

Aplicación de bajas temperaturas en la postcosecha de los frutos cítricos: factores involucrados en la tolerancia al daño por frío.

Joanna Lado^{1,2}, Pedro Pintos¹, Eleana Luque¹, Ana Inés Moltini^{1,2}, Giuliana Gambetta³, Matías Salvo⁴, Ana Arruabarrena^{1,4}.

¹Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. INIA Salto Grande. Uruguay.

²Plataforma de Agroalimentos, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria.

³ Departamento de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República.

⁴ Unidad de Biotecnología, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

Contacto: jlado@inial.org.uy

1. Introducción

La presencia de las moscas de la fruta (*Ceratitis capitata* y *Anastrepha fraterculus*) en el territorio nacional conlleva la necesidad de un tratamiento cuarentenario para prevenir la aparición de larvas vivas en los frutos cítricos exportados a Estados Unidos. Los protocolos de exportación sugieren la posible adopción de tres tipos de tratamientos para los frutos cítricos: irradiación (rayos gamma), bromuro de metilo y bajas temperaturas (tratamiento de frío) (USDA-APHIS). Los ensayos realizados en INIA Salto Grande han demostrado que las bajas temperaturas constituyen la opción más recomendable como tratamiento cuarentenario, provocando cambios menores en el producto final y favoreciendo también un menor crecimiento de patógenos durante el transporte refrigerado.

Sin embargo, la mayoría de los frutos cítricos son sensibles a las bajas temperaturas, desarrollando diversos síntomas de daño en la piel, conocidos como daño por frío (DF), los cuales no afectan la calidad interna del producto, pero sí deterioran la calidad comercial del mismo (Lafuente y Zacarías, 2006). Por lo tanto, el conocimiento de los principales factores o características de la fruta asociadas con una mayor tolerancia a las bajas temperaturas, brindaría información muy valiosa a la hora de gestionar la fruta según los diferentes destinos. Durante la experiencia de exportación durante varios años Estados Unidos con aplicación de tratamiento de frío, se han observado diferentes tipos de daño y niveles de incidencia de DF, variando notablemente entre años, especies y variedades cítricas.

Actualmente, el proceso de aplicación de bajas temperaturas (pre-enfriado, transporte en contenedores, circulación de aire, etc.) es diferente entre empresas exportadoras; esto puede colaborar en las diferencias en los niveles de DF registrados, así como también son clave las diferentes condiciones ambientales y de manejo durante el desarrollo de los frutos. Diferentes trabajos han demostrado una asociación entre la "condición" de la cáscara (composición y estructura celular y del tejido) con la sensibilidad a diferentes desordenes fisiológicos (Holland et al., 2005; Holland, Nunes et al. 2012; Lado et al., 2015; Sanchez-Ballesta et al., 2006), entre ellos el DF. Es más, la capacidad antioxidante del

tejido se ha descrito como clave para contrarrestar los síntomas de DF en los cítricos (Lado et al., 2016; Lafuente et al., 2005; Sala y Lafuente, 2000).

Para las condiciones de Uruguay, aún se desconoce el posible impacto de las condiciones ambientales y de manejo durante el desarrollo y maduración del fruto sobre su sensibilidad a bajas temperaturas. Paralelamente, durante la postcosecha se pueden aplicar medidas que ayuden a mitigar o enlentecer el desarrollo de síntomas, entre las que destaca el encerado con diferentes recubrimientos (Dou, 2004; Obenland et al., 1997) y la aplicación de hormonas como las Giberelinas (GAs). A nivel experimental y en condiciones comerciales hemos demostrado un efecto positivo de las ceras en enlentecer y minimizar la aparición de síntomas de DF durante el almacenamiento refrigerado, sin observar diferencias entre el nivel de sólidos (12 y 18%) para un mismo tipo de composición (polietileno oxidado y goma laca) (Lado et al., 2016). Sin embargo, sí hemos observado un efecto de la composición de la cera sobre la ocurrencia de DF, dependiendo de la variedad en estudio (Fernández et al., 2019).

