014). Diámetro medio de los frutos: 36 mm. La fotografía B es una ampliación de la grieta que marca la flecha roja	17
Figura 8. Frutos de naranjo dulce ‘Rodhe summer’ en el mes de Junio (2014). Su observación en el binocular (A y B) no permite observar las grietas características del creasing. Su observación en el CryoSEM permite observar grietas de un tamaño microscópico (C y D). Diámetro medio de los frutos: 17 mm	18
Figura 9. Mesocarpo del árbol sin clareta (Chislett/CC) (A), (C), (E), y con clareta (Rodhe summer/CL) (B), (D), (F), en los estados fenológicos flor cerrada (A), (B), anthesis (C), (D), y caída de pétalos (E), (F). Floración de 2015 (Mayo); ap: amiloplasto; c: citoplasma; ei: espacio intercelular; n: núcleo; pc: pared celular; v: vacuola; vap: vacuola de almacenamiento de proteína;. *: nuevas paredes procedentes de la división celular	20

Figura 10. Mesocarpo del árbol sin clareta (Chislett/CC) (A), y con clareta (Rodhe summer/CL) (B), en los estados fenológicos flor cerrada (A), (B). Floración de 2015 (Mayo); ap: amiloplasto; c: citoplasma; cp: cloroplasto; ei: espacio intercelular; li: lisosoma; lm: lamina media; n: núcleo; pc: pared celular; pd: plasmodesmo; v: vacuola; vap: vacuola de almacenamiento de proteínas.	21
Figura 11. Mesocarpo del árbol sin clareta (Chislett/CC) (A), (C), y con clareta (Rodhe summer/CL) (B), (D), en los estados fenológicos antesis, (D), y caída de pétalos (A), (B) y (C). Floración de 2015 (Mayo); lm; lámina media;pc: pared celular; v: vacuola. *: nuevas paredes procedentes de la división celular. La flecha indica el transporte de vesículas en la vacuola hacia la pared celular	22
Figura 12. Evolución de la superficie celular (A) y de la anchura de la pared celular (B) de células del mesocarpo del árbol sin clareta (Chislett/CC) y del árbol con clareta (Rodhe summer/CL) durante los estados fenológicos flor cerrada, antesis y caída de pétalos. Floración de 2015 (Mayo).....	23
Figura 13. Factores ambientales del período Abril-Junio en el año 2013 y 2014. A: Temperatura máxima del día (TM), B: Temperatura mínima del día (Tm), C: Humedad relativa máxima (HRM), D: Humedad relativa mínima, E: Precipitaciones (P), F: Evapotranspiración de referencia (ET0), G: velocidad del viento, H: procedencia del viento (días) e I: radiación solar	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis de varianza de la influencia del bloque, la variedad y el patrón sobre el porcentaje de creasing en fruta recolectada el 31 de Marzo del 2014	14
Tabla 2. Análisis de varianza de la influencia del bloque, la variedad y el patrón sobre el porcentaje de creasing en fruta recolectada el 30 de Marzo del 2015	14

1. Introducción.

Los cítricos son un cultivo en expansión a nivel mundial. Se cultivan principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo entre 40° norte y sur de latitud, en más de 137 países (Ismail y Zhang, 2004). En su mayoría son especies de hoja perenne que pueden producir cosechas rentables tanto en condiciones de clima tropical como subtropical (Agustí, 2003). España es el primer exportador mundial de frutos cítricos para consumo en fresco. La Citricultura representa una de las primeras partidas de ingresos en el capítulo general de las exportaciones nacionales, 2,803 millones de euros en 2012, (MAGRAMA, 2012). Durante los últimos años, la producción de cítricos en España ha superado los 6,6 millones de toneladas. Se estima que la superficie actual dedicada al cultivo de los cítricos supera las 300.000 Ha, de las cuales 182.951 Ha se encuentran en la Comunidad Valenciana (MAGRAMA, 2012).

Las especies de cítricos con interés comercial pertenecen a la familia de las *Rutaceas*, subfamilia *Aurantioideas*. Esta se encuentra dentro de la división *Embryophyta Siphonogama*, subdivisión *Angiospermae*, clase *Dicotyledonae*, subclase *Rosidae*, superorden *Rutales*. La subtribu *Citrinae* contiene todos los géneros a los que pertenecen los cítricos cultivados: *Fortunella*, *Poncirus* y *Citrus*. Las especies del género *Citrus* son las más importantes desde el punto de vista agronómico y representan casi la totalidad de los cítricos cultivados para consumo en fresco y para la obtención de zumo. La clasificación botánica del género *Citrus* se basa en los criterios de los taxónomos Swingle (1967) y Tanaka (1977) (Agustí, 2003).

La especie más cultivada en el mundo es el naranjo dulce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), (FAOSTAT, 2013). En España, la producción de naranjas supone el 52% del total de cítricos producidos (Figura 1). Las principales variedades de naranjo dulce cultivadas en España se encuentran dentro del grupo Navel.

Producción de cítricos en España

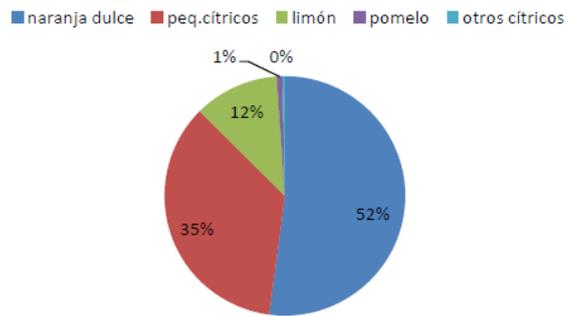


Figura 1. Distribución de la producción de cítricos en España en 2012. Fuente: Anuario estadística MAGRAMA

Las naranjas Navel presentan un segundo verticilo carpelar dando lugar, al desarrollarse, a un fruto secundario pequeño, que queda incluido en la corteza de la zona estilar del fruto principal. Su similitud con un *ombliigo* (*navel* en inglés) da nombre al grupo. Las flores son grandes, y pueden encontrarse aisladas o en inflorescencias. Las flores presentan esterilidad gamética masculina y femenina. Las células madre de los granos de polen degeneran dando lugar a polen estéril. Las anteras son de color blanco crema o amarillo pálido por su androesterilidad. En los óvulos, el saco embrionario degenera y no se produce la fecundación. Por lo tanto, las naranjas Navel no presentan semillas y dan lugar a frutos partenocárpicos.

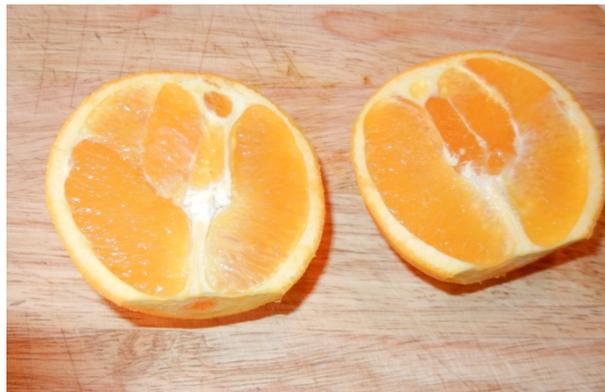


Figura 2. Fruto de naranja dulce, cv. 'Washington navel', mostrando el fruto secundario englobado por el fruto principal y la ausencia de semillas

Las principales variedades de naranja Navel cultivadas en España son la 'Navelina', 'Washington navel', 'Navelate' y 'Lane Late'. La naranja 'Navelina' es la más precoz

(madura en noviembre) mientras que la 'Lane Late' es la más tardía (madura en febrero-marzo). 'Washington navel' y 'Navelate' presentan una época de maduración intermedia. Sin embargo, la rentabilidad de estas variedades es cada vez menor. A ello contribuye el exceso de oferta de la variedad 'Navelina', la más cultivada, los problemas de producción de la variedad 'Navelate', y las alteraciones fisiológicas del fruto como el *creasing* o *clareta* (la más importante a nivel mundial) o el *Rind breakdown* o *Colapso de la corteza*. Todo ello ha obligado al sector cítrico a buscar nuevas variedades de navel que mejoren la rentabilidad de las actuales. Entre ellas, las variedades tardías 'Barnfield Late', 'Chislett Summer', 'Powell Summer' y 'Rohde Summer' se están introduciendo en España. Las cuatro, como la 'Lane Late', son mutaciones de Washington navel procedentes de Australia. Se desconoce la sensibilidad que presentan estas variedades al *creasing*.

1. El *creasing*.

En los cítricos la *clareta* o *creasing* es la alteración fisiológica que afecta a un mayor número de variedades en el mundo y mayores pérdidas representa. La alteración se presenta desde principios del siglo XX, la primera cita es de Sudáfrica (Le Roux y Crous, 1938) y actualmente es un problema importante en la industria de la naranja dulce en diferentes partes del mundo como Australia (Storey y Treeby, 1994), California (Jones et al., 1976), USA (Ali et al., 2000), Israel (Monselise et al., 1976; Greenberg et al., 2006), Uruguay (Gambetta et al., 2000), España (Agustí et al., 2001), Sudáfrica (Holtzhausen, 1982) y China (Li et al., 2009).

Prácticamente todas las variedades de naranjas y mandarinas son sensibles a esta alteración. En España se encuentra frecuentemente en las naranjas 'Navelina', 'Washington navel' (Gambetta et al., 2000; Ali et al., 2000) y 'Valencia late' (Jones and Embleton, 1967; Monselise et al., 1976) y las mandarinas 'Clementinas' (Greenberg et al., 2006) y 'Fortune'. Existen diversas causas que disminuyen la proporción de fruta exportable, pero el *creasing* se ha convertido en una de las principales, provocando porcentajes de destrucción que superan en ocasiones el 50% de la cosecha en Uruguay (Gravina, 1998), el 61% en Australia (Treeby et al., 2007), Sudáfrica (Gilfillan et al., 1981) y España (Ruiz y Primo-Millo, 1989).

1.1. Descripción.

El *creasing* es un desorden fisiológico caracterizado por la presencia de depresiones en el exocarpo (flavedo) correspondientes con adelgazamientos o rupturas del mesocarpo

(albedo) subyacente; las zonas que no sufren el agrietado se desarrollan con normalidad en forma de bultos que sobresalen de la corteza. Las características de este desorden fisiológico han sido detalladas por Monselise et al. (1976), Abadalla et al. (1984) y Storey y Treeby (1994). Las fracturas o roturas del tejido son debidas a la separación entre células adyacentes y no a la escisión de células individuales (Storey y Treeby, 1994). Aunque este desorden se manifiesta en la maduración del fruto, se origina en estados tempranos del fruto en desarrollo (Storey y Treeby, 1994).

