

## Obtención de nuevas variedades de cítricos tipo pomelo con bajo contenido en furanocumarinas y elevado en flavonoides

A. Garcia-Lor, A. Bermejo, J. Morales, A. Medina, M. Hernández, J. Cuenca y P. Aleza

Centro de Citricultura y Producción Vegetal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), 46113 Moncada (Valencia), Spain

**Palabras clave:** *Citrus paradisi*, polifenoles, antioxidantes, HPLC, triploides, diploides

### Resumen

En cítricos, los pomelos (*Citrus paradisi*) y pummelos (*C. maxima*) presentan un elevado contenido en furanocumarinas y bajo en flavonoides. Las furanocumarinas son polifenoles que interaccionan negativamente con ciertos medicamentos, produciendo el llamado “efecto pomelo”, mientras que los flavonoides son compuestos antioxidantes con propiedades beneficiosas para la salud. Con el objetivo de obtener nuevas variedades con bajo o nulo contenido en furanocumarinas y elevado en flavonoides, se realizaron hibridaciones entre clementina (bajo contenido en furanocumarinas y alto en flavonoides) y pummelo (perfil opuesto a las clementinas). De las progenies obtenidas se han analizado 15 híbridos diploides y 15 triploides obtenidos a partir de hibridaciones sexuales  $2x \times 2x$  y  $4x \times 2x$  en las cuales se ha utilizado como parental femenino ‘Clementina de Nules’ a nivel diploide y tetraploide y como parental masculino pummelo ‘Pink’ diploide. Los híbridos triploides mostraron en promedio un menor contenido en furanocumarinas ( $8.084 \text{ mg/L } 3x < 14.473 \text{ mg/L } 2x$ , 6,7-DHB;  $p < 0.05$ ) y mayor contenido en flavonoides ( $11.838 \text{ mg/L } 3x > 1.667 \text{ mg/L } 2x$ , hesperidin;  $p < 0.05$ ) que los híbridos diploides, siendo la estrategia de cruzamiento  $4x \times 2x$  mejor que la  $2x \times 2x$  para la obtención de nuevas variedades de cítricos tipo pomelo con bajo contenido en furanocumarinas y elevados contenidos en flavonoides. Además, estos híbridos triploides presentan una característica esencial en las nuevas variedades de cítricos, que es la ausencia de semillas, muy apreciada por los consumidores. La repetición de los análisis en posteriores campañas de recolección y el estudio de nuevos parentales nos ayudará a establecer las combinaciones parentales adecuadas para obtener nuevos híbridos con estas características.

### INTRODUCCIÓN

Los cítricos constituyen el cultivo frutal más importante del mundo con una producción estimada de más de 121 millones de t (Mt) y en España también constituyen el principal frutal, con una superficie total de cultivo de unas 300.000 ha y una producción de 7-7,5 Mt, que representa el 5% de la producción mundial. Los frutos contienen una gran cantidad de compuestos antioxidantes, incluyendo carotenoides, vitamina C y metabolitos secundarios como los flavonoides y furanocumarinas (Tripoli et al., 2007). Se ha demostrado que los flavonoides presentan propiedades beneficiosas para la salud como consecuencia de su alta capacidad antioxidante, ya que previenen algunos desordenes cardiovasculares y tienen actividad antiinflamatoria y antialérgica (Kozłowska y Szostak-Wegierek 2014). Respecto a las furanocumarinas, se ha demostrado que estos compuestos interaccionan con algunos fármacos, siendo paradisin C, 6,7-dihydroxy-bergamottin (6,7-

DHB), bergamottin, isoimperatorin, bergapten y bergaptol las que presentan una mayor interacción originando alteraciones severas del ritmo cardíaco o depresión respiratoria (Bailey et al., 2013), produciendo lo que se conoce como el “efecto pomelo”. Esto es debido a la interacción de las furanocumarinas con la enzima citocromo P450 (CYP3A4) en el intestino humano, provocando su inhibición y el posterior aumento en sangre de los niveles de algunos medicamentos (Wilkinson 2005). La disminución del contenido de furanocumarinas en los zumos de pomelo se puede realizar mediante tratamientos químicos, pero esto conlleva un importante coste adicional además de reducir la calidad del zumo (Chen et al., 2011).

