

(S2-P191)

**EFFECTO DE LA CONSERVACIÓN EN FRÍO Y MANIPULACIÓN  
POST-COSECHA DE FRUTOS DE *Citrus limon* (CV. FINO-49) SOBRE  
LOS NIVELES DE FLAVONOIDES Y RESISTENCIA A *Penicillium  
digitatum***

**JOSE ANTONIO DEL RÍO <sup>(1)</sup>, IGNACIO PORRAS <sup>(2)</sup>, DOMINGO MARTÍNEZ<sup>(1)</sup>,  
PEDRO GÓMEZ <sup>(1)</sup>, LICINIO DÍAZ <sup>(1)</sup>, ANGEL GARCÍA-LIDÓN <sup>(2)</sup>, FERNANDO  
RIQUELME <sup>(3)</sup> y ANA ORTUÑO <sup>(1)</sup>**

<sup>(1)</sup>Departamento de Biología Vegetal (Fisiología Vegetal). Facultad de Biología. Universidad de Murcia, Espinardo, 30100 Murcia, España, e:mail [jadelrio@um.es](mailto:jadelrio@um.es) teléfono 968 364944, fax 968363963

<sup>(2)</sup>Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario, La Alberca, Murcia, España, e:mail [ignacio.porras@carm.es](mailto:ignacio.porras@carm.es) teléfono 968366758, fax 968366792

<sup>(3)</sup>CEBAS- Murcia, Departamento de Nutrición Vegetal, Espinardo, 30100 Murcia, España, e:mail [riquelme@cebas.csic.es](mailto:riquelme@cebas.csic.es) teléfono 968396306, fax 968396213

**Palabras clave:** limón - tratamiento frío - tratamiento en tambor - ácido giberélico - fitoalexinas – hesperidina – eriocitrina - diosmina

**RESUMEN**

Los hongos del género *Penicillium* son responsables de importantes pérdidas durante los procesos de post-cosecha de los cítricos. Así mismo se ha descrito que diversos compuestos fenólicos presentes en los frutos cítricos pueden estar implicados en los mecanismos de defensa natural desarrollado por el género *Citrus* frente a hongos patógenos. En este trabajo se analiza el efecto de algunos tratamientos habituales durante la post-cosecha de los frutos cítricos como son el tratamiento con ácido giberélico, la conservación en cámara fría y el tratamiento en tambor, sobre los niveles de flavonoides y resistencia a *Penicillium digitatum* en frutos de limón Fino-49. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el tratamiento con 6 ppm de ácido giberélico, la conservación en cámara fría y los tratamientos con tambor producen incrementos en los niveles de algunos compuestos flavónicos, respecto a los niveles observados en los correspondientes controles. Entre los compuestos fenólicos presentes en los frutos de limón cabe destacar las flavanonas hesperidina y eriocitrina así como la flavona diosmina. Los estudios *in vivo* e *in vitro* llevados a cabo revelan que tanto las flavanonas como la flavona reducen el crecimiento micelial de *Penicillium digitatum*, produciendo alteraciones morfológicas y ultraestructurales de sus hifas. El papel de dichos compuestos fenólicos como posibles fitoalexinas, en el mecanismo de defensa de esta especie cítrica frente a *Penicillium digitatum*, es discutido.

**EFFECT OF COLD STORAGE AND POST HARVEST HANDLING ON  
FLAVONOID LEVELS AND RESISTANCE TO *Penicillium digitatum* IN FRUITS OF  
*Citrus limon* (CV. FINO-49)**