El origen de la alteración se asocia con una mayor actividad pectinmetilesterasa que produce la degradación de las pectinas de la lámina media y, por tanto, la separación celular (Monselise et al., 1976). Sin embargo, se desconoce si el origen de la alteración se debe a una deficiente síntesis de la pared celular, o, por otra parte, a una degradación anticipada de la lámina media en células bien formadas. Tampoco se conoce cuándo se inicia el *creasing*.

1.2. Causas.

Se desconoce la causa principal que origina la alteración. Sin embargo, se han detectado algunos factores que se han relacionado, al menos, con la intensidad con que se presenta como el genotipo (Agustí et al., 2003), el clima (Jones y Embleton 1967; Gambetta et al., 2000), el patrón (Storey et al., 2002), la cuantía de la cosecha (Jones y Embleton 1967), el grosor de la corteza (Holtzhausen, 1981), el riego (Treeby et al., 2007; Agustí et al., 2004) y la nutrición mineral (Pham et al., 2012; Bower, 2004; Storey et al., 2002; Treeby y Storey, 2002; Ali et al., 2000; Jones et al., 1967) y reguladores del crecimiento vegetal (Dick, 1995; Treeby y Storey, 1994; Tugwell et al., 1993; Jona et al., 1989; Embleton et al., 1973). El *creasing* afecta principalmente el tejido del flavedo y albedo pero no influye en la calidad del fruto (Goldie, 1998; Pham, 2009).

1.2.1. Exógenas.

Las condiciones del medio, tanto climáticas como del suelo, pueden alterar su desarrollo ya que la intensidad del *creasing* en un mismo árbol varía con los años. Cuanto mayor es la diferencial térmica, sobre todo en las épocas de desarrollo activo del fruto en los meses de junio y julio y de maduración, mayor es la incidencia (Jones et al., 1967). Jones et al., (1967) propusieron que la diferencia de la temperatura radial a través del fruto o el estrés hídrico podría desencadenar la alteración. Generalmente, el régimen de

temperaturas durante el crecimiento y desarrollo de fruto juegan un papel importante influenciando en su morfología (Rouse y Zerki, 2006).

La humedad relativa media alta en plena floración hasta la caída fisiológica de frutos está relacionada con una mayor incidencia de *creasing* (Gambetta et al., 2000). Períodos de sequía y lento desarrollo en verano seguidos de tiempo húmedo o amplias fluctuaciones de la humedad también incrementan la intensidad. Los árboles con riego por micro-aspersión presentan mayor incidencia que los árboles regados por goteo (du Plessis y Maritz, 2004). Treeby et al., (2007) y Mathews (1944) sugieren que la proporción de frutos afectados disminuye con el riego. Pero su observación es contradictoria con la de Miller y Turnbull (1948, Florida) que demuestran mayor incidencia en regadío que en secano.

1.2.2. Endógenas.

La intensidad del *creasing* se asocia con el individuo, árbol, de modo que independientemente de las variaciones anuales por los factores exógenos, los árboles que presentan mayor intensidad son, en general, siempre los mismos. Además, se ha demostrado que la alteración se intensifica en los frutos situados en la cara sur (HN) del árbol (Agustí et al., 2004). Los síntomas en un mismo fruto varían con la orientación de su superficie y, en general, la cara que mira al interior del árbol se halla más afectada (Jones et al., 1967). La alteración aumenta, también, con la edad del fruto y con un retraso en la recolección (Jones et al., 1967; Nagy et al., 1985). El patrón y la relación de absorción de agua están asociados al crecimiento del fruto, su desarrollo y el nivel acumulado de azúcares en los cítricos (Albrigo, 1977), por lo tanto el crecimiento vegetativo, la cosecha, el tamaño del fruto y su calidad se ven afectados por el patrón (Barry et al, 2004a; Syvertsen et al, 2000; Castillo, 1995). El patrón afecta a la incidencia y severidad de la degradación del albedo en naranjo Navel (Agustí et al., 2003; Moulds et al., 1995; Treeby et al., 1995), por lo tanto, la capacidad de absorción de agua y nutrientes por el patrón podría influir en el desglose del albedo (Treeby et al., 1995). En Sudáfrica, la incidencia del *creasing* fue mayor en patrones de menor vigor como son '*citrange Carrizo*' y '*citrumelo Swingle*' comparado con patrones de mayor vigor '*Volkameriana*' y Limón rugoso (du Plessis y Martiz, 2004). En Australia la situación era contraria (Treeby et al., 2000; 1995). Según Treeby et al, (2000; 1995) patrones vigorosos como el Limón rugoso y Lima '*Rangpur*' tienen más posibilidades de *creasing* que patrones de menor vigor como el Naranja dulce y el mandarino '*Cleopatra*'. Treeby et al, (1995) ordenó de menor a mayor resistencia a la incidencia de *creasing* en patrones susceptibles al desorden: Naranja dulce < mandarino '*Cleopatra*' < Naranja

Trifoliado < citrange Carrizo = citrange Troyer< Limón rugoso < Lima Rangpur. Sin embargo, se observó una menor incidencia de *creasing* en los árboles injertados sobre patrones de ‘Naranja amargo’ que en ‘citrange Carrizo’ (Agustí et al., 2003).

Pero los mayores avances en la comprensión de la alteración se han realizado en aquellos aspectos relacionados con la pared celular, su síntesis y degradación. El albedo está constituido por espacios aéreos unidos por ramificaciones celulares que aseguran su continuidad que son frágiles y fáciles de romper. Inicialmente, la rotura tiene lugar entre en la lámina media de dos o más células que, cuando alcanza a células próximas, genera grandes grietas. El desglose de la pectina y su despolimerización contribuyen al ablandamiento de los frutos y el desmontaje de la pared celular (Seymour y Gross, 1996). Durante la maduración del fruto el contenido de pectina soluble en agua aumenta, y es mayor en frutos con presencia de la alteración que en frutos que tienen menor incidencia de *creasing* (Monselise et al., 1976; Li et al., 2009). Además, el contenido de la pectina asociada iónicamente y unida covalentemente en la pared celular disminuye en mayor medida en las naranjas afectadas por *creasing*, como el contenido en hemicelulosa y celulosa (Li et al., 2009). La interrupción de las microfibrillas de celulosa es un factor importante para influir en la propiedad estructural del marco de hemicelulosa-celulosa mientras que la despolimerización de la hemicelulosa es una característica común del ablandamiento de la fruta y se cree que contribuye de manera significativa en los cambios en la textura (Redgwell et al., 1997; Brummell and Harpster, 2001; Manganaris et al., 2008). La poligalacturonasa juega un importante papel en la despolimerización de la pectina durante la maduración del fruto, correlacionado con la pérdida de la firmeza (Rose et al., 1998). Se ha demostrado que la poligalacturonasa libera galactosa de la pectina y otros polímeros de hemicelulosa que contienen galactosa (Ross et al., 1993). La enzima pectinmetilesterasa es la responsable de la degradación de la pectina de la lámina media de la pared celular (Monselise et al., 1976; Micheli et al., 2001), y, en los cítricos, aumenta con el tiempo, pero más rápidamente en los frutos que manifiestan la afección. Finalmente, la expresión de proteínas expansinas modifica la pared celular y contribuyen a su pérdida integridad (Cosgrove, 2000; Choi et al., 2006; Khurnpoon et al., 2008; Brummell et al., 2006). Las expansinas también se han asociado con una mayor incidencia de la alteración (Li et al., 2009).

La nutrición mineral y el contenido de elementos minerales en el albedo es importante en el desarrollo *creasing*, ya sea a través de su participación estructural en la formación del complejo de pectina, o a través de su influencia sobre la actividad de las enzimas (Bower, 2000). Bajos niveles en molibdeno, azufre, boro, magnesio y zinc están en

detrimento en la formación de fracciones de pectina en el tejido del albedo y el calcio está involucrado en la unión de las pectinas (Bower, 2004; Treeby et al., 2000; Verreyne, 2006). El Molibdeno actúa como cofactor en la síntesis ureica requerida en la formación de ácido galacturónico, un componente importante de la pectina, mientras que el azufre se cree que es un componente de la oxidasa del ácido urónico (Bower, 2004). El boro está implicado en la síntesis proteica, transporte de azúcares y metabolismo de carbohidratos (Hansch y Mendel, 2009). Además, el boro, reticula mediante un puente borato las moléculas de polisacáridos de la pared celular llamados rgalacturonas II, proporciona fuerza física a la pared celular y se asocia, también, con la formación de pectinas (Epstain y Bloom, 2005). Sin embargo, la relación entre el contenido de estos elementos minerales y la incidencia de la alteración no es clara.

El fósforo es imprescindible para la división celular y el alargamiento de las células, por lo tanto el crecimiento de las plantas se ve reducido cuando el suministro del mismo es muy bajo (Obreza et al., 2003). Se observó que el contenido de P en frutos con presencia de la alteración era más elevado que el de frutos sanos (Chapman, 1968; Gambetta et al., 2000). Por otra parte, la concentración de calcio en frutos con incidencia del *creasing* es menor en comparación con los frutos sanos (Gambetta, 2000; Jones ,1967; Nagy, 1982; Storey y Treeby, 2002). Este elemento enlaza transversalmente la cadena pectídica y afecta a las propiedades mecánicas de los geles de pectina (Epstain y Bloom, 2005).

El nitrógeno es importante en el crecimiento del fruto, la apariencia del árbol, la producción y la calidad del fruto (Agustí, 2003) ya que es un componente esencial para las células en división, para el crecimiento y la respiración (Obreza et al., 2003). Se ha asociado bajos niveles de nitrógeno en el suelo con frutos de corteza fina y con la gravedad de la incidencia de la alteración (Le Roux y Crous, 1938). En este sentido, la tasa de frutos con *creasing* de diferentes cultivares de naranja dulce está relacionada con los cambios en la firmeza de la fruta (Li, 2006). Pero el contenido de nitrógeno aumenta en frutos dañados en comparación con frutos sanos (Ali et al., 2000; Jones et al., 1967).

El potasio es importante en la formación de frutos, en su tamaño, en el sabor y en la coloración de la corteza (Obreza et al., 2003). Este elemento juega un papel importante en la activación enzimática, en la síntesis proteica, en la funcionalidad de los estomas, en los procesos de turgencia y el transporte de los metabolitos (Alva et al., 2006). Concentraciones elevadas de K en el suelo están relacionadas con frutos de corteza gruesa, mientras que concentraciones bajas provocan en el fruto corteza más delgada y más sensibilidad al *creasing* (Embleton et al., 1973; Jones et al., 1967; Obreza et al., 2008). Por lo contrario, la

concentración de K en frutos con *creasing* es más elevada que en frutos que no presentan la alteración (Gambetta et al., 2000; Jones et al., 1967; Storey et al., 2002).