Dentro de la diversidad de los cítricos, los pummelos (*C. maxima* Burm.), los pomelos (*C. paradisi* Macf.), algunas limas y el naranjo amargo (*C. aurantium* Christm.) son los que presentan mayor concentración en furanocumarinas. En cambio los mandarinos (*C. reticulata* Blanco), presentan un bajo o nulo contenido en las mismas (Dugrand-Judek et al., 2015). Por ello, la utilización de mandarinos como parentales en programas de mejora genética de cítricos mediante hibridación sexual es muy importante para la obtención de nuevas variedades tipo pomelo con bajo contenido en furanocumarinas.

En cuanto a los flavonoides, las mandarinas y las naranjas dulces, contienen rutinósidos como la hesperidin (sin sabor), mientras que los pummelos y los pomelos contienen altas cantidades de flavanonas neohesperidóosidas, como la naringin, que les confiere el sabor amargo característico (Kawaii et al., 1999).

Por tanto, la obtención de nuevas variedades que produzcan frutos tipo pomelo, con alto contenido de flavonoides y bajo de furanocumarinas, supondría una de las fuentes importantes de compuestos antioxidantes en nuestra dieta y una nula interacción con determinados fármacos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivares e híbridos

Se han analizado 15 híbridos de los dos cruzamientos realizados, ‘Clementina de Nules’ 2x X Pummelo ‘Pink’ 2x y ‘Clementina de Nules’ 4x X Pummelo ‘Pink’ 2x, en dos fechas distintas (Diciembre y Febrero de una misma campaña), además de sus respectivos parentales.

### Preparación del zumo y cromatografía (HPLC)

El zumo fresco de cada genotipo se obtuvo a partir de 3 frutos con una prensa mecánica. El zumo se congeló a -20°C hasta su procesado. La extracción de furanocumarinas y flavonoides se realizó con DMSO/MeOH (1:1, v/v), siguiendo el procedimiento descrito por Cano et al. (2008). Para la determinación y cuantificación de los compuestos, se utilizó un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Waters Alliance (Waters, Barcelona, Spain) con muestras y columnas termostataadas, detector fotodiodo array (DAD, Waters 2996), módulo espectrómetro de masas (MS, Waters ZQ2000), columna C18 en fase reversa, y software Empower. La cuantificación se realizó mediante calibración externa con los patrones correspondientes. Se analizaron tres furanocumarinas (bergamottin, 6,7-dihydroxybergamottin (6,7-DHB) y bergapten) y siete flavonoides (eriocitrin, neeriocitrin, narirutin, naringin, hesperidin, neohesperidin y una polimetoxiflavona (PMF) identificada tentativamente). Se realizaron tres réplicas técnicas de cada análisis.

### Análisis estadístico

El análisis de la varianza (ANOVA) se realizó con el software Statgraphics Plus 5.1.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración de furanocumarinas y flavonoides varía ampliamente entre los distintos híbridos y niveles de ploidía. En la Figura 1 se muestra la concentración de cada furanocumarina en los 15 híbridos analizados para cada nivel de ploidía en Diciembre. Por ejemplo, se observaron valores desde 4 a 44,2 mg/L de 6,7-DHB en los híbridos diploides y desde 2,8 a 13,4 mg/L de 6,7-DHB en los híbridos triploides. En cuanto a los flavonoides varían en distintos compuestos, como es el caso de la hesperidín de 0,2 a 45,8 mg/L en los híbridos triploides y 0,2 a 8,6 mg/L en los híbridos diploides. En la Tabla 1 se muestran los valores medios para los híbridos diploides y triploides en las dos fechas de recolección, además de los parentales, que mostraron valores similares en estos compuestos a los cuantificados en trabajos anteriores (Dugrand-Judek et al., 2015; Nogata et al. 2006).

