



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

**Programa de Doctorado en Recursos y Tecnologías Agrarias,
Agroambientales y Alimentarias**



**CARACTERIZACIÓN AGRONÓMICA, MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE
VARIEDADES DE LIMONERO (*Citrus limon* (L.) Burm.) INJERTADAS
SOBRE DIFERENTES PORTAINJERTOS**

TESIS DOCTORAL

MARLENE GLADYS AGUILAR HERNÁNDEZ

Directora

Dra. Pilar Legua Murcia

Codirector

Dr. Joaquín Julián Pastor Pérez

2021



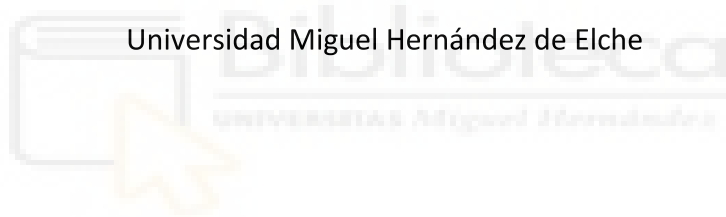
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

**Programa de Doctorado en Recursos y Tecnologías Agrarias,
Agroambientales y Alimentarias**

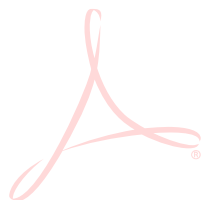
**CARACTERIZACIÓN AGRONÓMICA, MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE VARIEDADES DE
LIMONERO (*Citrus limon* (L.) Burm.) INJERTADAS SOBRE DIFERENTES PORTAINJERTOS**

Tesis presentada por Marlene Gladys Aguilar Hernández para el grado de doctora por la

Universidad Miguel Hernández de Elche



Marlene Gladys Aguilar Hernández



**INDICE DE CALIDAD DE
LAS PUBLICACIONES**

INDICE DE CALIDAD DE LAS PUBLICACIONES

PUBLICACIÓN 1

'INFLUENCE OF NEW CITRUS ROOTSTOCKS ON LEMON QUALITY'

Autores: Aguilar-Hernández, M.G., Sánchez-Rodríguez, L., Hernández, F., Forner-Giner, M.Á., Pastor-Pérez, J.J., Legua, P.

Revista: *Agronomy* **2020**, 10, 974

Doi: <https://doi.org/10.3390/agronomy10070974>

Editor: MDPI AG St. Alban-Angale, 66 Basel, Switzerland 4052

ISSN: 2073-4395



Categoría JCR	Categoría Cuartil	Rango	Factor de impacto	Factor de impacto de los últimos 5 años
Agronomy	Q1	18/91	2,603	2,315

INDICE DE CALIDAD DE LAS PUBLICACIONES

PUBLICACIÓN 2

'DETERMINATION OF THE VOLÁTILE PROFILE OF LEMON PEEL OILS AS AFFECTED BY ROOTSTOCK'

Autores: Aguilar-Hernández, M.G., Sánchez-Bravo, P., Hernández, F., Carbonell-Barrachina, Á.A., Pastor-Pérez, J.J., Legua, P.

Revista: *Foods* **2020**, 9(2): 241

Doi: <https://doi.org/10.3390/foods9020241>

Editor: MDPI AG St. Alban-Angale, 66 Basel, Switzerland 4052

ISSN: 2304-8158



2019

Categoría JCR	Categoría Cuartil	Rango	Factor de impacto	Factor de impacto de los últimos 5 años
Food Science and Technology	Q1	27/139	4,092	2,315

INDICE DE CALIDAD DE LAS PUBLICACIONES

PUBLICACIÓN 3

'QUALITY PARAMETERS OF SPANISH LEMONS WITH COMMERCIAL INTEREST'

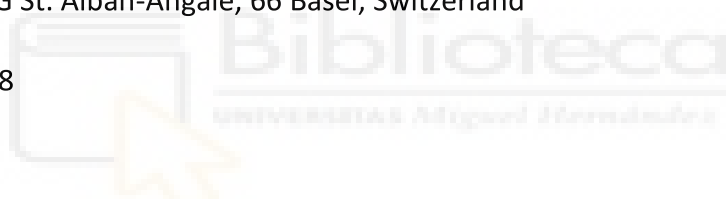
Autores: Aguilar-Hernández, M.G., Núñez-Gómez, D., Forner-Giner, M.Á, Hernández, F., Pastor-Pérez, J.J., Legua, P.

Revista: *Foods* **2021**, 10(1): 62

Doi: <https://doi.org/10.3390/foods10010062>

Editor: MDPI AG St. Alban-Angale, 66 Basel, Switzerland

ISSN: 2304-8158



2019				
Categoría JCR	Categoría Cuartil	Rango	Factor de impacto	Factor de impacto de los últimos 5 años
Food Science and Technology	Q1	27/139	4,092	2,315

Dra. Dña. Juana Fernández López, Catedrática de Universidad y Coordinadora del Programa de Doctorado en Recursos y Tecnologías Agrarias, Agroambientales y Alimentarias (ReTos-AAA) de la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH),

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Caracterización agronómica, morfológica y bioquímica de variedades de limonero (*Citrus limon* (L.) Burm.) injertadas sobre diferentes portainjertos**“ de la que es autora la graduada en Master de Técnicas Avanzadas para la Investigación y Producción en Fruticultura **Dña. Marlene Gladys Aguilar Hernández**, ha sido realizada bajo la dirección de la **Dra. Pilar Legua Murcia** y la codirección del **Dr. Joaquín Pastor Pérez**, actuando como tutora de la misma la **Dra. Francisca Hernández García**. Considero que la Tesis es conforme, en cuanto a forma y contenido, a los requerimientos del Programa de Doctorado ReTos-AAA, siendo por tanto apta para su exposición y defensa pública.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente certificado en Orihuela a veintinueve de marzo de dos mil veintiuno.

Dra. Dña. Juana Fernández López
Coordinadora del Programa Doctorado ReTos-AAA



**Dedicado a la memoria:
e mis padres Vidal y Gladys
e mi abuelos: Sabina, Papá Marcos, Mamá Api
Papá Nico y Mamá Justy
De mis tíos: Grimaldo, Olivier, Rita y Herminia.
Que con su ejemplo aprendí a ser mejor persona.**

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a la Universidad Miguel Hernández, a la Fundación Carolina y la Universidad Nacional Agraria La Molina que mediante la mutua colaboración y solidaridad han hecho posible que pueda realizar este doctorado.

Así mismo hago extensivo mi reconocimiento y mi estima personal a mis directores de tesis, Dra. Pilar Legua, Dr. Joaquín Pastor y a la tutora Dra. Francisca Hernández. Agradezco a cada uno de ellos, por su apoyo incondicional, su inagotable paciencia, por compartir sus conocimientos y su experiencia durante la presente investigación.

Incluyo en este agradecimiento a todos los miembros del Departamento de Horticultura, de la Universidad Nacional Agraria La Molina, en especial a la persona del Ingeniero Andrés Casas, (actual Decano de la Facultad de Agronomía), a la exDecana Dra. Liliana Aragón, por haberme incentivado y brindado su confianza para realizar el doctorado fuera de mi país. Así mismo a los Ingenieros Javier Arias y Julián Chura por siempre contar con su apoyo.

Además, quiero agradecer a mis hermanos Janet, Catherine, Vidal y Nilo, mis sobrinos Marcos, Mercedes, Camila, Alfonso, Gabriel, Martín, Nahuel, Olivier, Santino, Corayma, mis ahijados Maruzza, Eduardo, Carlos-Augusto, Naomí y demás familiares; que mediante su cercanía virtual han logrado hacer mi estancia, menos nostálgica y me han fortalecido en los momentos difíciles.

Por último, quiero agradecer a todos los amigos de Perú, entre ellos mi promoción Agro 83, que con su respaldo moral he logrado llegar a la meta, a los nuevos amigos (España, Portugal e Italia), que me hicieron sentir como en casa en este camino hacia el doctorado. A todos, ¡muchas gracias!!

Nostalgia

*Hace ya diez años
que recorro el mundo.
¡He vivido poco!
¡Me he cansado mucho!*

*Quien vive de prisa no vive de veras,
quien no echa raíces no puede dar frutos.
Ser río que recorre, ser nube que pasa,
sin dejar recuerdo ni rastro ninguno,
es triste y más triste para quien se siente
nube en lo elevado, río en lo profundo.*

*Quisiera ser árbol mejor que ser ave,
quisiera ser leño mejor que ser humo;
y al viaje que cansa
prefiero terruño;
la ciudad nativa con sus campanarios,
arcaicos balcones, portales vetustos
y calles estrechas, como si las casas
tampoco quisieran separarse mucho...*

*Estoy en la orilla
de un sendero abrupto.
Miro la serpiente de la carretera
que en cada montaña da vueltas a un nudo;
y entonces comprendo que el camino es largo,
que el terreno es brusco,
que la cuesta es ardua,
que el paisaje es mustio...*

*¡Señor! ¡Ya me canso de viajar! ¡Ya siento
nostalgia, ya ansío descansar muy junto
de los míos!... Todos rodearán mi asiento
para que les diga mis penas y mis triunfos;
y yo, a la manera del que recorriera
un álbum de cromos, contaré con gusto
las mil y una noches de mis aventuras
y acabaré en esta frase de infortunio:*

*¡He vivido poco!
¡Me he cansado mucho!*

J. Santos Chocano (1875-1934)

ÍNDICE

ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS	3
ESTRUCTURA DE LA TESIS	5
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. OBJETIVOS.....	39
3. MATERIALES Y MÉTODOS	43
4. PUBLICACIONES	53
4.1 Publicación 1	55
4.2 Publicación 2	71
4.3 Publicación 3	85
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	95
6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	115
7. INVESTIGACIONES FUTURAS.....	119
8. REFERENCIAS	123

ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS

Abreviatura	Artículos			Inglés	Español
	1	2	3		
IVIA	x		x	Valencian Institute for Agricultural Research	Instituto de Investigación Valenciano
'FA 5'	x			Forner-Alcaide 5	Forner-Alcaide 5
'FA13'	x			Forner-Alcaide 13	Forner-Alcaide 13
'FA517'	x			Forner-Alcaide 517	Forner-Alcaide 517
CTV	x	x	x	Citrus Tristeza Virus	Virus de la tristeza de los cítricos
BOE	x	X		State official newsletter	Boletín Oficial del Estado
CaCO ₃	x		x	Calcium carbonate	Carbonato de calcio
C.E.	x		x	Electric conductivity	Conductividad eléctrica
NPK	x		x	Nitrogen Phosphorus Potassium	Nitrogeno Fosforo Potasio
FW	x		x	Fruit weight	Peso del fruto
ED	x		x	Equatorial diameter	Diámetro ecuatorial
PD	x		x	Polar diameter	Diámetro polar
PT	x		x	Peel thickness	Espesor de la piel
pH	x		x	Hydrogen potential	Potencial de hidrógeno
TSS	x		x	Total soluble solids	Total sólidos solubles
TA	x		x	Titrateable acidity	Acidez titulable
MI	x		x	Maturity index	Índice de madurez
CCI	x			Citrus color index	Índice de color cítrico
HLPC	x		x	High performance liquid chromatograph	Cromatógrafo de líquidos de alta resolución
DAD	x		x	Diode array detector	Detector de matriz de diodos
RID	x			Refractive index detector	Índice de refracción
AA	x		x	Antioxidant activity	Actividad antioxidante
TPC	x		x	Total phenolic content	Contenido total de polifenoles
ABTS	x		x	2,2'-azino-bis (3-Ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico)
AA-ABTS	x			Antioxidant activity- ABTS	Actividad antioxidante -ABTS
DPPH	x		x	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	1,1 - difenil2- picrilhidracilo
AA-DPPH	x			Antioxidant activity-DPPH	Actividad antioxidante-DPPH
FRAP	x		x	Ferric reducing ability of plasma	Capacidad reductora férrica del plasma
AA-FRAP	x			Antioxidant activity-FRAP	Actividad antioxidante-FRAP
UV				Ultra violet	Ultra violeta
ANOVA				Analysis of variance	Análisis de varianza
PCA	x	x		Principal component analysis	Análisis de componentes principales

NSG	x	x	Number of fruit segments	Número de segmentos del fruto
NSD	x	x	Number of seeds	Número de semillas
PJ	x	x	Percentage of juice	Porcentaje de zumo
GAE	x	x	Gallic acid equivalents	Equivalentes de ácido gálico
(L*)	x	x	Lightness	Luminosidad
a*	x	x	Red/greenness	rojo/verde
b*	x	x	Yellow/blueness	amarillo / azul
C*	x	x	Chroma	croma
H°	x	x	Hue angle	ángulo de tono
CIEL	x	x	Commission Internationale de l'Eclairage	Comisión Internacional de Iluminación
CA	x		Citric acid	Ácido cítrico
MA	x		Malic acid	Ácido málico
AA	x		Ascorbic acid	Ácido ascórbico
SA	x		Succinic acid	Ácido succínico
Glu	x		Glucose	Glucosa
Fru	x		Fructose	Fructosa
ARF	x		Auxin Response Factors	Factores de respuesta auxina
ABA	x		Abscisic acid	Ácido abscísico
ATP	x		Adenosine triphosphate	Adenosín trifosfato
F95-M		x	'Fino 95'/ <i>Citrus macrophylla</i>	'Fino 95'/ <i>Citrus macrophylla</i>
F49-M		x	'Fino 49'/ <i>Citrus macrophylla</i>	'Fino 49'/ <i>Citrus macrophylla</i>
F49-A		x	'Fino 49'/ <i>Citrus aurantium</i>	'Fino 49'/ <i>Citrus aurantium</i>
V-M		x	'Verna'/ <i>Citrus macrophylla</i>	'Verna'/ <i>Citrus macrophylla</i>
V-A		x	'Verna'/ <i>Citrus aurantium</i>	'Verna'/ <i>Citrus aurantium</i>
CI		x	Colour index	Índice de color
HD		x	Hydrodistillation	Hidrodestilación
GC-MS		x	Gas chromatography-mass spectrometry	Cromatografía de gases-espectrometría de masas
NIST		x	National Institute of Standards and Technology	Instituto Nacional de Estándares y tecnología
RT		x	Retention time	Tiempo de retención
KI (Exp.)		x	Experimental Kovats indexes,	Índices de Kovats experimentales
*KI (Lit.)		x	Literature Kovats indexes	Literatura índices de Kovats
V		x	Variety	Variedad
R		x	Rootstock	Portainjerto
V*R		x	Variety interaction rootstock	Variedad interacción portainjerto

ESTRUCTURA DE LA TESIS

La presente Tesis Doctoral se ha redactado según la metodología basada en compendio de artículos de investigación, siguiendo la normativa exigida por la Universidad Miguel Hernández. Consta de las siguientes partes que se describen a continuación:

Resumen/Abstract: descripción de los resultados y conclusiones más relevantes (en castellano e inglés).

1. **Introducción.** Donde se resume la producción y distribución en el mundo del limonero y se describe los nuevos portainjertos y variedades, por medio de una revisión bibliográfica.

2. **Objetivo.** En este apartado se explica cuál es el objetivo final de la presente investigación y los objetivos específicos.

3. **Metodología.** En este apartado se describe la metodología utilizada para la determinación de las variables analizadas.

4. **Publicaciones.** En este apartado se incluyen las publicaciones científicas que componen esta Tesis Doctoral. Las tres publicaciones que componen esta tesis son:

- 1ª publicación: **Aguilar-Hernández, M.G.**, Sánchez-Rodríguez, L., Hernández, F., Forner-Giner, M.Á., Pastor-Pérez, J.J., Legua, P. 2020. Influence of New Citrus Rootstocks on Lemon Quality. *Agronomy*, 10, 974.

<https://doi.org/10.3390/agronomy10070974>

- 2ª publicación: **Aguilar-Hernández, M.G.**, Sánchez-Bravo, P., Hernández, F., Carbonell-Barrachina, Á.A., Pastor-Pérez, J.J., Legua, P. 2020. Determination of the volatile profile of lemon peel oils as affected by rootstock. *Foods*, 9(2), 241.

<https://doi.org/10.3390/foods9020241>

- 3ª publicación: **Aguilar-Hernández, M.G.**, Núñez-Gómez, D., Forner-Giner, M.Á., Hernández, F., Pastor-Pérez, J.J., Legua, P. 2021. Quality parameters of Spanish

Lemons with comercial interest. *Foods*, 10(1), 62.

<https://doi.org/10.3390/foods10010062>

5. **Resultados y discusión.** En este apartado se destacan los resultados obtenidos más relevantes en la investigación, así como una breve discusión de los mismos para cada una de las publicaciones.

6. **Conclusiones/Conclusions.** En este apartado se incluyen las principales conclusiones obtenidas de esta Tesis doctoral.

7. **Investigaciones futuras.** En este tópico, una breve reseña de las investigaciones futuras que se pueden realizar en base a lo investigado.

8. **Referencias.** En este apartado se relacionan las referencias utilizadas para escribir y justificar el presente documento de Tesis doctoral.



RESUMEN/ABSTRACT



RESUMEN

Los limones son beneficiosos para la salud humana por su actividad antioxidante, fenoles y vitamina C. El objetivo de la presente Tesis Doctoral fue evaluar el efecto de los portainjertos sobre la calidad de la fruta. El primer experimento evaluó tres portainjertos obtenidos en el programa de mejora genética de patrones español [Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)]: portainjerto de cítricos Forner - Alcaide 5 ('FA 5'), Forner - Alcaide 13 ('FA 13') y Forner- Alcaide 517 ('FA 517') injertados con cuatro variedades de limón (*Citrus limon* (L) Burm f.): 'Eureka', 'Verna', 'Fino 49' y 'Betera'. El segundo experimento investigó los dos portainjertos tradicionales, (*Citrus macrophylla* Wester y *Citrus aurantium* L.) injertados con 'Fino 95', 'Fino 49' y 'Verna'. La tercera investigación consistió en determinar el perfil volátil del aceite de la corteza de todas las combinaciones patrón/injerto. Los parámetros evaluados en fruto, en el primer y segundo estudio fueron: características morfológicas (color, peso, calibre, espesor de corteza, porcentaje de zumo), características químicas (sólidos solubles totales, acidez titulable, índice de madurez, azúcares y ácidos orgánicos) y características nutraceuticas (actividad antioxidante y contenido total de polifenoles). Como resultado del primer y segundo ensayo se encontró que los portainjertos del grupo Forner Alcaide influyeron en la disminución en el peso, tamaño y espesor de la corteza, pero incrementaron el porcentaje de zumo y sólidos solubles. En el contenido de polifenoles y actividad antioxidante, los portainjertos 'FA 13' y 'FA 517' mostraron los valores más altos en todas las variedades estudiadas. *C. aurantium* presentó mejores propiedades organolépticas que *C. macrophylla*. En el tercer experimento, los portainjertos que influyeron en los compuestos volátiles fueron de mayor a menor concentración 'FA5' > 'FA517' > 'FA13' > *C. aurantium* > *C. macrophylla* y las variedades más aromáticas 'Eureka' > 'Betera' > 'Fino 95' > 'Verna' > 'Fino 49'.

Estas evaluaciones determinaron que los portainjertos influyen en las características físicas, químicas, nutraceuticas y en el perfil de compuestos volátiles. Esta investigación contribuye a fortalecer la necesidad de continuar evaluando los portainjertos para obtener frutos en la apariencia requerida por el consumidor, pero también en sus propiedades internas como el contenido de vitamina C y antioxidantes importantes para la salud.

ABSTRACT

Lemons are beneficial for human health due to their antioxidant activity, phenols and vitamin C. The objective of this Doctoral Thesis was to evaluate the effect of rootstocks on the quality of the fruit. The first experiment evaluated three rootstocks obtained in the Spanish stock breeding program [Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)]: citrus rootstock Forner - Alcaide 5 ('FA 5'), Forner - Alcaide 13 ('FA 13') and Forner- Alcaide 517 ('FA 517') grafted with four varieties of lemon (*Citrus limon* (L) Burm f.): 'Eureka', 'Verna', 'Fino 49' and 'Betera'. The second experiment investigated the two traditional rootstocks, (*Citrus macrophylla* Wester and *Citrus aurantium* L.) grafted with 'Fino 95', 'Fino 49' and 'Verna'. The third investigation consisted in determining the volatile profile of the bark oil of all the standard / graft combinations. The parameters evaluated in the fruit, in the first and second study were: morphological characteristics (color, weight, size, rind thickness, percentage of juice), chemical characteristics (total soluble solids, titratable acidity, maturity index, sugars and organic acids) and nutraceutical characteristics (antioxidant activity and total polyphenol content). As a result of the first and second trials, it was found that the rootstocks of the Forner Alcaide group influenced the decrease in the weight, size and thickness of the bark, but increased the percentage of juice and soluble solids. In the content of polyphenols and antioxidant activity, the rootstocks 'FA 13' and 'FA 517' showed the highest values in all cultivars studied. *C. aurantium* had better organoleptic properties than *C. macrophylla*. In the third experiment, the rootstocks that influenced the volatile compounds were from higher to lower concentration 'FA5' > 'FA517' > 'FA13' > *C. aurantium* > *C. macrophylla* and the more aromatic cultivars 'Eureka' > 'Bétera' > 'Fino 95' > 'Verna' > 'Fino 49'.

These evaluations determined that rootstocks influence the physical, chemical, nutraceutical characteristics and the profile of volatile compounds. This research contributes to strengthening the need to continue evaluating rootstocks to obtain fruits in the appearance required by the consumer, but also in their internal properties such as the content of vitamin C and antioxidants important for health.

1. INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

Importancia Económica de los Cítricos

Los cítricos son importantes económicamente, porque se cultivan en más de 130 países alrededor del mundo y están en el segundo lugar en producción después de las musáceas (bananos y plátanos). A nivel mundial, la producción de cítricos para el año 2018 (FAOSTAT, 2020) fue de 138.550.738 toneladas, las naranjas alcanzaron alrededor de 75,4 millones de toneladas, las mandarinas, tangerinas y clementinas 34,4 millones, los pomelos 9,4 millones y los limones más limas 19,4 millones de toneladas, que en porcentaje a nivel mundial fue del 14% de la producción total de cítricos. La superficie cultivada de cítricos en el mundo fue de 9,8 millones de hectáreas, correspondiendo a las naranjas 4,5 millones de hectáreas, el grupo de mandarinas 3,6 millones de hectáreas, los pomelos y toronjas 374 mil hectáreas y, por último, los limones más limas fue de 1,3 millones de hectáreas, significando 13% del área mundial destinada a los cítricos.

La evolución en superficie de limones en el mundo desde 1961 al 2018 es registrada en la **Tabla 1**. En el año 1961 había 205.512 hectáreas y en 2018, la superficie cosechada había crecido en cinco veces a nivel mundial (1.267.401 ha). De acuerdo a lo registrado para la década de 1970 el área se incrementó en 22% aproximadamente, manteniendo ese registro en las siguientes décadas, salvo en 2010 donde creció 27%. Sin embargo, en España el crecimiento en ese periodo fue del 100%, debido a que en 1961 había 8.200 ha y en 1970 fue de 15.300 ha. Pero el mayor crecimiento se dió en 1985 con 48.111 ha, significando casi el 10% del área cultivada del mundo. Esto ocurrió probablemente cuando las condiciones del mercado eran más ventajosas, como la incorporación a la Unión Europa, pero después de las restricciones al mercado americano en 2004, al mercado ruso en 2014, la ley 12/2013 de las buenas prácticas agrícolas y las condiciones climáticas desfavorables se redujeron a 38.484 ha en el año 2015. Sin embargo, en 2018 se incrementó en 46.010 ha.

Tabla 1. Evolución de los limones y limas en superficie, producción y rendimiento desde 1961 – 2018.

Año	Superficie			Producción			Rendimiento	
	Mundo (ha)	España (ha)	%	Mundo (t)	España (t)	%	Mundo (t/ha)	España (t/ha)
1961	205.512	8.200	4,0	2.619.753	121.000	4,6	12,75	14,76
1965	248.719	11.200	4,5	2.969.680	96.000	3,2	11,94	8,57
1970	263.337	15.300	5,8	3.499.239	96.800	2,8	13,29	6,33
1975	325.720	22.200	6,8	5.028.729	253.700	5,0	15,44	11,43
1980	393.631	33.300	8,5	5.136.814	336.000	6,5	13,05	10,09
1985	499.081	48.111	9,6	6.299.546	481.633	7,6	12,62	10,01
1990	563.641	46.199	8,2	7.251.228	629.700	8,7	12,86	13,63
1995	619.698	41.085	6,6	8.197.970	605.500	7,4	13,23	14,74
2000	789.031	45.833	5,8	10.840.960	915.049	8,4	13,74	19,96
2005	761.510	45.171	5,9	12.345.508	944.836	7,7	16,21	20,92
2010	1.039.911	40.801	3,9	14.724.505	717.906	4,9	14,16	17,60
2015	1.057.586	38.484	3,6	16.908.006	886.272	5,2	15,99	23,03
2018	1.267.401	46.010	3,6	19.368.838	1.087.232	5,6	15,28	23,63

Fuente: FAOSTAT (2020)

En la **Tabla 1** también se observa la evolución de la producción mundial de limones y limas desde 1961 a 2018 de acuerdo a FAOSTAT (2020). El registro más antiguo es del año 1961 con 2.619.753 toneladas en el mundo, pero en 1975 la producción se duplicó en 5 millones de toneladas y para el año 2000 siguió la misma tendencia; para el año 2018 la producción fue de 19.368.838 toneladas. Cada 20 veinte años el mundo duplica la producción de limones y limas de acuerdo a las estadísticas, ésta parece ser la tendencia para este cultivo. En España, la producción en 1961 alcanzó 121.000 toneladas, se duplicó para 1975, e igual ocurrió para 1990, en el año 2000 creció un 70%, sin embargo, las condiciones climáticas no han favorecido el incremento de la producción para 2010 y 2015. En el año 2018 se ha recuperado en 1.087.232 toneladas y para 2019 se estima que la producción es de 1.104.000 toneladas (Ailimpo, 2020).

El rendimiento a nivel mundial ha sido constante siendo el máximo rendimiento de 16,21 t/ha; mientras en España en los últimos años ha mejorado llegando a 24 t/ha.

La producción mundial de los principales países productores de limones y limas desde 2010 a 2018 se observa en la **Tabla 2**. Los principales países productores son India y México. La producción total en el mundo de limones y limas frescos fue de 14,8 millones de toneladas en 2010 y en los siguientes años hubo un ligero incremento constante anual hasta 2018, cuando la producción mundial alcanzó los 19,4 millones de toneladas. Durante este periodo la producción se incrementó en un 30%. En el año 2018 India mostró una producción de 3,15 millones de toneladas, seguida por China, Argentina, Brasil, Turquía, España, U.S.A., Sudáfrica e Irán. Mientras Italia solo figura dentro del ranking hasta el 2016, que fue desplazado por Sudáfrica posteriormente. España en este periodo incrementó su producción en un 30% aproximadamente y la tendencia ha sido continuar aumentándola.

Es necesario tener en cuenta que han surgido nuevos países productores como Turquía, Sudáfrica e Irán los que serán los competidores inmediatos del mercado de la Unión Europea, y disputarán con España, mantenerse dentro de los diez principales productores mundiales.

Los diez primeros países con mayor superficie de limones y limas se muestran en la **Tabla 3**. El principal país es India, en el periodo 2010-2018, con 295.600 a 286.000 mil hectáreas. El segundo país en importancia es México, en ese lapso de tiempo ha incrementado su superficie en 32.000 mil hectáreas. Al igual que China que incrementó en 12 mil hectáreas. Luego siguen países como Argentina y Brasil con 57.665 y 52.784 hectáreas respectivamente. España en la última década sólo ha incrementado su área en 6.000 hectáreas. Los países con superficie menor de 28.000 ha, no figuran como Perú, Bangladés, Italia y EEUU para el año 2018.

INTRODUCCIÓN

Tabla 2. Producción mundial de limones y limas en toneladas (t) de los diez principales países desde 2010 al 2018.

Nº País	2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016		2017		2018	
		t	País	t	País	t	País	t	País	t	País	t	País	t	País	t	País	t
1	India	2.629.200	Mexico	2.147.740	India	2.272.100	India	2.523.500	India	2.835.020	India	2.950.000	India	2.438.000	México	2.528.174	India	3.148.000
2	China	2.040.500	India	2.108.000	México	2.070.764	México	2.138.737	México	2.205.079	México	2.342.780	México	2.429.839	India	2.364.000	México	2.547.834
3	México	1.891.403	China	1.776.080	China	1.942.570	China	2.014.000	China	2.130.500	China	2.196.050	China	2.258.922	China	2.290.068	China	2.482.884
4	Argentina	1.113.375	Argentina	1.756.351	Argentina	1.456.069	Argentina	1.485.963	Brasil	1.101.799	Argentina	1.561.606	Argentina	1.678.337	Argentina	1.676.000	Argentina	1.989.400
5	Brasil	1.020.741	Brasil	1.126.736	Brasil	1.208.275	Brasil	1.169.370	España	1.090.709	Brasil	1.180.443	Brasil	1.234.691	Brasil	1.293.774	Brasil	1.481.322
6	U.S.A.	800.137	U.S.A.	834.611	U.S.A.	912.000	U.S.A.	827.352	Argentina	953.890	España	886.272	España	955.578	Turquía	1.007.133	Turquía	1.100.000
7	Turquía	787.063	Turquia	790.211	Turquia	710.211	Turquia	726.283	U.S.A.	747.520	U.S.A.	820.100	U.S.A.	820.100	España	925.615	España	1.087.232
8	España	717.906	España	736.198	España	683.604	España	715.300	Turquía	725.230	Turquía	750.550	Turquía	850.600	U.S.A.	803.770	U.S.A.	812.840
9	Italia	522.377	Italia	483.088	Irán	406.296	Irán	427.715	Irán	481.111	Irán	438.374	Irán	451.726	Irán	446.878	Sudáfrica	474.149
10	Irán	368.245	Irán	384.123	Italia	346.325	Italia	327.282	Italia	370.458	Italia	388.435	Italia	435.471	Sudáfrica	446.340	Irán	445.460
	Mundo	14.724.505	Mundo	15.059.330	Mundo	15.026.675	Mundo	15.434.482	Mundo	15.899.014	Mundo	16.908.006	Mundo	17.234.276	Mundo	17.456.457	Mundo	19.368.838

Fuente: FAOSTAT (2020)

Tabla 3. Superficie mundial de limones y limas en hectáreas cosechadas de los diez principales países desde 2010 al 2018.

Nº	País	2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016		2017		2018	
		ha	ha	ha	ha	País	ha	País	ha	País	ha	País	ha	País	ha	País	ha	País	ha
1	India	295.600	219.000	India	234.000	India	255.200	India	286.410	India	268.000	India	245.000	India	248.000	India	286.000	India	286.000
2	México	143.869	151.021	México	150.684	México	151.765	México	156.429	México	161.681	México	163.466	México	172.255	México	175.826	México	175.826
3	China	115.000	85.000	China	92.260	China	97.000	China	96.000	China	106.000	China	100.605	China	104.620	China	126.804	China	126.804
4	Argentina	43.575	48.628	Brasil	47.349	Brasil	45.690	Brasil	43.399	Argentina	50.616	Argentina	51.926	Argentina	53.744	Malawi	104.612	Malawi	104.612
5	Brasil	42.779	47.267	Argentina	46.794	España	41.000	España	37.743	Brasil	46.088	Brasil	46.465	Brasil	48.162	Argentina	57.665	Argentina	57.665
6	España	40.801	39.571	España	39.463	España	38.400	Argentina	29.705	España	38.484	España	41.218	España	43.087	Brasil	52.784	Brasil	52.784
7	Italia	28.854	27.706	Turquía	26.563	Turquía	27.425	Turquía	27.665	Turquía	28.570	Sudán	30.870	Turquía	32.428	España	46.010	España	46.010
8	Irán	26.443	25.850	Italia	25.703	Irán	26.145	Irán	26.041	Irán	27.300	Irán	30.033	Sudán	32.000	Turquía	35.911	Turquía	35.911
9	Turquía	25.360	24.552	Irán	25.469	Italia	25.734	Italia	25.996	Italia	25.466	Irán	28.641	Irán	28.337	Irán	29.572	Sudán	29.572
10	U. S. A.	23.067	22.460	Perú	24.147	U. S. A.	25.140	U. S. A.	21.974	Bangladés	24.200	Perú	26.165	Perú	26.284	Irán	28.205	Irán	28.205
	Mundo	1.039.911	954.964	Mundo	972.717	Mundo	1.002.014	Mundo	1.018.325	Mundo	1.057.586	Mundo	1.052.240	Mundo	1.089.434	Mundo	1.267.401	Mundo	1.267.401

Fuente: FAOSTAT (2020)

España se ha mantenido como el primer exportador mundial y de Europa en cítricos (naranjas, mandarinas, toronjas y limones). En la **Tabla 4** se puede observar, para el año 2019, el volumen de las exportaciones dentro de la UE fue de 643.966 toneladas. Alemania, Francia y Reino Unido fueron los principales países con más del 50% de lo exportado. Las exportaciones fuera de UE han sido de 43.947 toneladas (Ailimpo, 2020).

Tabla 4. Exportación de limones en fresco a los países de la Unión Europea, en toneladas para el año 2019.

País	Año 2019 (t)	País	Año 2019 (t)
Alemania	193.838	Eslovaquia	6.636
Francia	118.309	Eslovenia	3.864
Reino Unido	71.274	Croacia	3.430
Italia	64.929	Irlanda	3.425
Polonia	54.422	Finlandia	2.856
Países Bajos	27.184	Letonia	2.590
Austria	15.593	Lituania	2.238
Bélgica	11.894	Estonia	1.695
Suecia	13.664	Grecia	1.186
Rep. Checa	13.048	Bulgaria	887
Portugal	8.810	Luxemburgo	450
Rumania	7.395	Malta	201
Dinamarca	7.305	Chipre	18
Hungría	6.780	TOTAL	643.966

Fuente: Ailimpo (2020)

El principal importador de limones ha sido Alemania con 193.838 toneladas, en segundo lugar, Francia con 118.309 toneladas. Otros países importantes son Reino Unido, Italia y Polonia sumando entre ellos 190.625 toneladas. Para la campaña 2019, el volumen total importado fue de 643.966 toneladas y el valor ascendió a 639.841.231 euros. La producción se incrementó en esa campaña un 10% respecto a la anterior; pero el valor en euros disminuyó un 4,7% (Ailimpo, 2020).

Sin embargo, España que también exporta a países fuera de la Unión Europea. En el año 2019, registró 43.947 toneladas con un valor económico de 46.878.250 euros,

incluyendo un total de 47 países. Este valor representó aproximadamente, el 4% de la producción, un aumento del 29% del volumen de exportación y un incremento del 14% del valor en euros con respecto a la campaña anterior. Los principales países de destino fueron Canadá y Suiza con 14.046.180 t y 11.611.033 t; en segundo lugar, en importancia Estados Unidos, Noruega y Serbia con 7.836.684 t, 3.528.267 t y 1.784.406 t, respectivamente. Además, se exportó en menor cuantía a otros países: Brasil, Congo, Emiratos Árabes Unidos, Bielorrusia, Ucrania y Singapur (Ailimpo, 2020). En total el limón español llegó a 74 países del mundo.

En cuanto a la industria de transformación España es el segundo productor en zumo, aceite esencial y corteza deshidrata, siendo en 2019 de 355.155 t y en el 2018 fue 211.374 toneladas (Ailimpo, 2019).