**Keywords:** lemon- cold treatment- mechanical test- gibberellic acid- phytoalexins- hesperidin- eriocitrin- diosmin

## ABSTRACT

Fungi of the genera *Penicillium* are responsible for substantial losses in citrus fruit during post harvest processes. Several phenolic compounds have been implicated in the natural defence mechanisms developed by *Citrus* against pathogenic fungi. In this study, we analyse the effect of some common post harvest treatments in citrus, such as 6 ppm gibberellic acid treatments, cold storage and mechanical test, on flavonoid levels and resistance to *Penicillium digitatum* in fruits of Fino-49 lemon. These treatments were seen to increase the levels of flavonoids compared with their respective controls. Among the phenolic compounds present in lemon, the flavanones, hesperidin and eriocitrin, and the flavone, diosmin, are of note. “*In vivo*” and “*in vitro*” studies showed that both the flavanones and flavone reduced the mycelial growth of *Penicillium digitatum*, in which morphological and ultrastructural alterations of the hyphae were noted. The possible role of these phenolic compounds as phytoalexins in the defence mechanism of lemon against *Penicillium digitatum* is discussed.

## INTRODUCCIÓN

Una de las más importantes enfermedades post-cosecha en los cítricos es la causada por hongos del género *Penicillium*, produciéndose en consecuencia importantes pérdidas económicas. Actualmente para el control de esta enfermedad se procede a la aplicación de fungicidas, si bien estos tratamientos pueden producir serios problemas de residuos en el fruto (Cabras et al., 1999), aparición de cepas resistentes al fungicida (Ben-Yehoshua et al., 1994), así como una posible acumulación en el tejido adiposo humano constituyendo un peligro adicional para la salud humana (Suwalsky et al., 1999). Una posible estrategia en la lucha frente a estas infecciones sería a nivel de la modulación de los mecanismos de defensa natural de la planta. En este sentido, aunque escasas, existen algunas aportaciones acerca del posible papel que algunos flavonoides pueden desempeñar como fitoalexinas en algunas especies de *Citrus* (Ben-Aziz, 1967; Ortuño et al., 1997, 2002, 2006a; Del Río et al., 1998, 2004a; Arcas et al., 2000).

Entre los flavanoides presentes en los frutos de limón (*Citrus limon* (L.) Burms.f ), caben destacar las flavanonas hesperidina (compuesto mayoritario) y eriocitrina, así como la flavona diosmina detectándose variaciones en los niveles de dichos compuestos fenólicos según la edad del fruto y el cultivar (Fuster, 1997; Del Río et al., 2004b).

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto del tratamiento con 6 ppm de ácido giberélico, la conservación en frío y la manipulación post-cosecha de frutos de *Citrus limon* (cv. Fino-49), sobre los niveles de algunas de las flavanonas y flavonas mayoritarias presentes en esta especie cítrica, así como sobre los mecanismos de defensa frente a *Penicillium digitatum*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal, tratamientos hormonales y en cámara

Para los ensayos se utilizaron árboles adultos de limón Fino-49 (20 años de edad), sobre el portainjerto *C. macrophylla*, localizados en una parcela del IMIDA (La Alberca, Murcia). Los tratamientos con 6 ppm de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) se realizaron en otoño, utilizándose para ello un equipo a presión de 18 atmósferas.

Los frutos se recolectaron transcurridos 7 días desde la aplicación de 6 ppm de GA<sub>3</sub> y se conservaron en cámara a baja temperatura (4°C) durante diferentes períodos de tiempo (20, 40 y 60 días), y en cámara (4° C) durante los mismos períodos de tiempo indicados anteriormente seguido de tratamiento en tambor. Posteriormente se procedió al análisis del

contenido en flavonoides y resistencia frente a *Penicillium digitatum*, siguiendo los protocolos que se describen a los siguientes apartados.