La aplicación de elementos minerales al inicio de la fase II del desarrollo del fruto consigue reducir la incidencia de *creasing*. Los mejores resultados se han obtenido mediante la aplicación de nitrato potásico, fosfato monoamómico, y nitrato cálcico (Monselise et al., 1976; Ruiz y Primo-Millo, 1989; Gambetta et al., 2002).

Los reguladores del desarrollo también se han relacionado con la incidencia de la alteración. Las giberelinas regulan la división celular en las fases iniciales del desarrollo fruto. La tasa de división celular varía durante la fase I del desarrollo del fruto entre los tejidos del pericarpo (Guardiola et al., 1993). Así, la desde la antesis hasta 15 días después, la tasa de división celular es mayor en el exocarpo y mesocarpo que en el endocarpo. En este tejido, la tasa de división celular aumenta 15 días después de la antesis y es máxima entre 20 y 30 días después (Yuste, 2014). La síntesis de giberelinas, caracterizada por la expresión del enzima *GA20ox2* se observa en todo el pericarpo durante la antesis, pero sólo en el endocarpo 30 días después, donde se localiza la división celular (Yuste, 2014). La aplicación de GA₃ estimula la división celular (Yuste, 2014) y reduce la intensidad de *creasing* (Monselise et al., 1976; Ruiz y Primo-Millo 1989; Gambetta et al., 2002).

Las citoquininas y las poliaminas también regulan la división celular y su aplicación también reduce el *creasing*, aunque con menor intensidad (Phiri, 2010, Hussain, 2014). Finalmente, la aplicación de inhibidores de la síntesis de etileno (AVG) reduce la incidencia de la alteración a través de la reducción de la actividad de las enzimas pectinesterasa y poligalacturonasa (Hussain, 2014).

2. Hipótesis de trabajo y objetivos.

En el presente trabajo de investigación se estudia la siguiente hipótesis:

La formación de grietas en el mesocarpo que ocasiona el desorden fisiológico del *creasing* depende de factores endógenos, relacionados con la variedad, y factores exógenos, ambientales y culturales.

Para ello, se han planteado los siguientes objetivos:

- 1) determinar la sensibilidad al '*creasing*' de las variedades de naranjo navel '*Barnfield Late*', '*Chislett Summer*', '*Lane Late*', '*Powell Summer*' y '*Rohde Summer*', y diferencias histológicas relacionadas con la alteración.
- 2) relacionar el patrón y las condiciones ambientales durante la floración con la intensidad de la alteración.

3. Material y métodos.

1. Material Vegetal.

Los experimentos se llevaron a cabo en una parcela de árboles adultos de naranjo dulce [*Citrus sinensis* (L.)], cv. ‘Barnfield’, cv. ‘Chislett’, cv. ‘Lane Late’, cv. ‘Powell’ y cv. ‘Rodhe Summer’ injertados sobre los patrones citrange ‘Carrizo’ [*C. sinensis* (L.) Osbeck x *P. trifoliata* (L.) Raf.], citrange ‘C-35’ (*C. sinensis* x *P. trifoliata*), ‘Former Alcaide-5’ [híbrido de *P. trifoliata* (L.) Raf x *C. reshni* (L.)] y mandarino ‘Cleopatra’ (*C. reshni* Hort. ex Tanaka).

La plantación de naranjo dulce se ubica en la parcela experimental de la cooperativa de Lliria (Valencia), con un suelo de textura franco arenosa (14% arcilla, 22% limo, 64% arena) según la U.S.D.A., 3,6% de materia orgánica, pH 7,5, 5,5% de caliza activa y exceso de calcio asimilable (13,6 meq/100 mg). La plantación presenta riego localizado y niveles de fertilización, riego y control fitosanitario adecuados a la plena producción de la especie.

2. Métodos.

2.1. Valoración de la incidencia de *creasing*.

El estudio de la influencia del patrón y de la variedad sobre la incidencia de *creasing* se realizó en las cosechas 2014 y 2015. Se seleccionaron 4 árboles al azar de cada combinación variedad-patrón, incluyendo en el estudio un total de 80 árboles. El *creasing* se determinó en el momento de la recolección de cada año, el 30/03 y el 31/03 para el año 2014 y 2015, respectivamente. El porcentaje de frutos afectados se evaluó en 40 kg de fruta por árbol (2 cajones), y se determinó la producción total de todos los árboles.

2.2. Registro de datos climáticos.

Para estudiar la relación de las condiciones climáticas con la incidencia del *creasing* se adquirió datos registrados por la estación meteorológica de Lliria a través del departamento de Riegos del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA).

La adquisición de datos se realizó diariamente y se registraron valores de temperatura media, máxima y mínima, hora de Temperatura media, máxima y mínima,

Horas frío acumuladas, humedad relativa máxima, mínima y media, velocidad media y dirección del viento, lluvia, evapotranspiración y radiación solar.

A través de la aplicación se descargaron los datos desde el 01/03 hasta 30/06 para 2013, ambos inclusive, y los datos desde el 01/03 hasta 30/06 para 2014 con el fin de evaluar las posibles influencias que tienen los factores ambientales en las primeras fases del desarrollo del fruto que se recolectará la primavera siguiente.

2.3. Estudio histológico.

Para estudiar histológicamente la aparición de la alteración se seleccionaron dos árboles de la parcela experimental de Lliria que en los dos ciclos productivos 2013-2014 y 2014-2015 presentaron alto y bajo índice de *creasing*. En la primavera de 2015, se recogieron muestras de ovarios en mayo (04/05) en los estados 'flor cerrada', 'antesis' y 'caída de pétalos', junio (01/06) con un diámetro de fruto de 17 mm, y en julio (02/07), con un diámetro de fruto de 36 mm. Una vez en laboratorio se separó por la zona de abscisión estilo-ovario y ovario-cáliz para obtener solo el ovario de los fruto. Las muestras de mayo se fijaron en tetróxido de osmio y se enviaron al Servicio de Microscopía de la Universitat de València para su procesado y montaje en un microscopio electrónico de transmisión (TEM), según el protocolo de Lado et al., (2015), con el fin de observar la formación de la pared celular. Las muestras de junio y julio se separaron en 2 grupos para su estudio en un binocular (Nikon E-600), en fresco, y para su estudio en el microscopio electrónico de barrido (Cryo-SEM) de la Universitat Politècnica de València utilizando el protocolo de (Agustí et al., 2003).

En las muestras de mayo, se estudió en el TEM una preparación, al azar, de cada tratamiento. Se realizaron veinte fotografías de cada preparación. En ellas, mediante el programa informático UTHSCSA *Image Tool* se determinó la superficie celular (ms^2) y la anchura pared celular (m) y la anchuediciones se realizaron de las paredes celulares que no se encontraban en la zona de división celular.

3. Análisis estadístico de los resultados.

El análisis estadístico se realizó mediante el programa informático Startgraphics Centurión XVI y los resultados obtenidos se analizaron mediante un análisis de la varianza

multifactorial con un nivel de confianza de $P \leq 0,05$. A los valores porcentuales se le aplicó la transformación arcsen (\sqrt{p}) previo a su estudio estadístico.

4. Resultados.

1. Influencia de la variedad, el patrón y el año.

Para determinar la influencia que tienen la variedad y el patrón en el porcentaje de frutos afectados por *creasing* se evaluó durante 2 años consecutivos el porcentaje de *creasing* en los mismos 80 árboles. En la figura 3 se representa el promedio de los 2 años de estudio, para la variedad y el patrón, y el porcentaje de *creasing* del año, con independencia de la variedad y el patrón.

Todas las variedades mostraron la alteración aunque con diferente intensidad (Figura 3A). La variedad que en los dos años de estudio alcanzó los valores más elevados de fruta afectada fue el naranjo dulce ‘Rodhe summer’, con un porcentaje promedio del 35%. Por contrario, la variedad de naranjo dulce ‘Chislett’ presentó la menor afección de *creasing* en ambos años, promediando un 13% de fruta afectada. Las variedades de naranjo dulce ‘Barnfield’, ‘Powell’ y ‘Lane late’ presentaron una afección intermedia, 27%, 19% y 23%, respectivamente, sin alcanzar la significación estadística entre ellas.

Los árboles injertados sobre patrón citrange ‘Carrizo’ mostraron un porcentaje menor de frutos afectados de *creasing*, 13% en el promedio de los 2 años, en comparación con los patrones ‘C-35’, ‘Cleopatra’ y ‘FA-5’ que mostraron un porcentaje de *creasing* de 28%, 29% y 23%, respectivamente (Figura 3B). Finalmente, en el año 2014 la intensidad de *creasing* fue significativamente mayor que en el año 2015 (Figura 3C).

El estudio más detallado de los 2 años indica que 1) la interacción entre la variedad y el patrón no es significativa en ninguno de los 2 años (Tablas 1 y 2), es decir, que citrange ‘Carrizo’ es el patrón con menor porcentaje de fruta afectada por *creasing* en todas las variedades y en los 2 años, y 2) que el año influye de un modo decisivo en el porcentaje de *creasing* con independencia de la variedad y el patrón, es decir, que en 2015 la reducción de la alteración ocurre en todas las combinaciones variedad-patrón (Figura 4).