A continuación, se presenta un resumen de los principales resultados obtenidos en relación con el estudio de los factores que podrían influir en el desarrollo de tolerancia al daño por frío postcosecha y también un abordaje de los posibles mecanismos endógenos que regulan este proceso de respuesta. Pretendemos con estos trabajos aportar conocimientos sobre algunos manejos agronómicos a considerar para inducir en los frutos una mayor tolerancia a las bajas temperaturas, minimizando la incidencia de DF. Conociendo los factores protectores en una fruta más tolerante, sería posible en el momento de la cosecha, tomar decisiones sobre el destino comercial de dicho embarque. En este sentido, se evaluó la expresión relativa de tres genes llamados C-repeat binding factors (CBFs), los cuales han sido descritos como reguladores de las respuestas a bajas temperaturas en otras plantas (Miura y Furumoto, 2013; Shi et al., 2018). Aún se desconoce su posible rol en los cítricos y podrían servir como marcadores o indicadores de tolerancia o incluso como blanco para futuras modificaciones genéticas en busca de genotipos resistentes.

2. Materiales y Métodos.

2.1. *Evaluación de sensibilidad, efecto del sombreado de frutos y estudio de posibles mecanismos implicados en la tolerancia al daño por frío postcosecha*

Los frutos de las especies/variedades estudiadas fueron: limones (*Citrus limon*) cv. 'Lisbon' y cv. 'Meyer' (*C. limon* x *C. sinensis*), pomelos (*C. paradisi*) cv. 'Star Ruby' y cv. 'Marsh', y naranjas (*C. sinensis*) cv. 'Washington Navel', cv. 'Navelina' y cv. 'Salustiana' y mandarinas (*C. reticulata*) cv. 'Nova' y cv. 'Afourer' fueron cosechados en su madurez comercial. Se evaluó color externo y calidad interna (sólidos solubles y acidez) en cada caso y los frutos fueron almacenados a $1 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Los trabajos de evaluación de daño y expresión génica fueron realizados durante dos años, mostrándose resultados que resumen el comportamiento en ambos años de evaluaciones.

La incidencia de DF en la piel de los frutos se determinó mediante el índice de DF (IDF). Los frutos se clasificaron mediante una escala visual que contempla incidencia y severidad según el siguiente criterio: 0=sin daños visibles; 1= daños ligeros, abarcando

hasta un 10% de la superficie del fruto; 2=daños moderados, abarcando entre 10 y 50% de la superficie del fruto y 3= daños severos, abarcando más del 50% de la superficie del fruto (Lafuente et al., 1997; Figura 1). El IDF se calculó mediante la fórmula: \sum (número de frutos de cada categoría x valor de cada categoría) / número total de frutos examinados.

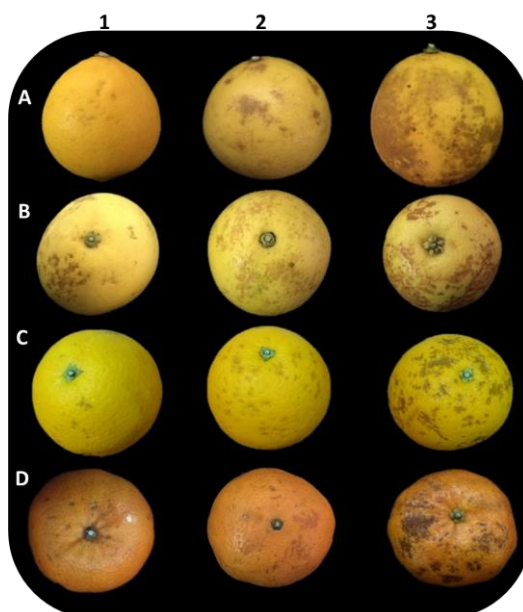


Figura 1. Representación de la escala de índice de daño por frío en Meyer (A), pomelo Marsh (B), naranja Valencia (C) y Mandarina Común(D).

Una vez cosechados y sin pasar por tratamientos de fungicidas ni encerado, los frutos fueron sometidos al **tratamiento cuarentenario según protocolo para EEUU** ("Treatment Manual, Plant Protection and Quarantine"; T107-A-1; USDA-APHIS) y simulando una **dobles cuarentena por frío** más la posterior vida mostrador de 7 días. El diseño experimental fue completamente aleatorio para todos los experimentos, con cinco repeticiones de 15 o 20 frutas por variedad, realizándose un ANOVA de los datos para evaluar el efecto de los tratamientos sobre el DF y una comparación de medias mediante la prueba Tukey ($p < 0,05$).

Para realizar el estudio se extrajo ARN del flavedo, se generó ADN copia y se aplicó la herramienta de PCR real time para cuantificar la expresión relativa de tres genes presentes en cítricos (*CBF1*, *CBF2* y *CBF3*). Estas evaluaciones se realizaron de forma paralela a la cuantificación de DF tras 1, 5, 14, 28, 35 y 58 días de almacenamiento a 1°C.