### **Extracción y Determinación de Flavonoides**

Para la extracción de los flavonoides se procedió al secado de los frutos completos, inmediatamente después de ser recolectados, en estufa de aire forzado a 50°C, para ser posteriormente molidos y extractados con dimetilsulfóxido (DMSO) (Castillo et al., 1992) durante 2 h, en una relación de 6 mg de peso seco/ml. Los extractos se filtraron a través de una membrana de nylon de 0,45 µm antes del análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), en un Cromatógrafo Líquido de Hewlett Packard modelo HP-1050 (USA) acoplado a una bomba cuaternaria e inyector automático y detector array de diodos. La separación cromatográfica se llevó a cabo en fase reversa, utilizando una columna analítica µ-Bondapak (Waters Associates, Milford, MA) termostaticada a 35° C, con un tamaño medio de partícula C<sub>18</sub> 5 µm (250 mmx 4 mm i.d.), eluyendo isocroticamente con una mezcla de agua-metanol-acetonitrilo-acético (15:2:2:1, por volumen) a flujo constante de 1,0 ml min<sup>-1</sup>. Los cambios en absorbancia fueron registrados en el detector array de diodos UV/V a 280 nm para las flavanonas y 340 nm para las flavonas. Estos compuestos se cuantificaron por HPLC mediante las condiciones cromatográficas descritas anteriormente, comparando las respuestas obtenidas con los correspondientes estándares externos. Las flavonoides principales obtenidos en esos extractos se recogieron con un colector de fracciones (Pharmacia FRAC 100, Sweden) acoplado a la salida de la columna de HPLC, confirmándose sus identidades mediante sus espectros <sup>1</sup>H NMR y <sup>13</sup>C NMR (200 MHz) (Bruker, Germany) en dimetilsulfóxido hexadeuterado.

### **Cultivo de hongos y estudio “in vitro” de la actividad antifúngica de flavanonas y flavonas polimetoxiladas de *Citrus* sp.**

Un aislado del hongo *Penicillium digitatum* obtenido de la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España) (CECT 2954) fue cultivado sobre medio PDA, a 25 °C, para servir como inóculo.

Para la medida de la actividad antifúngica de la flavona diosmina y de las flavanonas hesperidina y eriocitrina aisladas de los materiales vegetales descritos anteriormente, un disco de 5-mm de diámetro de medio de cultivo conteniendo micelio del hongo fue colocado en medio de cultivo PDA (control) o en el mismo medio PDA al cual se le ha incorporado previamente una concentración conocida de cada uno de los compuestos fenólicos mencionados. En cada caso, se analizó el crecimiento del hongo a diferentes tiempos desde la inoculación, midiendo el correspondiente radio del micelio (centímetros). El índice de inhibición (IC<sub>50</sub>) se expresa como la concentración (mM) de dichos compuestos requerida para producir una inhibición del 50% en el crecimiento radial del hongo. Así mismo se estudia a nivel macro y microscópico, el efecto de los compuestos fenólicos adicionados al medio sobre el crecimiento de *Penicillium digitatum*, según los protocolos descritos en trabajos previos (Del Río et al., 2001).

### **Reactivos y disolventes.**

Los patrones de las flavanonas hesperidina, y eriocitrina y la flavona diosmina fueron suministrados por SIGMA. Dimetil sulfóxido (DMSO), acetonitrilo, metanol y ácido acético de Scharlau.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El perfil cromatográfico correspondiente a un extracto de frutos maduros en DMSO de *Citrus limon* (cv. Fino-49) revela la presencia de un pico mayoritario (compuesto 2) cuyo

tiempo de retención ( $t_R$ ) coincidente con el de la flavanona rutinósido hesperidina ( $t_R = 15.5$  min, máximo de absorbancia a 280 nm), y dos picos minoritarios (compuestos 1 y 3) los cuales presentan un tiempo de retención coincidente con el de la flavanona eriocitrina (compuesto 1,  $t_R = 4,6$  min, máximo de absorbancia a 280 nm), y la flavona diosmina (compuesto 3,  $t_R = 21,5$  min, máximos de absorbancia a 280 y 350 nm) (datos no mostrados).

Los compuestos 1-3 se aislaron de acuerdo al método descrito en Material y Métodos. El espectro  $^1\text{H NMR}$  y  $^{13}\text{C NMR}$  de los compuestos 1-3 fue idéntico a los obtenidos para los estándares de eriocitrina, hesperidina y diosmina (Figura 1), respectivamente.