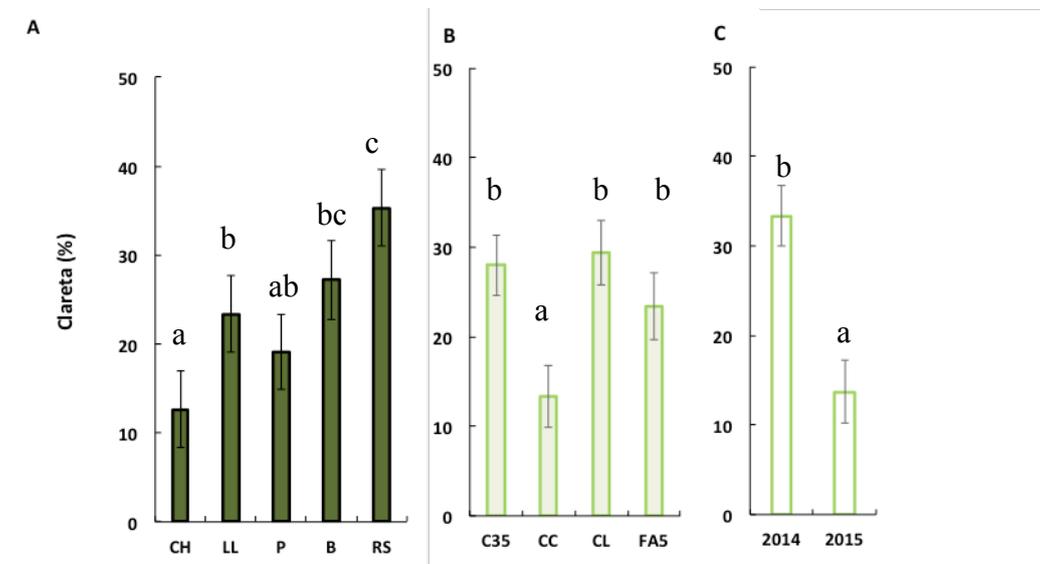


Figura 3. Influencia de la variedad (A) del patrón (B) y del año (C) en la incidencia de creasing del naranjo dulce. Cada valor en (A) y (B) es el promedio de los 2 años y de 16 y 20 árboles, respectivamente. En (C), el valor de cada año es del total de los 80 árboles. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$)

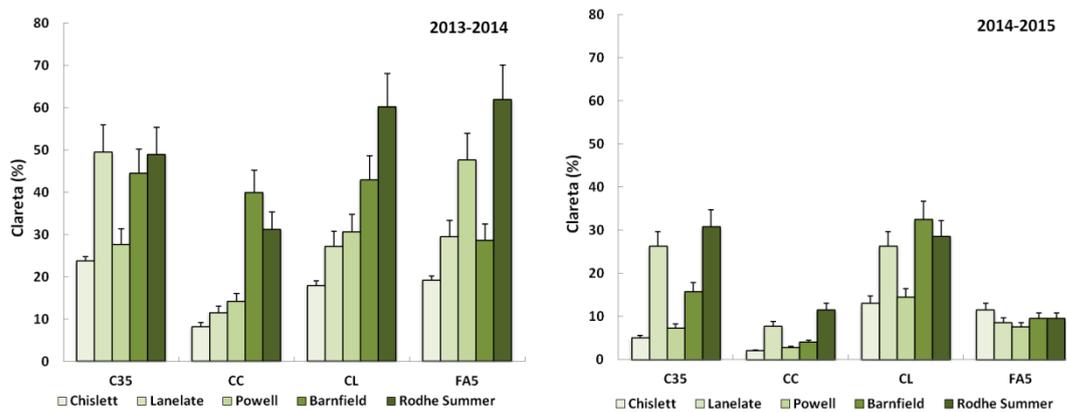


Figura 4. Influencia de la combinación variedad-patrón sobre la incidencia de creasing en el naranjo dulce, en los ciclos productivos 2013-2014 (A) y 2014-2015 (B). Cada valor es la media de 4 árboles. Las barras verticales indican el error estándar

Tabla 1. Análisis de varianza de la influencia del bloque, la variedad y el patrón sobre el porcentaje de creasing en fruta recolectada el 31 de Marzo del 2014

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:BLOQUE	3080,94	3	1026,98	2,79	0,0541
B:PATRON	4102,94	3	1367,65	3,72	0,0198
C:VARIEDAD	9823,38	4	2455,84	6,68	0,0004
INTERACCIONES					
AB	3280,11	9	364,457	0,99	0,4638
AC	3150,13	12	262,51	0,71	0,7277
BC	4608,63	12	384,052	1,05	0,4317
RESIDUOS	13229,1	36	367,474		
TOTAL (CORREGIDO)	41275,2	79			

Tabla 2. Análisis de varianza de la influencia del bloque, la variedad y el patrón sobre el porcentaje de creasing en fruta recolectada el 30 de Marzo del 2015

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:BLOQUE	1087,34	3	362,446	2,92	0,0470
B:PATRON	3628,44	3	1209,48	9,75	0,0001
C:VARIEDAD	1953,32	4	488,331	3,94	0,0094
INTERACCIONES					
AB	1084,61	9	120,512	0,97	0,4792
AC	1438,47	12	119,873	0,97	0,4970
BC	1608,37	12	134,031	1,08	0,4043
RESIDUOS	4465,82	36	124,051		
TOTAL (CORREGIDO)	15266,4	79			

A nivel individual, la variedad ‘Rodhe summer’ injertada sobre mandarina Cleopatra presentó el mayor porcentaje de *creasing* en 2014 (60%) y en 2015 (29%), mientras que la variedad ‘Chislett’ injertada sobre citrange ‘Carrizo’ la menor, 8% y 2% en 2014 y 2015, respectivamente (Figura 4).

2. Estudio histológico de la alteración.

Con los objetivos de 1) relacionar las diferencias en el porcentaje de *creasing* con diferencias histológicas en el mesocarpo, y 2) identificar el momento preciso en el que se originan las grietas que dan lugar a la alteración, se realizó un estudio histológico de los frutos en desarrollo de árboles con y sin *creasing*.

Generalmente, son siempre los mismos árboles los que presentan frutos con *creasing* (Jones et al., 1967). Sin embargo, aún muestreando de un árbol que presente habitualmente un porcentaje elevado de *creasing*, el fruto muestreado en su fase inicial no muestra, todavía, los síntomas externos. Por ello, un muestreo al azar no asegura que el fruto muestreado presente la alteración. Para reducir en la medida de lo posible este inconveniente, se seleccionaron 2 árboles de las combinaciones variedad-patrón con mayor y menor porcentaje de *creasing*. El árbol ‘170’ de la parcela, de la combinación RS-CL, presentó un porcentaje de *creasing* superior al 50% con independencia del año (Figura 5). Por el contrario, el árbol ‘65’ de la parcela, de la combinación CH-CC, presentó un porcentaje de *creasing* inferior al 1% con independencia del año (Figura 5).

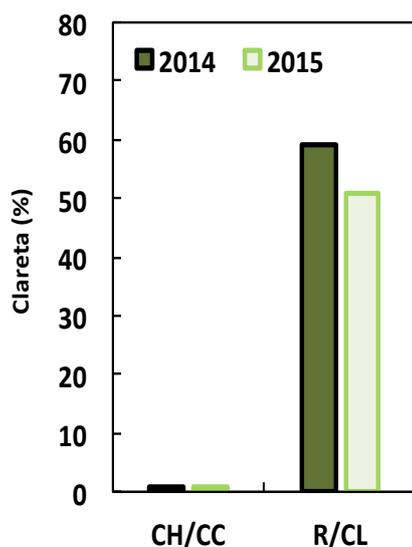


Figura 5. Porcentaje de *creasing* de árboles individuales de naranjo dulce de las combinaciones variedad-patrón Chislett/citrango Carrizo (CH/CC) y Rodhe summer/Mandarino Cleopatra (R/CL)

En los frutos maduros con *creasing* se observa con facilidad que las depresiones de la corteza en las áreas afectadas son consecuencia de las grietas que se producen en el mesocarpo (Figura 6A). La rotura de las paredes celulares dejan grandes espacios intercelulares que al unirse forman grietas e impiden el crecimiento de la corteza (Figura 6B y C).

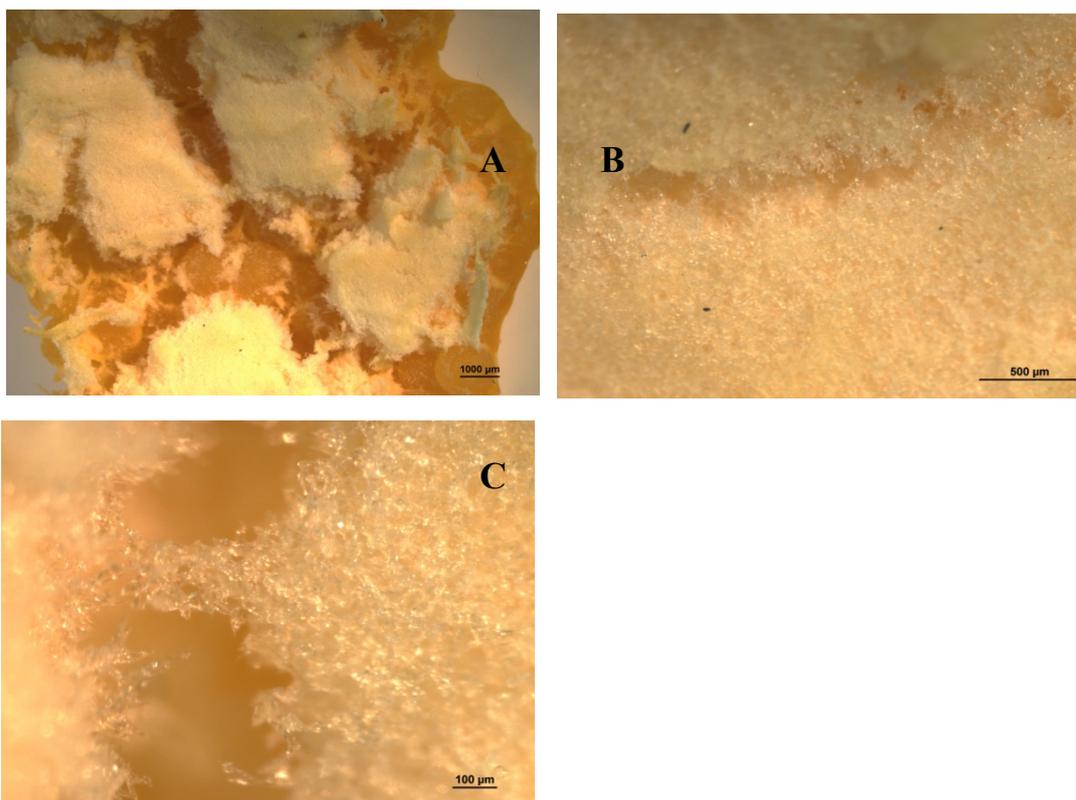


Figura 6. Mesocarpo de fruto maduro de naranjo dulce afectado de creasing. B y C son ampliaciones de zonas del mesocarpo en A que ilustran la separación del tejido

Para identificar el estado fenológico en el que se inicia la alteración se estudió histológicamente frutos de naranjo dulce ‘Rodhe summer’ al inicio de la fase lineal de desarrollo del fruto, el mes de Julio (2014) y al final de la fase de crecimiento exponencial, Junio (2014). En el mes de Julio, frutos con 36 mm de diámetro presentaban ya un número elevado de grietas evidentes similares a las observadas en los frutos maduros y responsables del *creasing* (Figura 7A y 7B). Sin embargo, algunos frutos mostraron un mesocarpo sano (Figura 7C y 7D). Por tanto, la alteración se inició en algún momento anterior al mes de Julio.