El análisis se dividió en dos etapas, una primera en donde se comparan cultivares sensibles/tolerantes, evaluándose la incidencia de DF y también la expresión de los tres genes *CBFs* durante el almacenamiento y una segunda etapa donde se seleccionan aquellos frutos más sensibles al daño para modificar la sensibilidad mediante un manejo postcosecha que consiste en cubrir los frutos de la luz durante su desarrollo en la planta (frutos tapados) (Lado et al., 2015), los cuales resultaron ser significativamente más resistentes al DF durante el almacenamiento. A continuación, se presenta un resumen breve de los principales resultados obtenidos.

3. Resultados

3.1. Sensibilidad diferencial al daño por frío y cambios en posibles genes reguladores

Para los dos tipos de limones evaluados (*Citrus limon* cv. 'Lisbon' y *Citrus meyeri* cv. 'Meyer'), se observaron diferencias significativas en sensibilidad al DF; mientras que Lisbon presentó un índice de daño muy bajo (0,28) tras 58 días de almacenamiento, en el caso del híbrido Meyer se observó una sensibilidad muy temprana (en algún año presentó daño ya a los 14 días de almacenamiento) y alcanzó un índice de daño elevado (1,24). Se destaca un buen comportamiento del cv. 'Lisbon', el cual se comportó como tolerante al daño durante los 58 días de almacenamiento a temperatura cuarentenaria.

Se evaluaron también los cambios en la expresión de genes *CBFs* durante diferentes tiempos de almacenamiento, observándose en la mayoría de los casos y principalmente en aquellos cultivares tolerantes al daño, una inducción temprana (1 o 5 días en frío) de estos genes. En el caso de limones, únicamente *CBF1* mostró cambios importantes en la expresión en Lisbon, mientras que Meyer mostró o una reducción o incluso ausencia de cambios en la expresión durante el almacenamiento, para los tres genes evaluados.

En los pomelos (*Citrus paradisi*) rojo Star Ruby y blanco Marsh ocurre algo similar a los limones; en el caso de Star Ruby resultó más tolerante al DF que Marsh, iniciándose los daños en forma posterior y registrando un IDF de 0,57 al finalizar el almacenamiento, en comparación con 1,81 en Marsh. En relación con la expresión de los genes, se observó un aumento en la expresión de *CBF1* y cambios menores en *CBF2* y *CBF3* tras 1 y 5 días de frío. Sin embargo, no se observaron cambios relevantes en la expresión de estos genes en pomelo Marsh, coincidiendo con las diferencias en DF observadas.

Se observaron diferencias en la sensibilidad al DF entre las naranjas (*Citrus sinensis*) evaluadas. W. Navel y Salustiana presentaron los mayores valores de IDF al finalizar los 58 días de almacenamiento, en comparación con un menor DF en Navelina. *CBF1* (en W. Navel y Navelina) y *CBF3* (en W. Navel) mostraron un aumento en su expresión en luego de 1 y 5 días de frío, lo cual no ocurrió en el cv. Salustiana (en donde se indujo únicamente *CBF2* tras 1 día de frío), coincidiendo con una alta incidencia de DF al finalizar el almacenamiento en el este último.

En el caso de las mandarinas, el comportamiento fue similar entre las estudiadas en cuanto al desarrollo de DF, siendo más intenso tras 58 días de almacenamiento, sin observarse síntomas a los 28 días (con excepción de daños leves en Clementina de Nules). En el mismo sentido, la expresión de los genes *CBFs* fue similar entre ellas, con una mayor expresión relativa en Afourer para los tres genes durante todo el período de almacenamiento. Cabe destacar que el único que registró una inducción durante el almacenamiento fue *CBF1*, mientras que *CBF2* y *CBF3* redujeron su expresión en todos los cultivares estudiados (datos no presentados). *CBF1* presentó una inducción en Nova y Afourer tras 1 y 5 días de frío, respectivamente, mientras que luego se mantuvo sin cambios. Para *CBF2* se observó una reducción importante de la expresión durante el

almacenamiento. *CBF3* mostró una mayor expresión siempre en Afourer, ya desde el momento de la cosecha, registrando una reducción posterior en su expresión.