Hesperidina es la flavanona mayoritaria detectándose los máximos niveles en frutos inmaduros con valores entorno a 32,2 g/100 g peso seco, descendiendo dichos niveles en frutos maduros a 0,6 g/100 g peso. Descenso similar se observa para la flavona diosmina, que pasa de 1,5 g/100 g peso seco (frutos inmaduros) a 0,4 g/100 g peso seco (frutos maduros). Por el contrario eriocitrina pasa de 0,2 g/100 g peso seco (fruto inmaduro) a 0,8 g/100 g peso seco (fruto maduro) (Tabla 1).

Los resultados obtenidos en los frutos maduros de limón (cv. Fino-49), recolectados transcurridos 7 días desde el tratamiento con  $\text{GA}_3$  6 ppm y almacenados durante 40 días en cámara fría (4° C), o almacenados durante 40 días en cámara fría (4° C) y sometidos a tratamiento en tambor, ponen de manifiesto un incremento en los niveles de hesperidina entorno al 8%, en ambos casos, no observándose diferencias significativas en los niveles de diosmina o eriocitrina, respecto a los correspondientes controles. El mantenimiento de los frutos tiempos menores (20 días) o mayores (60 días) al descrito anteriormente en cámara fría no suponen variaciones significativas en los niveles de hesperidina, diosmina o eriocitrina, respecto a los correspondientes controles.

Cuando se analiza la respuesta de los frutos de limón tratados con 6 ppm de  $\text{GA}_3$  y almacenados durante 40 días en cámara fría (4° C), o almacenados durante 40 días en cámara fría (4° C) y sometidos a tratamiento en tambor, frente a la infección por *Penicillium digitatum* se observa que el crecimiento del hongo es inhibido entorno a un 30 y 20%, respectivamente (Figuras 2 A y B), después de haber transcurrido 6 días desde la inoculación, si se compara con los resultados obtenidos para los correspondientes controles no tratados con 6 ppm de  $\text{GA}_3$ .

Los estudios *in vitro* llevados a cabo revelan que cuando se adicionan hesperidina, flavanona mayoritaria de *Citrus limon*, al medio de cultivo PDA, produce una reducción del crecimiento radial del micelio de *Penicillium digitatum*, con valores de  $\text{IC}_{50} = 7,86$  mM. Además de la inhibición del crecimiento radial de este hongo, también se observan una inhibición en la producción de esporas y modificaciones ultraestructurales en las hifas cuando *Penicillium digitatum* se cultiva en presencia de hesperidina (8 mM), así como en presencia de diosmina y eriocitrina (datos no mostrados).

En base a lo anteriormente expuesto se puede concluir que los tratamientos con 6 ppm de  $\text{GA}_3$  y posterior conservación en cámara fría, o cámara fría y tambor pueden producir incrementos en los niveles de hesperidina, flavanona mayoritaria en los frutos de limón. Así mismo, dichos tratamientos confieren a los frutos de limón una mayor resistencia frente a *Penicillium digitatum*, probablemente debido al aumento en la concentración de la flavanona hesperidina en los frutos tratados descritos anteriormente, ya que como se pone de manifiesto por los ensayos *in vitro* llevados a cabo, la flavanona hesperidina, puede actuar como agente fungitóxico frente a dicho hongo, causando importantes alteraciones a nivel de morfología y ultraestructura de las hifas, así como sobre las estructuras reproductivas. Por tanto dicho flavonoide podría estar implicado en el mecanismo de defensa natural de la planta frente al ataque por *Penicillium digitatum*, sin que se descarte que otros metabolitos secundarios que puedan haberse inducido tras el proceso de infección por dicho hongo, puedan también actuar en el mecanismo de defensa de este material vegetal, como se ha descrito para otras especies

cítricas y diferentes hongos patógenos (Ortuño et al., 1997, 2002, 2006; Angioni et al., 1998; Del Río et al., 1998, 2004a, 2006).