Amenazas a la producción de Cítricos – Limones

La producción de limones en fresco tiene importancia económica para España, porque se exporta a la comunidad europea y a otros 47 países fuera de ella, generando alrededor de 17.000 puestos de trabajo directo, con un valor de 710 millones de euros (Ailimpo, 2019). Sin embargo, los cítricos y concretamente los limones tienen algunas amenazas que pueden comprometer su producción y comercialización. A continuación, se mencionan:

Aumento de aranceles de Trump

Después de 16 años de conflicto entre Unión Europea y el gobierno de EEUU, la Organización Mundial de Comercio (OMC), dictaminó a favor de EEUU en diciembre de 2019. Esta discrepancia que comenzó 2004, surgió por la ayuda financiera a Airbus (industria aeronáutica), emitidas por algunos países de la UE, como Francia, Reino Unido, Alemania y entre ellos España. La sanción de EEUU fue restringir las importaciones al mercado americano imponiendo una tasa arancelaria del 35% a los productos agrícolas procedentes de aquellos países responsables de la UE, excepto Italia (Agrolibre, 2020).

Política de restricción al mercado ruso

En el año 2014, el presidente de Rusia Vladimir Putin, cerró el mercado ruso a las importaciones de productos agrícolas, materias primas y alimentos provenientes de la Unión Europea, EEUU y otros países como respuesta a las sanciones contra altos funcionarios y empresas (bancos y petroleras rusas), que fueron impuestas por estos países, por la intervención de Rusia al problema ucraniano. Y estas medidas han sido prorrogadas hasta el 31 de diciembre del 2020. Dichas medidas han afectado las exportaciones de España. Esta restricción, es conocida como el veto ruso (Agrolibre, 2020; Malunda, 2019).

Apertura de nuevos mercados para la importación de cítricos (incluido limón)

En el año 2018, la Unión Europea incrementó las importaciones de cítricos en 2,6 millones de toneladas, con un valor económico de 2,2 millones de euros; representando los limones un 10% de ello. Estas importaciones provienen de países como Sudáfrica, Turquía, China y Argentina donde los precios ofertados son bajos, debido a sus costes de producción, a la devaluación de su moneda y en algunos casos a la exoneración de los aranceles (Malunda, 2019).

Además, el anuncio de un tratado comercial (28 junio 2019) con el Mercosur (Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay) que aún se encuentra en negociaciones, así como el retiro paulatino de los aranceles al zumo de cítricos (naranja) en diez años para Brasil, la apertura de otros mercados como Ecuador para naranjas y mandarinas o el mercado de Vietnam para cítricos perjudica seriamente la citricultura española (Ailimpo, 2018).

Residuos de plaguicidas en contenedores de limoneros por las importaciones

Las importaciones de limón por terceros países registraron un exceso de residuos de plaguicidas. En el año 2018, se detectó en las fronteras de Bulgaria y Alemania, la presencia del producto Imazalil (10,7 – 6,8 mg/kg), por encima del límite permitido de 5 mg/Kg, así como Clorpirifos con 0,44 mg/kg, siendo el límite en limones 0,2 mg/Kg, en todos los casos los contenedores fueron rechazados (Ailimpo, 2019). Para la campaña

2017 se tuvieron 4 alertas con los productos Clorpirifos, Imazalil y Propiconazol, para los limones provenientes de Turquía (Ailimpo, 2018).

Salida del Reino Unido de la UE

La salida del Reino Unido de la Unión Europea (Brexit) fue concretado el 31 de enero del 2020, después de tres años de gestiones y, para España, el Reino Unido es el tercer comprador importante después de Alemania y Francia. Sin embargo, aún no se tiene claro cuál será la política para estas exportaciones de limón fresco, pero se plantea que no deberían tener aranceles o probablemente también podrían considerar aranceles portuarios (Maluenda, 2019; Ailimpo, 2020).

Introducción de nuevas plagas

Debido a la importación de limones procedentes de países terceros como Argentina, Turquía, China o Sudáfrica, se han registrado nuevas plagas en la Unión Europea. La introducción de plagas que no estaban presentes en España y que compromete la citricultura española, hace necesario adoptar medidas que protejan la producción, con la finalidad de evitar el incremento en los costes de producción por la aplicación de pesticidas que reducen la rentabilidad del cultivo (Calabuig et al., 2020; Mollá, 2020).

En 2011 fue detectada la plaga *Delottococcus aberiae* conocida como cotonet de Sudáfrica o cotonet de les Valls, por importaciones de Sudáfrica. En la actualidad está presente en las provincias de Alicante, Murcia y Tarragona (Mollá, 2020).

En agosto 2014 en Galicia fue detectada la Psila africana de los cítricos (*Trioza erytrae*), vector de la enfermedad bacteriana HLB (Huanglongbing). Es nativo del África subsahariana (Casado et al., 2015).

En junio de 2019 fue identificada una nueva plaga *Pulvinaria polygonata* (Cockerell) (Hemiptera: Coccidae), que afectó a más de 5.000 hectáreas en la Vega Baja, tiene preferencia por limones, naranjas, mandarinas y clementinas -en ese orden- (Calabuig et al., 2020; Mollá, 2020).

Con respecto a las enfermedades, la conocida como el mal seco (*Plenodomus tracheiphilus*), fue localizada en junio de 2015, en la provincia de Málaga (Valle del Guadalhorce), afectando a limoneros (Ailimpo, 2018).

Mollá (2020) declaró que se detectó un cargamento proveniente de EEUU infectado con *Xylella fastidiosa* conocida como clorosis variegada de los cítricos (CVC) - enfermedad que se encuentra presente en Alicante- en el puerto de Castellón y reportado en almendro en el municipio de Guadalest a mediados del 2017 (Ailimpo, 2017). Así mismo en el puerto de Valencia se han localizado limones con la bacteria *Xantomona citri*, que ocasiona el cancro de los cítricos (Mollá, 2020).

Sin embargo, existen otras enfermedades latentes como:

Candidatus liberibacter africanus llamado Huanglongbing (HLB) o Greening de los cítricos. Esta enfermedad tiene dos insectos vectores *Trioza erytreae* (que está presente en España) y *Diaphorina citri* (ausente), tiene presencia en EEUU, Brasil y el continente asiático (Casado et al., 2015).

Guignardia citricarpa (fase sexual) y *Phyllosticta citricarpa* (fase asexual), mancha negra de los cítricos, presente en Australia, y detectada en África (Sudáfrica), Asia y América Norte. El limón es el más susceptible a la enfermedad y el portainjerto *C. aurantium* es resistente (Casado et al., 2015). Esta enfermedad está presente en países como Argentina, Brasil y Uruguay (Ailimpo 2017).

Todas las amenazas anteriormente detalladas, perjudican seriamente al limonero aumentando los costes de producción y reduciendo la rentabilidad del cultivo. La importación de limones se produce porque hay una demanda sin satisfacer. Es fundamental el uso de portainjertos que contribuyan a mejorar la producción, prolonguen la cosecha, reduzcan el tamaño del árbol y mantengan la calidad de la fruta demandada por el consumidor. Los portainjertos más utilizados para limonero son *C. macrophylla* y *C. aurantium* por su tolerancia a enfermedades, a suelos calcáreos y a la calidad en la fruta que producen. Pero en el nuevo contexto internacional tener otras alternativas respecto a portainjertos, cultivares y ampliar las zonas de producción, es algo a tener presente para poder seguir incrementando la producción, el hectareaje y continuar liderando la exportación.

Portainjertos

El uso de portainjertos y la técnica de injerto empezaron en el siglo XV y fue empleada en los siglos XVI y XVII (Jiménez y Zamora 2010). A finales del siglo XVIII, comenzaron las plantaciones comerciales de los cítricos, así como las exportaciones en fresco y en el mundo la mayoría de árboles se habían propagado por semilla (Veyrat, 1968). Los cítricos procedentes de Italia y Portugal llegaron a España a las provincias de Valencia y Castellón, donde se utilizó como portainjertos el cidro y limonero, multiplicados por enraizamiento de estacas, también se propagó por semilla el naranjo sin injertar (Villalba, 2001; MARM, 2008).

La propagación de árboles frutales por semilla se llaman francos, siendo las desventajas un vigor excesivo, un largo periodo juvenil y un retraso en la producción (Veyrat, 1968). En 1860, apareció la gomosis (*Phytophthora* spp), en naranjo dulce y limonero, afectando a las plantaciones de cítricos por lo que se realizó el cambio de portainjerto a naranjo amargo (*Citrus aurantium* L). En 1957 se hizo presente la enfermedad de la tristeza, afectando en la cuenca Mediterránea al 95% de las plantaciones de cítricos que se encontraban sobre el portainjerto naranjo amargo (Veyrat, 1968; Villalba, 2001). En algunos lugares de España tenían como portainjerto mandarino común o naranjo dulce detectándose que eran tolerantes a dicha enfermedad.

Los portainjertos más utilizados para limonero, son *C. macrophylla* Wester y *C. aurantium* L. los cuales son tolerantes a *Phytophthora* y virus salvo con otras combinaciones resultan ser susceptibles (MARM, 2008).

Los portainjertos se unen a los cultivares comerciales mediante la utilización del injerto. El injerto es una técnica agronómica ancestral que consiste en unir dos porciones de plantas diferentes en una sola, para mejorar la producción y la calidad de la fruta (Gil-Izquierdo et al., 2004; Warschefsky et al., 2016). Esta práctica es muy antigua y data mil años antes de Cristo (Mudge et al., 2009). Para realizar la técnica del injerto ambos deben reunir algunas características como, por ejemplo, la variedad de la cual se recogerán las varetas, deben estar libre de plagas y enfermedades y tener por lo menos tres años de producción (Hartman et al., 2002). También, se requiere principalmente la

compatibilidad entre el portainjerto y la variedad, se debe tener en cuenta la orientación del injerto y el tamaño de la variedad con la finalidad de obtener una rápida brotación y mayor área foliar (Khan et al., 2018). El portainjerto ideal, debería tener alto rendimiento, adaptación a un amplio rango de factores medioambientales (clima, suelo, resistencia a las plagas y enfermedades) y una óptima calidad de la fruta -tamaño, color y larga vida postcosecha- (Wright y Peña, 2002).

Con el avance de la biotecnología se ha empleado la técnica del injerto a nivel de laboratorio, llamándola microinjerto o microinjerto-puntas y tiene un protocolo común donde el portainjerto y la variedad se desarrollan, se injertan *in vitro* y posteriormente se transfieren al suelo con el objetivo de obtener plantas libres de virus, espiroplasma y viroide, acortando el periodo juvenil (Navarro et al., 1975; Navarro, 1992). El tamaño del portainjerto y la variedad suele ser 25 mm y 0,5 mm, respectivamente. Además de obtener plantas libres del virus de la tristeza de cítricos (CTV), también es utilizada para localizar portainjertos compatibles (Sanabam et al., 2015).

Dentro de los nuevos avances, la técnica del injerto también ha evolucionado con la transgénesis. La utilización de portainjertos modificados genéticamente injertados con variedades no transgénicas se ha demostrado que influye en la calidad de la fruta, incrementa el porcentaje de enraizamiento radicular, el color del fruto y el contenido de sólidos solubles. Esta nueva técnica de injerto recibe el nombre de “transinjerto” (Smolka, et al., 2010; Limerá et al., 2017; Poles et al., 2020). Hay 13 portainjertos transgénicos con patentes, cinco de ellas pertenecen a Cornell Research Foundation (Estados Unidos) privado y es una de 10 instituciones que tienen la técnica del transinjerto patentada (Lusser et al., 2012).

Portainjertos más utilizados en el mundo

A continuación, los 21 portainjertos y los países donde son reconocidos, que han sido determinados considerando el 5% de propagación en las zonas donde se cultivan los cítricos (Browman y Joubert, 2020).

El primero, **1. *Poncirus trifoliata*** (L.) Raf. (naranja trifoliada) utilizada en Japón, China, Australia, Nueva Zelanda, Argentina. **2. Naranja amargo** (*Citrus aurantium* L.) considerado el portainjerto ideal, utilizado en nuevas producciones en Grecia, Turquía, Túnez, Arabia Saudí, Israel, Irán, Honduras y México. **3. Citrange Carrizo** híbrido ('Washington Navel' naranja x *P. trifoliata*), incompatible con 'Eureka', es muy utilizado en España, Sudáfrica, Italia, Australia y Estados Unidos (California). **4. Swingle** citrumelo híbrido ('Duncan' *Citrus paradisi* x *P. trifoliata*), incompatible con limón 'Eureka', predomina su utilización en Colombia, Panamá, Nicaragua, Costa Rica y Tailandia. **5. Limón Volkameriano** (*Citrus volkameriana*) híbrido (mandarina x cidra), un portainjerto reconocido en México, República Dominicana, Egipto e Israel. **6. Alemow o Macrophylla** híbrido (*Citrus micrantha* x *Citrus medica*), injertado con limón principalmente o lima usado en Sudáfrica, España, Estados Unidos (California, Florida) y Marruecos. **7. Limón rugoso** (*Citrus jambhiri* Lush), actualmente empleado en India y Pakistán en recientes plantaciones, es el segundo portainjerto utilizado en Sudáfrica. **8. Rangpur** (*Citrus limonia* Osbeck) portainjerto más importante en Brasil e Indonesia. **9. US812**, conocido como 'Sunki-Benecke' en Israel, Sudáfrica y de reciente difusión. **10. X639** ('Cleopatra' x *P. trifoliata*), compatible con 'Eureka', presenta importancia en Florida y Sudáfrica. **11. Mandarina 'Cleopatra'** (*C. reshni*) ampliamente distribuida pero no es predominante en ningún país. **12. Forner-Alcaide 5 (FA5)** híbrido (mandarina 'Cleopatra' x *P. trifoliata* 'Rubidoux') importante en España. **13. (MxT)** ('Minneola' x *P. trifoliata*) importante en Sudáfrica y compatible con limonero. **14. Sunki** (*Citrus sunki* hort ex Tanaka) utilizado ampliamente en Brasil. **15. Benton** híbrido (*C. sinensis* x *P. trifoliata*), cultivado en Australia e injertado con 'Eureka' principalmente. **16. Ziyang Xiangcheng** (*Citrus junos*) o híbrido (*Citrus ichangensis* x *C. reticulata*) limitado al sureste de China. **17. C35** híbrido (naranja dulce 'Ruby' x *P. trifoliata*), es el segundo en importancia en California (Estados Unidos). **18. Kuharske** (selección de citrange 'Carrizo') importante en nuevas plantaciones en Florida (Estados Unidos). **19-21. US-897, US-942, US-802**, híbrido (pomelo 'Siam' (*C. máxima*) x 'Gotha Road' (*P. trifoliata*)), importantes sólo en Florida -Estados Unidos- (Bowman y Joubert, 2020).

Portainjertos más utilizados para limón en España

***Citrus macrophylla* Wester**

Citrus macrophylla W. es el principal patrón de limonero en España, el cual es un portainjerto vigoroso, que induce cosecha temprana de los limones y frutos de corteza delgada, lo que favorece su calidad. En árboles de 'Fino 95' sobre este portainjerto se observaron menos rebrotes del portainjerto (Wright y Peña, 2002). También, se ha registrado que la combinación 'Fino'/*C. macrophylla*, con altas concentraciones de sales en el agua de riego, aumenta el porcentaje de pulpa, disminuye los sólidos solubles, la acidez y reduce el rendimiento en más del 30% (Pérez-Pérez et al., 2016).

Este portainjerto utilizado con limón 'Verna' es muy eficiente en el uso de agua, por ser vigoroso, incrementa el área foliar y la producción en condiciones óptimas de riego; pero con déficit hídrico el crecimiento vegetativo se reduce rápidamente (Robles et al., 2017). Al ser un portainjerto tolerante a la salinidad, las características como espesor de corteza, concentración de sólidos solubles, acidez total e índice de madurez no fueron afectados en pomelo 'Star Ruby' cuando fueron regados con agua salina de conductividad eléctrica de 3,51 dS m⁻¹ y un SAR (relación de adsorción de sodio) de 7,78 meq L⁻¹ (Romero-Trigueros et al., 2020).

En tangelo 'Minneola'/*Citrus macrophylla*, acentúa la coloración externa y el tamaño de los frutos y disminuye la concentración de sólidos solubles y acidez total siendo la relación SS/AT óptima y mejorando la calidad interna (Levy y Lifshitz, 1995). Resultados similares fueron observados en las características de los frutos de naranja 'Valencia Late' (Benyahia et al., 2017). Mientras en naranjas sanguinas 'Tarocco' y 'Moro', el color del zumo mostró una menor coloración (Morales et al., 2020). En la actualidad, por irradiación se han obtenido mutantes de este portainjerto, siendo más tolerantes a la salinidad (Pérez-Jiménez y Pérez-Tornero, 2020) donde algunos excluyen Cl (Cloro) como MM1A, MM4A, MM3B y otros Na (sodio) MM4B y MMN1 (Pérez-Jiménez y Pérez-Tornero, 2020a).

En resumen, se puede concluir que es un portainjerto vigoroso, tolerante a la salinidad, que influye en la coloración de los frutos, confiere corteza delgada en limones y puede inducir a una cosecha temprana.

***Citrus aurantium* L.**

Conocido como naranjo amargo o naranjo agrio, procede de la zona entre el noroeste de la India y los límites de China y Birmania (Ancilla y Medina, 2015). Es un híbrido F1 del cruce de *C. maxima* pura y *C. reticulata* (Wu et al., 2014). Algunas características reportadas en las investigaciones muestran que como portainjerto mejora la absorción de cobre y zinc en suelos con bajo contenido de nutrientes (Dubey y Sharma, 2016). Además, puede disminuir la granulación en naranja ‘Valencia’ y mejorar la calidad (Kotsias, 2004).

En evaluación a nivel de invernadero, *C. aurantium* fue moderadamente sensible a la salinidad, respecto a Citrange ‘Troyer’ que fue más sensible y *Poncirus trifoliata* que fue ligeramente tolerante (Rochdi et al., 2003). Sin embargo, la concentración de 35mM NaCl no afectó el crecimiento apical, mientras concentraciones de 70 mM NaCl, pueden reducir la biomasa de este portainjerto (Rochdi et al., 2005)

Las características de calidad, cuando se injerta con ‘Valencia Late’, son porcentaje de zumo del 50%, sólidos solubles bajo, alta concentración de acidez total (AT) y con relación SS/AT alta (Benyahia et al., 2017). En clementina ‘Marisol’, con portainjerto de naranjo amargo se obtuvo un mayor peso, menor cantidad de sólidos solubles, mayor acidez y menor índice de madurez cuando se comparó con citrange ‘Carrizo’, ‘Swingle’ citrumelo- y mandarino ‘Cleopatra’ (Bassal, 2009).

Con el portainjerto *C. aurantium*, la infección con diversos virus y viroides no alteró la calidad de la fruta manteniendo constante el pH, los sólidos solubles, la acidez total y el porcentaje en el zumo de naranja dulce ‘Maltaise demi sanguine’ con respecto al control (Najar et al., 2017).

Forner Alcaide

Los portainjertos del grupo Forner Alcaide fueron obtenidos por hibridación, en el Programa de Mejora de Portainjertos de Cítricos del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) en Moncada España. El objetivo fue conseguir portainjertos tolerantes al virus de la tristeza, salinidad, clorosis férrica y resistencia a *Phytophthora* sp (Forner et al., 2003). Así se obtuvieron los patrones ‘FA 5’ y ‘FA 13’,

selecciones del cruce de mandarino 'Cleopatra' por *P. trifoliata* 'Rubidoux' realizado en 1978 y registrado en 1998 (Forner et al., 2003a). En suelos calcáreos 'FA 5' se comporta mejor que 'FA13' (González-Mas et al., 2009). También, se demostró que 'FA5' es más tolerante a la salinidad mediante la exclusión que 'FA13' (Forner-Giner et al., 2009). Se determinó la resistencia al estrés hídrico, comparado con sus progenitores, y presentó un mayor ajuste osmótico, disminuyó la reducción del contenido relativo del agua en la hoja, tuvo un mayor potencial de turgencia y de intercambio de CO₂ y O₂ en las hojas (Rodríguez-Gamir et al., 2010) y por el menor vigor que influye asociándolo a la expresión de un gen (Rodríguez-Gamir et al., 2011). Con respecto a la clorosis férrica, 'FA 5' fue más tolerante que 'FA 13' (Llosá et al., 2009).

La respuesta de estos portainjertos en la asimilación de nutrientes en un medio salino determinó un mejor comportamiento de 'FA13' comparado a 'FA 5', en la reducción del crecimiento, en la absorción de elementos minerales, como N (que se correlacionó negativamente con el contenido de cloro en hojas) y potasio, calcio y magnesio, siguiendo la misma tendencia con el aumento de sodio (Forner-Giner et al., 2011).

En cuanto a la toxicidad de boro, el 'FA 5' demostró tener una alta tolerancia y no acumularlo en su sistema radicular (Simón-Grao et al., 2019). Las características que presenta la serie Forner Alcaide son: la reducción en la translocación de fotosintatos a las raíces, la cual está asociada a un menor volumen de copa, reducción del tamaño del árbol, eficiencia en el rendimiento, frutos de buena calidad, con lo que se pueden utilizar en alta densidad y con suelos alcalinos (Forner-Giner et al., 2014).

Las características en otras selecciones, el tamaño del árbol fue menor en 'FA 418', en comparación con 'FA2324' y 'FA 5' que fueron similares entre ellos en altura y rendimiento acumulativo. Sin embargo, algunas características de calidad de la fruta fueron particulares, así 'FA 418' influyó en una corteza delgada, mayor cantidad de zumo e índice de color, pero también tuvo un incremento en los sólidos solubles al igual que 'FA5' (Legua et al., 2018). El portainjerto 'FA5', fue quien registró mayor contenido de azúcares, ácidos, flavonoides y vitamina C (Morales et al., 2021). Todos los atributos relacionados a los portainjertos del grupo Forner alcaide, han superado o mantenido las

características de sus progenitores que contribuyen al rendimiento y calidad de los frutos cuando son sometidos a estrés.

Nuevos Portainjertos y cultivares de limón

Los nuevos portainjertos y cultivares han sido desarrollados mediante la selección clonal, por hibridación y la mutación espontánea. También, otra técnica utilizada para obtener nuevos genotipos es mediante la inducción a la mutación, haciendo uso de la irradiación de rayos gamma a yemas de madera. Esta técnica es empleada por los fitomejoradores cuando en su banco de genes no disponen del material genético que otorgue la tolerancia a una enfermedad o alguno de los factores del ambiente y es muy económico (Novak y Brunner, 1992).

En los últimos 20 años la Sociedad Americana para Ciencia Horticultura (ASHS) ha actualizado la lista de los cultivares y portainjertos, describiéndolos en forma detallada y resumida, como portainjertos de cítricos (Clark y Finn, 2010; Gasic y Preece, 2014; Gasic et al., 2020) y cultivares de limones (Clark y Finn, 2010; Gasic et al., 2016; Gasic et al., 2020). También, incluye una lista de otros cítricos en cultivares de naranja navel, naranja dulce, tangelo, tangor, clementinas, mandarinas, pomelos, limas, limas acidas y limones (Okie, 2000; Clark y Finn, 2010; Finn y Clark, 2012; Gasic y Preece, 2014; Gasic et al., 2016; Gasic et al., 2020).

Portainjertos destinados para cítricos

En búsqueda del portainjerto que pueda mejorar las condiciones del cultivo, diferentes instituciones en diversos países desarrollaron materiales promisorios. La Universidad de California, Riverside, (Estados Unidos), desarrolló los híbridos **African shaddock x Rubidoux trifoliolate**, con progenitores *C. máxima* x *Poncirus trifoliata*, los cuales confieren un mayor tamaño al árbol, fruta y menor contenido de sólidos solubles. Otros tres portainjertos con los mismos parentales (mandarina 'Sunki' x 'Swingle' trifoliado), pero con particulares características, son '**Bitters trifoliolate hybrid**', conocido como C-22 de porte pequeño, tolerante a CTV (virus de la tristeza) y a la pudrición radicular, pero susceptible al nemátodo; '**Carpenter trifoliolate hybrid**', probado como C-

54 pero con características de resistencia al nemátodo, tolerante al CTV, con buen tamaño y calidad de la fruta. Por último **'Furr trifoliolate hybrid'** reconocido como C-574, portainjerto de vigor medio y con mejores características como resistencia a nemátodo, tolerante a bajas temperatura, pudrición radicular, CTV, buen tamaño y calidad de fruta. En Australia, se desarrolló el híbrido de naranja agria **'Fraser Seville'** con su característica de resistencia CTV, pero con la desventaja de menor del 60% de embriones nucelares (Clark y Finn, 2010). **'Sunki' (VI 806)**, procedente de China, llevado a EEUU a mediados del siglo XX, por la tolerancia a la mayoría de enfermedades por virus- viroides, como a la salinidad y al frío; pero susceptible a exocortis, *Phytophthora* y a suelos calcáreos (Gasic et al., 2016).

La Universidad de Florida (Estados Unidos), consiguió patrones alelotetraploides como **'UFR-1', 'UFR-2', 'UFR-3' y 'UFR-4'**, provenientes de la fusión de protoplastos, que forman híbridos somáticos y por cruzamiento convencional se forma el híbrido cigótico alotetraploide, creada para altas densidades, reduce la infección Huanglongbing, buen rendimiento y con frutos de calidad óptima. Otros portainjertos diploides obtenidos por la misma Universidad, como **'UFR 6'** con parentales de mandarina 'Changsha' x naranja trifoliada. Algunos reducen la infección de Huanglongbing como **'UFR-15'**, con parentales de pomelo 'Hirado Buntan' x mandarina 'Cleopatra'. **'UFR-16'**, de padres (pomelo 'Hirado Buntan' x mandarina 'Shekwasha'). **'UFR-17'**, alelotetraploide de híbrido cigótico, de semilla parental híbrida somática 'Nova' mandarina híbrida + pomelo 'Hirado Buntan' (plántula cigótica) y naranja agria parental de polen híbrido somático + citrange 'Carrizo' (Gasic et al., 2020).

Además, portainjertos obtenidos por el Departamento de investigaciones de Agricultura de EUA (ARS-USDA), tienen características similares, e influye en los frutos de los cultivares injertados en el color, sólidos solubles y porcentaje de acidez del zumo. Pero el atributo principal, es que reduce la infección de Huanglongbing y solo difieren entre ellos en los progenitores: **'US SuperSour 1'** (pomelo 'Hirado Buntan' x mandarina 'Cleopatra'), **'US SuperSour 2'** (naranja trifoliada 'Benecke' x (naranja agria 'Chinotto' x *Citrus ichangensis*), **'US SuperSour 3'** (mandarina 'Sunki' x 'US-802' (pomelo 'Siamés' x 'Gotha' *P. trifoliata*) (Gasic et al., 2020). Otros portainjertos liberados por ARS-USDA,

han estado orientados a dar tolerancia a enfermedades principalmente así **'US-802'** es conocido FF5-23-65, HRS-802 y de progenitores pomelo 'Siamese' (*C. grandis*) x 'Gotha Road' naranja trifoliada (*P. trifoliata*). **'US-812'** probado como HRS-812, de progenitores mandarina 'Sunki' (*C. reticulata*) x naranja trifoliada 'Benecke' (*P. trifoliata*). **US-852**, con parental mandarina 'Changsha' (*C. reticulata*) x 'English Large Flowered' naranja trifoliada (*P. trifoliata*). **US-897**, reconocido como HRS-897, proviene del cruce mandarina 'Cleopatra' (*C. reticulata*) x 'Flying Dragon' naranja trifoliada (*P. trifoliata*). **US-942**, conocido como HRS-942, de progenitores mandarina 'Sunki' (*C. reticulata*) x 'Flying Dragon' naranja trifoliada (*P. trifoliata*) (Clark y Finn, 2010).

Nuevos cultivares de limón

Nuevos cultivares de limón, por irradiación de yemas como de 'Eureka', dieron **'3ELS0'**, **'7B97'**, **'7ELS1'**, **'Código 3X97'** obtenidos en Australia, caracterizados por su tolerancia al frío. En Estados Unidos (Universidad de Georgia) obtuvo **'Tift 2-16'** proveniente del limón 'Ichang', el fruto caracterizado por su forma redondeada (Gasic et al., 2020). En Sudáfrica desarrollaron **'Eureka SL'**, un limón sin semillas. Argentina, liberó **'Eureka 22'**, por el INTA, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Clark y Finn, 2010).

Canadá liberó por hibridación a **'First Canadian'** y **'First Canadian Golden'**, de frutos esferoide, cuatro cosechas al año y se cultivan en contenedores (Gasic et al., 2020). Turquía liberó el híbrido **'Limoneira Seedless'** con la característica de extender el almacenamiento bajo atmósfera controlada (Clark y Finn, 2010). Nueva Zelandia obtuvo, fruto de pulpa rosada y sin semillas llamado **'Italian Pink Flesh'** (Gasic et al., 2020) y **'Lemonade' (VI 734)**, que se caracteriza por ser un árbol de tamaño semienano (Gasic et al., 2016). Por selección clonal en California se obtuvo **'Limoneira 8A Lisbon'** caracterizado por su precosidad, prolongada cosecha y productividad y en Arizona con **'Corona Foothills'** originado de una selección del limón Villafranca, cuyo atributo es la precosidad (Clark y Finn, 2010). España obtuvo **'Limonero Fino 49'**, proveniente de una selección por mutación espontánea del limón 'Fino' también conocido como 'Primofiori' o 'Mesero' (Clark y Finn, 2010); **'Summer Prim'**, caracterizado por prolongar la cosecha,

sin semillas (Gasic et al., 2020) y **'Verna' (VI 701)**, caracterizada por dos floraciones diferenciadas, muy productivo y con copa vigorosa (Gasic et al., 2016). En Italia con los cultivares, como **'Santa Teresa' (VI 835)** selección proveniente de **'Femminello'**, con producción todo el año y ausencia de semillas (Gasic et al., 2016) y un triploide **'Yellow Star Seedless'**, tolerante al mal seco (*Phoma tracheiphila*) y con almacenamiento prolongado con atmósfera controlada durante seis meses (Clark y Finn, 2010).

Últimos avances en la investigación de portainjertos de limonero

De la revisión bibliográfica realizada, se han agrupado los avances científicos encontrados de los portainjertos de limoneros en tres líneas de investigación:

La **primera línea de investigación**, la evaluación de la influencia del portainjerto para limoneros. Estos ensayos están referidos a buscar otras alternativas de portainjertos para renovar los actuales así se realizó en México para lima *Citrus latifolia* T. (Raddatz et al., 2019); en India, para limonero 'Kagzi Kalan' (Dubey y Sharma, 2019), mandarina 'Nagpur' (Sau et al., 2018), pomelos 'Marsh Seedless' y 'Redblush' (Sharma et al., 2016); en Brasil, para lima Persian 'CNPMF-02', naranjas dulces y naranjas navel (Amorín et al., 2018), naranja 'Valencia' (Fadel et al., 2018) y lima ácida Tahiti 'IAC-5' (Machado et al., 2017); en España para limones 'Fino 49', 'Verna 50' y 'Fino Elche' (Legua et al., 2018).

En resumen, los parámetros evaluados en todas las investigaciones citadas, fueron factores agronómicos: producción, rendimiento, rendimiento acumulativo de la producción, índice de eficiencia de producción, eficiencia del rendimiento, índice de alternancia, altura, diámetro y volumen de la copa, área de la sección transversal del tronco (TCSA), análisis foliar de nutrientes macro y micro y números de frutos por árbol. También, consideraron los parámetros de calidad de la fruta como peso, diámetro ecuatorial, polar, número de semillas por fruto, espesor de corteza, volumen y porcentaje de zumo, color de la piel y del zumo, pH, acidez titulable total (TA), sólidos solubles totales (TSS), índice de madurez, contenido de pectina, ácidos orgánicos (oxálico, málico y ascórbico-vitamina C), azúcares (fructosa, glucosa y sacarosa), actividad antioxidante y caracterización del perfil volátil del aceite esencial. Los

portainjertos más destacados en la mayoría de investigaciones y que tradicionalmente se injertan con cultivares de limonero (*Citrus limon* (L.) Burm) pero que son probados para otros cítricos han sido *C. aurantium*, *Citrus volkameriana*; cruce 'Cleopatra' x *P. trifoliata* ('Rubidoux'); 'Stanford', C35, 'C-32', 'Troyer' 'C-13' "S" (*C. sinensis* x *P. trifoliata*); 'Gandharaj' (*Citrus limon* (L.) Burm); mandarino 'Cleopatra' (*C. reshni*); 'Volkameriana' (*C. limonia*); tangelo 'Minneola' [(*C. reticulata* x *C. paradisi*) x *P. trifoliata* (L.) Raf.]; 'Forner Alcaide 2324', 'Forner-Alcaide 418' y 'Forner-Alcaide 5' (Amorín et al., 2018; Dubey y Sharma, 2019; Fadel et al., 2018; Legua et al., 2018; Machado et al., 2017; Raddatz et al., 2019; Sau et al., 2018; Sharma et al., 2016).

La **segunda línea de investigación** estudiada ha sido el factor suelo y sus limitaciones. En España los experimentos se enfocan a solucionar los problemas de la zona mediterránea en limonero, con la finalidad de reducir la evapotranspiración y mejorar la producción. De esta manera, se ha evaluado la utilización de pantallas de sombra con los portainjertos *C. aurantium* y *C. macrophylla* (García-Sánchez et al., 2015). Además de las pantallas de sombra, se añadió el uso del acolchado y el riego con agua salina en varios niveles (CE: 0,8, 3,8 y 6,8 dS/m) en función de la evapotranspiración (100%, 60% y 40% ETc), en *C. macrophylla* Simón-Grao et al. (2016). Otro factor limitante al cultivo de limonero, son los suelos calcáreos, que inducen clorosis de hierro, por ello se evaluó nuevos portainjertos híbridos denominados '0501' (mandarina 'King' *Citrus nobilis* Lour x *Poncirus trifoliata* ((L.) Raf.) y otros dos *C. macrophylla* (tolerante a clorosis) y citrange 'Carrizo' -sensible- (Martínez-Cuenca et al., 2016). El problema de sales es otra limitación, para el limonero, la utilización de madera intermedia como 'Valencia' para dar tolerancia a las sales, sequía e inundación fueron investigadas (Gimeno et al., 2015). Recientemente, Pérez-Jiménez y Pérez-Tornero (2020), investigaron las mutaciones obtenidas por radiación gama de *C. macrophylla*, portainjerto con mayor tolerancia a sales.

En Brasil los portainjertos y sus híbridos de *C. volkameriana* o *P. trifoliata*, lima Rangpur, mandarina 'Sunki' y otros son evaluados para medir su tolerancia al déficit hídrico (Carvalho et al., 2016), determinar el punto de marchitez o de saturación (Ferreira et al., 2020). A nivel de vivero se midió la tolerancia a la salinidad, a dos niveles

de sales 0,3 y 4,0 dSm⁻¹ (Brito et al., 2016; Silva et al., 2018). Evaluando otros parámetros fisiológicos para determinar la respuesta al estrés salino (Almeida et al., 2018). Embrapa–Brasil, ha obtenido portainjerto tetraploides, tolerante al riego con agua salada, cuyos progenitores tienen *P. trifoliata* o *C. volkameriana* (Sá et al., 2017). La siguiente investigación evaluó la arquitectura de la raíz y del brote inicial de estos portainjertos en condiciones normales desde la germinación (da Cruz et al., 2019).