3.2. Efecto del sombreado en la incidencia de daño por frío y en la expresión de genes reguladores de la respuesta a bajas temperaturas

Limones

Dentro de las especies y cultivares que resultaron más sensibles al DF postcosecha, como pomelos, limón y naranja Salustiana, se observó un efecto muy marcado del tapado de fruta durante el desarrollo en la planta. La ausencia de luz durante un período extenso de 3 meses de crecimiento y maduración del fruto parecería inducir tolerancia a las bajas temperaturas. Este efecto fue visible en limones sensibles como el cv. Meyer, en el cual se observó DF a partir de los 14 días de almacenamiento en frutos no tapados, y se retrasó hasta los 28 días en frutos tapados, coincidiendo en este punto de muestreo con una incidencia y severidad 50% menor en los frutos tapados (Cuadro 1, Figura 2). Por otro lado, el limón Lisbon mostró en general una buena tolerancia al daño por frío, y únicamente se observaron diferencias entre frutos tapados y no tapados tras 58 días en frío (Cuadro 1, Figura 2).

En el caso de los cambios a nivel de los genes reguladores, Lisbon registró una inducción de *CBF1* y *CBF3* en frutos tapados, siendo la misma de una magnitud menor en frutos no tapados. No se observaron cambios importantes en *CBF2* en etapas tempranas del almacenamiento. Por otro lado, Meyer mostró inducción de los tres genes en frutos tapados, lo que no ocurrió en frutos no tapados, con mayores cambios relativos en *CBF3* (Figura 3). *CBF2* no varió tampoco su expresión en este cultivar durante el almacenamiento (Figura 3).

Cuadro 1. Índice de daño por frío (IDF) durante el almacenamiento a 1°C en frutos de diferentes especies y variedades cítricas tapados y no tapados durante su desarrollo.

	5d	14d	28d	35d	58d
Limón					
Limon Lisbon No Tap	-	0,05 a	0,11 a	0,11 a	0,20 a
Limon Lisbon Tap	-	0,02 a	0,08 a	0,09 a	0,14 b
Limon Meyer No Tap	-	0,01 a	1,39 b	1,91 b	2,11 a
Limon Meyer Tap	-	-	0,64 ab	0,75 a	2,06 a
Pomelo					
Pomelo Marsh No Tap	-	0,53 a	1,55 a	2,50 a	2,90 a
Pomelo Marsh Tap	-	0,07 b	0,29 b	1,70 b	2,68 b
Pomelo Star Ruby No Tap	-	0,15 a	0,92 a	1,83 a	2,68 a
Pomelo Star Ruby Tap	-	0,00 b	0,13 b	1,00 b	1,20 b
Mandarinas e híbridos					
Nova No Tap	-	0,04 a	0,11 a	0,11 a	0,69 a
Nova Tap	-	0,01 a	0,01 a	0,01 a	0,11 b
Clementina No Tap	-	-	0,40 a	0,63 a	0,63 a
Clementina Tap	-	-	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Afourer No tap	-	-	0,03 a	0,04 a	0,23 a
Afourer Tap	-	-	-	-	0,03 b
Naranja					

Salustiana No Tap	-	-	0,12 a	0,26 a	0,82 a
Salustiana Tap	-	-	-	-	-

Medias seguidas de igual letra entre No Tap y Tap no difieren significativamente ($p < 0,05$, Tukey).



Figura 2. Síntomas de DF en frutos tapados y no tapados de limones Lisbon y Meyer en cosecha y luego de 28 y 58 días a 1°C.