Los híbridos triploides mostraron, de media, un menor contenido en furanocumarinas que los híbridos diploides (6,7-DHB: 8,084 mg/L 3x < 14,473 mg/L 2x,  $p < 0,05$ ; bergamottin: 0,728 mg/L 3x < 1,393 mg/L 2x,  $p < 0,05$ ), además de un mayor contenido en algunos flavonoides (hesperidín: 11,838 mg/L 3x > 1,667 mg/L 2x,  $p < 0,05$ ), característicos de las mandarinas (Tabla 1). Esto puede ser debido a que los híbridos triploides obtenidos en hibridaciones sexuales 4x X 2x presentan doble información genética del parental clementina tetraploide respecto al parental masculino pummelo (Chen et al. 2011). Además, Chen et al. (2011) observaron una fuerte correlación y cosegregación entre tres de las furanocumarinas más abundantes en los pomelos, 6,7-DHB, bergamottin y paradisin C, lo que permite utilizar como estrategia de selección de cultivares con bajo o nulo contenido en furanocumarinas la cuantificación de alguno de estos compuestos.

Por todo ello, la estrategia de cruzamiento 4x X 2x es mejor que la 2x X 2x para la obtención de nuevas variedades de tipo pomelo con menor cantidad de furanocumarinas y mayor de flavonoides que los clásicos pomelos (*C. paradisi*). Además los híbridos triploides no producen semillas ni inducen la formación de semillas por polinización cruzada característica esencial para las nuevas variedades de cítricos (Aleza et al. 2010).

## Referencias

- Aleza P, Cuenca J, Juárez J, Pina JA, Navarro L. 2010. 'Garbí' Mandarin: a new late-maturing triploid hybrid. HortScience 45: 139-141.
- Bailey DG, Dresser G, Arnold JM. 2013. Grapefruit-medication interactions: forbidden fruit or avoidable consequences? Can Med Assoc J 185: 309-16.
- Cano A, Medina A y Bermejo A. 2008. Bioactive compounds in different citrus varieties. Discrimination among cultivars. Journal of Food Composition and Analysis, 21, 377-381. DOI: 10.1016/j.jfca.2008.03.005).
- Chen C, Cancalon P, Haun C, Gmitter FJ. 2011. Characterization of Furanocoumarin Profile and Inheritance Toward Selection of Low Furanocoumarin Seedless Grapefruit Cultivars. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 136: 358-363.
- Dugrand-Judek A, Orly A, Hehn A, Constantino G, Ollitrault P, Froelicher Y, Bourgaud F. 2015. The Distribution of Coumarins and Furanocoumarins in Citrus Species Closely Matches Citrus Phylogeny and Reflects the Organization of Biosynthetic Pathways. PLOSone DOI: 10.1371.
- Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M. 1999. HL-60 differentiating activity and flavonoid content of the readily extractable fraction prepared from citrus juices. J Agric Food Chem. 47: 128-135.
- Kozłowska A, Szostak-Wegierek D. 2014. Flavonoids--food sources and health benefits. Rocznik Panstw Zakł Hig. 65:79-85.

Nogata Y, Sakamoto K, Shiratsuchi H, Ishii T, Yano M, Ohta H. 2006. Flavonoid composition of fruit tissues of Citrus species. Biosci. Biotechnol. Biochem 70: 178-192.

Tripoli, E., La Guardia, M., Giammanco, S., Di Majo, D. and Giammanco, M. 2007. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. Food Chem. 104: 466–479.

Wilkinson GR. 2005. Drug metabolism and variability among patients in drug response. N Engl J Med. 352: 2211–2221. doi: 10.1056/NEJMra032424 PMID: 15917386.

Tabla 1. Contenido en furanocumarinas y flavonoides (mg/L) en el zumo en los 15 híbridos analizados en cada ploidia para dos recolecciones (Recol 1: Diciembre; Recol 2: Febrero; n.d. no detectado).