Similares ensayos se reportaron en Florida, Estados Unidos, mediante la utilización de esquejes con un solo nodo y una hoja, para realizar la propagación rápida de portainjertos *Poncirus trifoliata* y sus híbridos tradicionales y otros nuevos como ‘US-812’ ‘US-897’ y ‘US-942’ (Bowman y Albrecht, 2017). Mientras, en los países asiáticos tienen otras preocupaciones, en Irán se evaluó la aplicación foliar y fertilización vía sistema irrigación con los portainjertos *C. aurantium*, *C. volkameriana* y Citrumelo y de copa *C. limon* (Alkhafaji y Khalil, 2019). En Vietnam, se evaluó los portainjertos limón ‘Tau’ (*C. limonia*) y citrange ‘Carrizo’ (*Citrus sinensis* × *Poncirus trifoliata*) para determinar su adaptación a suelos ácidos (Khoe, 2016).

Las variables analizadas en las investigaciones citadas anteriormente han sido: producción, rendimiento, tolerancia a la sequía y diámetro del vástago y del portainjerto por encima y debajo de los 5 cm, altura de planta, diámetro del tallo del portainjerto y número de ramas; % de crecimiento, % del contenido de carbohidratos en brote, uso eficiente de los nutrientes, perímetro y volumen de copa, temperatura del aire, la irradiación, eficiencia de uso de agua, potencial hídrico, concentración de cloruro en hojas. También, hicieron mediciones de las variables fotosintéticas: concentración de clorofila a y b, total de carotenoides, fotosíntesis neta, conductancia estomática y concentración de CO₂, contenido de agua, turgencia, concentración de Fe, actividad de quelato reductasa férrica y capacidad de extrusión de protones (H⁺), intercambio de gases y análisis de fluorescencia (fotosíntesis II). Variables para los esquejes longitud y diámetro del brote, peso fresco y seco, longitud y diámetro del explante, peso fresco y seco del portainjerto, longitud total de la raíz (solo 8 semanas) y peso fresco y seco de la raíz por explante; para las raíces fueron volumen, longitud, número y porcentaje de raíces principales, secundarias, terciarias utilizando, longitud incluidos los números de

raíz primarios, secundarios y terciarios. Para la calidad de la fruta se midieron características morfológicas y químicas como peso, diámetro ecuatorial, polar, espesor de corteza, color piel y zumo, (García-Sánchez et al., 2015; Gimeno et al., 2015; Brito et al., 2016; Carvalho et al., 2016; Khoe, 2016; Martínez-Cuenca et al., 2016; Simón-Grao et al. 2016; Bowman y Albrecht, 2017; Sá et al., 2017; Almeida et al., 2018; Silva et al., 2018; Alkhafaji y Khalil, 2019; da Cruz et al., 2019; Ferreira et al., 2020; Pérez-Jiménez y Pérez-Tornero, 2020).

La **tercera línea de investigación** se basa en mejoramiento, biotecnología y marcadores moleculares. Los cítricos están inmersos en el avance de la biotecnología y las nuevas técnicas moleculares. Así la técnica del cultivo de tejido es utilizada para regenerar las plantas que han sido modificadas genéticamente y encontrar un protocolo que se adapte a una determinada variedad. Por ello Navarro-García et al. (2016) desarrolló como parte del protocolo para cultivares de *Citrus limon* 'Verna51' y 'Fino49', utilizar de 1–3 mg L⁻¹ N6-benciladenina, junto a 1 mg L⁻¹ de Ácido Giberélico, también el tipo de explantes (segmentos nodales, basal o intermodal) maduro o joven. Otra técnica empleada para generar nuevas variedades de portainjerto es a través de la hibridación somática proveniente de parentales estériles o sexualmente incompatibles o para crear híbridos interespecíficos (alotetraploides) con características agronómicas al estrés por la sequía, salinidad o a la deficiencia de macro y micronutrientes que afecta los rasgos fisiológicos y el metabolismo oxidativo en forma diferente. Navarro-García et al. (2016) probó diploides dobles y tetraploides como 'Flhorag1' y Citrumelo '4475' y encontró que los parámetros fotosintéticos fotosíntesis neta, conductancia estomática no disminuyeron, de igual manera tuvieron menores marcadores oxidativos en raíces y hojas, después de una prolonga carencia de nutrientes; atribuyendo esta tolerancia a una mejor activación del sistema de antioxidante de los genotipos evaluados (Oustric et al., 2019). España y Francia recuperaron híbridos somáticos de 'Carrizo' citrange y *C. macrophylla*, teniendo características para ser utilizados en suelos calcáreos, salinos y presencia del virus de la tristeza en condiciones de la zona mediterránea (Ruiz et al., 2018).

Otro uso de la técnica es la utilización de cuatro híbridos somáticos para determinar el potencial ante la infección del virus de la tristeza de los cítricos (CTV); los portainjertos de combinaciones somáticas de limón fueron: 1. limón 'Milam' (*Citrus jambhiri* Lush.) + Naranja agria (*C. aurantium* L Osb.), 2. Calamondin (*C. madurensis* Lour.) + Naranja agria 'Keen' (*C. aurantium* L.), 3. Calamondin + 'Femminello' limón (*C. limon* L. Burm. F.) y 4. mandarina 'Cleopatra' *C. reshni* Hort ex Tan. + 'Femminello' limón. Los portainjertos después de ser injertadas con el cultivar Valencia, naranja dulce, previamente había sido infectado con dos cepas diferentes de virus leve y severa. Los resultados indican que el genotipo 2. Calamondin y Keen no replicó la cepa del virus (Abbate et al., 2019). Este aporte sugiere que los tetraploides de híbridos somáticos podrían ser una alternativa para controlar esta enfermedad.

La técnica de marcadores genéticos, que permite crear plantas modificadas genéticamente y determinar los genes que la gobiernan, ha permitido determinar los genes y el mecanismo de la respuesta al frío de un portainjerto tolerante, los genes identificados PtrERF109 de naranja trifoliada (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.), que le dan la tolerancia al frío, así como su mecanismo, indicando Prx1 es el que codifica la peroxidasa de clase III y que las plantas más tolerantes lo expresan en asociación con el promotor PtrPrx1. Los resultados indican que PtrERF109 como un regulador positivo que contribuye a impartir tolerancia al frío, regulado directamente por el gen que codifica POD (peroxidasa de clase III) para mantener una capacidad antioxidante y eliminar eficazmente las especies reactivas de oxígeno (Wang et al., 2019).

La otra gran preocupación para los mejoradores es controlar la infección del Huanglongbing de cítricos (HLB), por ello Hao et al. (2019) obtuvo plantas transgénicas de 'Carrizo' y realizó el análisis de transcriptoma evidenciando las vías metabólicas y la biosíntesis de los metabolitos secundarios que se alteran ante la expresión del virus. Hay 27 metabolitos en la rizósfera de los portainjertos infectados con HLB, y que fueron diferentes entre los portainjertos y las plantas sanas (Padhi et al., 2019). Dependiendo del volumen de alimentación sustraído por psílido asiático, genera una mayor o menor concentración de los metabolitos en hojas de *C. macrophylla* (Chin et al., 2017). Los portainjertos tolerantes regeneran rápidamente su floema y el nivel de interrupción es

menor en comparación con las plantas que son sensibles (Deng et al., 2019). Se señala que en limón rugoso la amplitud de la expresión de genes relacionados con la defensa es mucho mayor que en naranja dulce (Yu et al., 2017).

Los portainjertos destinados a limón, se investigan para mandarina, naranja y pomelos, evaluando la producción, rendimiento y calidad de la fruta. Encontrar un portainjerto idóneo a los problemas del suelo como calcáreos, ácidos o con estrés por sequía, inundación y salinidad es otra preocupación. El mejoramiento genético, ha creado cultivares tetraploides, alelotetraploides resistentes a la sequía. Las técnicas moleculares han permitido determinar el gen tolerante al frío, conocer el mecanismo de la tolerancia a la enfermedad HLB. La nueva técnica de edición génica permitirá crear una planta perfecta con genes resistentes al frío o al calor, floración permanente, tolerante a la sequía, salinidad. Será eso posible, traerá beneficios o más desafíos.

Los limones son importantes para España, es ingreso de divisas por sus exportaciones, se comercializa en más 74 países y son fuente de trabajo tanto en la exportación como en la producción del manejo del cultivo. Cada vez el mercado es más exigente en su calidad externa e interna, un buen color o tamaño, presencia todo el año son solo algunas características relevantes.

La obtención de nuevos cultivares de portainjertos o la introducción deben basarse en una investigación que revalide sus características a las condiciones mediterráneas y ampliar las zonas de producción de este importante cultivo, evaluar la productividad, su adaptación a un amplio rango de suelos y sus principales problemas (salinidad, encharcamiento y deficiencia hídrica), pero también la calidad de la fruta en sus características morfológicas, químicas, bioquímicas y nutraceuticas. Es un reto continuar la evaluación de estos portainjertos mejorados que contribuirán a un mayor beneficio de los productores, una fruta de mejor calidad y a un menor costo para el consumidor.

El tema de esta tesis doctoral tenía como objetivo evaluar la calidad de la fruta en sus características físicas, químicas y funcionales, por el efecto de los portainjertos nuevos obtenidos por el IVIA del grupo Forner Alcaide y los tradicionales de campos

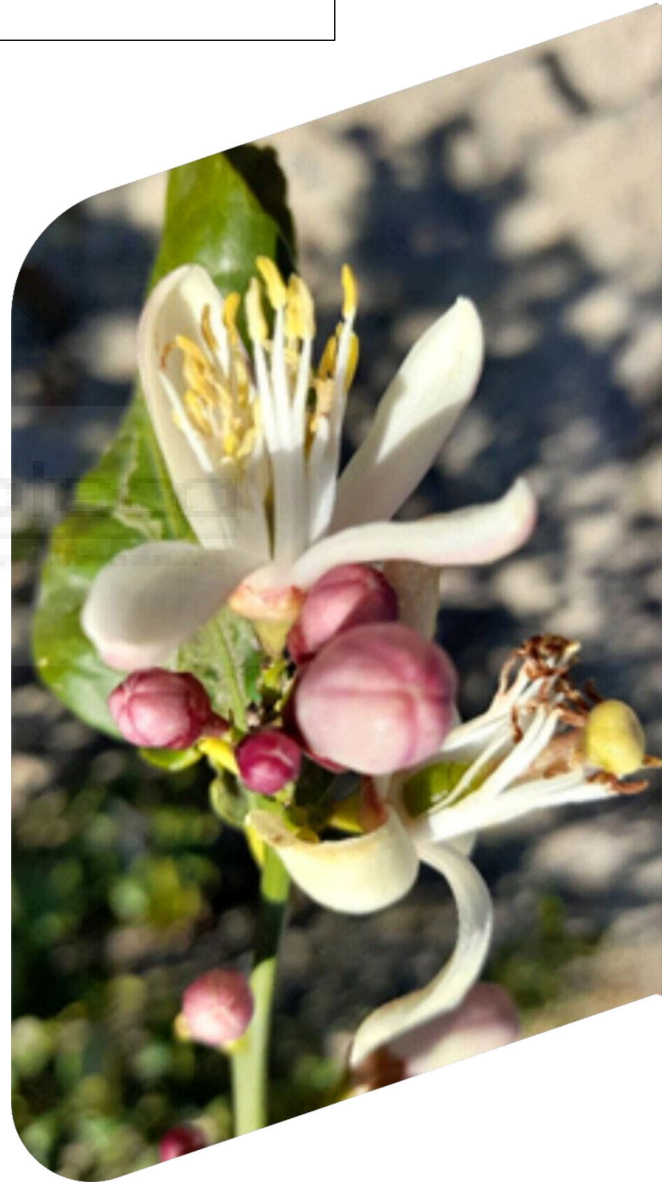
comerciales como *C. macrophylla* y *C. aurantium* sobre las variedades de limones 'Eureka', 'Verna', 'Betera', 'Fino 49' y 'Fino 95'.

La presente tesis propuesta complementa la línea de investigación

del Grupo de Investigación en Fruticultura y Técnicas de Producción, del Departamento de Producción Vegetal y Microbiología de la Universidad Miguel Hernández- EPSO (Escuela Politécnica Superior de Orihuela). El Grupo de Producción Vegetal, desarrolla nuevas técnicas para el uso eficiente de los recursos como factor agua y suelo evaluando sus deficiencias y problemas; en la obtención y selección de nuevos portainjertos, variedades comerciales o subutilizadas; en la protección de los cultivos por plagas o enfermedades y en las certificaciones internacionales para la comercialización en la producción de las frutas. El grupo de investigación además realiza ensayos en otros temas y cultivos, relacionados con la mejora de la productividad de los agricultores, empresas y la comunidad.



2. OBJETIVOS



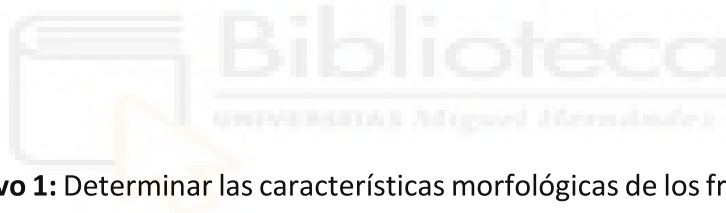
2. OBJETIVOS

Objetivo general:

El **objetivo general** de la presente investigación fue determinar las propiedades fitoquímicas, nutraceuticas y funcionales de diferentes variedades de limón en combinación con distintos portainjertos con la finalidad de poner en valor su uso para la alimentación humana y la obtención de compuestos bioquímicos para otros usos.

Objetivos específicos:

En la consecución del objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:



Objetivo 1: Determinar las características morfológicas de los frutos por el efecto de diferentes portainjertos en distintas variedades de limonero.

Objetivo 2: Caracterización bioquímica (contenido de ácidos orgánicos y azúcares, compuestos volátiles), nutraceuticas y funcional (actividad antioxidante por diferentes métodos ABTS, DPPH, FRAP y contenido de polifenoles totales) en los frutos de limón como resultado del uso de diversos portainjertos con variedades comerciales.

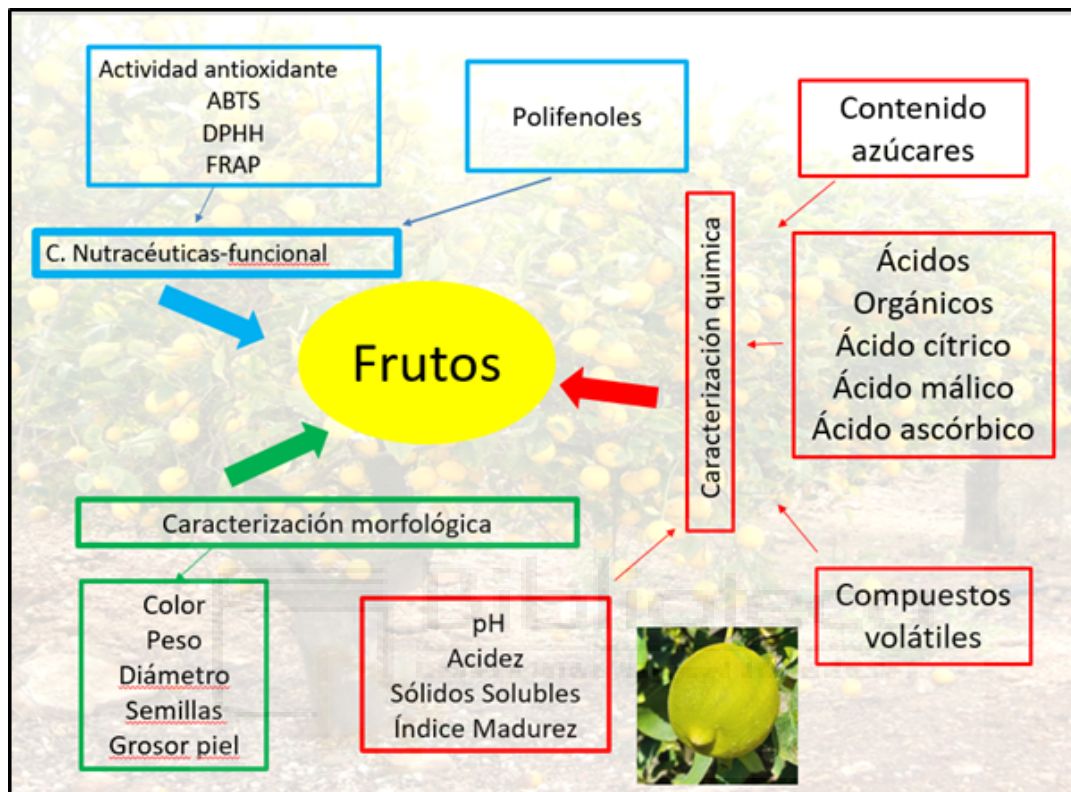


Imagen 1. Resumen de los objetivos de la Investigación.

3. MATERIALES Y MÉTODOS



3. MATERIALES Y MÉTODOS

Las condiciones experimentales en que se desarrollaron las investigaciones para la presente tesis doctoral consistieron en tres ensayos en los que se alcanzaron los dos objetivos planteados en esta investigación. Para el primero se obtuvieron frutos de limones procedente de la colección del banco de germoplasma en el IVIA (Valencia) y el segundo ensayo los frutos de limones procedieron de un campo comercial (Alicante).

Material vegetal

Para la evaluación del primer ensayo, el material vegetal utilizado fue de tres portainjertos del grupo Forner Alcaide 'FA5', 'FA13' y 'FA517' injertados con cuatro cultivares 'Bétera', 'Verna', 'Fino 49' y 'Eureka', las combinaciones 'FA5'/'Eureka', 'FA13'/'Fino 49', no sobrevivieron debido a enfermedades y al déficit híbrido, por ello no fueron evaluados (ver **Tabla 7**).

En el segundo ensayo los frutos de limones evaluados procedieron de un campo comercial y los portainjertos evaluados fueron *Citrus aurantium* y *C. macrophylla* injertados con tres cultivares 'Verna', 'Fino 95' y 'Fino 49' (ver **Tabla 7**). En este estudio no se ha considerado la combinación 'Fino 95'/*C. aurantium*, porque no existe esa combinación. Probablemente porque la cosecha coincide con la 'Fino 49', compitiendo por el mercado y perdiendo la característica de adelantar el inicio de recolección.

En el tercer ensayo se realizó con la corteza de los frutos, se obtuvo aceite, de todas las combinaciones variedad/portainjerto estudiados en los dos anteriores experimentos, con la finalidad de determinar el perfil volátil (**Tabla 7**).

Tabla 7. Material vegetal utilizado, portainjerto y cultivar en cada ensayo.

Ensayos	Portainjerto	Cultivar
Ensayo Nº 1	'FA 5' = mandarina 'Cleopatra' x <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.	'Betera' 'Fino 49' 'Verna'
	'FA13' = mandarina 'Cleopatra' x <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.	'Betera' 'Eureka' 'Verna'
	'FA 517' = mandarina 'King' x <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.	'Betera' 'Eureka' 'Fino 49' 'Verna'
Las combinaciones 'Eureka'/'FA5' y 'Fino 49'/'FA13', no sobrevivieron a la evaluación.		
Ensayo Nº 2	<i>Citrus macrophylla</i> Wester	'Fino 49' 'Fino 95' 'Verna'
	<i>Citrus aurantium</i> L.	'Fino 49' 'Verna'
Ensayo Nº 3. Perfil Volátil	Se utilizaron las cortezas de los frutos de las combinaciones anteriores cultivar/portainjerto	
La combinación 'Fino 95'/'C. aurantium', no se realizó, por no existir dicha combinación.		

Portainjertos

Los portainjertos empleados tienen las siguientes características. Los portainjertos del grupo Forner Alcaide (FA) son híbridos, conseguidos por el Programa de Mejora Sanitaria de Patrones de Cítricos del IVIA, iniciado en 1978. Algunos de estos patrones están comercializados desde 2004 (Llosa, 2004).

'FA 5', híbrido de mandarina 'Cleopatra' y de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., se caracteriza por el tamaño mediano del árbol, presencia de ramas de espinas profusas, ramas cortas, hojas trifoliadas, planas. Los frutos son pequeños, peso medio de 35–36

g, un diámetro medio de 40–45 mm, una altura media de 35 mm y de espesor de corteza gruesa.

Presenta resistencia al virus de la tristeza de los cítricos (CTV), *Phytophthora* spp. y resistencia a nemátodos. Tolerante a la caliza e inundaciones (Verdejo et al., 1997; Verdejo et al., 2000).

'**FA 13**', es un híbrido con los mismos parentales de 'FA5', pero con algunas características diferentes: induce un menor tamaño del árbol, resistencia a la salinidad y susceptibilidad a *T. semipenetreans* (Forner et al., 2000).

'**FA 517**', híbrido del cruce de la mandarina 'King' x *P. trifoliata* (L.) Raf. con característica de enanismo, tolerante a la caliza, salinidad, resistente a CTV y nemátodos (Forner et al., 2000).

Citrus aurantium ha sido el portainjerto más utilizado en limón, la principal característica limitante es la formación de miriñaque.

Citrus macrophylla es un portainjerto vigoroso, que confiere un mayor tamaño al árbol, altos rendimientos e inicio de cosecha antes que *C. aurantium*.

Variedades

Las variedades utilizadas en los ensayos procedentes del banco de germoplasma del IVIA son los siguientes:

'**Bétera**' es una mutación de 'Fino', obtenida en Valencia. Utilizado principalmente en jardinería. Se caracteriza por presentar pocas espinas y ser poco productivo. El peso medio del fruto varía de 130-150 g y el porcentaje de zumo está entre el 30-40%.

'**Eureka**', es una variedad proveniente de California. El fruto tiene un peso medio de 120-140 g y un porcentaje de zumo entre el 40-45%.

'**Fino**', es una variedad muy productiva, sensible a las bajas temperaturas, presenta dos clones de mayor importancia en la actualidad: 'Fino 95' y 'Fino 49'. El peso medio del fruto está entre 110-130 g, con un porcentaje de zumo entre el 30-35% y presenta semillas de 2 a 6.

'Verna', es una variedad de origen desconocido, presenta un peso medio de fruto de 130-170 g y el porcentaje de zumo está entre 30-35%.

Los limones fueron recolectados de árboles con más de diez años de edad, sin considerar los frutos del perímetro para evitar el efecto borde. El suelo se caracterizó por ser franco arcilloso a arcilloso, con alto contenido de carbonato de calcio, así como de pH, el riego fue localizado mediante riego por goteo. El marco de plantación de los árboles era de 6 x 4 m. Las prácticas culturales como: poda, fertilización, control de malezas, plagas y enfermedades se realizaron del mismo modo en todos los tratamientos. Se recogieron al azar, un total de 100 frutos por cada combinación, se realizaron tres repeticiones, cada submuestra fue de 30 frutos por repetición.

Características morfológicas y parámetros físicos

En los ensayos N^o1 y N^o 2 los parámetros evaluados fueron los mismos. Cuando las muestras de limones se encontraron en el laboratorio, se seleccionaron 90 frutos de limones provenientes de cada combinación variedad/portainjerto (ver **Tabla 7**) para la determinación de las variables.

Todos los frutos de cada submuestra fueron enumerados y se evaluaron las variables físicas como: color, peso, diámetro ecuatorial, polar y espesor de corteza. El color de la piel de los frutos de limones se evaluó en los cuatro puntos equidistantes de la región ecuatorial, utilizando un colorímetro Minolta CR 2000 (Minolta, Osaka, Japón), expresando los resultados en el sistema CIE L * a * b * (CIE, 1931). El significado de los valores de las coordenadas de luminosidad (L *), verde-rojo (a *) y azul-amarillo (b *) para cada fruto fueron calculados (Roberston, 1977), valores positivos y negativos (Pauli, 1976). Se calculó el croma ($C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$), el ángulo hue ($H^0 = \arctan (b^*/a^*)$) y el índice de color cítrico (CCI) utilizando la ecuación propuesta por Jiménez-Cuesta et al. (1981) [$CCI = 1000 a^*/ L^* b^*$].

El peso del fruto (PF) se determinó con una balanza Mettler modelo AG204 (Mettler Toledo, Barcelona, España). El diámetro ecuatorial (ED), diámetro polar (PD) y

el espesor de la corteza (PT) se evaluó con un calibre digital (Mitutoyo Corp., Aurora, IL, EEUU). Una vez realizadas las mediciones del fruto, se cortaron por la mitad y se midió el espesor de corteza, se contó el número de segmentos y luego se exprimieron cuidadosamente a mano con un exprimidor comercial. Los zumos recién exprimidos se centrifugaron a $15.000 \times g$ durante 20 min (Sigma 3-18 K, Osterode y Harz, Alemania) y se mantuvieron en el congelador a una temperatura de -18°C hasta su análisis.

Características bioquímicas

Los parámetros químicos se evaluaron en cada submuestra y se midieron en el zumo obtenido de los frutos de limones. Los parámetros medidos fueron: pH, sólidos solubles totales (TSS) y la acidez titulable (TA) y se analizaron de acuerdo a la metodología descrita por Forner-Giner et al. (2003a). El índice de madurez (IM) se calculó como la relación entre los TSS y la TA.

Contenido de azúcar y ácidos orgánicos

La identificación y cuantificación de los azúcares y ácidos orgánicos se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Legua et al. (2011). Los zumos se prepararon manualmente exprimiéndolos a mano en un exprimidor de cocina comercial y luego se centrifugó a $15.000 \times g$ durante 20 min (Sigma 3-18 K; Sigma, Osterode am Harz, Alemania). Luego, 1 mL del sobrenadante se filtró a través de un filtro Millipore de $0,45 \mu\text{m}$, y se inyectaron $10 \mu\text{L}$ en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Hewlett-Packard (modelo 1100). Para realizar las separaciones de azúcares y ácidos orgánicos se utilizó una columna Supelcogel™ C-610H ($30 \text{ cm} \times 7,8 \text{ mm}$) y una precolumna (Supelguard $5 \text{ cm} \times 4,6 \text{ mm}$; Supelco, Bellefonte, PA, EEUU). La absorbancia de ácidos orgánicos se midió a 210 nm usando un detector de diodos (DAD, HPLC, Waldbronn, Alemania), mientras que los azúcares se cuantificaron usando un índice de refracción (RID, HPLC, Waldbronn, Alemania). Los estándares de azúcares y ácidos orgánicos se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.) y las curvas de calibración mostraron buena linealidad ($r^2 \geq 0,999$). Los resultados se expresaron $\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$ para ácidos orgánicos y azúcares.

Actividad antioxidante (AA) y contenido total de polifenoles (TPC)

La extracción de los antioxidantes y polifenoles totales se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Wojdylo et al. (2013). Este extracto se utilizó para medir la actividad antioxidante (AA) por tres métodos y el contenido total de polifenoles (TPC). Las capacidades de captación de radicales libres se determinaron mediante tres métodos, ABTS (Re et al., 1999), DPPH (Brand-Williams et al., 1995) y FRAP (Benzie et al., 1996).

Para todos los análisis se utilizó un espectrofotómetro UV-visible (modelo Helios Gamma, UVG 1002E, Reino Unido). Se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como mmol Trolox L⁻¹ de zumo de limón para la actividad antioxidante. El TPC fue determinado por el método de Singleton et al. (1999) y cuantificado con el reactivo de Folin-Ciocalteu, como describen Gao et al. (2000). Se utilizó ácido gálico para preparar curvas de calibración. Y los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 mL de zumo de limón

Determinación del perfil volátil

La determinación de los compuestos volátiles se hizo con la piel de los frutos de los limones de todas las combinaciones variedad/portainjerto (**Tabla 7**). Se realizó primero la extracción del aceite esencial siguiendo el protocolo descrito por El-Zaeddi et al. (2016) con ligeras modificaciones. Mediante la hidrodestilación (HD) usando un Deryng. Para ello se utilizaron 60 g de la piel del limón, un matraz de fondo redondo de capacidad de 500 mL, al que se agregó 200 mL de agua destilada y 200 µL de isoamilacetato (utilizado como patrón interno), la mezcla estuvo hirviendo durante 5 minutos, y se recogió en un vial 2 mL del aceite destilado, por muestra con tres repeticiones y se almacenó a 4°C, para luego hacer el análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). Tres métodos fueron utilizados para identificar los compuestos volátiles: (1) tasas de retención y su comparación con la literatura, (2) tiempos de retención de compuestos químicos puros; (3) espectros de masas de compuestos químicos auténticos y la biblioteca espectral del Instituto Nacional de

Estándares y Base de datos de tecnología (NIST). Los resultados fueron expresados como la concentración de cada uno de los compuestos volátiles.

Análisis estadístico

En todos los experimentos se realizó una prueba de normalidad y, como se obtuvo una distribución de datos normal, se realizaron un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y la prueba de rango múltiple de Tukey para comparar datos experimentales y determinar diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$). También se realizó un análisis de componentes principales (PCA) utilizando la correlación de Pearson. XLSTAT (Versión 2016.02.27444, Addinsoft) se utilizó para realizar todos los análisis estadísticos.



4. PUBLICACIONES



Article

Influence of New Citrus Rootstocks on Lemon Quality

Marlene G. Aguilar-Hernández ¹, Lucía Sánchez-Rodríguez ², Francisca Hernández ³,
María Ángeles Forner-Giner ⁴, Joaquín J. Pastor-Pérez ⁵ and Pilar Legua ^{3,*}

¹ Department of Horticulture, Universidad Nacional Agraria La Molina, Av. La Molina s/n.,
Lima 15026, Perú; maguilarhe@lamolina.edu.pe

² Department of Agro-Food Technology, Research Group “Food Quality and Safety”, Universidad Miguel
Hernández de Elche, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Carretera de Beniel, km 3.2, Orihuela,
03312 Alicante, Spain; lucia.sanchez@goumh.umh.es

³ Department of Plant Sciences and Microbiology, Plant Production and Technology Research Group,
Universidad Miguel Hernández de Elche, Ctra. de Beniel, km 3,2, Orihuela, 03312 Alicante, Spain;
francisca.hernandez@umh.es

⁴ Citriculture and Vegetal Production Center, Valencian Institute for Agricultural Research, Apartado
Oficial, Moncada, 46113 Valencia, Spain; forner_margin@gva.es

⁵ Departamento de Ingeniería Agroforestal, Universidad Miguel Hernández de Elche, Ctra. de Beniel, km 3,2,
Orihuela, 03312 Alicante, Spain; jjpastor@umh.es

* Corresponding: p.legua@umh.es; Tel.: +34-966-749-669

Received: 19 May 2020; Accepted: 2 July 2020; Published: 7 July 2020

Abstract: Citrus fruits are one of the main crops produced in the world with oranges, tangerines, lemons and grapefruits being among the most important. Among them, lemons are beneficial for human health because of their antioxidant activity, phenols and vitamin C. This study evaluates three rootstocks obtained in a Spanish breeding program (Valencian Institute for Agricultural Research (IVIA)): Forner-Alcaide 5 citrus rootstock (‘FA 5’), Forner-Alcaide 13 (‘FA 13’) and Forner-Alcaide 517 (‘FA 517’) grafted onto cultivars ‘Eureka’, ‘Verna’, ‘Fino 49’ and ‘Betera’. The results determined that rootstocks have influenced cultivars in terms of a decrease in the fruit size, weight, and thickness of the peel; but has increased the percentage of juice and soluble solids. With respect to phenol content and antioxidant activity, higher values were found with all cultivars studied on rootstocks ‘FA 13’, followed by ‘FA 517’. Cultivars that were most influenced by rootstocks were ‘Betera’ and ‘Eureka’ in physical properties, while in chemical properties they were ‘Verna’ followed by ‘Fino 49’. This investigation demonstrated the interaction of rootstocks on different cultivars in morphological, biochemical and nutraceutical characteristics.

Keywords: Eureka; Fino; Forner-Alcaide; antioxidant activity

1. Introduction

Citrus fruits are one of the main crops produced in the world with oranges, tangerines, lemons and grapefruits among the most important. Production is located in the five continents North and South America, Europe, Africa, Asia and Oceania; but the largest citrus zone is located between 30° and 43° latitude of the Northern Hemisphere (United States, Mediterranean Basin and Japan) and in the Southern Hemisphere in Brazil, Argentina, South Africa and Australia. Lemon and lime worldwide production in 2017 was 17,218,173 t [1] and in Spain, it was 923.2 t [2], being the main citrus area Valencia, with oranges, tangerines and a lower proportion of lemons [3].

Different cultivars and rootstocks have mainly contributed to the development of the crop for its advantages and the economic success of citrus plantations [4], for example: rootstocks affect water relationships by influencing fruit growth, soluble solids and acidity [5], yield, weight fruit, juice percentage [6], and are used for threatening disease like Citrus Tristeza Virus (CTV) [7].

Prior to the arrival of CTV to Spain, sour orange (*Citrus aurantium* L.) was the standard rootstock in all plantations. Nowadays, in lemon orchards, *C. macrophylla* Wester is the only usable rootstock. It is tolerant to salinity, iron chlorosis and *Phytophthora* spp., but is susceptible to CTV and cold weather, and the fruit that it produced has low quality. Therefore, other rootstocks are being studied [4].

A citrus breeding program related to rootstocks started in 1974 at the Valencian Institute for Agricultural Research (IVIA). One of its purposes was to obtain rootstocks that grew better in Spanish conditions than rootstocks currently used [8]. A specific aim of the program was to develop rootstocks tolerant to salinity, iron chlorosis, water stress or flooding conditions [6]. Three rootstocks obtained from this breeding program are Forner-Alcaide 5 citrus rootstock ('FA 5'), Forner-Alcaide 13 ('FA 13') and Forner-Alcaide 517 ('FA 517'). The performance of these three rootstocks, grafted onto lemons, has been the subject of interest as a potential alternative to *C. macrophylla* which is very resistant to different abiotic plant stresses.

Citrus fruit have an excellent source of protective bioactive compounds for health [9]. The bioactive compounds of citrus fruits are involved in preventing carcinogenesis of the colon by being present in the juicy pulp or in the peel [10]. Cano and Bermejo [11] found that similar contents of bioactive compounds were different among species such as tangerine and orange, as well as in rootstocks.

The present study aimed to develop knowledge about three new citrus rootstocks Forner-Alcaide ('FA 5', 'FA 13' and 'FA 517') on the effect on the yield and fruit quality on four commercial cultivars of lemon: 'Bétera', 'Verna', 'Fino 49' and 'Eureka'. The quality was studied by evaluating their (i) morphology and physico-chemical parameters, (ii) chemical composition, and (iii) antioxidant properties in order to value their use for human consumption and/or obtaining biochemical compounds for other uses.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material, Experimental Conditions

'FA 5', 'FA 13' and 'FA 517' were the three citrus rootstocks used in the experiment. Seeds were collected from identified trees, of germplasm collection at IVIA, later grafted on four commercial lemon cultivars ('Bétera', 'Verna', 'Fino 49' and 'Eureka'). Cultivar was achieved through chip grafting and after one year it was transplanted to the final plot. Trees were evaluated when they were 15 years old. It is important to mention that, due to illness and water stress, 'Eureka' cultivar on 'FA 5' and 'Fino 49' on 'FA 13' did not prosper, with the consequent loss.

Rootstocks presented the following characteristics:

- 'FA 5' is a 'Cleopatra' mandarin and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. hybrid, characteristics are the size of the medium tree, branch presence of profuse thorns, short branches, trifoliolate leaves, flat, small fruits, weight 35–36 g, diameter 40–45 mm, height 35 mm, thick rind. It presents CTV, *Phytophthora* spp. (disease) and *Tylenchulus semipenetrans* (nematode) resistance, limestone and flooding tolerant [12,13].
- 'FA 13', comes from same parents as 'FA5', but with some different characteristics: it induces smaller size to the grafted plants, resistant to salinity and susceptible to *T. semipenetrans*.
- 'FA 517' is a 'King' mandarin and *P. trifoliata* (L.) Raf. hybrid, with dwarfing characteristic, tolerant of limestone, salinity, CTV-resistant and nematodes [14].