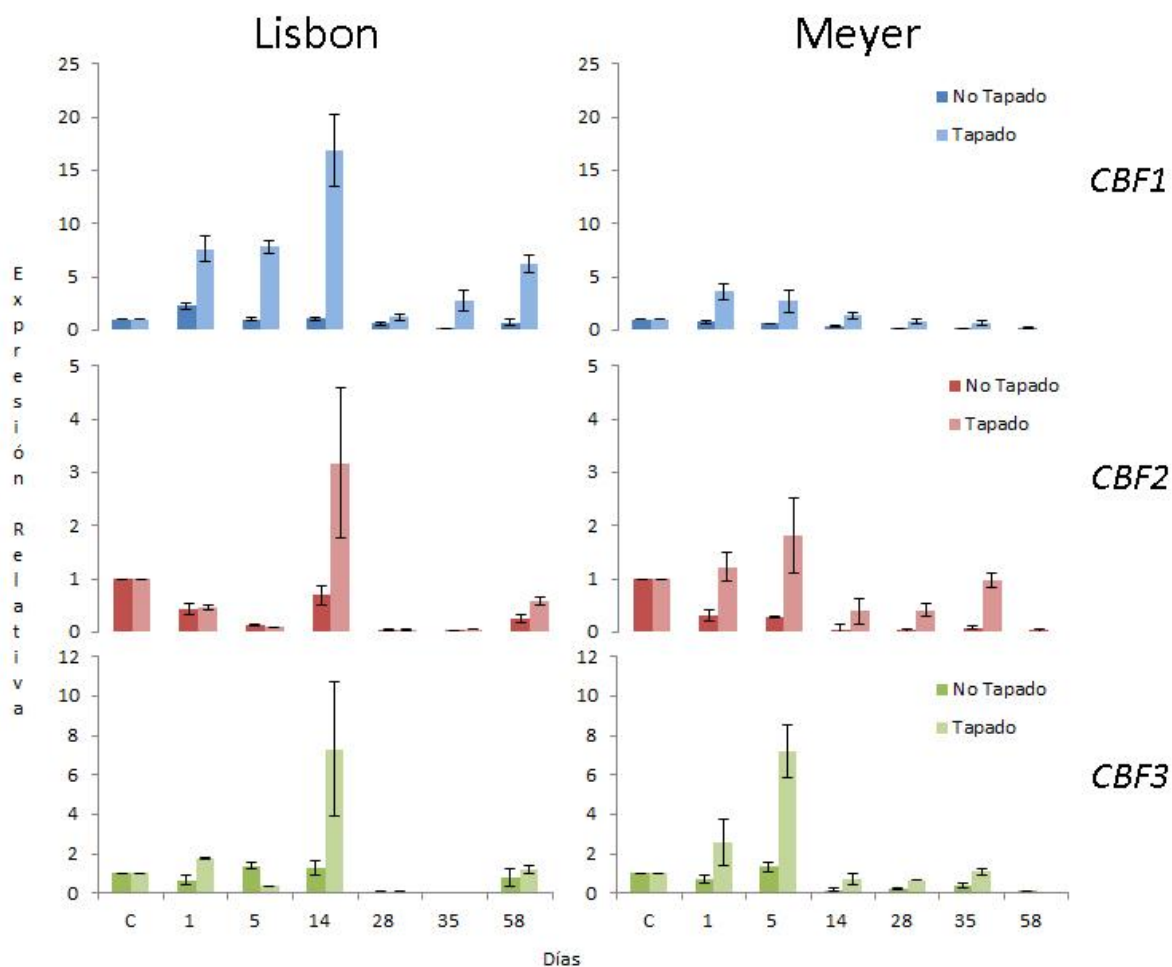


Figura 3. Expresión relativa de genes *CBF1*, *CBF2* y *CBF3* en frutos tapados y no tapados de limón Lisbon y Meyer durante el almacenamiento en frío. C: cosecha.

Pomelos

El pomelo rojo Star Ruby y el blanco Marsh se observó un efecto similar del tapado (Cuadro 1). En el caso de Marsh, la aparición de los primeros síntomas de daño ocurrió a los 14 días en frío, pero la incidencia y severidad siempre fue mayor en frutos no tapados durante todo el período de almacenamiento. El tapado de frutos permitió extender a 28 días el tiempo de almacenamiento sin síntomas importantes de daño. Algo similar ocurrió en Star Ruby, pero el daño se inició más tarde en frutos tapados, registrándose síntomas recién a partir de los 35 días, mientras que en los no tapados ya eran importantes tras 20 días en frío (Cuadro 1).

En el caso de los pomelos, los frutos de Star Ruby que se desarrollan en oscuridad responden con cambios tempranos y más intensos tras 1 día de almacenamiento en frío, principalmente para los genes *CBF1* y *CBF3*, no observándose ninguna inducción en *CBF2*. Sin embargo, esto no ocurrió en Marsh, en donde únicamente se registró un cambio en la expresión de *CBF1* en frutos no tapados.

Naranja

En Salustiana no se observaron diferencias en la coloración entre frutos tapados y frutos expuestos a la luz (Figura 4), existiendo una gran diferencia en la sensibilidad al DF. Los frutos tapados no registraron daños, mientras que los mismos fueron importantes en frutos no tapados, apareciendo tras 28 días de almacenamiento e intensificándose a los 58 días (Figura 4, Cuadro 1).



Figura 4. Síntomas de DF en frutos tapados y no tapados de naranja Salustiana en cosecha y luego de 28 y 58 días a 1°C.