## CONCLUSIONES

Estos resultados revelan que determinados flavonoides cítricos pueden estar implicados en los mecanismos de defensa, pudiendo ser considerados como fitoalexinas frente *Penicillium digitatum* actuando como barrera química, las flavonas a nivel de flavedo y las flavanonas a nivel de albedo.

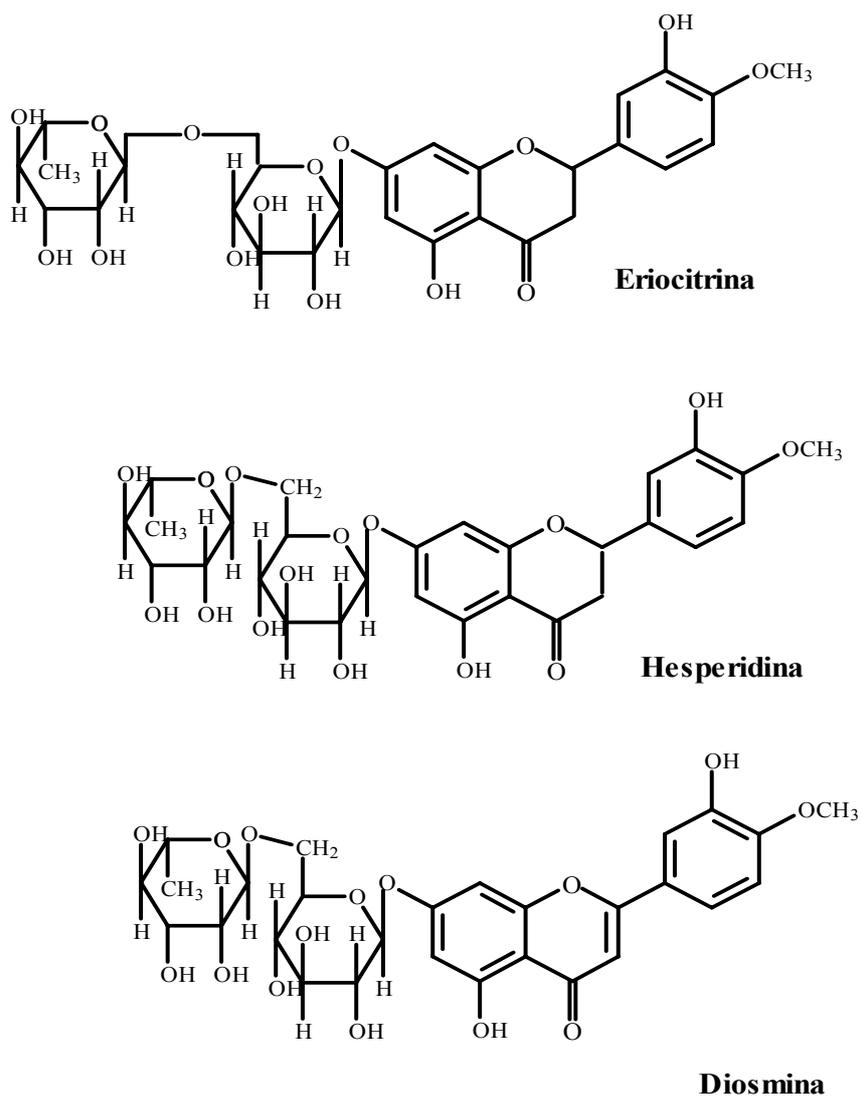
## AGRADECIMIENTOS

Proyecto AGR/8025/06 Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente de la Región de Murcia.