'FA13' and 'FA517' rootstocks were registered in the European Union and they were commercialized (BOE 04/12/2007), while 'FA5' was registered before (BOE 10/29/2004) and all were obtained in 1978 [15].

Characteristics of these cultivars could be found as they were previously reported by IVIA [16]. Briefly, 'Bétera' is a fine lemon mutation, obtained in Valencia. The cultivar is not very productive and it is used mostly in gardening because it has few thorns. The fruit weight varies between 130 to 150 g and the percentage of juice is 30–40%. 'Eureka': obtained in California, the fruit is characterized by a weight of 120–140 g, percentage of juice 40–45%. 'Fino': very productive, sensitive to cold weather, has two clones 'Fino 95' and 'Fino 49'. Fruit weight 110–130 g, percentage of juice 30–35%, and it has 2–6 seeds. 'Verna': of unknown origin, fruit weight 130–170 g, percentage of juice 30–35%.

Nursery work was undertaken according to the described by Legua et al. [6], plants grew at controlled conditions, anti-aphid mesh, temperature presented a mean of 22 °C and relative humidity was about 80%. One year after being grafted, they were taken to the field.

The field was located at the IVIA Experimental Station (UTMX: 723368.000, UTM Y: 4385233.000), Valencia, Spain. They were planted with a randomized complete block design, with 5 replications, the experimental unit was a grafted tree, and the distance between trees was 6 × 4 m. The edge effect was considered at the moment they were harvested. Soil characteristics were: clay loam soil, pH 8.5, CaCO₃ = 44.4%, active calcium carbonate 17.1% and electric conductivity (C.E.) 5.79 mS cm⁻¹. Cultural practices conducted manual pruning to third year, drip irrigation system, water characteristics (pH = 7.8, C.E = 2.0 – 3.5 mS cm⁻¹ and presence of boron from 400 to 500 mg kg⁻¹), fertilizer formula NPK = 4–1–1.5, and chemical weed control.

2.2. Morphology and Physico-Chemical Parameters

In the laboratory, 90 lemons were selected per cultivar/rootstock combination for analytical determinations. Lemons were not stored and were directly hand-squeezed. Three subsamples for each cultivar/rootstock combination (each one composed by 30 fruits) were randomly made, and then the fruits from each subsample were cut in half and carefully hand-squeezed in a commercial kitchen juicer. The freshly squeezed juices were centrifuged at 15,000 × g for 20 min (Sigma 3–18 K, Osterode and Harz, Germany) and were kept in freezer at temperature of –18 °C until analysis.

Fruit weight (FW) was determined with a Mettler balance model AG204 scale (Mettler Toledo, Barcelona, Spain). The size of each fruit: equatorial diameter (ED), polar diameter (PD), and peel thickness (PT) were measured, in each fruit, with a digital caliper model 500-197-20, 150 mm (Mitutoyo Corp., Aurora, IL, USA) on 30 fruits per replicate. pH, total soluble solids (TSS) and titratable acidity (TA) were analyzed as described by Forner-Giner et al. [8]. The maturity index (MI) was calculated as the ratio between the TSS and the TA.

Lemons peel color was assessed at four equidistant points of the equatorial region of individual fruits (the same 30 used for the measurement of ED, PD and PT) using a Minolta CR 2000 colorimeter (Minolta, Osaka, Japan), expressing the results using the CIE L* a* b* system (CIE, 1931). The mean values for lightness (L*), green-red (a*) and blue-yellow (b*) coordinates for each fruit were calculated. The objective color was calculated as chromaticity or chroma ($C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$) and hue angle ($H^{\circ} = \arctan(b^*/a^*)$), and with them, the corresponding citrus color index (CCI) using the equation proposed by Jimenez-Cuesta et al. [17], $CCI = 1000 a^*/L^* b^*$.

2.3. Sugar and Organic Acid Content

The extraction and quantification of sugar and organic acids in lemon juices were determined using three juice samples for each cultivar/rootstock combination as described by Legua et al. [18]. The juices were manually prepared by hand-squeezing in a commercial kitchen juicer and centrifuging at 15,000 × g for 20 min (Sigma 3–18 K; Sigma, Osterode am Harz, Germany). Then, 1 mL of supernatant was filtered through a 0.45 µm Millipore filter, and 10 µL was injected into a Series 1100 Hewlett-Packard high-performance liquid chromatograph (HPLC). A column SupelcogelTM C-610H (30 cm × 7.8 mm) and a pre-column (Supelguard 5 cm × 4.6 mm; Supelco, Bellefonte, PA, USA) were used for the analyses of sugars and organic acids. Organic acid absorbance was measured at 210 nm using a diode-array detector (DAD, HPLC, Waldbronn, Germany), while sugars were detected using a refractive index detector (RID, HPLC, Waldbronn, Germany). Standards of sugars and organic acids were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) and calibration curves showed

good linearity ($r^2 \geq 0.999$). Results for both individual organic acids and sugars were expressed g 100 mL⁻¹.

2.4. Antioxidant Activity (AA) and Total Polyphenol Content (TPC)

Extraction of antioxidants and total polyphenols was undertaken according to Wojdylo et al. [19]. This extract was used to measure three methods of antioxidant activity (AA) and total phenolic content (TPC). The free radical scavenging capacities were determined by three methods, ABTS⁺ [20], DPPH• radical [21], and FRAP [22]. Calibration curves (3.5–5.0 mmol Trolox L⁻¹) with good linearity ($r^2 \geq 0.999$) were used for the quantification of the AA by these methods. All analyses were done using an UV-visible spectrophotometer (Helios Gamma model, UVG 1002E, UK). Analyses were run in triplicate and results were expressed as mmol Trolox L⁻¹ of lemon juice.

TPC was method determined by Singleton et al. [23] and quantified using Folin–Ciocalteu reagent, as described by Gao et al. [24]. Gallic acid was used to prepare calibration curves. This analysis was run in triplicate and results were expressed as mg gallic acid equivalents (GAE) per 100 mL of lemon juice.

2.5. Statistical Design and Analysis

Normality test was conducted (results not shown) and, as a normal data distribution was obtained, one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple range test were performed to compare experimental data and determine significant differences among treatments ($P < 0.05$). Principal component analysis (PCA) using Pearson's correlation was also done. XLSTAT (2016.02.27444 version, Addinsoft) was used to perform all statistical analyses.

3. Results

3.1. Morphology and Physico-Chemical Parameters

The effect of rootstock and cultivars on morphology parameters can be found in Table 1. As can be observed, only the number of segments (NSG) did not show statistics differences among lemons under study. Fruit from 'Eureka' trees on 'FA 13' was significantly the heaviest (150.9 g) while lemons from 'Fino 49' trees on 'FA 517' presented the smallest weight with 95.5 g. With respect to 'Bétera' and 'Verna', contrary behavior was observed: on the first 'FA 517' presented higher weight while in the second, this rootstock produced lemons with smaller weight. Regarding ED, 'Bétera' on 'FA 5' was the highest (66.6 mm) and the lowest value was obtained with rootstock 'FA 517' in cultivars 'Verna' and 'Fino 49' with 56.3 mm and 54.6 mm, respectively.

Table 1. Effect of different rootstocks on lemons ('Bétera', 'Verna', 'Eureka' and 'Fino 49'), average fruit weight (FW, g), fruit equatorial diameter (ED, mm), fruit polar diameter (PD, mm), peel thickness (PT, mm), number of seeds (NSD), number of segments (NSG), volume of juice (VJ, mL) and percentage of juice (PJ, %).

Cultivar	Rootstock	FW	ED	PD	ED/PD	PT	NSD	NSG	PJ
'Bétera'	'FA 13'	#116.7 bc	58.0 bc	77.2 bc	0.7 cd	4.92 ab	8.7 bc	9.6	39.3 cd
	'FA 5'	119.2 bc	66.6 a	62.3 f	1.0 a	3.70 c	8.0 bc	9.3	48.9 a
	'FA 517'	126.0 ab	58.5 bc	70.6 cdef	0.8 bc	4.31 bc	7.5 bc	9.4	44.9 ab
'Verna'	'FA 13'	138.7 ab	64.2 ab	75.3 bcd	0.8 bc	4.67 ab	9.4 ab	9.8	45.9 ab
	'FA 5'	137.9 ab	59.3 bc	90.6 a	0.6 d	4.82 ab	5.8 c	9.0	43.0 bc
	'FA 517'	114.5 bc	56.3 c	82.5 ab	0.6 d	5.26 a	7.0 bc	9.4	38.4 d
'Eureka'	'FA 13'	150.9 a	63.2 ab	73.1 bcde	0.8 bc	4.42 abc	7.3 bc	9.1	45.0 ab
	'FA 517'	117.7 bc	60.6 abc	67.3 def	0.9 b	4.34 bc	7.7 bc	9.5	44.6 ab
'Fino 49'	'FA 5'	126.7 ab	60.6 abc	71.6 cdef	0.8 bc	4.41 abc	8.4 bc	9.1	45.3 ab
	'FA 517'	95.5 c	54.6 c	63.7 ef	0.8 bc	3.5 c	12.3 a	9.7	45.5 ab
†ANOVA		***	***	***	***	***	***	NS	***

† NS = not significant at $p < 0.05$, and ***, significant at $p < 0.05$, 0.01, and 0.001, respectively. ‡ Values followed by the same letter, within the same column, were not significantly different ($p < 0.05$), according to Tukey's least significant difference test.

As EP measures the fruit length, it could be observed that the largest fruit sizes (90.65 mm) was on 'FA 5' from 'Verna' whereas the smallest fruit was found on 'Bétera' on 'FA 5' (62.32 mm). Fruit round shape (ED/PD) was 1.0 for 'Bétera' on 'FA 5' and was more elongated in 'Verna' on 'FA 5' (0.65). Peel thickness was thickest in 'Verna' on 'FA 517' with 5.26 mm and the thinnest was 'Fino 49' on 'FA517' (3.70 mm) and 'Bétera' on 'FA 5'. Fruit that had a greater number of seeds (NSD) were 'Fino 49' on 'FA 517' (12.3) and fewer seeds were found on 'Verna' on 'FA 5' (5.8). Percentage of juice (PJ) achieved the highest yield (48.9%) on 'Bétera' 'FA 5', and 'Verna' on 'FA 517' had the lowest yield (38.4%).

Color values of fresh lemon juices and peel are shown in Table 2. Regarding juice color, the highest value of L* was obtained for 'Verna' in 'FA 517' (40.41), which means the highest luminosity, while the lowest value was obtained for 'Bétera' on 'FA 5' (40.10), respectively. The a* value of lemon juice (red color positive values and green colors negative values) presented the greenest color for 'Verna' on 'FA 517' (-1.24) while the reddest color was found for 'Bétera' on 'FA 5' (-1.14) and 'Verna' in 'FA 13' (-1.15). Changes in b* values (blue color represented by negative values and yellow color by positive values) were found; 'Eureka', 'Fino 49' and 'Bétera' on 'FA 517' (3.29, 3.29 and 3.29, respectively) were similar statistically and the most yellow, while the lowest was 'Verna' on 'FA 5' (3.07). C* values were ranged from 3.5 to 3.3 for 'Bétera' on 'FA 517' and 'Verna' on 'FA 5', respectively. Hue* and CCI values in lemon juice samples, were statistically significant.

Table 2. Effect of different rootstocks on lemons ('Bétera', 'Verna', 'Eureka' and 'Fino 49') juice and peel, lightness (L*), red/greenness (a*), yellow/blueness (b*), chroma (C*), and hue angle (H°) values, and citrus color index (CCI = 1000 a*/L* b*).

Cultivar	Rootstock	L*	a*	b*	C*	H°	CCI
Juice Color							
'Bétera'	'FA 13'	40.36 ab	-1.20 bc	3.13 bc	3.36 bcd	111.32 a	-9.73 b
	'FA 5'	40.10 e	-1.14 a	3.16 bc	3.37 bcd	110.13 b	-9.19 a
	'FA 517'	40.28 bcd	-1.20 bc	3.29 a	3.51 a	110.37 b	-9.27 a
'Verna'	'FA 13'	40.20 cde	-1.15 a	3.14 bc	3.35 cd	110.43 b	-9.32 a
	'FA 5'	40.18 cde	-1.17 ab	3.07 c	3.30 d	111.30 a	-9.79 b
	'FA 517'	40.41 a	-1.24 c	3.21 ab	3.46 ab	111.33 a	-9.72 b
'Eureka'	'FA 13'	40.15 de	-1.16 ab	3.17 bc	3.39 bcd	110.37 b	-9.30 a
	'FA 517'	40.31 abc	-1.19 b	3.29 a	3.51 a	110.30 b	-9.23 a
'Fino 49'	'FA 5'	40.28 abcd	-1.16 ab	3.20 ab	3.41 abc	110.31 b	-9.24 a
	'FA 517'	40.24 bcd	-1.18 ab	3.29 a	3.51 a	110.08 b	-9.14 a
†ANOVA		***	***	***	***	***	***
Peel Color							
'Bétera'	'FA 13'	68.81 e	5.48 b	54.81 cd	55.17 de	84.42 c	1.43 c
	'FA 5'	72.18 cd	6.07 b	55.60 bc	56.01 cd	83.84 c	1.52 c
	'FA 517'	71.85 cd	5.35 b	52.47 e	52.81 f	84.32 c	1.40 c
'Verna'	'FA 13'	72.76 bc	5.94 b	57.30 b	57.67 bc	84.12 c	1.43 c
	'FA 5'	72.65 c	2.15 c	52.17 e	52.30 f	87.80 a	0.53 e
	'FA 517'	70.24 de	3.49 c	53.19 de	53.43 ef	86.45 ab	0.89 de
'Eureka'	'FA 13'	74.68 ab	5.14 b	56.85 b	57.21 bc	84.99 bc	1.20 cd
	'FA 517'	73.20 bc	8.75 a	57.28 b	57.91 abc	81.35 d	2.09 b
'Fino 49'	'FA 5'	76.52 a	5.87 b	59.50 a	59.85 a	84.41 c	1.29 cd
	'FA 517'	69.00 e	9.70 a	57.31 b	58.21 ab	80.38 d	2.50 a
†ANOVA		***	***	***	***	***	***

†NS = not significant at $p < 0.05$; ***, significant at $p < 0.05$, 0.01, and 0.001, respectively. †Values (mean of 3 replications for color juice and 12 replications for color peel) followed by the same letter, within the same column, were not significantly different ($p < 0.05$), according to Tukey's least significant difference test.

With respect to lemon peel color, in all the variables, color results were statistically significant ($P < 0.05$). The values for L*, both the highest and lowest, were found on 'Fino 49' cultivar but in different

rootstocks, on 'FA 5' was found the most luminous (76.52) while in 'FA 517' the less luminous with 69.0. Also 'Bétera' on 'FA 13' with 68.81 showed less luminous value. Regarding a^* , cultivars 'Eureka' and 'Fino 49' on 'FA517' were the reddest peel colors (8.75 and 9.70, respectively) while the greenest was found on 'Verna' 'FA 5' (2.15). The highest values of parameter b^* , was found on 'Fino 49' 'FA 5' which means the yellowish peel color, while 'Bétera' 'FA 517' and 'Verna' 'FA 5' were found as the blueness lemon peels. CCI 'Fino 49' on 'FA517' was the highest (2.50) and the lowest 'Verna' on 'FA 5' with 0.53.

The quality parameters, including pH, juice yield, TSS, TA, and MI of citrus juices are shown in Table 3.

Table 3. Effect of different rootstocks on lemons ('Bétera', 'Verna', 'Eureka' and 'Fino 49') fruit total soluble solids (TSS, °Brix), titratable acidity (TA, g citric acid L⁻¹), pH and maturity index (MI).

Cultivar	Rootstock	pH	TSS	TA	MI
'Bétera'	'FA 13'	‡3.09	8.66 de	85.89 bc	1.00 b
	'FA 5'	2.97	9.53 c	97.41 ab	0.98 b
	'FA 517'	2.88	10.73 a	89.64 abc	1.19 a
'Verna'	'FA 13'	2.92	9.40 cd	86.18 bc	1.09 ab
	'FA 5'	2.92	8.43 e	81.50 c	1.04 ab
	'FA 517'	3.00	9.30 cd	86.34 bc	1.08 ab
'Eureka'	'FA 13'	3.01	9.06 cde	86.43 bc	1.05 ab
	'FA 517'	2.91	10.70 a	104.28 a	1.02 ab
'Fino 49'	'FA 5'	2.90	9.60 bc	86.17 c	1.11 ab
	'FA 517'	2.98	10.43 ab	87.45 bc	1.19 a
‡ANOVA		NS	***	**	**

† NS = not significant at $p < 0.05$; **, ***, significant at $p < 0.05$, 0.01, and 0.001, respectively. ‡ Values (mean of 3 replications) followed by the same letter, within the same column, were not significantly different ($p < 0.05$), according to Tukey's least significant difference test.

pH values did not show significant statistical differences. The rootstock 'FA 517' with cultivars 'Bétera', 'Eureka' and 'Fino 49' had the highest TSS (10.7, 10.7 and 10.4 °Brix, respectively), whereas 'Verna' on 'FA 5' had the lowest value (8.4 °Brix). TA had its maximum on 'Eureka' on 'FA 517' (104,28 g citric acid L⁻¹) and minimum on 'Verna' on 'FA 5' (81.5 g citric acid L⁻¹). In all cultivar/rootstock combinations, the maturity index ranged between values of 0.98 and 1.19.

3.2. Sugars and Organic Acids Content

Organic acids strongly influence the organoleptic properties of fruit. Table 4 shows sugars and organic acid profile of lemons under study. Citric acid and malic acid did not show significant differences; whereas ascorbic acid concentration, showed slight variation, being 0.06 g 100 mL⁻¹ the highest concentration on 'Verna' on 'FA 517' and 0.02 g 100 mL⁻¹ the lowest on 'Eureka' on 'FA 13'. Succinic acid contents were found to be the highest (0.82 g 100 mL⁻¹) for 'Bétera' on 'FA517' and the lowest (0,47 g 100 mL⁻¹) for Eureka' on 'FA 13'. Regarding sugars, glucose and fructose were identified for all lemon samples. Both sugars showed a similar behavior in samples, being 'Bétera' on 'FA 517' the lemons with highest concentration, and 'Verna' on 'FA 5' presented the lowest values.

Table 4. Effect of different rootstocks on lemons ('Bétera', 'Verna', 'Eureka' and 'Fino 49') fruit citric acid (CA, g 100 mL⁻¹), malic acid (MA, g 100 mL⁻¹), ascorbic acid (AA, g 100 mL⁻¹), succinic acid (SA, g 100 mL⁻¹), glucose (Glu, g 100 mL⁻¹), fructose (Fru, g 100 mL⁻¹).

Cultivar	Rootstock	CA	MA	AA	SA	Glu	Fru
'Bétera'	'FA 13'	‡3.61	0.36	0.04 abc	0.60 abcd	3.16 cd	4.24 d
	'FA 5'	3.83	0.46	0.04 abc	0.59 bcd	3.67 bc	4.96 bc
	'FA 517'	3.88	0.57	0.04 abc	0.82 a	4.34 a	5.59 a
'Verna'	'FA 13'	4.00	0.44	0.03 bc	0.69 abc	3.79 ab	5.00 bc
	'FA 5'	3.59	0.40	0.04 abc	0.53 cd	3.00 d	4.09 d
	'FA 517'	3.79	0.52	0.06 a	0.71 abc	3.76 b	4.94 bc
'Eureka'	'FA 13'	3.48	0.39	0.02 c	0.47 d	3.59 bc	4.78 c

	'FA 517'	3.88	0.54	0.04 abc	0.77 ab	3.91 ab	5.34 ab
	'FA 5'	3.62	2.14	0.05 ab	0.72 abc	4.04 ab	5.04 bc
'Fino 49'	'FA 517'	4.11	0.51	0.05 ab	0.76 ab	3.98 ab	5.32 ab
	ANOVA	NS	NS	**	***	***	***

†NS = not significant at $p < 0.05$; **, ***, significant at $p < 0.05$, 0.01, and 0.001, respectively. ‡Values (mean of 3 replications) followed by the same letter, within the same column, were not significantly different ($p < 0.05$), according to Tukey's least significant difference test.

3.3. Antioxidant Activity (AA) and Total Polyphenol Content (TPC)

Antioxidants determined using different methodologies (FRAP (ferric reducing/antioxidant power), ABTS⁺ (2,2-azinobis- [3 ethylbenzothiazolin-6-sulphonil]) and DPPH[•] (1,1-difenil2-picrilhidracil)) and total polyphenols of lemon cultivars under study are shown in Table 5.

Table 5. Effect of different rootstocks on lemons ('Bétera', 'Verna', 'Eureka' and 'Fino' 49) fruit total polyphenols content (TPC, mg GAE 100 mL⁻¹), and total antioxidant activity measured according to ABTS⁺ assay (AA-ABTS⁺, mmol Trolox L⁻¹ fw), DPPH (AA-DPPH[•], mmol Trolox L⁻¹ fw), and FRAP (AA-FRAP, mmol Trolox L⁻¹ fw) content.

Cultivar	Rootstock	TPC	AA-FRAP	AA-ABTS ⁺	AA-DPPH [•]
'Bétera'	'FA 13'	‡320.5 ab	1.12 bc	4.20	1.21
	'FA 5'	284.6 b	1.35 abc	4.26	1.21
	'FA 517'	327.3 ab	1.51 abc	4.47	1.02
'Verna'	'FA 13'	396.1 a	1.58 ab	4.18	1.52
	'FA 5'	270.5 b	1.32 abc	4.73	1.37
	'FA 517'	321.2 ab	1.04 c	4.07	1.91
'Eureka'	'FA 13'	245.9 b	1.25 abc	3.89	2.02
	'FA 517'	340.9 ab	1.25 abc	4.82	1.52
'Fino 49'	'FA 5'	351.3 ab	1.67 a	4.42	1.43
	'FA 517'	264.9 b	1.35 abc	4.57	1.60
	ANOVA	**	**	NS	NS

†NS = not significant at $p < 0.05$; **, ***, significant at $p < 0.05$, 0.01, and 0.001, respectively. ‡Values (mean of 3 replications) followed by the same letter, within the same column, were not significantly different ($p < 0.05$), according to Tukey's least significant difference test.

The two methods ABTS⁺ and DPPH[•] did not show statistically significant differences. The highest value of FRAP was for 'Fino 49' on 'FA 5' (1.67 mmol Trolox L⁻¹) and lowest for 'Verna' on 'FA 517' (1.04 mmol Trolox L⁻¹) but no statistical differences were found among the other lemons under study. Concerning TPC, 'FA 13' rootstock had a different behavior on the cultivars, being the highest value (396.15 mg GAE 100 mL⁻¹) with 'Verna' and the lowest (245.91 mg GAE 100 mL⁻¹) with 'Eureka' although it was also found that 'FA 5' on 'Bétera' and 'Verna' showed statistically the lowest values, as well as 'Fino 49' on 'FA 517'.

3.4. Principal Component Analysis (PCA)

PCA representing cultivars and rootstocks and all parameters previously detailed are shown in Figure 1. This graphic, representing Pearson correlations among parameters, is a very useful statistical tool to established relationships among attributes that define samples characteristics. As it could be observed, this graphic explained 56.01% of data (x axis: 20.23%; y axis: 35.78%) and 3 groups were obtained. The first group correlates 'Verna' 'FA 5', 'Bétera' 'FA 13' and 'Verna' 'FA 517' due to H° peel and juice parameters, PD and PT. In the second group it could be found 'Fino 49' on 'FA 5', 'Bétera' on 'FA 5', 'Eureka' on 'FA 13' and 'Verna' on 'FA 13'. These lemons were correlated with FRAP and DPPH[•] antioxidant activity methods, fruit weight, percentage of juice, equatorial diameter, ED/EP ratio, L*, b* and C* peel color, a* juice color and malic acid. Finally, the last group was formed by 'Eureka', 'Fino 49' and 'Bétera' on 'FA 517' rootstock and they are correlated with TPC, ABTS⁺, number of seeds, number of segments, a* and CCI of the peel, C* and b* of juice, TA, MI, TSS, ascorbic acid, succinic acid, glucose and fructose.

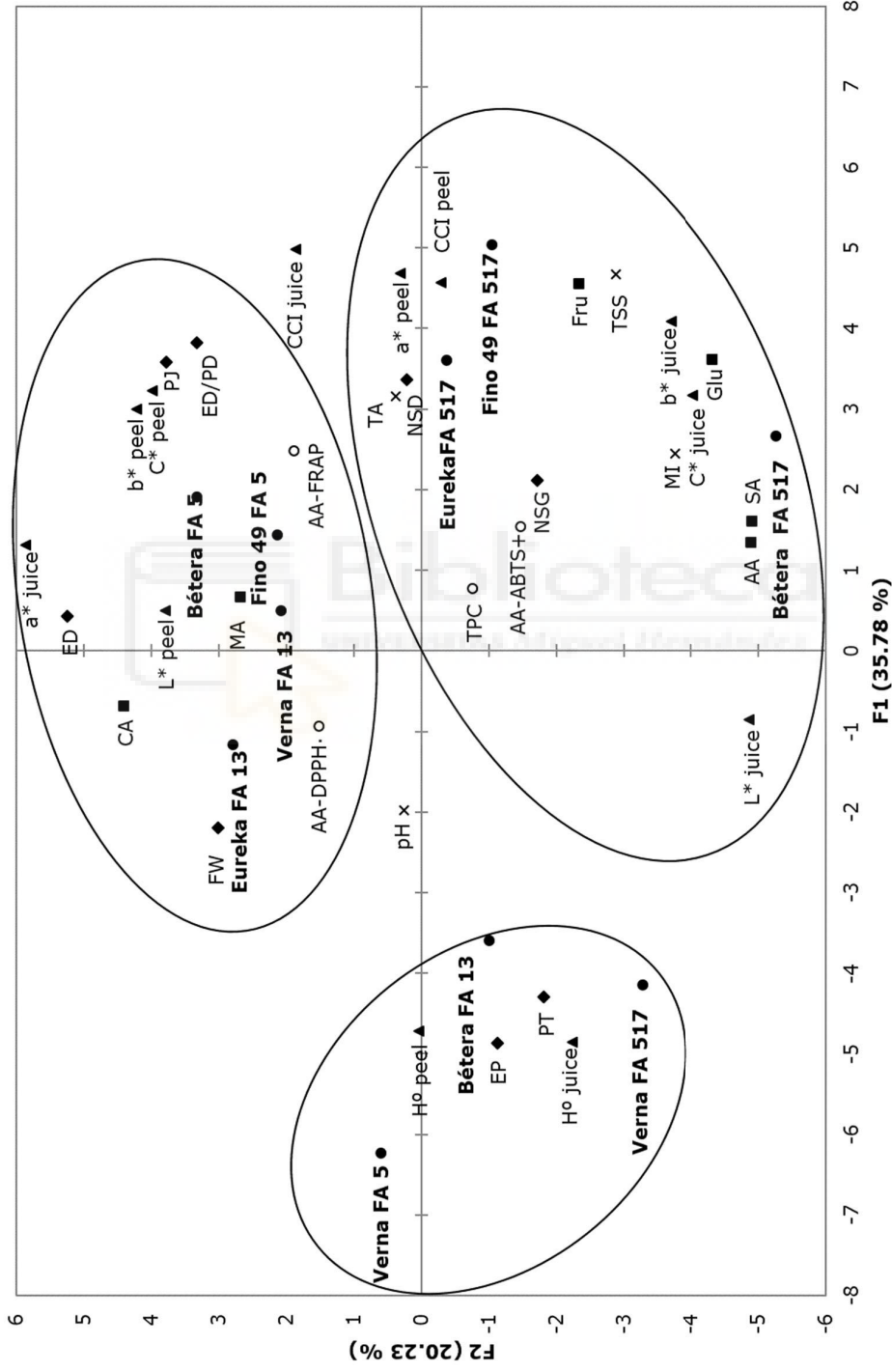


Figure 1. Principal component analysis (PCA) of variety and rootstocks (●), antioxidants and total polyphenols (°), morphological parameters (◆) (FW: fruit weight; ED: equatorial diameter; PD: polar diameter; PT peel thickness; NSD: number of seeds; NSG: number of segments; PJ: percentage of juice), color parameters (▲), chemical parameters (x) (TSS: total solid soluble; TA: titratable acidity; MI: maturity index) and organic acids and sugars (■) (CA: citric acid; MA: malic acid; AA: ascorbic acid; SA: succinic acid; Glu: glucose; Fru: fructose.)

4. Discussion

Citrus fruits are beneficial for human health because of their antioxidant activity, phenols and vitamin C; but they are also exposed to new diseases that appear in the citriculture as CTV [25]. The variables studied indicated that rootstocks have influenced cultivars in terms of decreases in the fruit size, weight, peel thickness; but have increased the percentage of juice and soluble solids; these data obtained differ from the aforementioned from IVIA [16] who reported higher values than those found.

Other research coincided with the current experiment for 'Eureka' on *C. macrophylla* that had smaller fruits, with higher content of titratable citric acid and sugars [26]; while Jiménez and Zamora [27] evaluated different rootstocks that had a higher values in weight (147.1 g) on *C. macrophylla*, diameter (60.8 mm), peel thickness (5.2 mm) in *C. volkameriana*, percentage of juice (33.6%) and soluble solids (8.7%) on Citrange 'Troyer'; acidity 6.43% in sour orange and maturity index Citrange 'Carrizo'. Different rootstocks influenced physical and chemical characteristics to fruits.

For 'Verna' cultivar, Perez et al. [26] indicated, during three years of evaluation, that weight and diameter results were not conclusive, but in other variables, some conclusions were obtained, for instance, further thickening of the bark, increase soluble solids, acidity and maturity index for rootstock *C. macrophylla*.

Deficit irrigation with saline water [28], showed a reduction in weight, peel thickness and TSS (total soluble solids) while juice percentage increased. These data agrees with our research where an inverse Pearson correlation was obtained ($r^2 = -0.813$, $P < 0.001$ —data not shown) increasing the thickness of the crust, juice content decreases and soluble solids increase, detecting a negative correlation between these two variables ($r^2 = -0.561$, $P < 0.001$ —data not shown). Liu et al. [29] indicated that differences in growth of fruit size is related to several factors such as increase of cell expansion during the maturation period, high levels of auxin in fruits due to rootstocks or their progenitors, participation of multiple ARF genes, such as the ARF1 and ARF2 transcriptional repressors and ARF6 transcriptional activator, as well as the vigor of rootstock that develops an extensive root system absorbing water better; moreover, high levels of ABA (abscisic acid) can inhibit this mechanism, obtaining smaller size fruit.

Color is a subjective attribute that can be interpreted differently from one person to another, often defining purchase decision and relating it to the state of maturity or to the taste of fruit [30], and influencing commercial activity in the market [31].

The data obtained by measuring the skin shown that the rootstock have had an influence on the brightness (L^*) of the fruits, mainly in the 'Fino 49' cultivar over 'FA 5' and where the value of a^* increases; but there is a high correlation (0.98) with the CCI. These tendencies are similar to those found by Legua et al. [6]. Thus, in other studies they pointed out that the color is due to the degradation of chlorophyll by the difference in temperatures, low temperatures with respect to average temperatures [32], to the color coordinates a^* , b^* and the angle index of hue with maturation [33]. The same team, Conesa et al. [34] worked with 'Eureka Frost', 'Lisbon Frost', 'Fino 49' and 'Verna 51' on *C. macrophylla* and their results indicated that the first three acquired the yellow coloration two months before 'Verna' which changed color at the end of January. Another influence in the values of the color is the time of harvest and the storage under average temperatures increasing these when fruits change of color [35].

Chemical parameters under study (pH, TSS, TA and MI) defined the quality of the fruit and determined the time of harvest, which have an influence on its post-harvest life. The results found in the present research indicated that the higher the value of soluble solids, the lower the acidity, and the maturity index increases in 'Bétera' and 'Verna' on 'FA 13' and 'FA 517' rootstocks, and these data coincide with other studies [36,37] where the increase in soluble solids was explained by the hydrolysis effect of the structural polysaccharides (pectins of the cell wall) in their basic components that would accumulate sugars [38]. It could also be due to the final stage of fruit development [39], accumulating mainly sucrose [40] and, when using organic fertilizer, decreasing the acidity but

increasing the MI [41]. MI can also be increased by performing the scratching technique, as indicated by Soler et al. [42].

While other rootstocks differ in their influence as high acids, lower soluble solids and MI, similar results were reported in different studies [6,26,43–45]. The decrease in soluble solids with respect to other rootstocks could be because it is a non-climacteric fruit and has a respiratory activity where the oxidation of sugars would occur to obtain carbon dioxide, water and energy; other studies indicated that applications of ethephon in lemon decreased the content of soluble solids, acidity and MI [46]. The increase of acidity could be due to the inhibition of aconitase enzyme limiting the conversion of citrate [47,48] indicated that the enzyme citrate synthase catalyzes the condensation reaction of acetate, which comes from acetyl-CoA and the oxaloacetate forming citrate, which decreases during maturation while increasing the activity of isocitrate dehydrogenase and succinate dehydrogenase. However, Soler et al. [42] points out that there are three genes that encode three aconitase enzymes, one in the mitochondria that manifests itself constantly in the process of development and maturation; the other two are located in the cytosol and at least one of them is manifested in the maturation; being the increase of the acidity directly related to a reduction in the level of transcription of the ATP citrate lyase, decreasing the degradation of citrate in the cytosol and leaving a greater amount of citrate stored in the vacuole.

Sugar and organic acid contents are major factors for fruit flavor and are important breeding traits. The major organic acid found in the present research was citric acid, which is also confirmed by other authors [46,49–51]. Citric and malic acid did not show significant differences. In contrast, with succinic acid and ascorbic acid were affected by rootstock, succinic acid has four carbon, is a dicarboxylic acid and is considered as a non-volatile acid [52] along with other components of different chemical nature participate in the taste properties of salty, astringent or bitter taste [53] and this would explain its low values.

Ascorbic acid (vitamin C) deficiency causes a disease known as scurvy that, according to Shaikh et al. [54], has other implications such as severe anemia with hemolysis (rash on neck, shoulders, chest, trunk and lower extremities). It is necessary to include in our diet citrus juice that has amount of ascorbic acid necessary for health; therefore, our results indicate that the rootstocks that had the highest value in ascorbic acid were 'FA 517' and 'FA 5' in all the cultivars and 'Eureka' had the lowest value of ascorbic acid on 'FA 13' rootstock, this coincides with results reported by Ortiz et al. [55], where a similar behavior was found but with other varieties. Bermejo and Cano [56] found that 'Fino 49' lemon presented higher Vitamin C concentration on *C. macrophylla* rootstock.

Regarding sugars, results in the current research indicated that the rootstocks that had highest value in glucose and fructose were 'FA 517' and 'FA 5' in all the cultivars which differ from what was reported by Bermejo and Cano [56], who indicated that 'Fino 49' on *C. macrophylla* had values of glucose 4.36 g L⁻¹ and fructose 4.33 g L⁻¹ juice; while other research indicated that the content of fructose and glucose was higher in 'Fino 49' than 'Verna' [55] and this matches with results found in this study.

Citrus juice is a health benefit because it improves intestinal [57], cardiovascular [58], and cancer diseases [59]. These properties are related to its richness in phenolic compounds such as flavones and flavanones [60] and, within the latter group, erythrin and hesperidin are the main compounds in lemon juice [61]. In this research, the highest TPC was found on 'Verna' on 'FA 13' while 'Eureka' on 'FA 517' rootstock had a lower amount. Probably, other cultivars on other rootstocks do not have a similar behavior, as was observed for ascorbic acid, the reason why these data are not conclusive; this should be due to the fact that the content of phenols differs at the moment of harvest [62], in terms environmental conditions, and in the seasons [63]. Phenols also depends on the received brightness between plants [64], parts of plants (leaves, fruit), peel, pulp or juice, phenol compounds vary from one cultivar to another.