Se observó un cambio importante en frutos tapados en la expresión de *CBF2*, a diferencia de lo observado en otras especies cítricas, y también en *CBF3* tras un día de almacenamiento (Figura 5). Esto no ocurrió en ningún momento en frutos no tapados, siendo más intenso el daño en estos últimos (Cuadro 1, Figura 4).

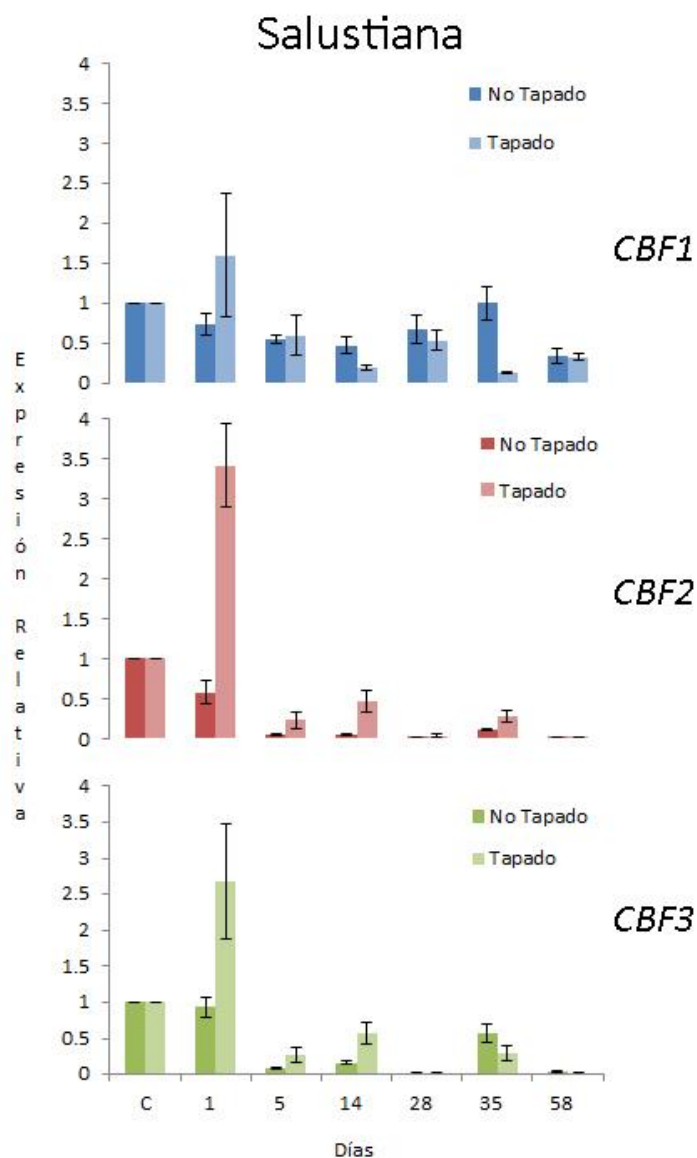


Figura 5. Expresión relativa de genes *CBF1*, *CBF2* y *CBF3* en frutos tapados y no tapados de naranja Salustiana durante el almacenamiento en frío. C: cosecha.

Mandarinas

En el caso de las mandarinas estudiadas (Nova, Clementina de Nules y Afourer), se observó nuevamente una menor incidencia de daño en frutos tapados, aunque la magnitud del efecto fue menor que en pomelos y limones. Cabe destacar que, en mandarinas, con excepción de Nova, se observó una coloración de la piel menos intensa, tanto el Clementina como en Afourer (Figura 6).

Se observó un retraso en el inicio de los síntomas de DF en Afourer y Nova y una menor

incidencia y severidad del daño durante todo el almacenamiento en Nova en los frutos tapados. En el caso de Clementina, los daños en los frutos no tapados se iniciaron tras 28 días de almacenamiento, intensificándose luego, mientras que los frutos tapados no presentaron síntomas de daño. En cuanto a los genes de regulación de la respuesta a bajas temperaturas no se observó un comportamiento claro en respuesta a las bajas temperaturas en mandarinas, con excepción de *CBF3* en Afourer que mostró una inducción (x2) tras un día de almacenamiento en frío, únicamente en frutos tapados.