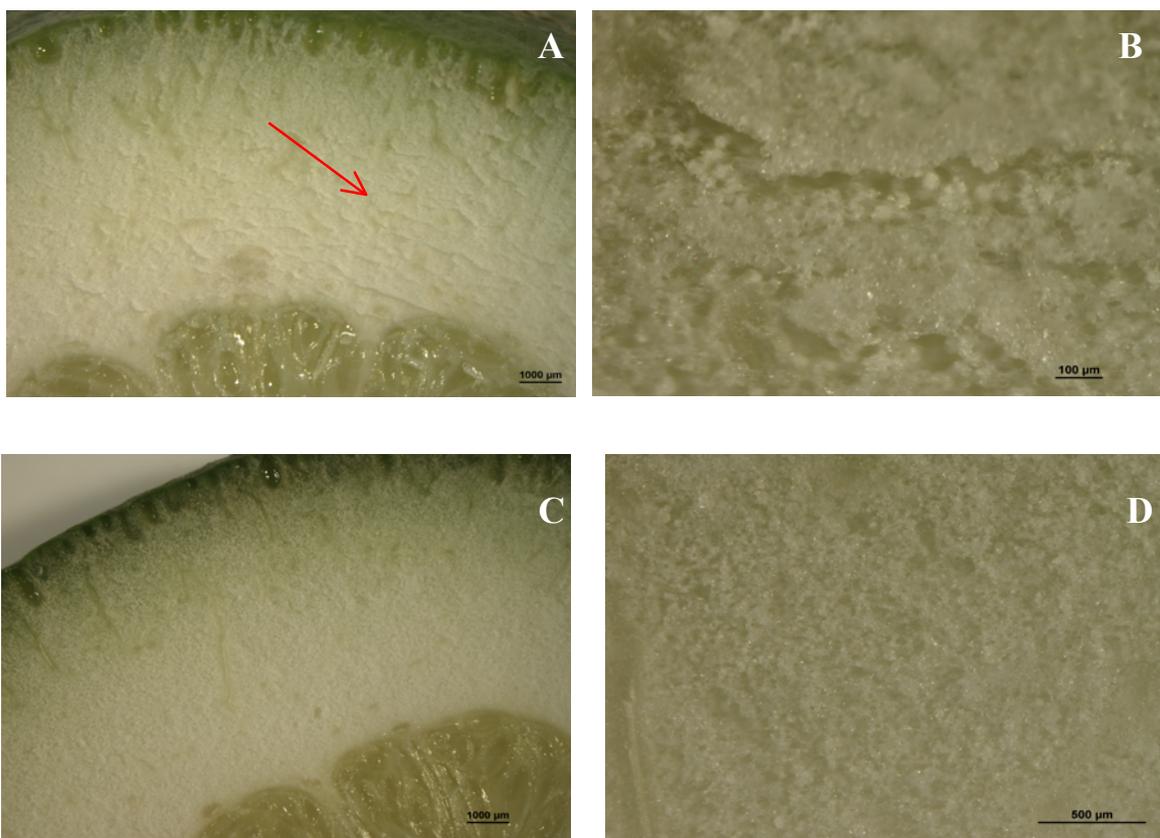


Figura 7. Frutos de naranjo dulce 'Rodhe summer' con el mesocarpio afectado de grietas (A y B) y con el mesocarpio sano (C y D) en el mes de Julio (2014). Diámetro medio de los frutos: 36 mm. La fotografía B es una ampliación de la grieta que marca la flecha roja

El estudio de frutos en el mes de Junio, con un diámetro de 17 mm, no permitió observar con tanta claridad ese tipo de grietas. El albedo mostró un aspecto normal al observarlo en el binocular (Figura 8A y 8B) y en ningún fruto se detectó las grietas observadas en los frutos de Julio. Al observar los frutos en el microscopio electrónico de barrido (SEM) se detectaron unas grietas incipientes, de tamaño microscópico, que afectaban a un número reducido de células (Figura 8C y 8D).

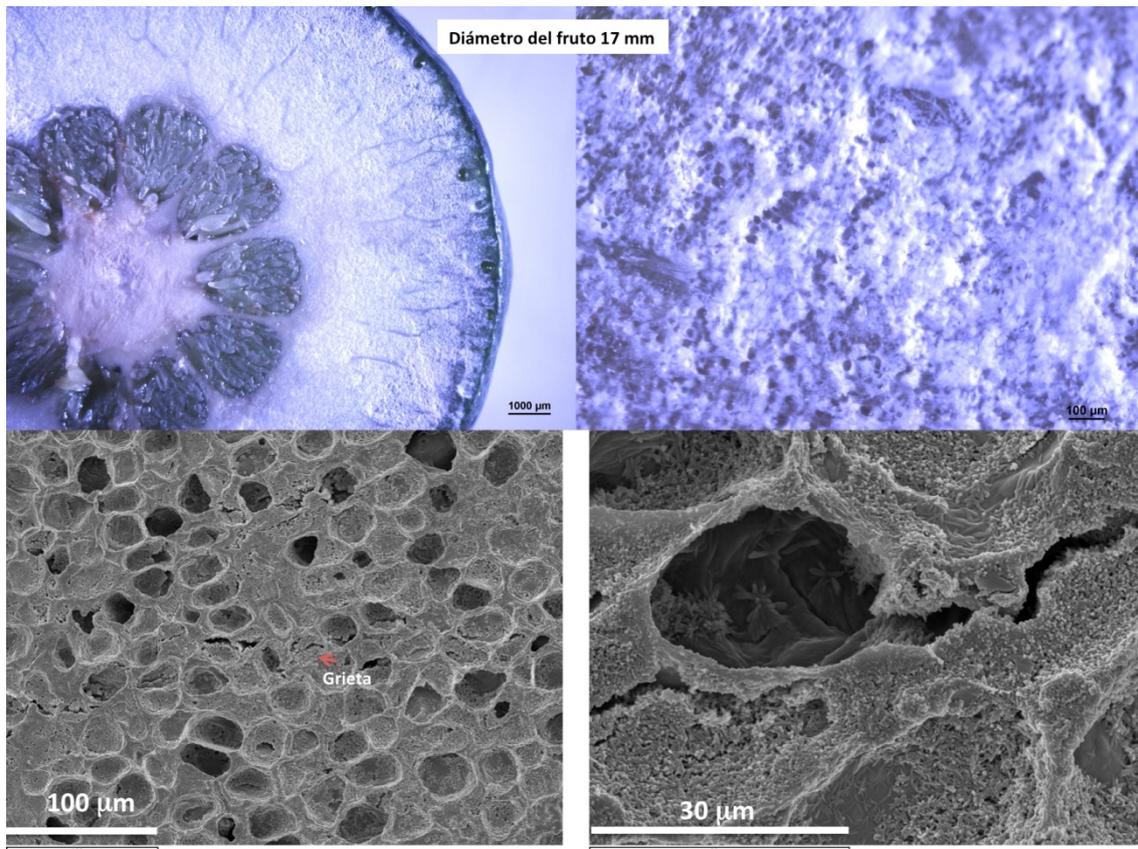


Figura 8. Frutos de naranjo dulce 'Rodhe summer' en el mes de Junio (2014). Su observación en el binocular (A y B) no permite observar las grietas características del creasing. Su observación en el CryoSEM permite observar grietas de un tamaño microscópico (C y D). Diámetro medio de los frutos: 17 mm

De estas observaciones no se puede deducir, directamente, que las grietas sean las responsables del *creasing*, por lo que no se puede asegurar que el inicio de la alteración haya sido antes de junio. Por ello, se realizó un estudio histológico más profundo del mesocarpo mediante el microscopio electrónico de transmisión (TEM) comparando ovarios del árbol sin clareta (CH/CC) con ovarios del árbol con clareta (RS/CL). Los muestreos se realizaron durante el mes de mayo (2015), tomando estados fenológicos precoces del desarrollo del ovario, esto es, flor cerrada, flor en antesis y caída de pétalos.

En los ovarios de flores cerradas, las células del mesocarpo son pequeñas, presentan paredes delgadas y aparecen en disposición compacta (Figura 6A y 6B). Con el transcurso del tiempo las células van siendo desplazadas a zonas más profundas del tejido, aumentan de tamaño, sus paredes celulares se hacen más gruesas y los espacios intercelulares se van ensanchando (Figura 6C-6F). Puesto que la pared celular está compuesta,

fundamentalmente, por carbohidratos (90% en peso seco) y glicoproteínas (10% en peso seco), se determinó la presencia de orgánulos de reserva de estas sustancias. En el estado flor cerrada las células del mesocarpo del árbol CH/CC presentaron mayor cantidad de amiloplastos en el citoplasma, mientras que las células del mesocarpo del árbol RS/CL presentaron orgánulos específicos para almacenar proteínas, vacuolas de almacenamiento de proteínas (Figura 9A, 9B, 10A y 10B). En el transcurso del desarrollo del ovario, antes y caída de pétalos, los amiloplastos perdieron progresivamente los acúmulos de almidón y redujeron su tamaño (Figuras 9C-9F), mientras que las vacuolas de almacenamiento de proteínas desaparecieron (Figura 9D y 9F).

En los 2 árboles, las células muestran una tasa elevada de división celular, y generan nuevas paredes celulares pero también, debido al crecimiento celular, engrosan las paredes ya formadas (Figura 10B, 11B, 11C). Las células mostraron numerosos adelgazamientos de la pared celular con plasmodesmos activos, por los que se observó el tráfico de vesículas (Figura 10B, 11C, 11D). También se observó la presencia de lisosomas vacuolares (Figura 10A). No se observó ninguna deficiencia en la lámina media (Figura 10A, 11A, 11B). No hubo diferencias significativas ni en el tamaño celular, creciente en el transcurso del tiempo, ni en el grosor de la pared celular entre los árboles CH/CC y RS/CL (Figura 12).