Concerning antioxidants, the results indicate for ABTS⁺ and DPPH that they had little ability to inhibit free radicals and that this was similar between cultivars and rootstocks, being statistically not significant. In contrast to FRAP, where the highest ferric-reducing capacity was found on 'Verna' on 'FA 13' while the lowest was 'Eureka' on the same rootstock. The data shown differ from those found

by other authors as [65] they point out that antioxidant activity in lemon varies significantly with different degrees of maturity depending on when they were harvested, being greater in green than in mature specimens. In summary, antioxidant activity will depend on many factors, but mainly on the amount of compounds present, because antioxidants have a similar structure, isomerism, stereochemistry and the lower or higher presence of flavone or flavonones.

5. Conclusion

In conclusion, results indicated that best rootstock was 'FA 517' that had a positive influence on cultivars studied as well as the physical variables of smaller fruits, thin rind, increase in soluble solids, higher maturity index and the content of organic acids and carbohydrates.

With respect to the content of phenols and antioxidant activity, higher values were found in all cultivars studied on rootstocks 'FA 13', followed by 'FA 517'. Cultivars that were most influenced by rootstocks were 'Bétera' and 'Eureka' in terms of physical properties while, in chemical properties, they were 'Verna' followed by 'Fino 49'. Summing up, each rootstock had an influence on the different cultivars studied in terms of the physical, chemical and antioxidant properties.

Author Contributions: M.A.-H. and L.S.-R. performed the experiments and wrote the manuscript; M.A.F.-G. and J.J.P.-P. analyzed the data; F.H. and P.L. coordinated the study, planned and designed the experiments. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgment: Work of Mrs. Aguilar was supported by a scholarship from Fundación Carolina.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. FAO. Crop data base. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> (accessed 4 November 2019).
2. MAGRAMA. Ministry of Agriculture, Food and Environment. Available online: <http://www.magrama.gob.es/es>. (accessed 2 November 2019).
3. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Available online: <http://gipcitricos.ivia.es/citricultura-valenciana>. (accessed 2 November 2019)
4. Castle, W. A career perspective on citrus rootstocks, their development, and commercialization. *HortScience*. **2010**, *45*, 11–15.
5. Barry, G.; Castle, W.; Davies, F. Rootstocks and Plant Water Relations Affect Sugar Accumulation of Citrus Fruit Via Osmotic Adjustment. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **2004**, *129*, 881–889.
6. Legua, P.; Martínez-Cuenca, M.; Belver, R.; Forner-Giner, M. Rootstock's and scion's impact on lemon quality in southeast Spain. *Int Agrophys.* **2018**, *32*, 325–333.
7. Bitters, W. *Citrus Rootstock: Their Characters and Reactions*. Editor, digital version: Marty Nemeth, Reference Librarian, UC Riverside Science Library, USA, **2012** pp 236, Available online: <https://citrusvariety.ucr.edu/links/documents/Bitters.pdf>
8. Forner-Giner, M.A.; Alcaide, A.; Primo-Millo, E.; Forner, J.B. Performance of 'Navelina' orange on 14 rootstocks in Northern Valencia (Spain). *Sci. Hortic.* **2003**, *98*, 223–232.
9. Sicari, V.; Pellicano, T.; Giuffrè, A.; Zappia, C.; Capocasale, M. Bioactive compounds and antioxidant activity of citrus juices produced from varieties cultivated in Calabria. *Food Measure.* **2016**, *10*, 773–780.
10. Kaur, J.; Kaur, G. An insight into the role of citrus bioactives in modulation of colon cancer. *J. Func. Foods.* **2017**, *13*, 239–261.
11. Cano, A.; Bermejo, A. Influence of rootstock and cultivar on bioactive compounds in citrus peels. *J. Sci. Food Agric.* **2011**, *91*, 1702–1711.
12. Verdejo-Lucas, S.; Sorribas, F. J.; Forner-Giner, J.B.; Alcaide, A. Screening of hybrid citrus rootstocks for resistance to *Tylenchulus semipenetrans* Cobb. *HortSci.* **1997**, *32*, 1116–1119.
13. Verdejo-Lucas, S.; Sorribas, F.; Forner-Giner, J.B.; Alcaide, A. Resistance of hybrid citrus rootstocks to a Mediterranean biotype of *Tylenchulus semipenetrans* Cobb. *HorSci.* **2000**, *35*, 269–273.

14. Forner, J.B.; Forner, M.A.; Alcaide, A.; Verdejo-Lucas, S.; Sorribas, F.J. New hybrid citrus rootstocks released in Spain. *Proc. Int. Soc. Citricult.* **2000**, *1*, 58–61.
15. Llosá, M.J.; Bermejo, A.; Cano, A.; Quiñones, A.; Forner-Alcaide, M.A. The citrus rootstocks Cleopatra mandarin, Poncirus trifoliata, Forner-Alcaide 5 and Forner-Alcaide 13 vary in susceptibility to iron deficiency chlorosis. *J. Am. Pomol. Soc.* **2009**, *63*, 160–167.
16. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, La Habana, Cuba. Available online: <http://riacnet.net/wp-content/uploads/2014/11/Conf-1-Cultivares.pdf>. 44 p. (accessed 2 November 2019).
17. Jiménez-Cuesta, M.J.; Cuquerella, J.; Martínez-Jávega, J.M. Determination of a color index for citrus fruit degreening. In *Proc. Int. Soc. Citriculture*, **1981**, *2*, 750–753.
18. Legua, P.; Bellver, R.; Forner, J.; Forner-Giner, M.A. Plant growth yield and fruit quality of Lane Late navel orange on four citrus rootstocks. *Span. J. Agric. Res.* **2011**, *9*, 271–279.
19. Wojdyło, A.; Oszmiański, J.; Bielicki, P. Polyphenolic composition, antioxidant activity, and polyphenol oxidase (PPO) activity of quince (*Cydonia oblonga* Miller) varieties. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 2762–2772.
20. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* **1999**, *26*, 1231–1237.
21. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci Technol.* **1995**, *28*, 25–30.
22. Benzie, I.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem.* **1996**, *239*, 70–76.
23. Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Meth. Enzymol.* **1999**, *299*, 152–178.
24. Gao, X.; Ohlander, M.; Jeppsson, N.; Bjork, L.; Trajkovski, V. Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1485–1490.
25. Abbate, L.; Panno, S.; Mercati, F.; Davino, S.; Fatta Del Bosco, S. Citrus rootstock breeding: response of four allotetraploid somatic hybrids to Citrus tristeza virus induced infections. *Eur J. Plant Pathol.* **2019**, *153*, 837–847.
26. Pérez-Pérez, J.G.; Porras, I.; García-Lidón, A.; Botia, P.; García-Sánchez, F. Fino 49 lemon clones compared with the lemon varieties Eureka and Lisbon on two rootstocks in Murcia (Spain). *Sci Hort.* **2005**, *106*, 530–538.
27. Jiménez, R.; Zamora, V. Principales cultivares y patrones utilizados en la citricultura. Taller Regional sobre viveros de cítricos., Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, La Habana, Cuba. Available online: <http://riacnet.net/wp-content/uploads/2014/11/Conf-1-Cultivares.pdf>. 44 p. (accessed 24 November 2019).
28. Pérez-Pérez, J.G.; Robles, J.M.; García-Sánchez, F.; Botía, P. Comparison of deficit and saline irrigation strategies to confront water restriction in lemon trees grown in semi-arid regions. *Agric. Water Manag.* **2016**, *164*, 46–57.
29. Liu, X.; Li, J.; Huang, M.; Chen, J. Mechanisms for the influence of citrus rootstocks on fruit size. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 2618–2627.
30. Pathare, P.B.; Opara, U.L.; Al-Said, F.J. Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: a review. *Food Bioprocess Technol.* **2013**, *6*, 36–60.
31. Gueli, A.M.; Stella, G.; Timpanaro, G. Colorimetric and raman characterization as marketing value index of Sicilian citrus. *Quality-Access to Success.* **2019**, *20* 287–234.
32. Conesa, A.; Manera, J.; Brotons, J.M.; Porras, I. Relation between temperature and the color coordinate “a” during the development of the external color of lemon fruits (Conference Paper). *Acta Hort.* **2015**, *1065*, 305–312.
33. Conesa, A.; Manera, F.J.; Brotons, J.M.; Fernandez-Zapata, J.C.; Simón, I.; Simón-Grao, S.; Alfosea-Simón, M.; Martínez-Nicolás, J.J.; Valverde, J.M.; García-Sánchez, F. Changes in the content of chlorophylls and carotenoids in the rind of Fino 49 lemons during maturation and their relationship with parameters from the CIELAB color space. *Sci Hort.* **2019**, *243*, 252–260.
34. Conesa, A.; Manera, J.; Brotons, J.M.; Castañar, R.; Porras, I. El cambio de color de la corteza del limonero ‘Verna’ y ‘Fino’. In Proceedings of XIV Congreso de la SECH Orihuela, Spain 3–5 June 2015; pp 290–293.
35. Sun, Y.; Singh, Z.; Tokala, V.Y.; Heather, B. Harvest maturity stage and cold storage period influence lemon fruit quality. *Sci Hort.* **2019**, *249*, 322–328.

36. Fallahi, E.; Rodney, D.R.; Mousavi, Z. Growth, Yield, and Fruit Quality of Eight Lemon Cultivars in Arizona. *J. Amer. Soc. Hort Sci.* **1990**, *115*, 6–8.
37. Continella, A.; Pannitteri, C.; La Malfa, S. Influence of different rootstocks on yield precocity and fruit quality of 'Tarocco Scirè' pigmented sweet orange. *Sci Hort.* **2018**, *230*, 62–67.
38. Arrieta, A.; Baquero, U.; Barrera J. Caracterización fisicoquímica del proceso de maduración del plátano "Papocho" (Musa ABB Simmonds), *Agro. Colomb.* **2006**, *24*, 48–53.
39. Davies, F.S.; Albrigo, L.G. Cítricos. CAB international. Editorial Acribia S.A: Wallingford, U.K., 1999, pp., 283.
40. Hardy, S.; Sanderson G. Citrus maturity testing. *Prime fact.* **2010**, *980*, 1–6.
41. Liu, C.H.; Liu, Y. Influences of organic manure addition on the maturity and quality of pineapple fruits ripened in winter. *J. soil Sci. Plant. Nut.* **2012**, *12*, 211–220.
42. Soler, G.; Iglesias, D.J.; Cercós, M.; Tadeo, F.R.; Primo-Millo, E.; Talón, M. Acumulación de ácidos orgánicos durante la maduración del fruto de los cítricos. *Levante agrícola.* **2003**, *42*, 372–378.
43. Georgiou, A. Evaluation of rootstocks for the Cyprus local lemon variety 'Lapithkiotiki'. *Sci Hort.* **2009**, *123*, 184–187.
44. Armadans, A.J.; Villalba, N.; Rodríguez, H. Influencia del porta-injertos y la época de cosecha sobre la calidad de pomelo (*Citrus paradisis* Macf) variedad Rio Red. *Acta Agronómica.* **2014**, *63*, 1–8.
45. Robles, J.; Botía, P.; Pérez-Pérez, J. Sour orange rootstock increases water productivity in deficit irrigated 'Verna' lemon trees compared with *Citrus macrophylla*. *Agric. Water Manag.* **2017**, *186*, 98–107.
46. Zhang, P.; Zhou, Z. Postharvest ethephon degreening improves fruit color, flavor quality and increases antioxidant capacity in 'Eureka' lemon (*Citrus limon* (L.) Burm.f. *Sci Hort.* **2019**, *248*, 70–80.
47. Echeverría, E.; Valich, J. Carbohydrate and enzyme distribution in protoplasts from Valencia orange juice sacs. *Phytochemistry.* **1988**, *27*, 73–76.
48. Lizada, C. Mango. In *Biochemistry of Fruit Ripening*. Ed. G. B. Seymour, J. E. Taylor, & G. A. Tucker. Chapman and Hall: London, U.K., 1993, pp. 255–271.
49. Gargouri, B.; Ammar, S.; Verardo, V.; Besbes, S.; Segura-Carretero, A.; Bouaziz, M. RP-HPLC–DAD–ESI–TOF–MS based strategy for new insights into the qualitative and quantitative phenolic profile in Tunisian industrial Citrus Limon by-product and their antioxidant activity. *Eur. Food Res. Technol.* **2017**, *243*, 2011–2024.
50. Nile, S.H.; Baskar, V.; Keum, Y.S. Characterization of organic acids, sugars, antioxidant and anti-inflammatory activities of Citrus reticulata Blanco cv. Nagpur. *Indian J. Exp. Biol.* **2017**, *55*, 604–610.
51. Asencio, A.; Serano, M.; García-Martínez, S.; Pretel, M. Organic acids, sugars, antioxidant activity, sensorial and other fruit characteristics of nine traditional Spanish Citrus fruits. *Eur. Food Res. Technol.* **2018**, *244*, 1497–1508.
52. Velioglu, Y. Food acids: Organic acids, volatile organic acids and phenolic acids. In: *Advances in food biochemistry*; Yildiz, F., Eds.; CRC Press: Boca Raton, Florida, USA, 2009, pp 313–339.
53. Sancho, V.J.; Bota-Prieto, E.; De Castro, J.J. Introducción al análisis sensorial de los alimentos. Ediciones de la Universitat de Barcelona. Barcelona, Spain, 1999, pp. 319.
54. Shaikh, H.; Salman-Faisal, M.; Mewawalla, P. Vitamin C deficiency: rare cause of severe anemia with hemolysis. *Int. J. Hematol.* **2019**, *109*, 618–621.
55. Ortiz, J.M.; García-Lidón, A.; Tadeo, J.L.; Fernández de Córdoba, J. Rootstock effect on fruit and juice characteristics of lemons. *Proc. Int. Soc. Citriculture, I.* **1984**, *1*, 50–53.
56. Bermejo, A.; Cano, A. Analysis of nutritional constituents in twenty citrus cultivars from the Mediterranean area at different stages of ripening. *Food Nutr. Sci.* **2012**, *3*, 639–650.
57. Ekawati, E.R.; Darmanto, W. Lemon (*Citrus limon*) juice has antibacterial potential against diarrhea-causing pathogen. *Earth and Env. Sci.* **2019**, *217*, doi:10.1088/1755-1315/217/1/012023.
58. Chen, C.; Zhang, Q.; Wang, F.Q.; Li, C.H.; Hu, Y.J.; Xia, Z.N. In vitro anti-platelet aggregation effects of fourteen fruits and vegetables. *Pak J. Pharm. Sci.* **2019**, *32*, 185–195.
59. Cao, X.; He, Y.; Kong, Y.; Mei, X.; Huo, Y.; He, Y.; Liu, J. Elucidating the interaction mechanism of eriocitrin with β -casein by multispectroscopic and molecular simulation methods. *Food Hydrocoll.* **2019**, *94*, 63–70.
60. Kamran, M.; Huma, Z.E.; Dangles O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *J. Food Comp. Anal.* **2014**, *33*, 85–104.
61. Gonzales-Molina, E.; Dominguez-Perles, R.; Moreno, D.A.; García-Viguera, C. Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *51*, 327–345.

62. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 727–747.
63. Dwyer, J.; Peterson J.J. Measuring flavonoid intake: need for advanced tools. *Public. Health Nutr.* **2002**, *5*, 925–930.
64. Aherne, S.; O'Brien, N. Dietary flavonols; chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition.* **2002**, *18*, 75–81.
65. Dong, X.; Hu, Y.; Li, Y.; Zhou, Z. The maturity degree, phenolic compounds and antioxidant activity of Eureka lemon (*Citrus limon* (L.) Burm.f.: A negative correlation between total phenolic content, antioxidant capacity and soluble solid content. *Sci Hort.* **2019**, *243*, 281–289.






© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Article

Quality Parameters of Spanish Lemons with Commercial Interest

Marlene G. Aguilar-Hernández¹, Dámaris Núñez-Gómez^{2,*}, María Ángeles Forner-Giner³,
Francisca Hernández², Joaquín J. Pastor-Pérez⁴ and Pilar Legua²

¹ Department of Horticulture, Universidad Nacional Agraria La Molina, Av. La Molina s/n, 15026 Lima, Peru; maguilarhe@lamolina.edu.pe

² Department of Plant Sciences and Microbiology, Escuela Politécnica Superior de Orihuela (EPSO), Miguel Hernandez University, Ctra. de Beniel, Km. 3,2, 03312 Orihuela, Spain; francisca.hernandez@umh.es (F.H.); p.legua@umh.es (P.L.)

³ Citriculture and Vegetal Production Center, Valencian Institute for Agricultural Research, Apartado Oficial, 46113 Moncada, Spain; forner_margin@gva.es

⁴ Departamento de Ingeniería Agroforestal, Escuela Politécnica Superior de Orihuela (EPSO), Miguel Hernandez University, Ctra. de Beniel, Km. 3,2, 03312 Orihuela, Spain; jjpastor@umh.es

* Correspondence: dnunez@umh.es; Tel.: +34-966-749-724

Abstract: The Spanish Mediterranean region concentrates the largest producers of lemons (*Citrus limon* Burm. f.) at the national level where the 98.4% of the cultivated area of lemons corresponds to the varieties “Verna” and “Fino”. In this study, the morphological and chemical variations of the fruits obtained in five variety / rootstock combinations were investigated in order to determine the influence and impact of the rootstock on the physicochemical properties of the fruits. The assay was carried out using three lemon varieties (“Fino 95”, “Fino 49” and “Verna”) grafted onto two different rootstocks (*Citrus macrophylla* and *Citrus aurantium*). The varieties were selected due to be consolidated commercial varieties, while the rootstocks are the most commonly used in the world. Both the morphological characteristics of the fruits (colour, weight, size) as well as their physicochemical characteristics (total soluble solids, titratable acidity, maturity index, antioxidant activity, sugars, and organic acids) were evaluated. Based on the results, the lemons with the best physicochemical and the best compositional characteristics were obtained in the “Fino 95” and “Fino 49” lemons grafted onto *C. aurantium* rootstock presented the highest quality fruits.

Keywords: sugars; antioxidants; phenols; *Citrus limon* (L.) Burm f.; rootstock



Citation: Aguilar-Hernández, M.G.; Núñez-Gómez, D.; Forner-Giner, M.Á.; Hernández, F.; Pastor-Pérez, J.J.; Legua, P. Quality Parameters of Spanish Lemons with Commercial Interest. *Foods* **2021**, *10*, 62. <https://doi.org/10.3390/foods10010062>

Received: 19 November 2020

Accepted: 23 December 2020

Published: 29 December 2020

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The lemon (*Citrus limon* Burm f.) represents one of the most important citrus fruits in the world after the orange and the mandarin, for its various food, industrial and medicinal/therapeutic uses [1,2]. Worldwide, Spain holds the second position in the ranking among the lemon-producing countries, with its production concentrated in the southeast of the country, that is, in the Mediterranean region [3]. In this region, among the most relevant varieties of Spanish origin of lemon trees, the varieties “Verna” and “Fino” stand out. These two varieties concentrate 98.4% of the cultivated area of lemons in Spain.

The “Fino” lemons (autumn-winter variety) are of high quality for international exports to European countries from October to February when prices are higher, while the “Verna” season runs from March to July when prices on the market are low [4].

The importance of adequate rootstocks in the cultivation of citrus fruits is vital for the development of the plantation. Citrus rootstocks affect many external and internal characteristics of the fruit, such as size, shape, skin thickness, juice content, total soluble solids, and phytonutrient composition. In recent times, many efforts have been made to search and evaluate new rootstocks that are better adapted to different areas and environmental conditions [4–10]. However, in citrus cultivation, it is necessary to carry out

new research aiming to identify the impact, behaviour and synergies between the variety and the rootstock mainly related to its resistance/adaptability (water stress, nutrients, soil biota among others), harvest yield per tree, and morphological and quality fruit characteristics. The selection of one rootstock to the detriment of another one can give to the citric farmers a competitive advantage, or not, since the correct choice can facilitate and improve crop management, the trees can show better resistance/adaptability to different agro-environmental variations, and the fruit obtained can present the characteristics physicochemical demanded by both the market and consumers.

Historically, the bitter orange tree (*Citrus aurantium* L.) has been the most used rootstock in lemon trees. However, this rootstock is highly sensitive to the Citrus Tristeza Virus (CTV) [11] and is being replaced by the *Citrus macrophylla* rootstock, due to its greater vigour, which induces higher yields and an earlier harvest than with *C. aurantium* [6].

When selecting a rootstock, adaptability to the prevailing soil conditions and the horticultural characteristics of the cultivar, such as tree growth, yield and, above all, fruit quality, are considered. The objective of this study was to compare the quality of the fruit obtained from the principal bloom, from the morphological and physicochemical point of view as well as the antioxidant capacity of three commercial varieties of lemon (“Fino 95”, “Fino 49” and “Verna”) grafted on two rootstocks: *C. macrophylla* and *C. aurantium*.

Once the importance of the study of the variety/rootstock interactions for lemon cultivation has been highlighted, it is striking that, to our knowledge, there are no specific studies with these variety/rootstock combinations, since they represent the main lemon cultivation combinations in Spain.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material and Sampling

In the present study, three commercial varieties of *Citrus limon* (“Verna”, “Fino 95” and “Fino 49”) grafted on two different rootstocks (*C. macrophylla* and *C. aurantium*) were used (Table 1). The 10-year-old trees were located in a commercial lemon plantation in Alicante, Spain. The growing (drip irrigation with addition of NPK 4-1-1.5 fertilizer) and soil conditions (clay soil, 44.4% CaCO₃, 17.1% active calcium carbonate, 5.79 mS cm⁻¹ and pH = 8.5) were maintained the same for all varieties and rootstocks. All the conditions (environmental, soil, irrigation, fertilization, climate, etc.) remained homogeneous for all the trees studied in order to evaluate the morphological and nutritional variations/differences among the three varieties grafted onto two rootstocks. The fruits were collected in the middle of May for “Verna” combinations and the beginning of October for “Fino” combinations according to the commercial collected dates. In all the cases, the lemon fruits resulted from the principal bloom and all the trees were in perfect sanitary conditions. Representative samples of the fruits were manually collected with specific pruning shears. Twenty fruits from five trees for each combination (*n* = 5) were collected with a total of 100 lemons. The fruits collection was made in all tree orientations, internal and external, aiming to avoid the edge effect. For this study, “Fino 95” grafted on *C. aurantium* was not considered because it is not a commercial combination and it is not used in commercial plantations. This is due to “Fino 95” being a very early variety and the *C. aurantium* rootstock delays its maturation.

Table 1. Varieties and rootstocks studied in this work.

Cultivar	Rootstock	Acronym
“Fino 95”	<i>Citrus macrophylla</i>	F95-M
“Fino 49”	<i>Citrus macrophylla</i>	F49-M
“Fino 49”	<i>Citrus aurantium</i>	F49-A
“Verna”	<i>Citrus macrophylla</i>	V-M
“Verna”	<i>Citrus aurantium</i>	V-A

2.2. Morphological Characterization of the Fruits

The assays were carried out on the same day of harvesting on fruit held at room temperature. The size of the fruits was determined by the measuring the equatorial diameter (ED), polar diameter (PD), size of the neck and base nipple by means of a digital caliper (model 500-197-20, 150 mm; Mitutoyo Corp., Aurora, IL, USA). To determine the peel thickness (PT), the lemon fruits were split vertically in the area of the equator, later the measurements were taken at equidistant points by a digital caliper (model 500-197-20, 150 mm; Mitutoyo Corp., Aurora, IL, USA). The weight of the fruits was also determined (model AG204 scale; Mettler Toledo, Barcelona, Spain) with a precision of 0.1 mg. Additionally, the number of seeds and segments of each of the fruits was counted for all the samples, by means of simple visual manual counting.

2.3. Colour Determination

Colour was measured using a colorimeter (model CR-300, Minolta, Osaka, Japan). Four readings of the peel were made in four equatorial and equidistant zones of all the fruits. Measurements were made at constant room temperature (22 ± 2 °C). Colour was evaluated according to the Commission Internationale de l'Éclairage (CIE) and expressed as L^* , a^* and b^* colour values [12]. The coordinates L^* , a^* and b^* indicate the lightness of the colour ($L^* = 0$ and $L^* = 100$ represent the colour white and black, respectively), its position between green and red (the negative and positive values of a^* indicate green and red, respectively) and its position between blue and yellow (negative and positive values of b^* indicate blue and yellow, respectively) [13]. The target colour ($C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$), the hue angle ($H^0 = \arctan(b^*/a^*)$), and colour index ($CI = a^* \times 1000/L^* \times b^*$) were also calculated.

2.4. Biochemical Characterization of the Fruits

Biochemical analyses were determined on five juice samples (3 lemons each) for each variety/rootstock combination studied. The juice was carefully obtained using a commercial manual juicer and immediately centrifuged at 15,000 rpm for 20 min (Sigma 3-18 K, Osterode and Harz, Lebach, Germany). The juice samples were kept in the freezer at -18 °C until later analysis for pH, titratable acidity (TA) and total soluble solids (TSS) were calculated according to the methodology described by Aguilar-Hernández et al., (2020). The maturity index (MI) was calculated as the TSS/TA ratio. All analyses were carried out at constant room temperature (22 ± 2 °C).

2.5. Organic Acids and Sugars Content

Sugar and organic acids in lemon juices were determined according to methodology described by Legua et al. [14] with using the Agilent 1100 high performance liquid chromatography (HPLC) with ChemStation software. Sugar and organic acids were separated using a Supelcogel C610H column, 30 cm \times 7.8 mm, and a Supelguard pre-column, 5 cm \times 4.6 mm (Supelco, Bellefonte, PA, USA). A diode array detector (DAD) (Diode Array DAD G1315A, Bellefonte, PA, USA) set at 210 nm and a refractive index detector (RID) (G-1362-A) were used to quantify organic acids and sugars, respectively. In both cases, reference standards were used for the organic acids (L-ascorbic acid, malic acid, citric acid, oxalic acid, acetic acid, lactic acid and succinic acid) and the sugars (glucose, fructose and sucrose) supplied by Sigma Aldrich (Poole, Dorsert, UK) with calibration curves with $R^2 \geq 0.999$. The results obtained are expressed in g 100 mL⁻¹.

2.6. Total Polyphenols and Antioxidant Activity

The antioxidant activity (AA) was studied using three different but widely used methodologies recognized in the bibliography, such as the 2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic] radical method (ABTS⁺), the 2,2'-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl radical method (DPPH[°]) and by reduction of the ferric ion (FRAP) by means of a UV-visible spectrophotometer (Hellos Gama 9423 Uvg 1002E model, Thermo Spectronic, Gloucester, UK) according

to the methodology described by Wojdyło et al. [15]. The results were expressed in mmol Trolox per liter of juice as the mean value of the triplicate repetitions. The total polyphenols content (TPC) was determined by means of the Folin-Ciocalteu colorimetric reagent as described by Singleton et al. [16]. Readings were made by spectrophotometry (HP 8451, Cambridge, UK) compared to the gallic acid calibration curve. Tests were carried out in triplicate and the results are presented as mg gallic acid equivalents (GAE) per 100 mL of juice.

2.7. Statistical Analysis

The significant differences of the data were evaluated by means of the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey's multiple range test for $p < 0.05$. Statistical analysis was performed with the Minitab Statistical Software 19 data analysis software.

3. Results

3.1. Fruit Quality Parameters

In most of the parameters studied, significant differences were observed between varieties and rootstocks (Table 2). The highest fruit weight (183.6 g) was obtained for the V-M lemons, while the lemons of "Verna" variety grafted on *C. aurantium* (V-A) showed the lowest values (100.1 g). In relation to the size of the fruits, the maximum and minimum values were 66.9 mm (V-M) and 55.0 mm (V-A) for equatorial diameter (ED) and 91.9 mm (F95-M) and 72.2 (V-A) for polar diameter (PD), respectively. In this way, considering the fruit weight (FW) and its size (ED), the varieties grafted on *C. macrophylla* showed the highest values compared to the varieties grafted on *C. aurantium* (V-M > F49-M > F95-M > F49-A > V-A). All the fruits presented a similar geometry regardless of the cultivar and/or rootstock with ED/PD values between 0.7 and 0.8, where the most elongated shape was observed only in F95-M (0.6). Despite the fact that all the lemons studied had a juice percentage > 31%, F95-M and F49-A had the highest percentages, 44.3% and 41.6%, respectively, while V-A had the lowest values (31.7%). The highest and lowest number of segments in the fruits were observed for F49-M (10.2) and V-A (8.8) respectively, while the rest of varieties presented values > 9 (F49-A > F95-M > V-M). Significant differences were observed in relation to the number of seeds contained in the lemons, with maximum values of 11.3 for F49-M and minimum values of 1.3 for F95-M.

Table 2. Morphological characterization of lemons ("Fino 95", "Fino 49" and "Verna") obtained in different rootstocks (*C. macrophylla* and *C. aurantium*), with emphasis on the weight fruit (FW), equatorial diameter of the fruit (ED), polar diameter of fruit (PD), Peel thickness (PT), Number of fruit segments (NSG), Number of seeds (NSD) and percentage of juice (PJ). The values represented are the mean.

Parameter	F95-M	F49-M	F49-A	V-M	V-A
FW (g)	144.9 b	169.6 b	138.1 a	183.6 a	100.1 c
ED (mm)	61.0 b	66.5 a	59.9 b	66.9 a	55.0 c
PD (mm)	91.9 a	86.4 ab	77.5 c	84.9 b	72.7 c
ED/PD	0.6 b	0.7 a	0.7 a	0.8 a	0.8 a
PT (mm)	5.8 ab	6.4 a	4.9 b	6.7 a	6.8 a
NSG	9.8 ab	10.2 ab	9.8 ab	9.3 a	8.8 b
NSD	1.3 c	5.0 bc	11.3 a	7.8 ab	2.6 c
PJ (%)	44.3 a	36.7 bc	41.6 ab	36.8 bc	31.7 c

The different letters within the rows indicate significant differences according to the Tukey test ($p < 0.05$).

3.2. Physical-Chemical Parameters of the Fruits

Both the colour of the peel and the juice of the different lemons were studied (Table 3). The luminosity (L^*) in the fruit peel ranged from 68.1 (V-A) to 64.3 (F95-M), but the differences were not significant between the three varieties grafted on *C. macrophylla* and *C. aurantium*. The F95-M lemons (3.9) were the only ones that presented red coloration (positive values of a^*), while for the other varieties/rootstock the coloration was green

(negative values of a^*) with the maximum and minimum for F49-A (−7.5) and VM (−2.6) respectively. The b^* values were statistically homogeneous in all the fruits, going from more to less yellow (positive values of b^*) F95-M > F49-A > F49-M > V-A > V-M. In the same line, the color index (CI) values did not show statistically significant differences between the samples, presenting values between −2.5 (F49-A) and 1.1 (F95-M), which corresponds to shades between yellow-green (more negative values) and pale yellow (values close to 0).

Table 3. Variations in the colour of the skin and the juice of lemons (“Fino 95”, “Fino 49” and “Verna”) obtained in different rootstocks (*C. macrophylla* and *C. aurantium*), where L^* represents the luminosity, a^* the green/red, b^* blue/yellow, C^* the chroma values, H° the hue angle and CI (color index) the citrus colour index. The values represented are the mean with their standard deviation in parentheses.

Parameter	F95-M	F49-M	F49-A	V-M	V-A
Colour of the peel					
L^*	64.3 (7.3) a	64.6 (5.5) a	65.9 (3.7) a	65.6 (4.5) a	68.1 (4.8) a
a^*	3.9 (4.6) a	−4.8 (3.1) b	−7.5 (2.0) b	−2.6 (3.7) a	−3.3 (2.7) b
b^*	48.5 (8.8) a	44.7 (4.7) a	47.2 (3.2) a	42.4 (4.8) a	44.4 (3.7) a
C^*	49.1 (7.5) a	45.1 (4.5) a	47.8 (3.0) a	42.7 (4.6) a	44.6 (3.6) a
H°	88.0 (21.1) a	96.5 (4.4) a	99.2 (2.7) a	93.9 (5.4) a	94.4 (3.6) a
CI	1.1 (1.4) a	−1.8 (1.4) a	−2.5 (0.8) a	−1.1 (1.5) a	−1.2 (1.0) a
Colour of the juice					
L^*	74.7 (1.2) a	75.1 (1.9) a	61.6 (6.5) b	56.9 (10.4) a	61.3 (9.0) a
a^*	4.8 (1.3) a	6.6 (2.4) a	−7.6 (2.6) a	−5.2 (2.7) a	−6.2 (3.0) a
b^*	59.4 (1.9) a	59.9 (1.4) a	43.8 (7.0) a	38.1 (12.6) a	44.0 (10.9) a
C^*	59.6 (2.0) c	60.3 (1.5) c	44.6 (6.8) c	38.6 (12.4) c	44.6 (10.7) c
H°	85.4 (1.1) a	83.7 (2.3) a	100.2 (3.5) a	99.0 (5.0) a	98.8 (4.5) a
CI	1.0 (0.2) a	1.5 (0.6) a	−3.0 (1.1) b	−3.1 (1.9) b	−2.7 (1.6) b

The different letters within the rows indicate significant differences according to the Tukey test ($p < 0.05$).

Likewise, the brightest juice (L^*) ranged from 75.1 to 56.9 for three cultivars grafted on *C. macrophylla* and *C. aurantium* rootstocks, but were not significantly different. The a^* values showed two different groups, on the one hand, F49-M (6.6) and F95-M (4.8) with positive values of a^* indicating reddish coloration, and on the other, F49-A (−7.6), VA (−6.20) and VM (−5.2) with greenish coloration indicated by the negative values of a^* .

All the juices presented yellowish coloration (positive b^* values) with F49-M > F95-M > F49-A > V-A > V-M from more to less yellow. In relation to the CI, V-M (−3.1), F49-A (−3.0), and V-A (−2.7) showed yellowish-green tones while the tone for F49-M (1.5) and F95-M (1.0) was pale yellow.

The varieties “Verna” and “Fino 49”, both with the *C. aurantium* rootstocks, presented the highest levels of total soluble solids contained in the juice (10.5° and 10.3 °Brix, respectively) while the lowest amount was for VM (8.4 °Brix). On the other hand, the cultivar “Fino 49” presented the highest TA values in both grafts, being 74.9 g citric acid L^{-1} for F49-A and 74.7 g citric acid L^{-1} for F49-M. The MI for all varieties/rootstocks studied was between 1.05 and 1.5 (Table 4).

Table 4. Variations of total soluble solids (TSS), titratable acidity (TA) and maturity index (MI) of lemons (“Fino 95”, “Fino 49” and “Verna”) obtained in different rootstocks (*C. macrophylla* and *C. aurantium*). The values represented are the mean with their standard deviation in parentheses.

Parameter	F95-M	F49-M	F49-A	V-M	V-A
TSS (°Brix)	9.1 (0) b	7.8 (0.1) c	10.3 (0.1) a	8.4 (0.4) b	10.5 (0.1) a
TA (g citric acid L^{-1})	67.6 (3.5) b	74.7 (6.8) b	74.9 (1.4) a	56.0 (0.5) c	68.3(3.9) b
MI	1.3 (0.07) a	1.05 (0.08) b	1.3 (0.04) a	1.5 (0.07) a	1.5 (0.08) a

The different letters within the rows indicate significant differences according to the Tukey test ($p < 0.05$).