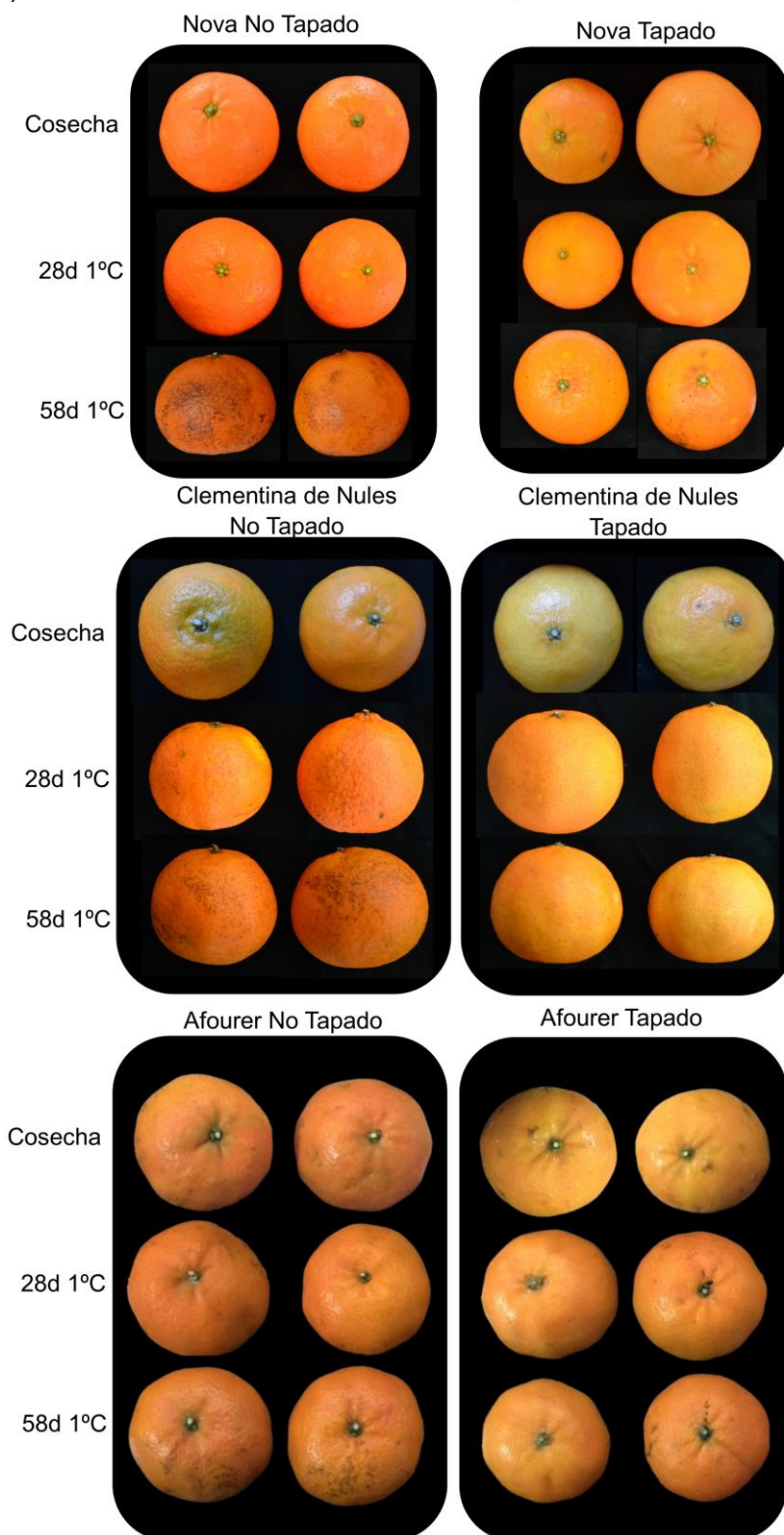


Figura 6. Síntomas de DF en frutos tapados y no tapados de mandarinas Nova, Clementina de Nules y Afourer en cosecha y luego de 28 y 58 días a 1°C.

Conclusiones

En la mayoría de las especies y cultivares estudiados (limones, naranjas y pomelos) existió una inducción temprana (1-5 días en frío) en la expresión de estos genes, con una reducción posterior durante el resto del almacenamiento. Esta inducción no se observa tan claramente en mandarinas, así como tampoco en los cultivares más sensibles al daño como limón Meyer y pomelo Marsh.

Los cultivares más tolerantes al daño (Lisbon, Navelina y Star Ruby) presentaron en general una inducción temprana de *CBF1* y *CBF3*, mientras que la expresión de *CBF2* parecería variar en forma independiente de la temperatura. La misma inducción se observó en frutos tapados de algunos cultivares, coincidiendo con un enlentecimiento o incluso ausencia de síntomas de DF.