## BIBLIOGRAFÍA

- Angioni, A.; Cabras, P.; D'Hallewin, G.; Pirisi, F.M.; Reneiro F.; Schirras, M. 1998. Synthesis and inhibitory activity of 7-geranoxycoumarins against *Penicillium* species in *Citrus* fruit. *Phytochemistry*. 47:1521-1525.
- Arcas, M.C.; Botía, J.M.; Ortuño, A.; Del Río, J.A. 2000. UV Irradiation alters the levels of flavonoids involved in the defence mechanisms of *Citrus aurantium* fruits against *Penicillium digitatum*. *European Journal of Plant Pathology*. 106: 617-622.
- Ben-Yehoshua, S.; Goldschmidt, E.E.; Bar-Joseph, M. 1994. *Citrus* Fruits. *Encyclopedia of Agricultural Science*; Academic Press, Inc., New York; Vol. 1, 357-378.
- Ben-Aziz, A. 1967. Nobiletin is main fungistat in tangerins resistant to Mal Secco. *Science*. 155: 1026-1027.
- Cabras, P.; Schirras, M.; Pirisi, F.M.; Garau, V.L.; Angioni, A. 1999. Factors affecting imazalil and thiabendazole uptake and persistence in *Citrus* fruits following dip treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 3352-3354.
- Castillo, J.; Benavente-García, O.; Del Río, J.A. 1992. Naringin and Neohesperidin levels during development of leaves, flowers and fruits of *Citrus aurantium*. *Plant Physiology*. 99: 67-73.
- Del Río, J.A.; Arcas, M.C.; Benavente-García, O.; Ortuño, A. 1998. *Citrus* polymethoxylated flavones can confer resistance against *Phytophthora citrophthora*, *Penicillium digitatum* and *Geotrichum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 4423-4428.
- Del Río, J.A.; González, A.; Fuster, M.D.; Botía, J.M.; Gómez, P.; Frías, V.; Ortuño, A. 2001. Tylose formation and changes in phenolic compounds of grape roots infected with *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* species. *Phytopathology Mediterranea*. 40: 394-399.
- Del Río, J.A.; Gómez, P.; Báidez, G.A.; Arcas, M.C.; Botía, J.M.; Ortuño, A. 2004a. Changes in the level of polymethoxyflavones and flavones as part of the defence mechanism of *Citrus sinensis* (cv. Valencia late) fruits against *Phytophthora citrophthora*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 1913-1917.
- Del Río, J.A.; Fuster, M.D.; Gómez, P.; Porrás, I.; García-Lidón, A.; Ortuño, A. 2004b. *Citrus limon*: a source of flavonoids of pharmaceutical interest. *Food Chemistry*. 84: 457-461.
- Del Río, J.A.; Porrás, I.; García-Lidón, A.; Lacasa, A.; Martínez, D.; Ortuño, A. 2006. Fitoanticipinas de *Citrus* sp. implicadas en los mecanismos de resistencia frente a *Penicillium digitatum* y *Alternaria alternata* pv. citri. *Todo Citrus*. 35:5-9.

- Fuster, M.D. 1997. *Citrus* Flavonoids. Distribution, modulation by phyto regulators and their possible physiological function. PhD. University of Murcia. Spain. ISBN: 84-7684-973-0.
- Ortuño, A.; Botía, J.M.; Fuster, M.D.; Porras, I.; García-Lidón, A.; Del Río, J.A. 1997. Effect of Scoparone (6,7-dimethoxycoumarin) biosynthesis on the resistance of Tangelo Nova, *Citrus paradisi*, and *Citrus aurantium* fruits against *Phytophthora parasitica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45: 2740-2743.
- Ortuño, A.; Arcas, M.C.; Botía, J.M.; Fuster, M.D.; Del Río, J.A. 2002 Increasing resistance against *Phytophthora citrophthora* in tangelo Nova fruits by modulating polymethoxyflavones levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 2836-2839.
- Ortuño, A.; Báidez, A.; Gómez, P.; Arcas, M.C.; Porras, I.; García-Lidón, A.; Del Río, J.A. 2006. *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chemistry*. 98: 351-358.
- Suwalsky, M.; Rodríguez, C.; Villena, F.; Aguilar, F.; Sotomayor, C.P. 1999. The Pesticide Hexachlorobenzene Induces Alterations in the Human Erythrocyte Membrane. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 10: 205-214.