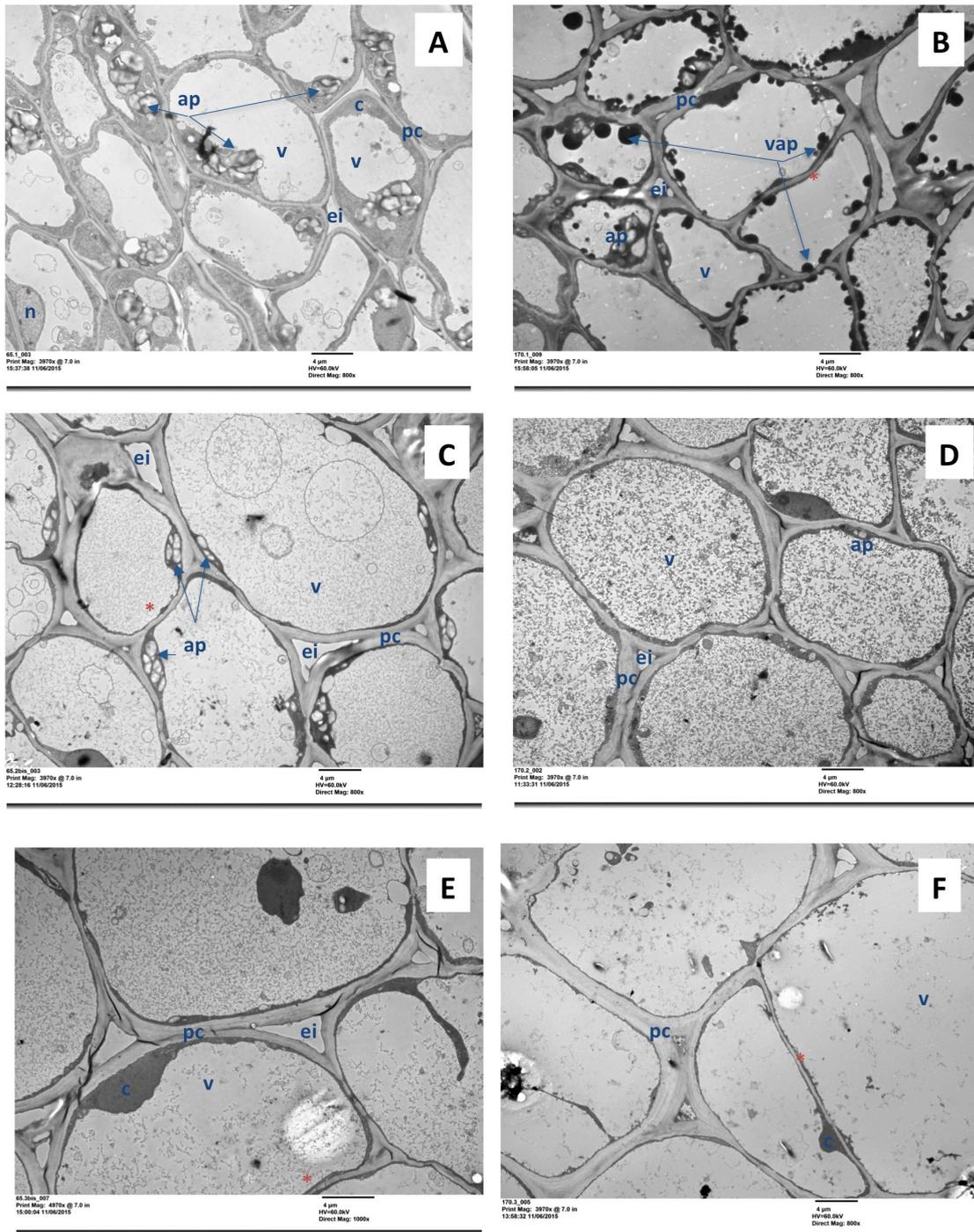


Figura 9. Mesocarpio del árbol sin clareta (*Chislett/CC*) (A), (C), (E), y con clareta (*Rodhe summer/CL*) (B), (D), (F), en los estados fenológicos flor cerrada (A), (B), antesis (C), (D), y caída de pétalos (E), (F). Floración de 2015 (Mayo); ap: amiloplasto; c: citoplasma; ei: espacio intercelular; n: núcleo; pc: pared celular; v: vacuola; vap: vacuola de almacenamiento de proteína; *: nuevas paredes procedentes de la división celular

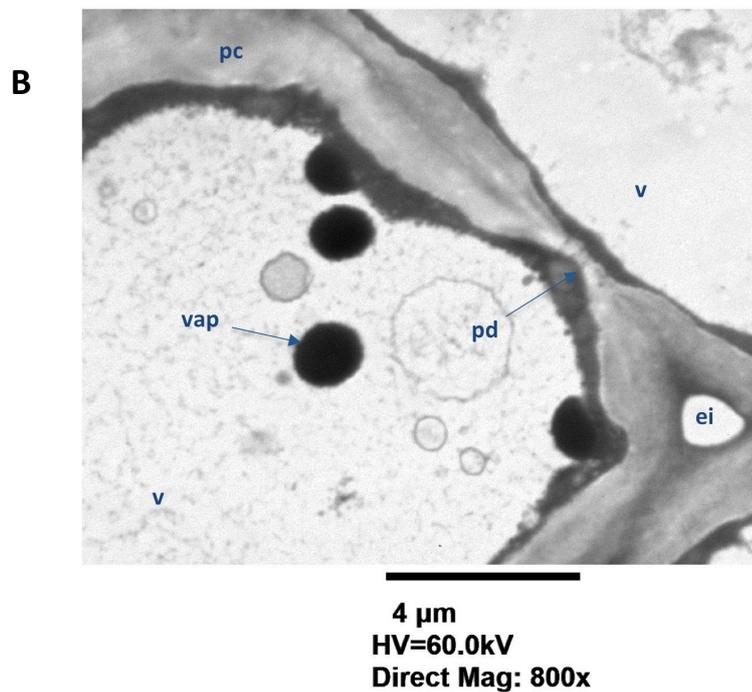


Figura 10. Mesocarpo del árbol sin clareta (Chislett/CC) (A), y con clareta (Rodhe summer/CL) (B), en los estados fenológicos flor cerrada (A), (B). Floración de 2015 (Mayo); ap: amiloplasto; c: citoplasma; cp: cloroplasto; ei: espacio intercelular; li: lisosoma; lm: lamina media; n: núcleo; pc: pared celular; pd: plasmodesmo; v: vacuola; vap: vacuola de almacenamiento de proteínas.

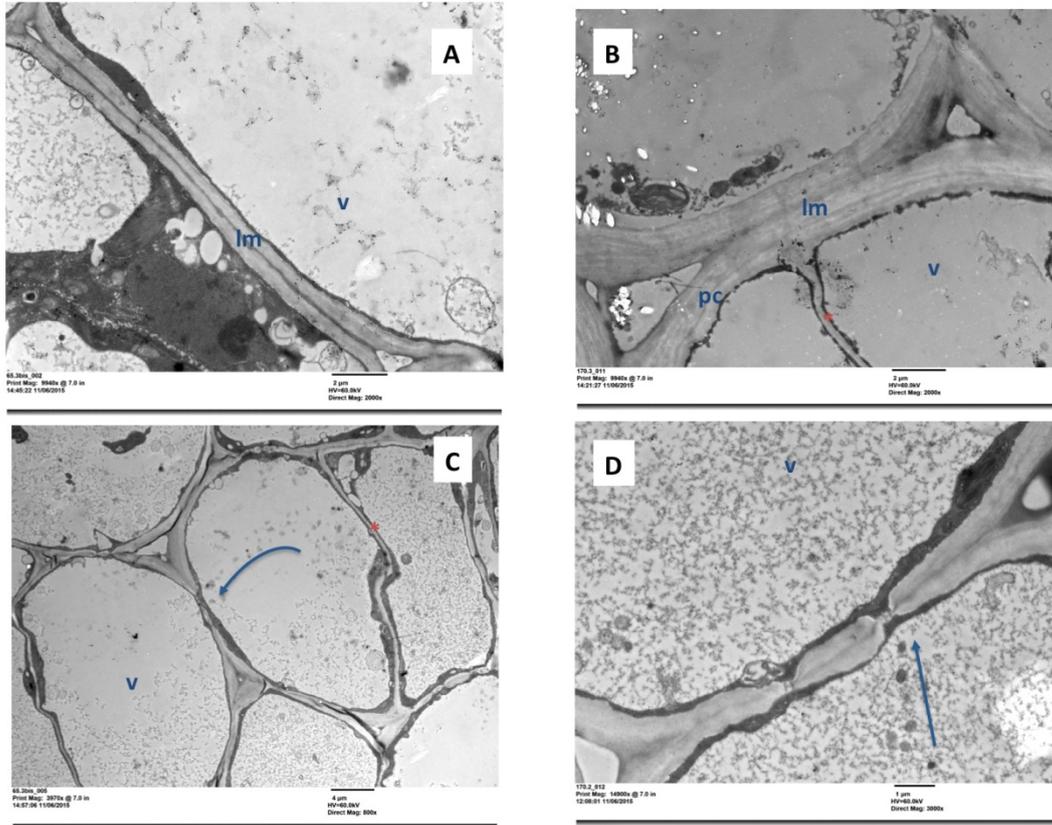


Figura 11. Mesocarpo del árbol sin clareta (Chislett/CC) (A), (C), y con clareta (Rodhe summer/CL) (B), (D), en los estados fenológicos anthesis, (D), y caída de pétalos (A), (B) y (C). Floración de 2015 (Mayo); lm; lámina media; pc: pared celular; v: vacuola. *: nuevas paredes procedentes de la división celular. La flecha indica el transporte de vesículas en la vacuola hacia la pared celular