En naranja Salustiana *CBF2* y *CBF3* podrían regular la respuesta al frío y la mayor tolerancia observada al daño en frutos tapados.

En limón Meyer y en el pomelo Marsh, no se observaron cambios importantes en la expresión de los tres genes en respuesta al frío, lo cual coincide con una mayor incidencia de DF en estos cultivares. Star Ruby mostró inducción temprana de los tres genes *CBFs* y una menor incidencia de daño en comparación con Marsh.

Los cambios en la expresión de los genes *CBFs* en frutos cítricos podrían constituirse como marcadores tempranos (1-5 días) de tolerancia al frío en almacenamiento extendido, con énfasis en *CBF1* y *CBF3*, aunque dependiendo siempre de la especie y cultivar. Aquellos más sensibles al frío muestran muy pocos o ausencia de cambios en la expresión de estos genes durante el almacenamiento.

Bibliografía

- Dou, H. (2004). Effect of Coating Application on Chilling Injury of Grapefruit Cultivars. *HortScience*, 39(3), 558–561.
- Fernández et al. (2019). Nuevos recubrimientos y efecto en la calidad postcosecha de frutos cítricos para exportación. Informe de Resultados, Red Sectorial para la Innovación en Postcosecha de Cítricos.
- Holland, N., Menezes, H. C., & Lafuente, M. T. (2005). Carbohydrate metabolism as related to high-temperature conditioning and peel disorders occurring during storage of citrus fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8790–8796. <https://doi.org/10.1021/jf051293o>
- Holland, N., Nunes, F. L. D. S., de Medeiros, I. U. D., & Lafuente, M. T. (2012). High-temperature conditioning induces chilling tolerance in mandarin fruit: a cell wall approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(15), 3039–3045. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5721>
- Lado, J., Rodrigo, M. J., Cronje, P., & Zacarías, L. (2015). Involvement of lycopene in the induction of tolerance to chilling injury in grapefruit. *Postharvest Biology and Technology*, 100, 176–186. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.10.002>
- Lado, J., Rodrigo, M. J., López-Climent, M., Gómez-Cadenas, A., & Zacarías, L. (2016). Implication of the antioxidant system in chilling injury tolerance in the red peel of grapefruit. *Postharvest Biology and Technology*, 111, 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.09.013>
- Lado, J. Pintos, P., Luque, E., Moltini Al. 2016. Aplicación de bajas temperaturas en la poscosecha

- de los frutos cítricos: Estrategias para minimizar el daño por frío. Poscosecha de Frutos Cítricos. SAD 770: 3-15.
- Lafuente, M., Zacarías, L., Sala, J., Sánchez-Ballesta, M. T., Gosalbes, M., Marcos, J., González-Candelas, L., Lluch, Y., & Granell, A. (2005). Understanding the basis of chilling injury in citrus fruit. *Acta Horticulturae*, 682, 831–842.
- Lafuente, M. T., Martínez-Téllez, M. A., & Zacarías, L. (1997). Abscisic Acid in the Response of ' Fortune ' Mandarins to Chilling . Effect of Maturity and High-Temperature Conditioning. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73, 494–502.
- Lafuente, María Teresa, & Zacarías, L. (2006). Postharvest physiological disorders in citrus fruit. *Stewart Postharvest Review*, 2(1), 1–9.
- Miura, K., & Furumoto, T. (2013). Cold signaling and cold response in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 5312–5337. <https://doi.org/10.3390/ijms14035312>
- Obenland, D., Margosan, D., Houck, L., & Aung, L. (1997). Essential oils and chilling injury in lemon. *HortScience*, 32(1), 108–111.
- Sala, J. M., & Lafuente, M. T. (2000). Catalase enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruits to chilling. *Postharvest Biology and Technology*, 20(1), 81–89. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00115-0](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00115-0)
- Sánchez-Ballesta, M. T., Gosalbes, M. J., Rodrigo, M. J., Granell, A., Zacarías, L., & Lafuente, M. T. (2006). Characterization of a β -1,3-glucanase from citrus fruit as related to chilling-induced injury and ethylene production. *Postharvest Biology and Technology*, 40(2), 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.01.002>
- Shi, Y., Ding, Y., & Yang, S. (2018). Molecular Regulation of CBF Signaling in Cold Acclimation. *Trends in Plant Science*, xx, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.04.002>