3.3. Organic Acids and Sugars

Table 5 shows the content of sugars and organic acids of lemons obtained from the different variety/rootstock combinations studied. In all the fruits, glucose and fructose were identified as the main sugars, with values between 3.1 and 2.2 g 100 mL⁻¹ and 4.0 and 2.7 g 100 mL⁻¹ for glucose and fructose respectively.

Table 5. Variations of sugars (glucose and fructose) and organic acids (citric acid, malic acid, ascorbic acid and succinic acid) of lemons (“Fino 95”, “Fino 49” and “Verna”) obtained in different rootstocks (*C. macrophylla* and *C. aurantium*). The values represented are the mean with their standard deviation in parentheses.

Parameter	F95-M	F49-M	F49-A	V-M	V-A
Sugars					
Glucose (g 100 mL ⁻¹)	3.0 (0.1) ab	2.2 (0.3) b	2.8 (0.08) ab	2.9 (0.3) ab	3.1 (0.4) a
Fructose (g 100 mL ⁻¹)	4.0 (0.08) a	2.7 (0.5) b	3.9 (0.07) a	3.6 (0.4) ab	3.8 (0.5) a
Organic acids					
Citric acid (g 100 mL ⁻¹)	5.7 (0.02) a	5.6 (0.5) a	6.3 (0.09) a	5.8 (0.3) a	5.4 (0.4) a
Malic acid (g 100 mL ⁻¹)	0.8 (0.09) a	0.8 (0.1) a	0.9 (0.004) a	0.4 (0.09) b	0.5 (0.1) b
Ascorbic acid (g 100 mL ⁻¹)	0.08 (0.001) a	0.05 (0.01) b	0.05 (0.003) b	0.04 (0.01) b	0.05 (0.004) b
Succinic acid (g 100 mL ⁻¹)	1.03(0.06) ab	0.7 (0.1) b	0.9 (0.05) ab	0.8 (0.1) ab	1.4 (0.4) a

The different letters within the rows indicate significant differences according to the Tukey test ($p < 0.05$).

Regarding the organic acids, F49- no significant differences were observed for citric acid, while for malic acid, the differences were observed only between the varieties “Fino” and “Verna”. On the other hand, F95-M presented the maximal values for ascorbic acid (0.08 g 100 mL⁻¹) statistically significant when compared with the other combinations of variety/rootstock.

3.4. Total Polyphenol Content and Antioxidant Activity

The total polyphenols content was statistically homogeneous for all samples, that is, without significant differences between them, being that the maximum values were reported for VA (331.6 mg GAE 100 mL⁻¹) and the minimum for F49-M (226.4 mg GAE 100 mL⁻¹) (Table 6).

Table 6. Variations of the total content of polyphenols and the total antioxidant activity of lemons (“Fino 95”, “Fino 49” and “Verna”) obtained in different rootstocks (*C. macrophylla* and *C. aurantium*). The values represented are the mean with their standard deviation in parentheses.

Parameter	F95-M	F49-M	F49-A	V-M	V-A
TPC (mg GAE 100 mL ⁻¹)	240.0 (44.1) a	226.4 (16.8) a	307.2 (59.0) a	281.1 (23.9) a	331.6 (44.9) a
Total antioxidant activity					
ABTS ⁺ (mmol Trolox L ⁻¹)	2.8 (0.5) b	5.7 (0.3) a	6.5 (1.0) a	6.2 (1.0) a	6.4 (0.4) a
DPPH ⁺ (mmol Trolox L ⁻¹)	1.7 (0.8) ab	2.0 (0.3) ab	2.0 (0.56) ab	3.0 (0.5) a	1.2 (0.09) b
FRAP (mmol Trolox L ⁻¹)	1.4 (0.2) a	1.1 (0.09) a	1.4 (0.1) a	1.1 (0.08) a	1.3 (0.2) a

The different letters within the rows indicate significant differences according to the Tukey test ($p < 0.05$).

Regarding the total antioxidant activity, of the three different methodologies used for its determination, the FRAP method did not show statistically significant differences between the samples, with values between 1.4 mmol Trolox L⁻¹ (F95-M) and 1.1 mmol Trolox L⁻¹ (VM). For the ABTS⁺ methodology, the data were statistically homogeneous in the range of 5.7–6.5 mmol Trolox L⁻¹ for all samples except for F95-M (2.8 mmol Trolox L⁻¹) which presented significant differences among the others. Finally, the antioxidant activity obtained by the DPPH⁺ method showed statistically different values only between “Verna” variety grafted on the two studied rootstocks being 3.0 and 1.2 mmol Trolox L⁻¹ for V-M and V-A, respectively.

4. Discussion

The importance of appropriate rootstocks in the citrus fruits industry is well defined [5,17–20] but the results must be analysed with caution, since they undoubtedly establish and define the effects of rootstocks in different locations and for different commercial varieties of lemons, and may present significant variations between varieties, regions and growing conditions. However, the identification of the physicochemical and quality parameters of the lemons carried out in this study is adequate to evaluate and identify the potential differences/impacts of the variety/rootstock combinations studied, once the trees were grown under homogeneous conditions (climatic, cultivation, edaphic, nutritional, etc.) and the fruits came from the principal bloom. Note that the variations between the fruits of different blooms can be significant, despite being the same tree and the same agro-environmental conditions.

4.1. Fruit Quality Parameters

The size of the fruit is an important parameter for citrus producers, where, based on this parameter, producers decide whether the fruit will be supplied to the market for consumption as fresh products or will be destined to the manufacturing and/or processing industry. Small-sized fruits are mainly processed for juice, although they can be consumed fresh. Medium to large fruit is the one that generally presents the highest profitability in the market for fresh consumption [5]

In this study, all the lemons of the variety/rootstock combinations obtained, except V-A, can be considered medium/large fruits, the largest being those of the V-M combination. Similar results were reported in the bibliography, where the fruits of the “Verna” variety had larger sizes when grafted to *C. macrophylla* than to *C. aurantium* [6]. In relation to the quality parameters of the fruit, although the highest amounts of juice were obtained in F95-M, the little difference with F49-A, together with the lower thickness of the skin, as well as the more rounded shape of the fruit, point out F49-M as the most appropriate, in relation to its fresh consumption and/or as juice in the industry. It should be noted that the results, both in relation to the amount of juice and the thickness of the skin, obtained in this study are higher and lower, respectively, when compared to the bibliography [4,6,21]. All the combinations studied obtained a quantity of juice higher than the minimum content (20%) required by the legislation for their commercialization [22].

The F95-M and V-A varieties proved to be the most appropriate combinations to produce fruits with fewer seeds and segments, a characteristic that makes them more palatable for fresh consumption. Another relevant parameter in relation to the quality of the fruits is the peel thickness, not being commercially attractive the extremes values. Thus, thick-rind fruits generally show little juice yield, while thin-rind fruits are more vulnerable to breakage and disruption during transport and/or storage [19]. In this study, the results indicated the combinations F95-M and F49-A with the finest rind, 5.8 mm and 4.9 mm respectively, coinciding with the fruits with the highest juice yield (44.3% in F95-M and 41.6% in F49-A). In all cases, the values obtained for the thickness of the rind were higher than those obtained in “Fino” and “Verna” lemons grown in other rootstocks, such as Forner-Alcaide 5, Forner-Alcaide 13 and Forner-Alcaide 517 [10], indicating the influence of the rootstocks on the quality of the fruit obtained.

4.2. Physicochemical Parameters of the Fruits

The flavour and palatability of citrus is a function of the relative levels of TSS, acids, and the presence or absence of various aromatic or bitter components of the juice [23]. The concentration of soluble solids in lemon juice should not be ignored as an important parameter, although the fruit quality standards for lemons do not include a minimum requirement for this [22]. The amount of TSS of the fruits of the three varieties studied in *C. macrophylla* presented the highest values (F49-M > V-M > F95-M). However, in this study, the results obtained for TSS in the juices of all variety/rootstock combinations were higher than those defined in the specific bibliography, established between 6–7.5 °Brix for

the variety “Verna” [24] and between 6.5–9.2 °Brix for the variety “Fino” [21] possibly due to significant differences in edaphic and/or climatological conditions or even the influence of the rootstocks.

On the other hand, titratable acidity (TA) is used as an indicator of citrus juice quality and is also useful to determine the appropriate harvest time for production practices [25]. In this study, the TA values of the lemon juices “Fino 95”, “Fino 49” and “Verna” did not show significant differences between the grafts used, and for all variety/rootstocks combinations the values are shown within the expected range [26].

The external colouring of the fruit (colour of the peel) is generally associated with the internal quality (flavour and texture), which can become a decisive factor for the consumer and, therefore, its price in the market. The change in colour from green to yellow in lemon fruits is associated with alterations in the composition and concentration of pigments, mainly chlorophylls and carotenoids. When the air temperature falls below 13 °C, the degradation of chlorophylls begins at the same time as the synthesis of carotenoids starts, which are the compounds responsible for the yellow colour [27]. Based on the results (Table 3), the little or no influence of the rootstock on the final colour of the juice could be affirmed, since the values of a^* and H° were similar and did not present significant differences. These results are in agreement with those obtained by other authors who already indicated the limited influence of the rootstock on the colour of the fruits [4,28,29]. This parameter would be much more influenced by other factors, such as temperature, humidity, and solar incidence among others [27,29–31].

4.3. Organic Acids and Sugars

Total acidity is considered a relevant factor in the general quality of the juice, as well as in determining the moment of harvest [19]. In this study, four organic acids with direct influence on the acidity of lemons were identified: citric acid, malic acid, ascorbic acid, and succinic acid.

Despite being the main acid identified with percentages between 73% and 80% of the total organic acids, citric acid did not show significant differences between the variety/rootstock combinations studied. The results were superior when compared with those indicated for lemons of the varieties “Verna” and “Fino 49” obtained in different rootstocks Forner-Alcaide [10], although they were consistent when compared to other varieties of *Citrus limon* [32,33].

Malic acid, commonly present in some fruits such as apples, bananas, pears, and plums, has been identified in citrus fruits as a secondary acid substitute for citric acid [34]. In general, the content of malic acid identified for all the variety/rootstocks combinations studied was considerably higher than those identified for both other lemon varieties such as Eureka, which ranged between 0.17 and 0.26 g 100 mL⁻¹ [35], and for the same varieties obtained in a different rootstock [10], which provides the variety/rootstocks combinations studied a soft and acid flavour without impact on the taste in the mouth [36].

Ascorbic acid (vitamin C) presented concentrations between 490 and 840 mg L⁻¹ in F95-M and VM respectively, showing values considerably higher than those for “Fino” and “Verna” lemons [24,37] as well as other varieties [38,39]. However, despite the quantitative difference, the results obtained are shown in accordance with the bibliography, where higher values of L-ascorbic acid had already been reported in “Fino” lemons than in “Verna” lemons [24,26]. These variations may be related to the clone of the variety, the maturity of the fruits and the climatic and edaphic conditions of the crop. Nevertheless, can be also related to the differences derivate the different blooms of the trees, even be the same tree and under the same cultivation conditions. Ascorbic acid is used as an antioxidant to prevent the damage of free radicals and other reactive oxygen species [40], it influences many metabolic processes such as gene expression and cell division, defence reactions and intestinal absorption of iron among others [40–42], in addition to being an important antioxidant traditionally used in the food, pharmaceutical and/or cosmetic industry [43,44].

Therefore, identifying and quantifying varietal differences can be of great commercial and industrial interest.

Along the same lines as ascorbic acid, succinic acid or butanedioic acid, presents high commercial interest, since it can be used in the pharmaceutical industry (i.e., biostimulant and anticoagulant), food industry (i.e., antioxidant E363) and agriculture (i.e., growth regulators for plants and insecticide) among others [45,46]. In this sense, the identification of natural sources with high concentrations of succinic acid is important both from an industrial and economic point of view. In this study, significant differences were identified between the variety/rootstocks combinations studied, however, the succinic acid values obtained were considerably higher than those reported in other varieties [10,47] indicating its potential use in the industry as well as the influence of both the variety and the rootstock used to obtain the fruits.

In relation to the glucose and fructose concentrations identified in this study, results were observed in line with other investigations. Likewise, Aguilar et al. [10] reported similar concentrations of fructose and glucose, although slightly lower, for the varieties "Fino 49" and "Verna" obtained in different rootstocks Forner-Alcaide, confirming the influence of the rootstock on the content of sugars in the fruits. Albertini et al. [33] highlighted fructose as the predominant sugar in "non-acid" varieties of citrus fruits, while for acid varieties it would be glucose, confirming the results obtained in this study for all the variety/rootstocks combinations analysed.

Since the metabolism of sucrose is dependent on the enzymes β -fructosidase, for the synthesis of fructose, and α -glucosidase, for glucose [48], it could be stated that the varieties studied present a higher activity of β -fructosidase versus α -glucosidase, mainly in the fruits of F49-M and VA, where the highest fructose/glucose ratio (0.8) was obtained. This enzymatic predominance related to the content of fructose and glucose in the lemon fruits can be confirmed since other studies did not identify the direct impact of the rootstock on the sugar content but rather related it mainly to the harvest flowering [49]. However, for all the lemons studied, the fructose/glucose ratio, which varied between 0.71 and 0.80, did not reach the range of variation indicated by the European Fruit Juice Association, established between 0.95 and 1.3 [22]. These results reconfirm the influence of both the variety and the rootstock on the predominant sugar metabolic pathway, as proposed by Oustric et al. [50].

4.4. Total Polyphenol Content and Antioxidant Activity

Different investigations demonstrate the great variety of beneficial biological effects of phenolic compounds that include hepatoprotective, anti-inflammatory, anticancer and antibacterial actions among others [51–54], in addition to contributing to the sensory and organoleptic quality of fruits due to its influence on parameters such as colour, astringency and/or flavour. In our case, the total content of polyphenols was similar for the five variety/rootstock combinations studied with a range between 226.4 ± 44.1 to 331.6 ± 44.9 mg GAE 100 mL⁻¹. These values are lower than those reported for "Verna" and "Fino" obtained in Forner-Alcaide rootstocks [10] but higher than those reported for the Eureka variety [47]. Other studies indicate the influence of the method used for the juice extraction, as a possible reason for the variation in the total polyphenol content, since the peel of lemons has higher levels compared to the pulp and/or juice [55,56]. The higher content of phenolic compounds in the fruit peel may be related to the protective effect against degradation derived from the incidence of ultraviolet light, pathogens, and predators [57].

The antioxidant capacity determined by the FRAP, DPPH[°] and ABTS⁺ methods showed considerably lower results than those reported for both "Fino" and "Verna" determined during three consecutive seasons in fruits grown in an area close to that of this study [24,58], only "Fino 49" presented ABTS⁺ values significantly higher than those reported by González-Molina et al. [58] possibly due to the effect of environmental parameters such as irrigation, fertilization, temperature, complementary treatments for the management and/or control of pests, etc. In general, the antioxidant capacity for all the

studied Spanish variety/rootstock combinations was much higher than that obtained for different Italian and Chinese varieties [59,60], indicating the excellent antioxidant capacity of the variety/rootstock combinations analysed.

5. Conclusions

Morphological and biochemical characteristics of the fruits among the five variety/rootstock combinations studied were quite consistent and similar. The cultivar “Fino 49” stands out as opposed to “Verna”, and presented better physicochemical and compositional characteristics. In relation to the rootstock, the results indicated *C. aurantium* as the rootstock that presented the highest quality fruits (juice percentage, peel tightness, an appropriate size for fresh consumption, ascorbic and malic acid, fructose/glucose ratio). Based on the results obtained in this study, the relationship and/or influence existing between the variety/rootstocks combinations and the morpho chemical characteristics of the fruits can be confirmed in a limited way. It is difficult to clearly identify which is the degree of impact that corresponds to the root and which to the cultivar, in addition to considering the influence of environmental and/or cultivation conditions. However, thanks to this type of study, it is possible to determine and establish which variety/rootstocks combinations grown in a certain region may be more commercially interesting depending on their use (fresh consumption, juice, extract, etc.). Improvements in production, and therefore in the quality of the marketed fruits, can be developed considering the results obtained, providing scientific-technical advice on the maintenance and increase of the production of lemons.

Author Contributions: Conceptualization, M.G.A.-H., J.J.P.-P., and P.L.; formal analysis, D.N.-G.; funding acquisition, M.Á.F.-G.; investigation, M.G.A.-H. and M.Á.F.-G.; methodology, F.H. and P.L.; resources, M.Á.F.-G. and P.L.; Supervision, J.J.P.-P. and P.L.; validation, F.H. and P.L.; writing—original draft, D.N.-G.; writing—review & editing, D.N.-G., F.H., and P.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript

Funding: This research was funded by the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (RTI2018-098379-R-I00) and the Generalitat Valenciana.

Acknowledgments: M.G. Aguilar-Hernández work was supported by a scholarship from Fundación Carolina.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

ED	Equatorial diameter
PD	polar diameter
PT	peel thickness
FW	weight fruit
NSG	Number of fruit segments
NSD	Number of seeds
PJ	percentage of juice
CIE	<i>Commission Internationale de l'Éclairage</i>
CI	colour index
TA	titratable acidity
TSS	total soluble solids
MI	maturity index
HPLC	liquid chromatography
RID	refractive index detector
AA	antioxidant activity
ABTS ⁺	2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic] radical method
DPPH•	2,2'-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl radical method
TPC	total polyphenols content
AGE	gallic acid equivalents
ANOVA	analysis of variance

References

1. Miran, W.; Nawaz, M.; Jang, J.; Lee, D.S. Sustainable electricity generation by biodegradation of low-cost lemon peel biomass in a dual chamber microbial fuel cell. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2016**, *106*, 75–79. [CrossRef]
2. Tekgül, Y.; Baysal, T. Comparative evaluation of quality properties and volatile profiles of lemon peels subjected to different drying techniques. *J. Food Process. Eng.* **2018**, *41*, e12902. [CrossRef]
3. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Anuario de Estadística Agraria 2019. Available online: <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/2019/default.aspx?parte=3&capitulo=07&grupo=8> (accessed on 20 August 2020).
4. Perez-Perez, J.G.; Castillo, I.P.; Garcia-Lidon, A.; Botia, P.; Garcia-Sanchez, F. Fino lemon clones compared with the lemon varieties Eureka and Lisbon on two rootstocks in Murcia (Spain). *Sci. Hortic.* **2005**, *106*, 530–538. [CrossRef]
5. Dubey, A.K.; Sharma, R.M. Effect of rootstocks on tree growth, yield, quality and leaf mineral composition of lemon (*Citrus limon* (L.) Burm.). *Sci. Hortic.* **2016**, *200*, 131–136. [CrossRef]
6. Robles, J.M.; Botia, P.; Pérez-Pérez, J.G. Sour orange rootstock increases water productivity in deficit irrigated ‘Verna’ lemon trees compared with *Citrus macrophylla*. *Agric. Water Manag.* **2017**, *186*, 98–107. [CrossRef]
7. Abbate, L.; Panno, S.; Mercati, F.; Davino, S.; Fatta Del Bosco, S. Citrus rootstock breeding: Response of four allotetraploid somatic hybrids to Citrus tristeza virus induced infections. *Eur. J. Plant. Pathol.* **2019**, *153*, 837–847. [CrossRef]
8. Abdallah, H.; Elkashif, M.; Eljack, A.; Dafaallah, A. Growth performance of two lemon [*Citrus limon* (L.) Osbeck] cultivars budded on three rootstocks, Gezira State, Sudan. *Gezira J. Agric. Sci.* **2019**, *17*, 1–9.
9. Pérez-Jiménez, M.; Pérez-Tornero, O. Improved salt-tolerance in *Citrus macrophylla* mutant rootstocks. *Sci. Hortic.* **2020**, *259*, 108815. [CrossRef]
10. Aguilar-Hernández, M.G.; Sánchez-Rodríguez, L.; Hernández, F.; Forner-Giner, M.Á.; Pastor-Pérez, J.J.; Legua, P. Influence of New Citrus Rootstocks on Lemon Quality. *Agronomy* **2020**, *10*, 974. [CrossRef]
11. Moreno, P.; Ambrós, S.; Albiach-Martí, M.R.; Guerri, J.; Peña, L. Citrus tristeza virus: A pathogen that changed the course of the citrus industry. *Mol. Plant. Pathol.* **2008**, *9*, 251–268. [CrossRef]
12. Robertson, A.R. The CIE 1976 Color-Difference Formulae. *Color. Res. Appl.* **1977**, *2*, 7–11. [CrossRef]
13. Pauli, H. Proposed extension of the CIE recommendation on “Uniform color spaces, color difference equations, and metric color terms”. *J. Opt. Soc. Am.* **1976**, *66*, 866. [CrossRef]
14. Legua, P.; Bellver, R.; Forner, J.; Forner-Giner, M.A. Plant growth, yield and fruit quality of ‘Lane Late’ navel orange on four citrus rootstocks. *Spanish J. Agric. Res.* **2011**, *9*, 271–279. [CrossRef]
15. Wojdyło, A.; Oszmiański, J.; Bielicki, P. Polyphenolic composition, antioxidant activity, and polyphenol oxidase (PPO) activity of quince (*cydonia oblonga miller*) varieties. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 2762–2772. [CrossRef] [PubMed]
16. Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **1999**, *299*, 152–178. [CrossRef]
17. Cerda, A.; Nieves, M.; Guillen, M.G. Salt tolerance of lemon trees as affected by rootstock. *Irrig. Sci.* **1990**, *11*, 245–249. [CrossRef]
18. Gil-Izquierdo, A.; Riquelme, M.T.; Porrás, I.; Ferreres, F. Effect of the Rootstock and Interstock Grafted in Lemon Tree (*Citrus limon* (L.) Burm.) on the Flavonoid Content of Lemon Juice. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 324–331. [CrossRef] [PubMed]
19. Al-Jaleel, A.; Zekri, M.; Hammam, Y. Yield, fruit quality, and tree health of “Allen Eureka” lemon on seven rootstocks in Saudi Arabia. *Sci. Hortic.* **2005**, *105*, 457–465. [CrossRef]
20. Gimeno, V.; Syvertsen, J.P.; Nieves, M.; Simón, I.; Martínez, V.; García-Sánchez, F. Additional nitrogen fertilization affects salt tolerance of lemon trees on different rootstocks. *Sci. Hortic.* **2009**, *121*, 298–305. [CrossRef]
21. García-Sánchez, F.; Carvajal, M.; Porrás, I.; Botia, P.; Martínez, V. Effects of salinity and rate of irrigation on yield, fruit quality and mineral composition of “Fino 49” lemon. *Eur. J. Agron.* **2003**, *19*, 427–437. [CrossRef]
22. EU Commission implementing regulation (EU) n° 543/2011 of 7 June 2011 laying down detailed rules for the application of Council Regulation (EC) No 1234/2007 in respect of the fruit and vegetables and processed fruit and vegetables sectors. *Off. J. Eur. Union* **2011**. [CrossRef]
23. Frederick, D.; Larry, J. *Citrus Growing in Florida*, 5th ed.; University of Florida: Gainesville, FL, USA, 2009; ISBN 9780813034096.
24. González-Molina, E.; Moreno, D.A.; García-Viguera, C. Comparison of “Verna” lemon juice quality for new ingredients and food products. *Sci. Hortic.* **2009**, *120*, 353–359. [CrossRef]
25. Levy, Y. Use of the interaction between rootstock and old-line cultivars for dwarfing lemon trees. *Sci. Hortic.* **1989**, *37*, 317–323. [CrossRef]
26. Marín, F.R.; Martínez, M.; Uribealago, T.; Castillo, S.; Frutos, M.J. Changes in nutraceutical composition of lemon juices according to different industrial extraction systems. *Food Chem.* **2002**, *78*, 319–324. [CrossRef]
27. Manera, J.; Brotons, J.; Conesa, A.; Porrás, I. Relationship between air temperature and degreening of lemon (“*Citrus lemon*” L. Burm. f.) peel color during maturation. *Aust. J. Crop. Sci.* **2012**, *6*, 1051–1058.
28. Simon-Grao, S.; Simon, I.; Lidon, V.; Conesa, A.; Manera, J.; Brotons, J.M.; Martínez-Nicolas, J.J.; Garcia-Sanchez, F. Effects of shade screens and mulching on the color change of fruits from “Fino 49” lemon trees irrigated with water of different salinity or irrigation regimes. *Sci. Hortic.* **2016**, *209*, 316–322. [CrossRef]
29. Conesa, A.; Manera, F.C.; Brotons, J.M.; Fernandez-Zapata, J.C.; Simón, I.; Simón-Grao, S.; Alfosea-Simón, M.; Martínez Nicolás, J.J.; Valverde, J.M.; García-Sanchez, F. Changes in the content of chlorophylls and carotenoids in





- the rind of Fino 49 lemons during maturation and their relationship with parameters from the CIELAB color space. *Sci. Hortic.* **2019**, *243*, 252–260. [[CrossRef](#)]
30. García-Sánchez, F.; Simón, I.; Lidón, V.; Manera, F.J.; Simón-Grao, S.; Pérez-Pérez, J.G.; Gimeno, V. Shade screen increases the vegetative growth but not the production in “Fino 49” lemon trees grafted on *Citrus macrophylla* and *Citrus aurantium* L. *Sci. Hortic.* **2015**, *194*, 175–180. [[CrossRef](#)]
31. Lado, J.; Gambetta, G.; Zacarias, L. Key determinants of citrus fruit quality: Metabolites and main changes during maturation. *Sci. Hortic.* **2018**, *233*, 238–248. [[CrossRef](#)]
32. Karadeniz, F. Main Organic Acid Distribution of Authentic Citrus Juices in Turkey. *Turkish J. Agric. For.* **2004**, *28*, 267–271.
33. Albertini, M.V.; Carcouet, E.; Pailly, O.; Gambotti, C.; Luro, F.; Berti, L. Changes in organic acids and sugars during early stages of development of acidic and acidless citrus fruit. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 8335–8339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Perera, C.O.; Perera, A.D. Technology of processing of horticultural crops. In *Handbook of Farm, Dairy and Food Machinery Engineering*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 299–351.
35. Clements, R. Organic Acids in Citrus Fruits. I. Varietal Differences. *J. Food Sci.* **1964**, *29*, 276–280. [[CrossRef](#)]
36. Søltoft-Jensen, J.; Hansen, F. New chemical and biochemical hurdles. In *Emerging Technologies for Food Processing*; Elsevier Ltd.: Amsterdam, The Netherlands, 2005; pp. 387–416. ISBN 9780126767575.
37. Martí, N.; Mena, P.; Cánovas, J.A.; Micol, V.; Saura, D. Vitamin C and the Role of Citrus Juices as Functional Food. *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *4*. [[CrossRef](#)]
38. Bacharach, A.L.; Cook, P.M.; Smith, E.L. The ascorbic acid content of certain citrus fruits and some manufactured citrus products. *Biochem. J.* **1934**, *28*, 1038–1047. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Abbasi, A.; Niakousari, M. Kinetics of Ascorbic Acid Degradation in Un-Pasteurized Iranian Lemon Juice During Regular Storage Conditions. *Pak. J. Biol. Sci.* **2008**, *11*, 1365–1369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Walker, R.P.; Famiani, F. Organic acids in fruits. In *Horticultural Reviews*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2018; Volume 45, pp. 371–430.
41. Smirnoff, N. Vitamin C: The metabolism and functions of ascorbic acid in plants. In *Advances in Botanical Research*; Academic Press Inc.: Cambridge, MA, USA, 2011; Volume 59, pp. 107–177.
42. Varvara, M.; Bozzo, G.; Celano, G.; Disanto, C.; Pagliarone, C.N.; Celano, G.V. The use of ascorbic acid as a food additive: Technical-legal issues. *Ital. J. Food Saf.* **2016**, *5*, 7–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Hon, S.L. Vitamin C (Ascorbic Acid). In *Encyclopedia of Toxicology*, 3rd ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2014; pp. 962–963. ISBN 9780123864543.
44. Gyawali, R.; Zimmerman, T.; Aljaloud, S.O.; Ibrahim, S.A. Bactericidal activity of copper-ascorbic acid mixture against *Staphylococcus aureus* spp. *Food Control.* **2020**, *111*, 107062. [[CrossRef](#)]
45. Ponomarenko, S.P.; Borovikov, Y.Y.; Sivachek, T.E.; Vovk, D.N. Specific physicochemical properties of succinic acid. *Russ. J. Gen. Chem.* **2003**, *73*, 1769–1773. [[CrossRef](#)]
46. Anyasi, T.A.; Edokpayi, J.N.; Anokwuru, C. Application of organic acids in food preservation. In *Organic Acids—Characteristics, Properties and Synthesis*; Vargas, C., Ed.; Nova Publishers: New York, NY, USA, 2017.
47. Sun, Y.; Singh, Z.; Tokala, V.Y.; Heather, B. Harvest maturity stage and cold storage period influence lemon fruit quality. *Sci. Hortic.* **2019**, *249*, 322–328. [[CrossRef](#)]
48. Asencio, A.D.; Serrano, M.; García-Martínez, S.; Pretel, M.T. Organic acids, sugars, antioxidant activity, sensorial and other fruit characteristics of nine traditional Spanish Citrus fruits. *Eur. Food Res. Technol.* **2018**, *244*, 1497–1508. [[CrossRef](#)]
49. Morales, J.; Bermejo, A.; Navarro, P.; Salvador, A. Rootstock Effect on Physico-Chemical and Nutritional Quality of Mandarin ‘Clemenules’ during the Harvest Season. *Agronomy* **2020**, *10*, 1350. [[CrossRef](#)]
50. Oustric, J.; Antoine, S.; Giannettini, J.; Gibon, Y.; Luro, F.; Berti, L.; Santini, J. Biochemical characterization of the primary metabolism and antioxidant defense systems of acidic and acidless citrus genotypes during the major stages of fruit growth. *Acta Physiol. Plant.* **2015**, *37*, 228. [[CrossRef](#)]
51. Ejaz, S.; Ejaz, A.; Matsuda, K.; Lim, C.W. Limonoids as cancer chemopreventive agents. *J. Sci. Food Agric.* **2006**, *86*, 339–345. [[CrossRef](#)]
52. Tripoli, E.; La Guardia, M.; Giammanco, S.; Di Majo, D.; Giammanco, M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem.* **2007**, *104*, 466–479. [[CrossRef](#)]
53. Krishnaiah, D.; Sarbatly, R.; Bono, A. Phytochemical antioxidants for health and medicine—A move towards nature. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* **2007**, *1*, 97–104.
54. Patil, J.R.; Jayaprakasha, G.K.; Murthy, K.N.C.; Chetti, M.B.; Patil, B.S. Characterization of Citrus aurantifolia bioactive compounds and their inhibition of human pancreatic cancer cells through apoptosis. *Microchem. J.* **2010**, *94*, 108–117. [[CrossRef](#)]
55. Guimarães, R.; Barros, L.; Barreira, J.C.M.; Sousa, J.; Carvalho, A.M.; Ferreira, I.C.F.R. Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 99–106. [[CrossRef](#)]
56. Ramful, D.; Baborun, T.; Bourdon, E.; Tarnus, E.; Aruoma, O.I. Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flaveddo extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology* **2010**, *278*, 75–87. [[CrossRef](#)]
57. Ignat, I.; Volf, I.; Popa, V.I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* **2011**, *126*, 1821–1835. [[CrossRef](#)]

58. González-Molina, E.; Moreno, D.A.; García-Viguera, C. Genotype and harvest time influence the phytochemical quality of fino lemon juice (*Citrus limon* (L.) Burm. F.) for industrial use. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 1669–1675. [[CrossRef](#)]
59. Chen; Wang; Tan; Hu; Sundararajan; Zhou Profiling of Flavonoid and Antioxidant Activity of Fruit Tissues from 27 Chinese Local Citrus Cultivars. *Plants* **2020**, *9*, 196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Di Matteo, A.; Di Rauso Simeone, G.; Cirillo, A.; Rao, M.A.; Di Vaio, C. Morphological characteristics, ascorbic acid and antioxidant activity during fruit ripening of four lemon (*Citrus limon* (L.) Burm. F.) cultivars. *Sci. Hortic.* **2021**, *276*, 109741. [[CrossRef](#)]



Article

Determination of the Volatile Profile of Lemon Peel Oils as Affected by Rootstock

Marlene G. Aguilar-Hernández¹, Paola Sánchez-Bravo² , Francisca Hernández^{3,*} ,
Ángel A. Carbonell-Barrachina² , Joaquín J. Pastor-Pérez⁴ and Pilar Legua³ 

¹ Departamento de Horticultura, Universidad Nacional Agraria La Molina, Av. La Molina s/n, Lima 15026, Peru; maguilarhe@lamolina.edu.pe

² Departamento Tecnología Agroalimentaria, Grupo Calidad y Seguridad Alimentaria, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Universidad Miguel Hernández de Elche, Carretera de Beniel, Km 3.2, 03312 Orihuela, Spain; paola.sb94@gmail.com (P.S.-B.); angel.carbonell@umh.es (Á.A.C.-B.)

³ Departamento de Producción Vegetal y Microbiología, Grupo Producción Vegetal, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Universidad Miguel Hernández de Elche, Carretera de Beniel, km 3.2, 03312 Orihuela, Spain; p.legua@umh.es

⁴ Departamento de Ingeniería Agroforestal, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Universidad Miguel Hernández de Elche, Carretera de Beniel, km 3.2, 03312 Orihuela, Spain; jjpastor@umh.es

* Correspondence: francisca.hernandez@umh.es; Tel.: +34-966-749-702

Received: 24 January 2020; Accepted: 18 February 2020; Published: 24 February 2020



Abstract: *Citrus limon* (L.) Burm is an important crop that grows between latitudes 30° North and 30° South, the main producers being China, the USA, Mexico, India, Brazil, and Spain. In Spain, lemon grows mainly in Mediterranean areas such as Murcia, Valencia, and Andalucía. The most cultivated varieties are “Fino” and “Verna”. In this study, five varieties of lemon, “Verna”, “Bétera”, “Eureka”, “Fino 49”, and “Fino 95” were evaluated on different rootstocks: three new Forner-Alcaide (“FA13”, “FA5”, “FA517”), *Citrus macrophylla*, Wester, and *Citrus aurantium* L. Hydrodistillation was used to obtain essential oil from fresh peels and then the volatile profile was studied by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). A total of 26 volatile compounds were identified, limonene being the main one followed by β -pinene, γ -terpinene, sabinene, and α -pinene. The results revealed that Forner-Alcaide rootstocks (“FA5” > “FA517” > “FA13”) proved to be the best rootstocks for the aroma quality as they led to high volatile contents, followed by *C. aurantium* and *C. macrophylla*. Among the other varieties, the most aromatic one was “Eureka”. The whole trend was as follows (in decreasing order): “Eureka” > “Bétera” > “Fino 95” > “Verna” > “Fino 49”.

Keywords: aroma composition; *Citrus limon* (L.); concentrations—monoterpene; GC-MS; limonene; sesquiterpenes; aldehydes

1. Introduction

Lemon is an important crop that grows in different parts of the world. The main lemon producers are in China, the United States, Mexico, India, Brazil, and Spain [1]. In Spain, it grows mainly in the Mediterranean areas of Murcia, Valencia, and Andalucía, which represent the highest productions [2]. These high productions are associated with selected, suitable, and compatible rootstocks [3]. Moreover, the use of rootstock influences quantitative and qualitative characteristics of agronomic variables which improve size, color, soluble solids, acidity, yield, and quality of the fruit [4–6].