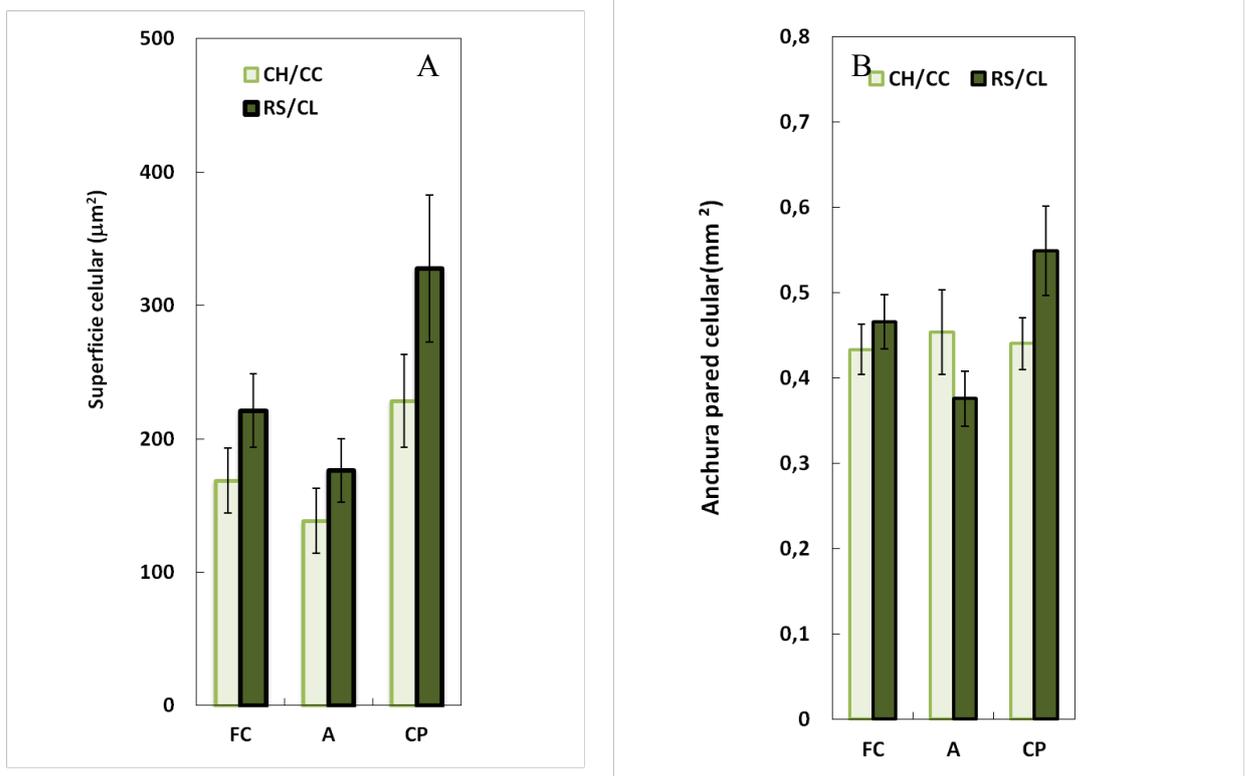


Figura 12. Evolución de la superficie celular (A) y de la anchura de la pared celular (B) de células del mesocarpo del árbol sin clareta (Chislett/CC) y del árbol con clareta (Rodhe summer/CL) durante los estados fenológicos flor cerrada, antesis y caída de pétalos. Floración de 2015 (Mayo)

3. Influencia de las condiciones ambientales.

El porcentaje de frutos afectados de *creasing* depende significativamente del año (Figura 4), lo que indica la existencia de factores ambientales envueltos en la manifestación de la alteración. Dado que el inicio de la alteración sucedió con anterioridad a la fase lineal del desarrollo del fruto (Julio) se estudió los factores ambientales de la primavera de 2013 y 2014.

En general, la primavera de 2013 fue más fresca y húmeda que la primavera de 2014. Así, la temperatura máxima del día (TM) fue significativamente menor durante el mes de abril, $19,9^{\circ}\text{C}$ y $24,4^{\circ}\text{C}$ en promedio para 2013 y 2014 respectivamente, y parte del mes de mayo, $22,7^{\circ}\text{C}$ y $24,3^{\circ}\text{C}$ en promedio para 2013 y 2014 respectivamente (Figura 13A). Además, la temperatura mínima del día (Tm) fue menor en 2013 que en 2014 durante la mayor parte del periodo de estudio, $9,1^{\circ}\text{C}$ y $11,6^{\circ}\text{C}$ en promedio, respectivamente (Figura 13B). La amplitud térmica (TM-Tm) solo difirió significativamente a finales del mes de Abril (datos no mostrados).

La humedad relativa máxima del día (HRM) también difirió significativamente entre los 2 años. Así, mientras en 2013 se mantuvo entre el 75%-95%, en 2014 mostró frecuentes reducciones hasta el 50% (Figura 13C). Las diferencias observadas en la humedad relativa mínima del día (HRm) se concentraron únicamente a finales del mes de abril (Figura 13D). En esa fecha de la primavera de 2013 se produjo un periodo de precipitaciones de 9 días, con un máximo de 28,5 mm d⁻¹ el 27/4 (Figura 13E). Como consecuencia de ello, se redujo la ET₀ (Figura 13F) y la radiación (Figura 13I).

No se observaron diferencias significativas en la velocidad del viento (4,2 y 4,5 km h⁻¹ en 2013 y 2014 respectivamente); la procedencia del viento más frecuente fue, en los 2 años, el Este (33 días y 39 días en 2013 y 2014, respectivamente). Sin embargo, en 2014 hubo más días con viento procedente del Este-Sureste mientras que en 2013 hubo más días con viento procedente del Oeste-Noroeste (Figura 13H).

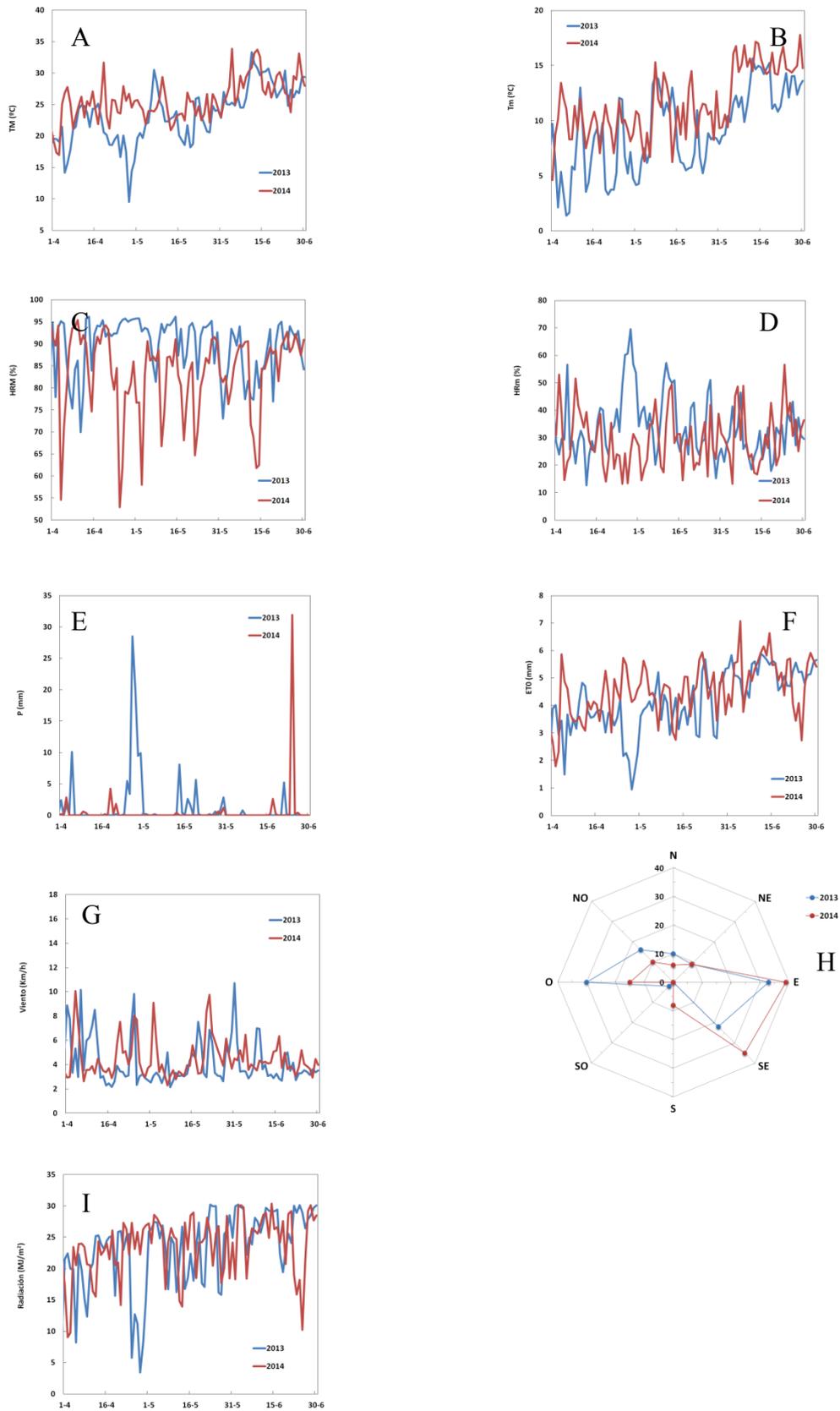


Figura 13. Factores ambientales del periodo Abril-Junio en el año 2013 y 2014. A: Temperatura máxima del día (TM), B: Temperatura mínima del día (Tm), C: Humedad relativa máxima (HRM), D: Humedad relativa mínima, E: Precipitaciones (P), F: Evapotranspiración de referencia (ET0), G: velocidad del viento, H: procedencia del viento (días) e I: radiación solar

5. Discusión.

El porcentaje de frutos afectados de *creasing* depende de la acción conjunta entre factores endógenos, genéticos, anatómicos y fisiológicos, y exógenos, climáticos y culturales. La separación celular que origina la alteración puede ser de células con la pared celular bien formada a causa de un estrés externo, o, por otra parte, de células con una pared celular débil a causa de una formación deficiente. Ello explicaría las diferencias entre cultivares y la variabilidad entre años. En el estudio de las características de la pared celular mediante el TEM no se observaron diferencias significativas en la anchura de la pared entre variedades, en los estados de flor cerrada, anthesis y caída de pétalos. Sin embargo, sí se observó una menor presencia de amiloplastos en las células del mesocarpo de ovarios de ‘Rodhe Summer’, la variedad que presentó más *creasing*, en comparación con los ovarios de Chislett, sin *creasing*. Tanto en la semilla de *Arabidopsis* como en el polen de *Lilium* la acumulación de pectinas en la pared celular ocurre simultáneamente a la degradación del almidón de los amiloplastos (Aouali et al., 2001; Young et al., 2008). Aunque la menor concentración de amiloplastos no se puede interpretar como una deficiencia en carbohidratos (las hojas suministran sacarosa al fruto) que daría lugar a una deficiencia en la síntesis de pectina, Jona et al (1989) correlacionaron la concentración de pectinas y hemicelulosas con la presencia de la alteración, observando que cuando ésta era menor que el 70% del total de polisacáridos de la pared, se producía *creasing*. Por otra parte, Bower (2002) propuso la hipótesis de que el *creasing* es consecuencia de una formación deficiente de pectina durante las semanas posteriores a la caída de pétalos. El metabolismo de los carbohidratos, por ello, y la síntesis de pectinas jugarían un papel esencial en la aparición de la alteración.

La alteración se presentó en todas la variedades de Naranja navel aunque con distinta intensidad. La variedad que presentó la mayor sensibilidad fue ‘Rodhe summer’ y la que menor fue ‘Chislett’. ‘Lanelate’, ‘Powell’ y ‘Barnfield’ presentaron un nivel intermedio. Hasta la fecha, no se tenía ningún registro científico de la sensibilidad de estas variedades al *creasing*. No se han descrito diferencias anatómicas importantes entre estas variedades, con la salvedad del espesor de la corteza. Según los datos del Banco de Germoplasma de la Universidad de Riverside, California, la variedad ‘Rodhe Summer’ presenta el mayor espesor de corteza (53 mm), seguida de Powell (50 mm) y ‘Chislett’, ‘Lanelate’ y ‘Barnfield’ (48 mm). Holtshausen (1981) y Ali et al (2000) indican una relación inversa entre el espesor de la corteza y el *creasing*, aunque Du Plessis y Maritz

(2004) no encuentran esta relación. Otros factores, por tanto, deben explicar la diferente sensibilidad al *creasing*.