**Figura 1.-** Estructura química desarrollada de las flavanonas eriocitrina, hesperidina y la flavona diosmina.

**Tabla 1.-** Niveles de hesperidina, diosmina y eriocitrina en frutos limón (var. Fino-49) inmaduros y maduros (diámetro entorno a 12 y 60 mm respectivamente). Los datos se expresan en g/100 g de peso seco ± ES (n = 3).

FRUTO	HESPERIDINA g/100g Peso seco	DIOSMINA g/100g Peso seco	ERIOCITRINA g/100g Peso seco
INMADURO	32,2 ± 1	1,5 ± 0,07	0,2 ± 0,02
MADURO	0,6 ± 0,01	0,4 ± 0,02	0,8 ± 0,01

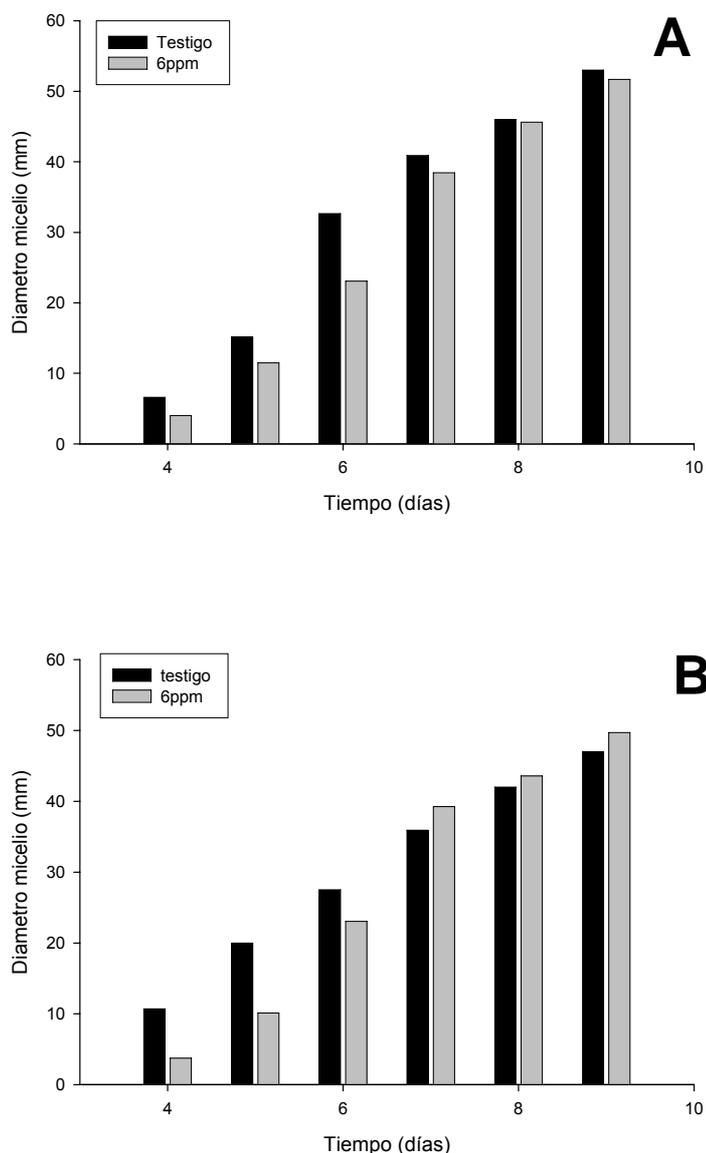


Figura 2.- Efecto del tratamiento con 6 ppm de GA<sub>3</sub> y conservación en cámara fría , ó en cámara fría y tratamiento en tambor, sobre la tolerancia a *Penicillium digitatum* en frutos maduros de *Citrus limón* (cv. Fino-49). A) Tratamiento en cámara fría (4° C) durante 40 días. B) Tratamiento en cámara fría (4° C) durante 40 días y sometidos posteriormente a tratamiento en tambor.