Selecting the proper rootstock is decisive in order to succeed in a commercial citrus fruit plantation [4]. Fruit quality is currently valued, in addition to visual attributes (e.g., size, color), including chemical properties such as contents of vitamins, minerals, carotenoids, phenols, and volatile compounds [7]. The organic compounds are associated with the fruit aroma and are present in

peel, flowers, leaves, and juice [8]. In citrus species, the main quality characteristic is the aroma [9]. The quality of the lemon is highly influenced by the rootstock [10]. Several factors may modify the volatile profile of the lemon, including factors such as rootstock and variety [11–13]. Among these factors we can include environment, soil fertility, the content of beneficial microorganisms, the state of immaturity (green color), and unpeeled vs. peeled fruit juice [14–17]. Additionally, the volatile fraction may be altered by analytical method, sampling, and equipment used [18,19].

Throughout the world, citrus flavors are some of the most important flavors in the global market [20]. In this sense, fresh lemon peel can be used to obtain volatile compounds which give the characteristic citrus aroma and flavor [21,22]. For this, many citrus cultivars have been analyzed to identify their volatile profile [20]. Several authors have studied the volatile profile of the oil from the lemon peel [22–24], but information on how the rootstock influences the odorous compounds is very limited.

Thus, the purpose of this study was to identify and quantify the volatile profile of five varieties of lemon grafted on five rootstocks and analyze the influence that the rootstock–graft interaction can have on the volatile profile of lemons.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Materials

Fruits were collected from 10-year-old, healthy trees, cultivated under the same pedoclimatic and cultural conditions. The climate was characterized by mild winters and slightly hot summers, temperatures ranging between 26 and 17 °C, and light rains concentrated in spring and autumn. Soil characteristics were as follows: sandy loam texture, 40% calcium carbonate, 8% active calcium, and pH = 8. The field was located at the IVIA (*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias*) Experimental Station in Elche (latitude 38°14'56" N, longitude 0°41'35.95" E, altitude 149 m above sea level).

The selected varieties of *Citrus limon* used in this study were “Betera”, “Verna”, “Fino 49”, “Fino 95”, and “Eureka”; grafted on to the rootstocks Forner-Alcaide N°5 (“FA5”), Forner-Alcaide N°13 (“FA13”), Forner-Alcaide N°517 (“FA517”), *C. macrophylla* West, and *C. aurantium* L. The progenitors of hybrids Forner-Alcaide N°5 (“FA5”) and Forner-Alcaide N°13 (“FA13”) were “Cleopatra” mandarin × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., both characterized as being resistant to salinity and tolerant to waterlogging. Forner-Alcaide N°517 (“King” (mandarin) × *P. trifoliata*) is distinguished by its tolerance to limestone and its dwarfing character. All of them reside in the European Union (BOE/04/12/2007) and were obtained by targeted hybridizations by Forner in IVIA (Valencia) [25].

Twenty-five plots (a combination of variety and rootstock) were used for this study, with a completely randomized factorial design. Each plot was composed of six trees spaced at 6 m × 2.5 m.

Twenty lemons from each tree in each plot were collected. Next, the lemons were manually peeled with a peeler (no albedo was collected). Subsequently, the lemon peels were crushed with a grinder (Delhi model 180 W; Moulinex, Alençon, France) for 3 min and kept at −20 °C until analysis.

2.2. Determination of Volatile Compounds

For the determination of the volatile compounds, the essential oil was extracted using the protocol described by El-Zaeddi et al. [26] with slight modifications. Hydrodistillation (HD) using a Deryng system was used for isolating the essential oil in the lemons. Sixty grams of crushed lemon skin was placed in a 500 mL round-bottom flask with 200 mL of distilled water and 200 µL of isoamyl acetate, which was used as an internal standard. Once the mixture was boiling for 5 min, 2 mL of the essential oil was collected in a vial of 2.5 mL and maintained in refrigerated storage (4 °C) until the gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analyses were conducted. All the samples were extracted in triplicate.

Volatile compounds were analyzed and identified using a Shimadzu GC-17A gas chromatograph coupled to a Shimadzu QP-5050A mass-spectrometry detector (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). The GC-MS system was equipped with a Supelco (Supelco, Inc., Bellefonte, PA, USA) SLB-5 MS column

(fused silica) 30 m × 0.25 mm, with a film thickness of 0.25 µm. The carrier gas used for this analysis was helium kept at a column flow rate of 0.6 mL min⁻¹ and a total flow of 181.2 mL min⁻¹ in a split ratio of 1:300. The program started with an increase of 3 °C min⁻¹ from 80 to 170 °C. Afterwards, the temperature was increased at 25 °C·min⁻¹ to 300 °C, maintaining this final temperature for 1 min. The temperature of the detector was 300 °C, and it was 230 °C for the injector.

Three methods were used to identify volatile compounds: (1) retention rates and their comparison with those in the literature; (2) retention times of pure chemical compounds; (3) mass spectra of authentic chemical compounds and the spectral library of the National Institute of Standards and Technology (NIST) database. In this study, only fully identified compounds have been described. The analysis of the volatile composition was run in triplicate for each extraction and the results were expressed as the concentration of each of the volatile compounds as well as the concentration of the main chemical families of compounds.

2.3. Statistical Analysis

Two-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple range test were performed to compare experimental data and to determine significant differences among varieties and rootstock ($p < 0.05$). Principal component analysis (PCA) using Pearson correlation was also run. The software XLSTAT (Addinsoft 2016.02.270444 version, Paris, France) was used.

3. Results and Discussion

3.1. Identification of Volatile Compounds in Lemon Peels

Twenty-six volatile compounds in the lemon peel oils were identified by GC-MS (Table 1). These compounds can be grouped into four main chemical families: (i) monoterpenes (20 compounds); (ii) sesquiterpenes (3 compounds); (iii) aldehydes (2 compounds), and (iv) esters (1 compound). Moreover, Table 1 shows the main sensory descriptors of each of the volatiles identified in the lemon peel oils.

Table 1. Retention indexes of the volatile compounds by GC-MS in lemon peel oils.

Compound	Chemical Family	Odor Properties	RT † (min)	KI (Exp.) ‡	KI (Lit.) *	
1	α-Thujene	Wood, green, herb *	5.09	930	933	
2	α-Pinene	Pine, turpentine *	5.28	939	944	
3	Camphene	Camphor *	5.64	969	964	
4	Sabinene	Pepper, turpentine, wood *	6.03	983	977	
5	β-Pinene	Pine, resin, turpentine *	6.21	990	990	
6	Octanal	Aldehyde	Strong and fruity smell ☉	6.62	1004	1001
7	α-Phellandrene	Monoterpene	Turpentine, mint, spice *	6.78	1010	1003
8	α-Terpinene	Monoterpene	Lemon *	7.04	1019	1018
9	p-Cymene	Monoterpene	Woody and spicy ✖	7.25	1027	1026
10	Limonene	Monoterpene	Lemon, orange *	7.44	1034	1031
11	γ-Terpinene	Monoterpene	Gasoline, turpentine *	8.15	1059	1062
12	cis-Sabinene-hydrate	Monoterpene	Herbal *	8.64	1076	1074
13	Terpinolene	Monoterpene	Herbal *	8.99	1089	1089
14	Linalool	Monoterpene	Flower, lavender *	9.39	1103	1098
15	Nonanal	Aldehyde	Rancid ✖	9.51	1106	1102
16	Citronellal	Monoterpene	Fat *	11.17	1152	1165
17	Terpineol-4	Monoterpene	Peppery, woody, sweet, musty *	12.46	1189	1184
18	α-Terpineol	Monoterpene	Oil, anise, mint *	13.02	1204	1197
19	Nerol	Monoterpene	Sweet *	14.11	1231	1228
20	Neral	Monoterpene	Lemon *	14.63	1244	1239
21	Geraniol	Monoterpene	Rose geranium *	15.16	1257	1255
22	Geranial	Monoterpene	Lemon, mint *	15.82	1273	1277
23	Neryl acetate	Ester	Fruit *	19.43	1360	1366
24	trans-Caryophyllene	Sesquiterpene	Wood and spicy ±	22.18	1425	1420
25	trans-α-Bergamotene	Sesquiterpene	Wood *	22.59	1435	1437
26	β-Bisabolene	Sesquiterpene	Balsamic *	25.68	1509	1509

† RT = retention time, ‡ KI (Exp.) = experimental Kovats indexes, * KI (Lit.) = literature Kovats indexes; * Tekgül and Baysal [23]; ☉ Lewis and Wiley [27]; ✖ Bravo et al. [28]; ± Pino et al. [29].

3.2. Effects of Rootstock/Scion Combination in the Profile Volatile Compounds

Table 2 shows the concentration of the 26 compounds, expressed in $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, identified and quantified in lemon peel oils. The order from the highest to lowest concentration was: limonene, β -pinene, γ -terpinene, sabinene, α -pinene, geranial, neral, α -thujene, β -bisabolene, terpinolene, *trans*- α -bergamotene, α -terpineol, α -terpinene, neryl acetate, linalool, *p*-cymene, citronellal, *trans*-caryophyllene, terpineol-4, nerol, camphene, nonanal, geraniol, octylaldehyde, α -phellandrene, and *cis*-sabinene-hydrate. These results agreed with those previously obtained by Gonzalez-Mas et al. [30], Liu et al. [31], Cano-Lamadrid et al. [32], and Tekgül and Baysal [23].

The volatile profile of the five varieties of lemon studied was dominated by only five monoterpene hydrocarbon compounds (in decreasing order): limonene, β -pinene, γ -terpinene, sabinene, and α -pinene (Table 2). The most abundant volatile compound found in all varieties was limonene, and this volatile compound ranged from $19.76 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ("Verna") to $22.71 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ("Eureka"). Limonene was followed by β -pinene, the content of which ranged from $3.75 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ("Fino 95") to $5.01 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ("Verna"), γ -terpinene from $3.22 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ("Fino 49") to $3.84 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ("Verna"), sabinene from $0.61 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ("Fino 95") to $0.85 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ("Verna"), and α -pinene from $0.64 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ("Fino 95") to $0.79 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ("Verna"). Among the varieties, the highest concentration of total volatile compounds was found (in decreasing order) in "Eureka", followed by "Bétera" > "Fino 95" > "Verna" > "Fino 49". The essential oil composition of the current five varieties of lemon was similar to that reported by Di Vaio et al. [33], who analyzed the peel of 18 lemon cultivars, and by Lota et al. [34] who analyzed the peel and leaf essential oils of 15 species of mandarins. Another 15 monoterpene hydrocarbons which had not been previously identified in lemon peel were also identified and quantified, but at lower contents ($<0.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Di Vaio et al. [33] only identified 5 monoterpene in 18 lemon cultivars studied compared with the 20 monoterpenes identified in the present study. These differences may be due to the extraction methods, among other factors. Lu et al. [19] showed that differences in the presence or absence of volatile compounds depend on the oil distillation process; there is a greater presence of oxygenated compounds when hydrodistilled and a higher concentration of terpene compounds when pressed cold.

The results showed that rootstock strongly affected the total volatile contents (Table 2). The rootstocks of the Forner-Alcaide series ("FA517", "FA13", and "FA 5") showed the highest values of limonene and γ -terpinene ($>22 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ and $>3.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively), while the lowest values were in *C. macrophylla* and *C. aurantium*. In general, the series Forner-Alcaide rootstocks induced a greater content of all the volatile compounds identified compared to the traditional *C. aurantium* and *C. macrophylla* rootstocks. The reason for these differences among the rootstock of the Forner-Alcaide series and the *C. aurantium* and *C. macrophylla* rootstock might be to do with the specific rootstock/scion combinations which affect citrus fruit aroma volatiles levels, and these qualities may be governed by the level of rootstock/scion compatibility, which obviously affects the translocation of water, nutrients, plant growth regulators, and photosynthetic assimilates through the graft union.

The sesquiterpenes were the second most abundant chemical group in the lemon peel (Table 2). Only three compounds were identified (in decreasing order): β -bisabolene, *trans*- α -bergamotene, and *trans*-caryophyllene. Furthermore, the rootstocks of the Forner-Alcaide series showed the highest content for these three sesquiterpenes, while the *C. macrophylla* and *C. aurantium* had the lowest.

Two aldehyde compounds were identified: nonanal and octanal. The aldehyde concentrations were in the range of 14.7 to $28.9 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ in the varieties grafted on "FA 517" and *C. macrophylla* respectively for nonanal, and ranged between $10.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ to $19 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ in the varieties grafted on *C. aurantium* and "FA 5" respectively for octanal (Table 2).

Finally, regarding the esters, only one compound was identified: neryl acetate. No significant differences were observed in either the variety or the rootstock (Table 2).

Table 2. Concentrations (mg·kg⁻¹) of volatile compounds in lemon peel oils.

Compound	ANOVA †										Rootstock			
	V	R	V*R	Verna	Betera	Eureka	Fino 49	Fino 95	FA 5	FA 13	FA 517	C. macrophylla	C. aurantium	
α-Thujene	***	***	***	195.1 a †	188.0 ab	170.0 bc	156.2 c	120.8 d	187.9 a	179.5 a	180.0 a	140.4 b	142.4 b	
α-Pinene	***	***	***	797.3 a	765.8 ab	735.5 ab	704.8 b	648.5 b	798.1 a	743.8 ab	743.2 ab	685.5 b	681.2 b	
Camphene	***	***	***	24.8 a	20.9 b	20.9 b	20.1 b	13.1 c	22.8 a	21.2 ab	18.9 b	21.4 ab	15.4 c	
Sabinene	***	***	***	853.0 a	758.8 b	721.9 bc	730.3 bc	611.8 c	802.6 a	734.8 abc	691.9 bc	785.9 ab	660.5 c	
β-Pinene	***	***	***	501.1 a	4390 b	4417 b	4327 b	3757 b	4870 a	4451 abc	4193 bc	4501 ab	3888 c	
Octanal	***	***	***	20.9 a	18.8 a	10.2 b	18.5 a	9.9 b	16.2 a	17.6 a	15.1 ab	19.0 a	10.2 b	
α-Phellandrene	***	***	***	15.5 a	15.2 ab	14.6 ab	14.3 ab	11.7 b	16.0 a	15.4 a	15.9 a	12.3 b	11.7 b	
α-Terpinene	***	***	***	101.0 a	98.1 ab	86.6 ab	87.1 ab	81.6 b	101.9 a	101.8 a	99.2 a	73.6 b	77.9 b	
p-Cymene	NS	NS	NS	88.1	80.0	88.5	86.6	55.8	85.6	92.0	72.9	79.6	68.9	
Limonene	***	***	***	19,760 c	21,140 b	22,716 a	20,398 bc	22,107 ab	22,248 a	22,189 a	22,726 a	18,604 c	20,354 b	
γ-Terpinene	***	***	***	3849 a	3786 a	3439 ab	3226 b	3299 ab	3967 a	3807 a	3882 a	2770 b	3172 b	
cis-Sabinene-hydrate	***	NS	***	15.3 a	9.0 b	7.7 b	6.0 b	3.8 b	6.2	6.2	7.4	11.0	11.0	
Terpinolene	***	NS	***	167.8 a	166.2 a	151.5 ab	142.3 b	145.2 ab	175.5 a	167.6 a	171.2 a	119.9 b	138.8 b	
Linalool	NS	NS	***	80.2	80.2	76.3	89.8	74.7	87.0	85.1	85.0	74.2	69.9	
Nonanal	NS	**	***	21.1	21.4	17.8	23.9	14.8	19.0 ab	19.1 ab	14.7 b	28.9 a	17.4 b	
Citronella	NS	***	***	74.1	76.7	68.3	68.5	60.0	85.3 a	77.2 a	85.4 a	49.7 b	50.0 b	
Terpineol-4	*	NS	***	55.0 a	52.7 a	45.0 a	52.3 a	28.3 b	50.7	57.1	46.7	46.7	32.1	
α-Terpineol	**	NS	***	141.5 a	141.7 a	116.8 ab	135.0 a	60.6 b	113.1	118.4	110.7	143.2	110.3	
Nerol	NS	NS	**	38.4	38.0	33.4	51.1	22.3	42.6	44.5	37.5	40.3	18.3	
Neral	NS	*	**	265.3	258.0	220.5	329.1	251.5	289.0 ab	317.0 a	287.3 ab	237.4 ab	193.5 b	
Geranial	NS	NS	**	15.6	11.4	13.5	24.2	9.2	21.0 a	21.2 ab	14.5 ab	12.4 ab	3.8 b	
Geranial	NS	NS	**	265.5	263.7	210.0	341.4	256.2	294.0	325.2	291.7	241.8	184.2	
Neryl acetate	NS	NS	***	107.8	92.3	122.2	86.1	59.9	99.5	82.7	89.4	92.5	104.1	
trans-Caryophyllene	***	***	***	64.8 ab	61.4 ab	75.8 a	55.2 b	46.9 b	61.5 ab	54.0 b	71.2 a	49.3 b	68.0 ab	
trans-α-Bergamotene	***	***	***	139.0 b	142.5 ab	168.2 a	133.1 b	124.0 b	150.2 ab	138.3 bc	162.0 a	117.5 c	138.8 abc	
β-Bisabolene	NS	***	***	170.8	174.6	203.9	167.1	156.1	185.1 a	171.9 ab	197.0 a	142.4 b	176.1 ab	
Total	NS	***	***	32,338	32,851	33,950	31,473	32,029	34,796 a	34,037 a	34,310 a	29,100 b	30,399 b	

† NS = non-significant F ratio ($p < 0.05$); * ** and *** significant at $p < 0.05$, 0.01, and 0.001, respectively. ‡ Values followed by the same letter within the same row were not significantly different ($p < 0.05$) according to Tukey's least significant difference test ($n = 9$).

In this study, we examined the effects of five rootstocks, three new in the Forner-Alcaide series, and two commercially important rootstocks (i.e., *C. aurantium* and *C. macrophylla*) on volatile compounds in the lemon peel oils of five varieties. The results indicate that the effect of rootstock on the volatile compounds is a rather complex phenomenon that greatly depends on specific interactions between the rootstock and each particular scion variety. Our results agreed with those reported by Benjamin et al. [4] in varieties of mandarin, Seher et al. [35] in the fruits of peach, and Wang et al. [13] in grapefruit and in pistachio [36] as they all noted that rootstock affected the concentration and the ability of volatiles. This could be explained by the fact that rootstock generally affects the uptake of water and minerals due to the roots of rootstock or the compatibility of graft and canopy [37].

3.3. Principal Component Analysis

3.3. Principal Component Analysis

To better understand the relationships among the volatile compounds found (26 volatile compounds) in the different samples (varieties and rootstocks), principal component analyses (PCAs) were applied to the experimental results (Figures 1 and 2). The PCA of the rootstocks (Figure 1) explained 92.05% of the variables in two axes, F1 (59.98%) and F2 (32.07%). Thanks to this statistical technique, it was very easy to observe that the *C. macrophylla* and *C. aurantium* rootstocks were isolated from the rest of the rootstocks, and were therefore characterized by volatile compounds such as nonanal and α -terpineol for *C. macrophylla* and *neryl acetate* in the case of *C. aurantium*. Of the rootstocks “FA517”, “FA5” and “FA13” were linked to a higher number of volatile compounds, perhaps because genetically these rootstocks have a common parent and are characteristically smaller trees [25].

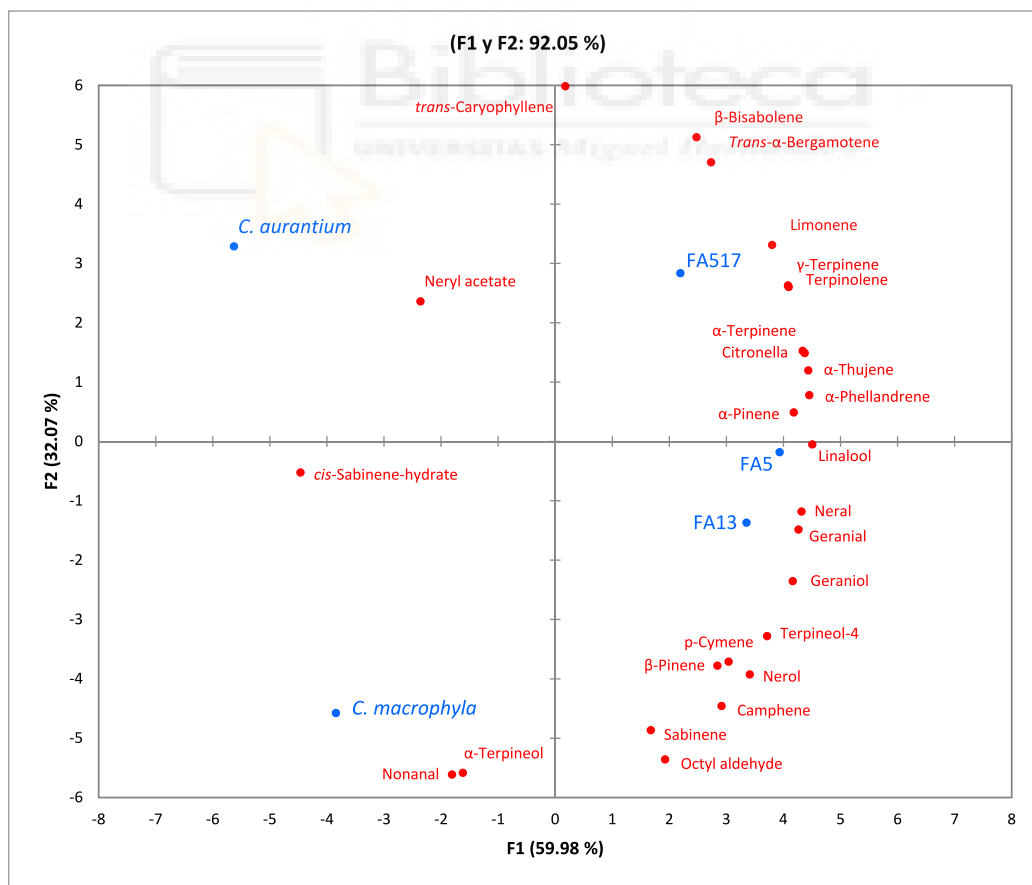


Figure 1. Principal component analysis (PCA) plot showing the relationships among volatile compounds and the factor “rootstock” (n = 9).

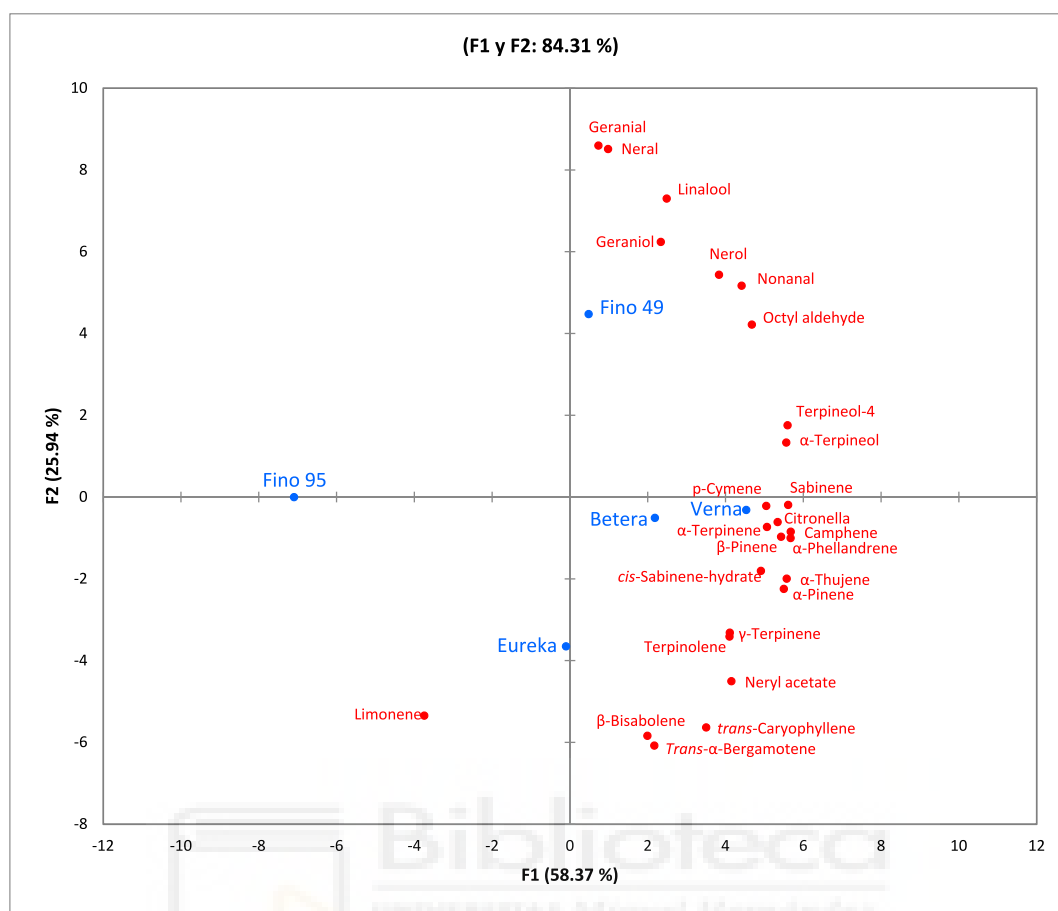


Figure 2. Principal component analysis (PCA) plot showing the relationship among volatile compounds and the factor “variety” ($n = 9$).

On the other hand, the PCA of the varieties (Figure 2) explained 84.31% of the variables in the F1 (58.37%) and F2 (25.94%) axes. This indicated that varieties such as “Betera”, “Verna”, and even “Eureka” had very similar aromatic profiles, while varieties such as “Fino 95” and “Fino 49” were isolated.

4. Conclusions

In this study, five rootstocks (three Forner-Alcaide rootstocks and two traditional *C. macrophylla* and *C. aurantium* rootstocks) were evaluated to study the effect on volatile composition of five commercial lemon varieties: “Bétera”, “Verna”, “Eureka”, “Fino 49”, and “Fino 95”. A total of 26 aromatic compounds were identified and quantified by GC-MS in lemon peel oils. Of all the aroma compounds identified in lemon peel oils, five monoterpene hydrocarbons (limonene, β -pinene, γ -terpinene, sabinene, and α -pinene) were present at the highest levels, followed by sesquiterpenes, aldehydes, and esters. The present experimental results demonstrate that Forner-Alcaide rootstocks (“FA5” > “FA517” > “FA13”) were the best rootstocks, leading to high content of volatile compounds, followed by *C. aurantium* and *C. macrophylla*. The order of total volatile contents was (in decreasing order): “Eureka” > “Bétera” > “Fino 95” > “Verna” > “Fino 49”. These results confirm that a strong relationship exists between the rootstock/scion combinations and the concentration of volatile compounds in the lemon peel oil. Aroma volatiles should be considered key parameters for the determination of rootstock-induced effects.

Author Contributions: M.G.A.-H. and P.S.-B. performed the experiments and wrote the manuscript; M.G.A.-H. and J.J.P.-P. analyzed the data; Á.A.C.-B. coordinated the study; F.H. and P.L. planned and designed the experiments. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. FAO/STAT. Production Lemons World's. Available online: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> (accessed on 24 September 2019).
2. Pérez, A. Tonnes of Lemons Produced in Spain in 2018; Autonomous Community. Available online: <https://es.statista.com/estadisticas/508962/producciones-de-limones-en-espana-por-comunidad-autonoma/> (accessed on 24 September 2019).
3. Dubey, A.; Sharma, R. Effect of rootstocks on tree growth, yield, quality and leaf mineral composition of lemon (*Citrus limon* (L.) Burm.). *Sci. Hortic.* **2016**, *200*, 131–136. [[CrossRef](#)]
4. Benjamin, G.; Tietel, Z.; Porat, R. Effects of rootstock/scion combinations on the flavor of citrus fruit. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 11286–11294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lordan, J.; Fazio, G.; Francescato, P.; Robinson, T.L., II. Horticultural performance of 'Honeycrisp' grown on a genetically diverse set of rootstocks under Western New York climatic conditions. *Sci. Hortic.* **2019**, *257*, 108686. [[CrossRef](#)]
6. Continella, A.; Pannitteri, C.; La Malfa, S.; Legua, P.; Distefano, G.; Nicolosi, E.; Gentile, A. Influence of different rootstocks on yield precocity and fruit quality of 'Tarocco Scirè' pigmented sweet orange. *Sci. Hortic.* **2018**, *230*, 62–67. [[CrossRef](#)]
7. González-Molina, E.; Domínguez-Perles, R.; Moreno, D.A.; Garcia-Viguera, C. Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *51*, 327–345. [[CrossRef](#)]
8. Molyneux, R.J.; Schieberle, P. Compound identification: a journal of agricultural and food chemistry perspective. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4625–4629. [[CrossRef](#)]
9. González-Mas, M.C.; Rambla, J.L.; López-Gresa, M.P.; Blázquez, M.A.; Granell, A. Volatile compounds in citrus essential oils: A comprehensive review. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 12. [[CrossRef](#)]
10. Legua, P.; Martínez-Cuenca, M.R.; Bellver, R.; Forner-Giner, M.Á. Rootstock's and scion's impact on lemon quality in southeast Spain. *Int. Agrophys.* **2018**, *32*, 325–333. [[CrossRef](#)]
11. Lado, J.; Gambetta, G.; Zacarias, L. Key determinants of citrus fruit quality: metabolites and main changes during maturation. *Sci. Hortic.* **2018**, *233*, 238–248. [[CrossRef](#)]
12. Wang, Y.; Chen, W.-K.; Gao, X.-T.; He, L.; Yang, X.-H.; He, F.; Duan, C.-Q.; Wang, J. Rootstock-Mediated Effects on cabernet sauvignon performance: vine growth, berry ripening, flavonoids, and aromatic profiles. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 401. [[CrossRef](#)]
13. Gamboa, G.G.; Garde-Cerdán, T.; Carrasco-Quiroz, M.; Del Alamo-Sanza, M.; Moreno-Simunovic, Y.; Pérez-Álvarez, E.P.; Gil, A.M. Volatile composition of Carignan noir wines from ungrafted and grafted onto País (*Vitis vinifera* L.) grapevines from ten wine-growing sites in Maule Valley, Chile. *J. Sci. Food Agric.* **2018**, *98*, 4268–4278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Barboni, T.; Muselli, A.; Luro, F.; Desjobert, J.-M.; Costa, J. Influence of processing steps and fruit maturity on volatile concentrations in juices from clementine, mandarin, and their hybrids. *Eur. Food Res. Technol.* **2010**, *231*, 379–386. [[CrossRef](#)]
15. Bourgou, S.; Rahali, F.Z.; Ourghemmi, I.; Tounsi, M. Changes of peel essential oil composition of four Tunisian citrus during fruit maturation. *Sci. World J.* **2012**, *2012*, 1–10. [[CrossRef](#)]
16. Ji, X.; Liu, F.; Shi, X.; Wang, B.; Liu, P.; Wang, H. The effects of different training systems and shoot spacing on the fruit quality of 'kyoho' grape. *Sci. Agric. Sin.* **2019**, *52*, 1164–1172.
17. Lan, Y.; Qian, X.; Yang, Z.-J.; Xiang, X.-F.; Yang, W.-X.; Liu, T.; Zhu, B.-Q.; Pan, Q.-H.; Duan, C.-Q. Striking changes in volatile profiles at sub-zero temperatures during over-ripening of 'Beibinghong' grapes in Northeastern China. *Food Chem.* **2016**, *212*, 172–182. [[CrossRef](#)]
18. Baaliouamer, A.; Meklati, B.Y.; Fraisse, D.; Scharff, C. Qualitative and quantitative analysis of petitgrain Eureka lemon essential oil by fused silica capillary column gas chromatography mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.* **1985**, *36*, 1145–1154. [[CrossRef](#)]
19. Lu, Q.; Huang, N.; Peng, Y.; Zhu, C.; Pan, S. Peel oils from three Citrus species: Volatile constituents, antioxidant activities and related contributions of individual components. *J. Food Sci. Technol.* **2019**, *56*, 4492–4502. [[CrossRef](#)]

20. Liu, Y.; Heying, E.; Tanumihardjo, S.A. History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2012**, *11*, 530–545. [[CrossRef](#)]
21. Forney, C.; Song, J. Flavors and aromas: chemistry and biological functions. In *Fruit and Vegetable Phytochemicals*; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2017; pp. 515–540.
22. Zhang, B.; Chen, J.; He, Z.; Chen, H.; Kandasamy, S. Hydrothermal liquefaction of fresh lemon-peel: parameter optimization and product chemistry. *Renew. Energy* **2019**, *143*, 512–519. [[CrossRef](#)]
23. Tekgül, Y.; Baysal, T. Comparative evaluation of quality properties and volatile profiles of lemon peels subjected to different drying techniques. *J. Food Process. Eng.* **2018**, *41*, e12902. [[CrossRef](#)]
24. Zhong, S.; Ren, J.; Chen, D.; Pan, S.; Wang, K.; Yang, S.; Fan, G. Free and bound volatile compounds in juice and peel of Eureka lemon. *Food Sci. Technol. Res.* **2014**, *20*, 167–174. [[CrossRef](#)]
25. Llosa, M.J. Evaluation of the Behavior of New Citrus Patterns against Ferric Chlorosis. Ph.D. Thesis, Polytechnic University of Valencia, Valencia, Spain, 2009.
26. El-Zaeddi, H.; Martínez-Tomé, J.; Calin-Sánchez, Á.; Burló, F.; Carbonell-Barrachina, Á.A. Volatile composition of essential oils from different aromatic herbs grown in Mediterranean regions of Spain. *Foods* **2016**, *5*, 41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Lewis, R.J. *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*, 15th ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2007; p. 998.
28. Bravo, A.; Hotchkiss, J.H.; Acree, T.E. Identification of odor-active compounds resulting from thermal oxidation of polyethylene. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 1881–1885. [[CrossRef](#)]
29. Benitez, N.P.; León, E.M.M.; Stashenko, E. Essential oil composition from two species of Piperaceae family grown in Colombia. *J. Chromatogr. Sci.* **2009**, *47*, 804–807. [[CrossRef](#)]
30. Ahmed, E.M.; Dennison, R.A.; Dougherty, R.H.; Shaw, P.E. Flavor and odor thresholds in water of selected orange juice components. *J. Agric. Food Chem.* **1978**, *26*, 187–191. [[CrossRef](#)]
31. Liu, C.; Cheng, Y.; Zhang, H.; Deng, X.; Chen, F.; Xu, J. Volatile constituents of wild *Citrus mangshanyegan* (*Citrus nobilis* Lauriro) Peel Oil. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 2617–2628. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Cano-Lamadrid, M.; Lipan, L.; Hernández, F.; Martínez, J.J.; Legua, P.; Carbonell-Barrachina, Á.A.; Melgarejo, P. Quality Parameters, Volatile Composition, and Sensory Profiles of Highly Endangered Spanish Citrus Fruits. *J. Food Qual.* **2018**, *2018*, 1–13. [[CrossRef](#)]
33. Di Vaio, C.; Graziani, G.; Gaspari, A.; Scaglione, G.; Nocerino, S.; Ritieni, A. Essential oils content and antioxidant properties of peel ethanol extract in 18 lemon cultivars. *Sci. Hortic.* **2010**, *126*, 50–55. [[CrossRef](#)]
34. Lota, M.-L.; Serra, D.D.R.; Tomi, F.; Jacquemond, C.; Casanova, J. Volatile Components of Peel and Leaf Oils of Lemon and Lime Species. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 796–805. [[CrossRef](#)]
35. Seker, M.; Ekinçi, N.; Gür, E. Effects of different rootstocks on aroma volatile constituents in the fruits of peach (*Prunus persica* L. Batsch cv. 'Cresthaven'). *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* **2017**, *45*, 1–13. [[CrossRef](#)]
36. Noguera-Artiaga, L.; Sánchez-Bravo, P.; Pérez-López, D.; Szumny, A.; Calin-Sánchez, Á.; Burgos-Hernandez, A.; Carbonell-Barrachina, Á.A. Volatile, sensory and functional properties of HydroSOS pistachios. *Foods* **2020**, *9*, 158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Ballesta, M.M.; Alcaraz-López, C.; Muries, B.; Mota-Cadenas, C.; Carvajal, M. Physiological aspects of rootstock–scion interactions. *Sci. Hortic.* **2010**, *127*, 112–118. [[CrossRef](#)]



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Biblioteca
UNIVERSITAS AFGANISTANA



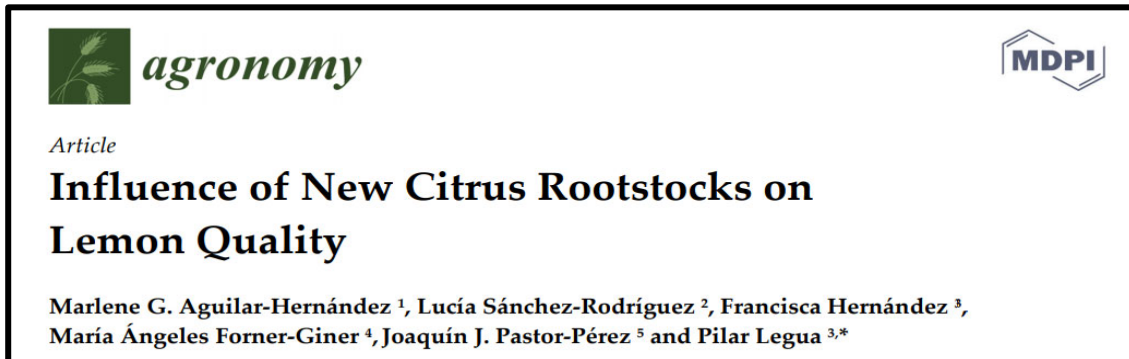
PUBLICACIÓN 1

Influence of new citrus rootstocks on lemon quality

Marlene G. Aguilar Hernández, Lucía Sánchez-Rodríguez, Francisca Hernández, María Ángeles Forner-Giner, Joaquin J. Pastor-Pérez and Pilar Legua.