El patrón también afecta a la incidencia y severidad del *creasing* en el naranjo dulce (Agustí et al., 2003; Moulds et al., 1995; Treeby et al., 1995). En los dos años de estudio de porcentaje de fruta afectada por *creasing* fue menor en los árboles injertados sobre patrón ‘citrange Carrizo’ lo que coincide con resultados previos (Agustí et al., 2003). En Sudáfrica, la presencia de *creasing* se presenta en mayor medida con patrones de menor vigor, ‘citrange Carrizo’ y ‘citrumelo Swingle’ comparado con patrones de mayor vigor ‘Volkameriana’ y Limón rugoso (du Plessis y Martiz, 2004), lo que coincide con los resultados de este estudio (mandarino ‘Cleopatra’ > citrange ‘Carrizo’). Por el contrario, en Australia, y con condiciones de suelo similares a las de este estudio, el patrón citrange ‘Carrizo’ presentó mayor porcentaje de frutos afectados que el mandarino ‘Cleopatra’ (Treeby et al., 2007).

El porcentaje de fruta afectada depende significativamente del año (Figura 4), hecho que pone de manifiesto la importancia de los factores ambientales. El año de mayor afección de la alteración, 2013, presentó una primavera más húmeda y más fría, durante la floración y hasta la caída fisiológica de frutos, que el 2014. En la zona costera del Sur de Uruguay, con clima subtropical húmedo (Cfa, según la clasificación de Köppen-Geiger), la humedad relativa media alta en plena floración hasta la caída fisiológica de frutos también está relacionada con una mayor incidencia de *creasing* (Gambetta et al., 2000). En Australia, en condiciones de clima árido (BSh) la reducción de la humedad del suelo mediante la restricción del riego redujo la incidencia de *creasing* de 70 % a 55% en el patrón ‘citrange Carrizo’ y de 45% a 37 % en mandarino ‘Cleopatra’ (Treeby et al., 2007), verificando la relación entre la humedad y el porcentaje de *creasing*. De un modo similar, en el año 2013, se registraron cambios bruscos en la precipitación, mientras que en 2014 la precipitación fue prácticamente ausente. Ello se relaciona con observaciones anteriores que indican que períodos de sequía y lento desarrollo en verano seguidos de tiempo húmedo o amplias fluctuaciones de la humedad también incrementan la intensidad (Jones et al., 1967). Huang et al., (2000) demostraron que durante el periodo de sequía, el fruto reajusta su potencial hídrico mediante la acumulación de carbohidratos y la pérdida de rigidez de la pared celular activando la degradación de pectinas. El reajuste osmótico permite la rápida entrada de agua en el fruto cuando el estado hídrico se recupera. Todo ello podría estar relacionado con el aumento del *creasing*, como indican Storey y Treeby (1994) y explicar la influencia de los cambios en la humedad y la temperatura entre años con la intensidad de la alteración.

6. Conclusiones.

- La variedad de naranjo dulce ‘Rodhe Summer’ presenta el mayor porcentaje de frutos afectados de *creasing* mientras que ‘Chislett’ presenta el menor. ‘Barnfield’, ‘Powell’ y ‘Lanelate’ presentan un porcentaje de afección intermedio. Las células del mesocarpo de ‘Rodhe Summer’ presentan menos amiloplastos que las de ‘Chislett’ y no difieren en el grosor de la pared celular entre los estados fenológicos flor cerrada-caída de pétalos.
- Los árboles injertados sobre citrange Carrizo presentan menor porcentaje de frutos con *creasing* que los injertados en citrange C-35, mandarino Cleopatra y Former-Alcaide-5.
- El año de mayor intensidad de la alteración presentó una primavera más húmeda y más fría durante la floración y hasta la caída fisiológica de frutos.

7. Bibliografía.

Abadalla, K. M., Badawi, A. M., & Tewfik, A. A. (1984). Anatomical aspects of creasing development in citrus rind. In *Proc. Int. Soc. Citriculture* .Vol. 1: 267-270.

Agustí, M. (2003). Citricultura. Ediciones Mundi Prensa, Madrid, España.

Agustí, M., Almela, V., & Juan, M. (2004). Alteraciones fisiológicas de los frutos cítricos. *MAPA, Madrid*.

Agustí, M (2004). Fruticultura. Ediciones Mundi Prensa, Madrid, España

Agustí, M., Almela, V., Juan, M., Alferez, F., Tadeo, F. R., & 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., Juan, M., Martínez-Fuentes, A., & Mesejo, C. (2002). Quality of citrus for fresh consumption as affected by water relationships. In *XXVI International Horticultural Congress: Citrus and Other Subtropical and Tropical Fruit Crops: Issues, Advances and 632* , 141-148.

Agustí, M., Martínez-Fuentes, A., & Mesejo, C. (2002). Citrus fruit quality. Physiological basis and techniques of improvement. *Agrociencia*, 6(2), 1-16.

Agustí, M., Almela, V., Juan, M., Mesejo, C., & Martínez-Fuentes, A. (2003). Rootstock influence on the incidence of rind breakdown in 'Navelate'sweet orange. *Journal of horticultural science & biotechnology*, 78(4), 554-558.

Aouali, N., Laporte, P., & Clément, C. (2001). Pectin secretion and distribution in the anther during pollen development in *Lilium*. *Planta*, 213(1), 71-79.

Bieto, J. A., Cubillo, M. T., Mangas, I. B., & Ormaechea, A. G. (2008). *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGraw-Hill Interamericana de España ,Vol 1 :3-25.

Bower, J. P. (2002). The physiological control of citrus creasing. In *XXVI International Horticultural Congress: Citrus and Other Subtropical and Tropical Fruit Crops: Issues, Advances and 632*, 111-115.

Du Plessis, S.F. & J.G.J Maritz. (2004). 258-530. Factors affecting the occurrence of creasing in citrus fruit. *Proc. Intl. Soc. Citriculture*.1, 258-530.

Gambetta, G., Telias, A., Arbiza, H., Espino, M., Franco, J., Rivas, F., & Gravina, A. (2002). "Creasing" en naranja "Washington" navel en Uruguay. Incidencia, severidad y control. *Agrociencia*, 6(2), 17-24.

Gambetta, G. (2009). *Control endógeno y exógeno de la maduración externa de los frutos cítricos* (Doctoral dissertation, Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia España).

Greenberg, J., Kaplan, I., Fainzack, M., Egozi, Y., & Giladi, B. (2006). Effects of auxins sprays on yield, fruit size, fruit splitting and the incidence of creasing of Nova mandarin. *Acta Hort*, 727, 249-254.

Greenberg, J., Mossak, I., & Kaplan, I. (2000). Effects of NAA and 2, 4-DP on fruit size, yield and creasing of 'Newhall' and 'Carter' navel oranges. In *Proc. Int. Soc. Citricult. IX Congress*, 569-571.

Holtzhausen, L. C. (1982). Creasing: formulating a hypothesis. In *Proceedings of the International Society of Citriculture/[International Citrus Congress, November 9-12, 1981, Tokyo, Japan; K. Matsumoto, editor]*. Shimizu, Japan: International Society of Citriculture, 1982-1983.

Huang, X. M., Huang, H. B., & Gao, F. F. (2000). The growth potential generated in citrus fruit under water stress and its relevant mechanisms. *Scientia Horticulturae*, 83(3), 227-240.

Hussain, Z. (2014). Role of polyamines and ethylene in creasing of sweet orange fruit (Doctoral dissertation, Curtin University).

Hussain, Z., & Singh, Z. (2015). Involvement of polyamines in creasing of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] fruit. *Scientia Horticulturae*, 190, 203-210.

Jones, W. W., Embleton, T. W., Garber, M. J., & Cree, C. B. (1967). *Creasing of orange fruit*. University of California, 231-243.

Lado, J., Cronje, P., Alquézar, B., Page, A., Manzi, M., Gómez-Cadenas, A., Stead, A.D., Zacarías, L., & Rodrigo, M. J. (2015). Fruit shading enhances peel color, carotenes accumulation and chromoplast differentiation in red grapefruit. *Physiologia plantarum*.

Le Roux, J. C., Crous, P.A., (1938). Effect of fertilizer on creasing of Mediterranean sweet oranges. *Farming* 5. Afr. 13, 66-68.

Li, J., Zhang, P., Chen, J., Yao, Q., & Jiang, Y. (2009). Cellular wall metabolism in citrus fruit pericarp and its relation to creasing fruit rate. *Scientia horticulturae*, 122(1), 45-50.

Monselise, S. P., Weiser, M., Shafir, N., Goren, R., & Goldschmidt, E. E. (1976). Creasing of orange peel--physiology and control. *Journal of horticultural science*.

Pham, T. T. M. (2009). Pre-harvest factors affecting fruit quality in sweet oranges with an emphasis on albedo breakdown.

Phiri, Z. P. (2010). *Creasing studies in citrus* (Doctoral dissertation, Stellenbosch: University of Stellenbosch).

Storey, R., & Treeby, M. T. (2000). Seasonal changes in nutrient concentrations of navel orange fruit. *Scientia Horticulturae*, 84(1), 67-82.

Swingle, W. T. (1967). The botany of Citrus and its wild relatives. *The citrus industry*., 190-430.

Tadeo, F. R., Moya, J. L., Domingo, J.I., Talon, M & Primo-Millo, E.,(2003). *Histología y citología de cítricos*. Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal* (Vol. 10). Universitat Jaume I 588-629.

Treeby, M. T., Henriod, R. E., Bevington, K. B., Milne, D. J., & Storey, R. (2007). Irrigation management and rootstock effects on navel orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] fruit quality. *Agricultural Water Management*, 91(1), 24-32.

Treeby, M. T., Milne, D. J., Storey, R., Bevington, K. B., Loveys, B. R., & Hutton, R. (2000). Creasing in Australia: causes and control. In *ISC Congress*.

Young, R. E., McFarlane, H. E., Hahn, M. G., Western, T. L., Haughn, G. W., & Samuels, A. L. (2008). Analysis of the Golgi apparatus in *Arabidopsis* seed coat cells during polarized secretion of pectin-rich mucilage. *The Plant Cell*, 20(6), 1623-1638.