Recol 1	Furanocumarinas			Flavonoides						
	Bergapten *	6,7-DHB *	Bergamottin *	Eriocitrin *	Neoeriocitrin	Narirutin *	Naringin	Hesperidin *	Neohesperidin *	PMF *
2n	2.373	16.116	1.640	5.604	27.627	14.396	68.098	1.813	26.262	16.160
3n	1.271	7.48	1.187	7.44	24.249	23.388	55.507	11.764	49.316	20.960
Clem 2x	0.000	1.600	0.000	n.d.	n.d.	11.667	2.733	147.533	5.333	3.400
Clem 4x	0.000	2.333	0.000	2.067	6.200	25.000	15.933	249.533	25.267	7.600
Pum 2x	5.333	84.600	1.800	n.d.	n.d.	n.d.	174.467	6.4	n.d.	n.d.

Recol 3	Furanocumarinas			Flavonoides						
	Bergapten *	6,7-DHB *	Bergamottin *	Eriocitrin *	Neoeriocitrin	Narirutin *	Naringin	Hesperidin *	Neohesperidin *	PMF
2n	1.240	12.831	1.147	6.218	25.724	14.218	69.169	1.52	25.547	15.307
3n	0.649	8.689	0.269	8.142	29.604	22.813	61.747	11.911	59.573	19.836
Clem 2x	0.000	2.267	0.000	2.200	4.133	12.933	4.200	207.4	8.467	1.600
Clem 4x	0.000	4.667	0.000	2.200	2.600	27.267	26.800	303.2	50.733	7.133
Pum 2x	0.667	18.933	1.400	n.d.	n.d.	n.d.	138.133	32.2	2.067	2.133

\* indica diferencias significativas entre ploidias (2n y 3n) para cada compuesto

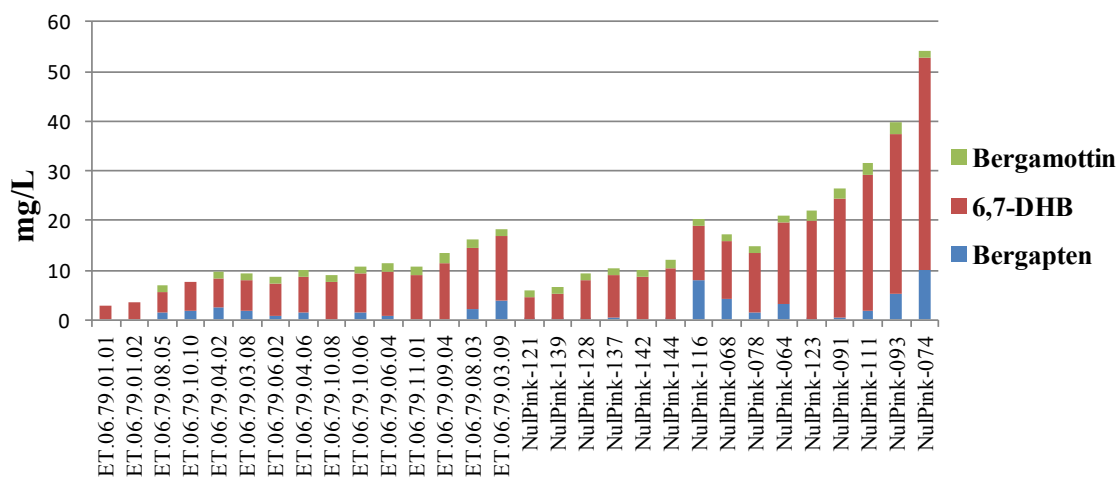


Fig. 1. Gráfico del contenido en mg/L de Bergamottin, 6,7-DHB y Bergapten en 15 híbridos diploides y triploides obtenidos mediante hibridación sexual analizados en diciembre de 2015. Los híbridos con código ET son triploides y los NulPink diploides.