Agronomy 2020, 10, 974

<https://doi.org/10.3390/agronomy10070974>



Agronomy 2020, 10, 974. <https://doi.org/10.3390/agronomy10070974>

Los objetivos planteados en la tesis están interrelacionados en los artículos publicados. Este primer ensayo evaluó la utilización de nuevos portainjertos del grupo Forner Alcaide injertados con diferentes cultivares. Se determinó su influencia en la calidad de la fruta obtenida mediante la determinación de sus características morfológicas, bioquímicas y nutraceuticas.

1. **Morfología y parámetros físico-químicos**

Se evaluaron los frutos que procedían del Instituto de Investigación Valenciano (IVIA) y de las combinaciones de los nuevos portainjertos del grupo Forner Alcaide ('FA5', 'FA13' y 'FA517') injertados con 'Betera', 'Fino 49', 'Eureka' y 'Verna'. Las combinaciones 'Eureka'/'FA5', 'Fino 49'/'FA13' debido a la sequía y problemas fitosanitarios no sobrevivieron al período de evaluación.

Los resultados de las características morfológicas que mostraron mayores valores han sido: el mayor peso (150,9 g) se obtuvo en la combinación 'Eureka'/'FA13', mientras que el mayor diámetro ecuatorial (66,6 mm), mayor relación DE/DP (1,0) y mayor porcentaje de zumo (48,9%) se obtuvo en la combinación 'Bétera'/'FA5'; el mayor diámetro polar (90,6 mm) se obtuvo en la combinación 'Verna'/'FA5'; el mayor espesor de corteza (5,26 mm) en la combinación 'Verna'/'FA517' y el mayor número de semillas (12,3) en la combinación 'Fino 49'/'FA517'. Los resultados obtenidos coinciden con los mostrados por la variedad 'Eureka' sobre *C. macrophylla* (Pérez-Pérez et al., 2005) y difieren con los obtenidos en otras investigaciones (Jiménez y Zamora, 2014;

Pérez-Pérez et al., 2016) en las que se alcanzaron mayores pesos de fruto sobre *C. macrophylla*. Liu et al. (2019) con respecto al calibre del fruto señalaron que está asociado a la auxina que regula el control de la expresión génica por los múltiples genes de la familia factores de respuesta de auxina (ARF) unida al ADN.

La variable color define muchas veces la decisión de compra. Se evaluó el color en el zumo: en cuanto a la variable L^* , los frutos que mostraron una mayor luminosidad fueron los de 'Verna' injertados sobre 'FA517' mientras los valores más bajos se alcanzaron en 'Bétera' sobre 'FA5'. Los valores del parámetro C^* oscilaron entre 3,3 y 3,5 para 'Verna' sobre 'FA5' y 'Bétera' sobre 'FA517'.

En el color de la corteza, se obtuvieron los mayores valores de luminosidad (L^*) e intensidad del color (C^*) con 'Fino 49' injertada sobre el portainjerto 'FA5' y el índice de color en la combinación 'Fino 49'/'FA517', estando estos valores dentro del rango de comercialización. Los resultados son congruentes con otras investigaciones (Legua et al., 2018; Conesa et al., 2015). El color también está asociado a la temperatura, al momento de cosecha o del almacenamiento (Sun et al., 2019).

Respecto a las variables de calidad, el portainjerto 'FA517' con las variedades 'Bétera', 'Eureka' y 'Fino 49' mostró los mayores valores (9,3 a 10,73 °Brix) de sólidos solubles totales mientras 'Verna' sobre 'FA 5' mostró menor valor (8,4 °Brix). La acidez alcanzó su máximo en la combinación 'Eureka' sobre 'FA 517' con 104,28 g ácido cítrico L^{-1} . Estos resultados son coincidentes con estudios realizados por Fallahi et al. (1990) y Continella et al. (2018). El aumento de sólidos solubles estaría relacionado con la degradación de las pectinas de la pared celular que se acumulan en azúcares (Arrieta et al., 2006). Mientras el aumento de la acidez ocurre por la inhibición de la enzima aconitasa (Echeverra y Valich, 1988; Lizada, 1993), debido a que está gobernada por tres genes que codifican a las enzimas y, por lo menos una de las enzimas se manifiesta en la maduración (Soler et al., 2003).

2. Contenido de azúcares y ácidos orgánicos

El ácido cítrico y el ácido málico no mostraron diferencias significativas, mientras el ácido ascórbico mostró una ligera variación siendo la mayor concentración de 0,06 g mL^{-1} en 'Verna' sobre 'FA 517' y 0,02 g mL^{-1} de 'Eureka' sobre 'FA 13'.

Respecto a los azúcares, glucosa y fructosa fueron identificadas en todas las muestras mostrando un comportamiento similar. Los resultados reportados coinciden con Bermejo y Cano (2012) y Ortiz et al. (1984). El ácido orgánico mayoritario fue el ácido cítrico, lo que está confirmado por otros autores (Zhang and Zhou, 2019; Gargouri et al., 2017; Asencio et al., 2018).

3. Actividad antioxidante (AA) y contenido total de polifenoles (TPC)

La actividad antioxidante se midió por los tres métodos pero solo con FRAP, mostró un mayor valor en la combinación 'Fino 49'/'FA5'. En el contenido total de polifenoles fue mayor en la combinación 'Verna'/'FA13'. La actividad antioxidante y el contenido de polifenoles depende de muchos factores como el momento de cosecha (Manach et al., 2004), las condiciones ambientales, incluso las estaciones (Dwyer y Peterson, 2002) o la luminosidad recibido en campo (Aherne y O'Brien, 2002).

Conclusión

Los resultados indican que el mejor portainjerto fue 'FA 517' ya que presentó una influencia positiva sobre las variedades estudiadas y sobre las variables físicas de los frutos. Mostrando frutos más pequeños y con menor espesor de corteza, mientras los mayores valores fueron en el contenido de sólidos solubles, índice de madurez y los ácidos orgánicos y azúcares. Respecto al contenido total de polifenoles y la actividad antioxidante los mejores resultados se obtuvieron en los portainjertos 'FA13', 'FA517' y 'FA 5'. Las variedades 'Bétera' y 'Eureka' han sido influenciados por los portainjertos en sus propiedades físicas, mientras 'Verna' y 'Fino 49' en las características químicas.

Con este estudio se ha demostrado que el portainjerto tiene diferente efecto en las distintas variedades, tanto en sus características físicas, químicas y bioquímicas.

PUBLICACIÓN 2

Quality parameters of spanish lemons with comercial interest

Marlene G. Aguilar Hernández, Dámaris Núñez-Gómez, María Ángeles Forner-Giner, Francisca Hernández, Joaquín J. Pastor-Pérez and Pilar Legua.

Foods, 10(1):62

<https://doi.org/10.3390/foods10010062>



Foods, 10(1):62. <https://doi.org/10.3390/foods10010062>

El objetivo de este estudio fue comparar la influencia de los portainjertos en la calidad del fruto, evaluando las características morfológicas, fisicoquímicas y la actividad antioxidante en tres variedades comerciales de limón: 'Fino 95', 'Fino 49' y 'Verna' injertadas en dos portainjertos: *C. macrophylla* y *C. aurantium*. Es necesario indicar que la combinación 'Fino 95'/*C. aurantium* no se ha evaluado, porque comercialmente no existe.

1. Parámetros de calidad de la fruta

Los resultados indican diferencias entre la combinación de variedad/portainjerto. La combinación 'Verna'/*C. macrophylla* mostró valores más altos en algunas variables como peso medio del fruto (183,6 g), diámetro ecuatorial medio (66,9 mm) y número de segmentos (9,3) con respecto al portainjerto *C. aurantium*. Considerando el peso del fruto y el diámetro ecuatorial, las variedades injertadas sobre *C. macrophylla* mostraron valores superiores a las injertadas sobre *C. aurantium*. Todos los frutos mostraron una forma similar siendo los frutos de 'Fino 95' sobre *C. macrophylla* los que tuvieron una forma más alargada. Esta misma combinación alcanzó asimismo el mayor contenido en zumo (44,3 %). El mayor número de semillas se observó en la combinación 'Fino 49'/*C. aurantium* (11,3). El espesor medio de corteza fue menor (4,9 mm) en la combinación 'Fino 49'/*C. aurantium*. Estas características definen el calibre, importante para conseguir una buena rentabilidad en el momento de venta

(Dubey y Sharma, 2016). Así, *C. macrophylla* influye sobre la variedad produciendo frutos con un mayor peso y tamaño. También el espesor de la corteza tiene una relación indirecta con el porcentaje de zumo. Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por otros investigadores (García-Sánchez 2003; Pérez-Pérez., et al., 2005; Robles et al., 2017; Abbate et al., 2019).

2. Parámetros físico-químicos de los frutos

Los parámetros de color evaluados en la corteza de los frutos no fueron significativos en las principales características como luminosidad, intensidad e índice de color. Mientras para el color del zumo, el zumo menos luminoso (L^*) se obtuvo para la combinación 'Fino 49'/*C. aurantium*; mientras que el mayor índice de color (ICC) se obtuvo para las variedades 'Fino' injertadas sobre *C. macrophylla*. Por lo expuesto, los portainjertos tendrían poca influencia en las características del color (Pérez-Pérez et al., 2005; Simón-Grao et al., 2016; Conesa et al., 2019) y dependería de la temperatura, incidencia solar y humedad (Manera et al., 2012; Lado et al., 2018; Conesa et al., 2019).

Los resultados obtenidos para los sólidos solubles totales, de mayor a menor, han sido con el portainjerto *C. aurantium* injertado con 'Verna' (10,5 °Brix) y 'Fino 49' (10,3 °Brix), seguido del portainjerto *C. macrophylla* con 'Fino 95' (9,1 °Brix), 'Verna' (8,4 °Brix) y 'Fino 49' (7,8 °Brix). Los resultados obtenidos difieren de otras investigaciones asociadas a las condiciones del suelo y manejo del cultivo (García-Sánchez et al., 2003; González-Molina et al., 2009).

Mientras la acidez total mostró el valor más alto en la combinación 'Fino 49'/*C. aurantium* y el menor en 'Verna'/*C. macrophylla* fluctuando entre 74,9 – 56,0 g ácido cítrico L^{-1} , respectivamente. El índice de madurez (IM) fue menor (1,05) en 'Fino 49' sobre *C. macrophylla*. En las demás combinaciones fueron similares estando dentro del rango esperado (Marín et al., 2002).

3. Ácidos y azúcares orgánicos

En todas las combinaciones variedad/portainjerto la glucosa y fructosa fueron

identificados como los principales azúcares, con valores de glucosa entre 3,1 g 100 mL⁻¹ para la combinación 'Verna'/*C. aurantium* y 2,2 g 100 mL⁻¹ para 'Fino 49'/*C. macrophylla* y 4 g 100 mL⁻¹ y 2,7 g 100 mL⁻¹ para la fructosa.

Respecto a los ácidos orgánicos, no se observaron diferencias significativas en su contenido en ácido cítrico ni entre portainjertos ni variedades. Sin embargo, se observaron diferencias en el contenido en ácido málico entre las variedades 'Fino' y 'Verna' siendo superiores en la primera respecto a la segunda. Los resultados coinciden con otras investigaciones en los azúcares (Aguilar et al., 2019) y en los ácidos orgánicos (Marín et al., 2002; Gonzáles-Molina et al., 2009).

4. Contenido total de polifenoles y actividad antioxidante

En el contenido total de polifenoles, no hubo diferencias significativas en ninguna de las combinaciones. Sin embargo, numéricamente se registraron los valores más altos con el portainjerto *C. aurantium*, (331,6 mg GAE 100 mL⁻¹) respecto a *C. macrophylla*, (226,4 mg GAE mL⁻¹). Los resultados coinciden con Sun et al. (2019) y difieren de otros portainjertos como Forner Alcaide (Aguilar et al., 2019). Se piensa que esta diferencia está asociada al efecto protector por la incidencia de factores abióticos o bióticos (Ignat et al., 2010). También estaría relacionado con el método utilizado para extraer el zumo (Guimarães et al., 2010; Ranful et al., 2010).

La actividad antioxidante total se midió por tres métodos. Con el método FRAP todas las combinaciones fueron estadísticamente homogéneas. Similar tendencia se observó con el método método ABTS, excepto en la combinación 'Fino 95'/*C. macrophylla* que mostró menor valor (2,8 mmol Trolox L⁻¹). Con el método DPPH, mostró un mayor valor (3,0 mmol Trolox L⁻¹) en 'Verna' cuando fue injertada en *C. macrophylla* y cuando se injerto sobre *C. aurantium* se obtuvo el menor valor (1,2 mmol Trolox L⁻¹). Los resultados reportados en esta investigación fueron mas altos, probablemente por las condiciones ambientales o las prácticas culturales del sistema de producción a los obtenidos por Gonzales-Molina et al. (2009).

Conclusiones

La variedad 'Fino 49' fue mejor con respecto a 'Verna', en las características fisicoquímicas. Con respecto a los portainjertos, *C. aurantium* influyó mayor porcentaje de zumo, tamaño, ácido ascórbico y málico.

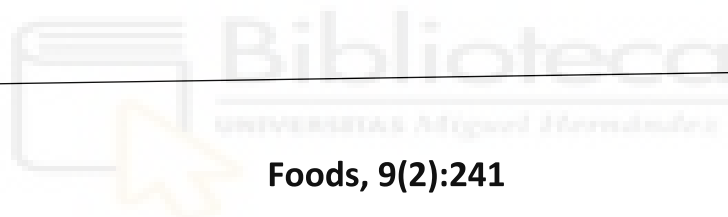
Este estudio comprobó la influencia de las combinaciones variedad /portainjerto en las características morfoquímicas evaluadas.



PUBLICACIÓN 3

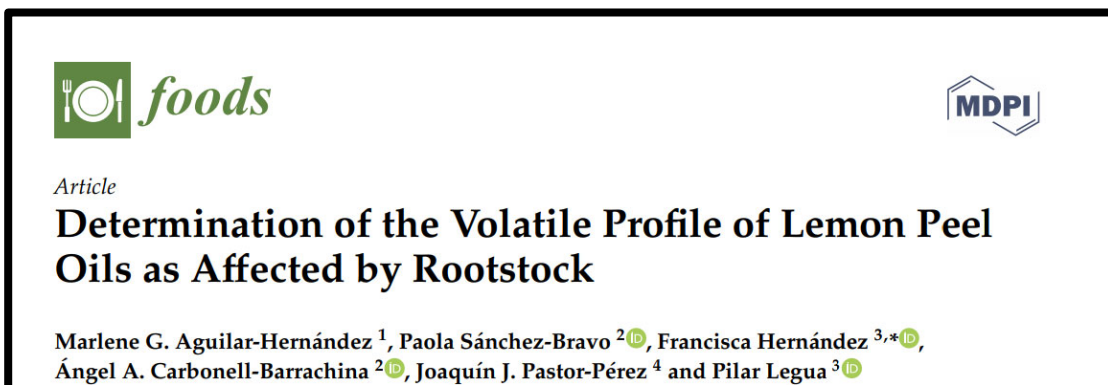
Determination of the volátil profile of lemon peel

Marlene G. Aguilar Hernández, Paola Sánchez-Bravo, Francisca Hernández, angel A. Carbonell-Barrachina, Joaquín J. Pastor-Pérez and Pilar Legua.



Foods, 9(2):241

<https://doi.org/10.3390/foods9020241>



Foods, 9(2):241. <https://doi.org/10.3390/foods9020241>

El objetivo del estudio fue identificar, cuantificar y analizar el perfil volátil en la corteza de los frutos de limón, que fueron recolectados de árboles injertados en diferentes portainjertos y variedades.

1. Identificación de los componentes volátiles

Las variedades utilizadas han sido 'Eureka', 'Betera', 'Fino 49', 'Fino 95', 'Verna' y los portainjertos Forner Alcaide ('FA 5', 'FA13', 'FA517'), *Citrus aurantium* y *C. macrophylla*. Se usaron las cortezas de los frutos de limón de las cuales se extrajeron los aceites. Se determinó el perfil volátil mediante GC-MS. En total 26 componentes fueron identificados en la corteza del limón. Los compuestos identificados pertenecen a las siguientes familias químicas: (i) monoterpenos (20 compuestos), (ii) sesquiterpenos (3 compuestos), (iii) aldehídos (2 compuestos) y (iv) ésteres (1 compuesto).

2. Efectos de la combinación de portainjerto / variedad en el perfil de compuestos volátiles

Veintiséis componentes volátiles en orden decreciente (respecto a su concentración) se identificaron: limoneno, β -pineno, γ -terpineno, sabineno, α -pineno, geranial, neral, α -tujeno, β -bisaboleno, terpinoleno, trans- α -bergamoteno, α -terpineol, α -terpineno, acetato de nerilo, linalol, p- cimeno, citronelal, trans- cariofileno, terpineol-4, nerol, canfeno, nonanal, geraniol, octilaldehído, α -felandreno y cis-sabinene-hidrato. Estos resultados coinciden con los reportados anteriormente por otros autores (González-Mas et al., 2019; Liu et al., 2012; Cano-Lamadrid 2018; Tekgül y Baysal, 2018).

La suma de todas las concentraciones fue mayor en la variedad 'Eureka' (33,95 mg Kg⁻¹). El componente principal, el limoneno, mostró un mayor valor (22,71 g kg⁻¹) en 'Eureka' y los demás compuestos volátiles alcanzaron el mayor valor en 'Verna' como: β-pineno (5,01 g kg⁻¹), γ-terpineno (3,84 g kg⁻¹), sabineno (0,85 g kg⁻¹) y α-pineno (0,79 g kg⁻¹). Respecto al total de las concentraciones que definen el aroma en las variedades, 'Eureka' fue el más aromático y el menos aromático 'Fino 49'. Los resultados obtenidos en la composición de los compuestos volátiles coinciden con otros autores como Di Vaio et al. (2010), pero difieren con otros que reportaron un número menor de compuestos (Lota et al., 2020), e incluso en la concentración (Di Vaio et al., 2010). Esta diferencia en el número de compuestos identificados y la concentración estaría relacionada con el método de obtención del aceite; por hidrodestilación se obtienen concentraciones más altas y compuestos oxigenados; mientras que con la utilización del prensado en frío los productos obtenidos son terpenos (Lu et al., 2019).

Con respecto a los portainjertos los resultados indicaron que el grupo Forner-Alcaide fue estadísticamente homogéneo ('FA517' 'FA13' y 'FA 5') y con los valores más altos en los diferentes compuestos identificados con respecto a *C. aurantium* y *C. macrophylla*. Así para limoneno fue mayor de 22 g kg⁻¹ y en γ-terpine superior a 3,8 g kg⁻¹. El total de las concentraciones de los compuestos identificados en los portainjertos estudiados fueron: 'FA5' > 'FA517' > 'FA13' > *C. aurantium* > *C. macrophylla*. Esta diferencia podría atribuirse a la compatibilidad, la interacción de la variedad y portainjerto, absorción de agua, tamaño de copa que influyen en el aroma de los frutos (Ballesta et al., 2010). Los resultados coinciden con lo reportado por otros autores que determinaron que los portainjertos influyen en la disponibilidad y concentración de los compuestos volátiles (Wang et al., 2012; Benjamín et al., 2013; Seker et al., 2017; Noruega et al., 2020).

Conclusiones

Las diferentes combinaciones evaluadas de las cinco variedades en los diferentes portainjertos dieron frutos de diferente calidad aromática.

Los mejores portainjertos que inciden en el aroma son los del grupo Forner Alcaide, seguidos de *C. aurantium* y *C. macrophylla*. La variedad más aromática fue 'Eureka' mientras el menos oloroso 'Fino 49'.



6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS



6. CONCLUSIONES

Las características morfológicas y bioquímicas del fruto del limón varían según la combinación de variedad y portainjerto.

1. El portainjerto 'FA 517' obtiene frutos más pequeños y corteza más fina, pero con mayor contenido de sólidos solubles, índice de maduración, ácidos orgánicos y azúcares. Los portainjertos 'FA 13' y 'FA517' inducen una mayor actividad antioxidante y un mayor contenido de compuestos polifenólicos. Asimismo, estos portainjertos influyen en las características físicas de 'Betera' -'Eureka' y las características químicas de 'Verna' -' Fino 49 '. Mientras que con el portainjerto *C. aurantium* se obtiene mayor porcentaje de jugo, ácido ascórbico y málico con respecto a *C. macrophylla*. La misma tendencia se obtiene con 'Fino 49' frente a 'Verna'.
2. Los portainjertos de Forner-Alcaide ('FA5'> 'FA517'> 'FA13') inducen un mayor contenido de compuestos volátiles, seguidos de *C. aurantium* y *C. macrophylla*. La gradación aromática de variedades de mayor a menor 'Eureka'> 'Béterá'> 'Fino 95'> 'Verna'> 'Fino 49'. En todas las combinaciones variedad sobre portainjerto, son identificados 26 compuestos volátiles. La mayor concentración de limoneno.
3. Todos los portainjertos evaluados influyen en las distintas variedades estudiadas en las variables como peso medio, calibre y color del fruto, así como actividad antioxidante, contenido de fenoles totales y perfil volátil.

CONCLUSIONS

The morphological and biochemical characteristics of lemon fruit vary according to combination variety and rootstock.

1. The rootstock 'FA 517' obtains smaller fruit and thinner peel, but with higher content soluble solids, ripening index, organic acids and sugars. Rootstocks 'FA 13' and 'FA517' induce higher antioxidant activity and content of polyphenolic compounds. Likewise, these rootstocks influence physical characteristics of 'Betera' -'Eureka' and chemical characteristics of 'Verna' - 'Fino 49'. While with rootstock *C. aurantium* higher percentage of juice, ascorbic and malic acid is obtained with respect to *C. macrophylla*. The same trend is obtained with 'Fino 49' versus 'Verna'.
2. Forner-Alcaide rootstocks ('FA5'> 'FA517'> 'FA13') induce higher content of volatile compounds, followed by *C. aurantium* and *C. macrophylla*. The aromatic gradation of varieties ranges from highest to lowest 'Eureka'> 'Bétera'> 'Fino 95'> 'Verna'> 'Fino 49'. In all the combinations variety on rootstock, 26 volatile compounds are identified. The highest concentration limonene.
3. All evaluated rootstocks influence different varieties studied in the features such as average weight, size and color of fruit, as well as antioxidant activity, total phenol content and volatile profile.

7. INVESTIGACIONES FUTURAS



Actualmente en España sólo hay dos portainjertos tradicionales para el cultivo de limonero *Citrus aurantium* y *Citrus macrophylla* y las principales variedades son 'Fino' y 'Verna', además de sus selecciones que involucran las mayores áreas. Existe una demanda creciente de limón por lo que debería incrementarse la producción y disminuir los costes para aumentar la competitividad.

Por ello sugiero que las investigaciones futuras deberían centrarse en:

Evaluación de nuevos portainjertos para limón de los actualmente utilizados para naranja y mandarina, que se adapten a las condiciones limitantes de la zona como son agua, suelo con alto contenido de carbonatos, clorosis férrica, salinidad; pero que no disminuyan sus características nutraceuticas.

Probar los portainjertos que han sido manipulados genéticamente llamados "transinjerto", y que aseguran mejores niveles de resistencia a enfermedades, estrés hídrico o limitaciones del suelo y su influencia en los parámetros morfológicos y bioquímicos.

Importación y evaluación de material genético mejorado, como cultivares de limón que han sido mejorados y que tienen un mejor comportamiento; pero continuar investigando la influencia en la calidad de la fruta en sus propiedades internas como el contenido de ácido ascórbico.

Realizar investigaciones para utilizar las técnicas empleadas en otros cultivos como mango o aguacate, referidas a adelantar o retrasar la floración y de esta manera prolongar la cosecha del limón y limitar la entrada de fruta importada, que en muchos casos ha significado la introducción de plagas y enfermedades, que a la larga comprometerán la citricultura española.

Se sugiere evaluar plantaciones en alta densidad, con la finalidad de duplicar el área, tener un retorno económico antes y aumentar la producción.

Continuar evaluando nuevos portainjertos, en diferentes zonas para ampliar las áreas de limonero, en lugares donde aún no se han instalado y que satisfagan las necesidades del productor, del sistema de producción, consumidor y la industria.

8. REFERENCIAS



Bib
UNIVERSITAT



- A -

- Abbate, L., Panno, S., Mercati, F., Davino, S., Bosco, S., 2019. Citrus rootstock breeding: response of four allotetraploid somatic hybrids to Citrus tristeza virus induced infections. *European Journal of Plant Pathology*, 153, 837-847.
<https://doi.org/10.1007/s10658-018-1599-0>
- Agrolibre, 2020. Crónica económica – Redacción Agrolibre. Actualizado 06 de agosto 2020. Visitado el 21 octubre 2020.
En: <https://www.cronicaeconomica.com/tras-16-anos--solucionaremos-el-problema-de-los-aranceles-usa-146200.htm>
- Alkhafaji, A, Khalil, N., 2019. Effect of fertilization, rootstocks and growth stimulant on growth of *Citrus limon* L. Sapling. *Iraqi Journal of Agricultural Sciences*, 50(4), 990-1000.
<https://www.iasj.net/iasj/download/0746114f95f3b236>
- Almeida, J., Sales, G., Brito, M., Fernandes, P., Soares-Filho, W., Almeida, I., 2018. Salt balance in substrate cultivated with ‘Sunki’ mandarin x ‘Swingle’ citrumelo hybrids. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 22 (7), 493-498.
<http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v22n7p493-498>
- Ailimpo (Asociación Interprofesional de Limón y Pomelo), 2020. Memoria anual 2019. Edita Ailimpo. 133 pp. Visitado 22 de octubre del 2020.
<https://www.ailimpo.com/wp-content/uploads/2020/09/Memoria-AILIMPO-2019-reducida.pdf>.
- Ailimpo (Asociación Interprofesional de Limón y Pomelo), 2019. Memoria anual 2018. Edita Ailimpo. 81pp. Visitado 24 de octubre del 2020.
<https://www.ailimpo.com/wp-content/uploads/2019/04/Memoria-AILIMPO-2018.pdf>.
- Ailimpo (Asociación Interprofesional de Limón y Pomelo), 2018. Memoria anual 2017. Edita Ailimpo. 108 pp. Visitado 26 de octubre del 2020.
https://www.ailimpo.com/wp-content/uploads/2018/04/Memoria_Anual_Actividades-2017.pdf.
- Ailimpo (Asociación Interprofesional de Limón y Pomelo), 2017. Memoria anual 2017. Edita Ailimpo. 108 pp. Visitado 26 de octubre del 2020.
https://www.ailimpo.com/wp-content/uploads/2018/04/Memoria_Anual_Actividades-2017.pdf
- Amorín, M., Girardi, E., Franca, N., Gesteira, A., Soares, W., Passos, O., 2018. Initial performance of alternative citrus scion and rootstock combinations on the northern coast of the state of Bahia, Brazil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 40(4), 1-11.
<http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452018480>
- Ancilla, G., Medina, A., 2015. Citrus. Botanical Monographs. Jardí Botànic de la Universitat de València, 2, 149 pp.
http://www.jardibotanic.org/fotos/pdf/publicacion_3_84_CITRUS-ENGLISH.pdf

- B -

- Bassal, M., 2009. Growth, yield and fruit quality of 'Marisol' clementine grown on four rootstocks in Egypt. *Scientia Horticulturae*, 119(2), 32-137. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.07.020>
- Benyahia, H., Talha, A., Fadli, A., Chetto, O., Omari, F., Beniken, L., 2017. Performance of 'Valencia Late' sweet orange (*Citrus sinensis*) on different rootstocks in the Gharb Region (Northwestern Morocco). *Annual Research y Review in Biology*, 20(4), 1-11. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2017/37924>
- Bowman, K., Albrecht, U., 2017. Efficient propagation of citrus rootstocks by stem cuttings. *Scientia Horticulturae*, 225, 681-688. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2017.07.049>
- Bowman, K., Joubert, J., 2020. Citrus rootstocks. En: Talon, M., Caruso, M., Gmitter, F. (Eds). *The Genus Citrus*. Publishing Elsevier, 105-127 pp. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812163-4.00006-1>.
- Brito, M., Sá, F., Filho, W., Silva, L., Fernandes, P., 2016. Gas Exchange and fluorescence of Citrus rootstocks varieties under saline stress. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 38(2), 1-8. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452016951>

- C -

- Calabuig, A., Navarro, C., Pellizzari, G., Soto, A., 2020. Primera detección de *Pulvinaria polygonta* en Europa. *Phytoma* 317 marzo. 8pp. <https://www.phytoma.com/la-revista/phytohemeroteca/317-marzo-2020/primera-deteccion-de-pulvinaria-polygonata-en-europa>
- Carvalho, H., Martins, C., Teodoro, A., Filho, W., Passos, O., 2016. Agronomical performance of 'Piemonte' mandarin grafted on several rootstocks in the Brazilian Coastal Tablelands. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira-Brasilia*, 51(11), 1830-1838. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2016001100005>
- Casado, G., Romero, E., Hervalejo, A., Arenas, F., 2015. Nuevas Plagas de los Cítricos. Junta de Andalucía. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. www.juntadeandalucia.es › [registro-servifapa](#) ›
- Chin, R., Godfrey, K., Polek, M., Slupsky, C., 2017. HNMR analysis of *Citrus macrophylla* subjected to Asian citrus psyllid (*Diaphorina citri* Kuwayama) feeding. *Arthropod-Plant Interactions*, 11(6), 901-909. <https://doi.org/10.1007 / s11829-017-9546-0>.
- Clark, J., Finn, Ch., 2010. Register of New Fruit and Nut Cultivars List 45. *HortScience*, 45(5), 716–756. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.5.716>

- D -

- da Cruz, M., de Carvalho, D., da Costa, D., Colombo, R., Pacheco, C., Tazima, Z., Neves, C., 2019. Initial shoot development and root architecture of citrus rootstocks. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, 40(4), 1393-1404.
<http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n4p1393>
- Deng, H., Achor, D., Exteberria, E., Yu, Q., Du, D., Stanton, D., Liang, G., Gmitter, F., 2019. Phloem regeneration is a mechanism for huanglongbing tolerance of “Bearss” lemon and “LB8-9” sugar belle mandarin. *Frontiers in Plant Science*, 10, 277, 1-13.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00277>
- Dubey, A., Sharma, R., 2016. Effect of rootstocks on tree growth, yield, quality and leaf mineral composition of lemon (*Citrus limon* (L.) Burm). *Scientia Horticulturae*, 200, 131-136.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.01.013>
- Dubey, A., Sharma, R., 2019. Effect of rootstocks on tree growth, yield, quality and leaf mineral composition of lemon (*Citrus limon* (L.) Burm.). *Scientia Horticulturae*, 200,131-136.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.01.013>

- F -

- FAO STAT, 2020. Food and Agriculture Organization of the United Nations database.
<http://www.fao.org/faostat/en/?#data/QC>. Visitado 29 mayo 2020.
- Fadel, A., Mourao, F., Stuchi, E., Ramos, Y., 2018. Production of ‘Valencia’ sweet orange on 41 rootstocks in the north of the state of Sao Paulo, Brazil. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira-Brasilia*, 53 (6), 774-778.
<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2018000600015>
- Ferreira, R., da Silva, L., da Nacimiento, M., Silveira, F., 2020. Permanent wilt point from two methods for different combinations of citrus rootstock. *Ciência Rural*, Santa Maria, 50(1), 1-6.
<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20190074>
- Finn, Ch, Clark, J., 2012. Register of New Fruit and Nut Cultivars List 46. *HortScience*, 47(5), 536–562.
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.47.5.536>
- Forner, J., Forner-Giner, M., Alcaide, A., 2003. Forner-Alcaide 5 and Forner-Alcaide 13: Two new citrus rootstocks released in Spain. *HortScience*, 38(4), 629-630.
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.38.4.629>
- Forner-Giner, M., Alcaide, A., Primo-Millo, E., Forner, J., 2003a. Performance of ‘Navelina’ orange on 14 rootstocks in Northern Valencia (Spain). *Scientia Horticulturae*, 98, 223–232.
[https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(02\)00227-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00227-3)

-
- Forner-Giner, M., Legaz, F., Primo-Millo, E., Forner, J., 2011. Nutritional responses of citrus rootstocks to salinity: Performance of the new hybrids Forner-Alcaide 5 and Forner-Alcaide 13. *Journal of Plant Nutrition*, 34(10), 1437-1452.
<https://doi.org/10.1080/01904167.2011.585202>
- Forner-Giner, M., Primo-Millo, E., Forner, J., 2009. Performance of Forner Alcaide 5 Forner-Alcaide 13, hybrids of Cleopatra mandarin x *Poncirus trifoliata*, as salinity-tolerant Citrus rootstocks. *Journal of the American Pomological Society*, 63(2), 72-80.
<http://hdl.handle.net/20.500.11939/4261>
- Forner-Giner, M., Rodríguez-Gamir, J., Martínez-Alcántara, B., Quiñones, A., Iglesias, D., Primo-Millo, E., Forner, J., 2014. Performance of Navel orange trees grafted onto two new dwarfing rootstocks (Forner-Alcaide 517 and Forner-Alcaide 418). *Scientia Horticulturae*, 179, 376-387.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.07.032>
- G -**
- García-Sánchez, F., Simón, I., Lidón, V., Manera, F., Simón-Grao, S., Pérez-Pérez, J., Gimeno, V., 2015. Shade screen increases the vegetative growth but no the production in 'Fino 49' lemon trees grafted on *Citrus macrophylla* and *Citrus aurantium* L. *Scientia Horticulturae*, 194, 175-180.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.005>
- Gasic, K, Preece, J., Karp, D., 2020. Register of New Fruit and Nut Cultivars List 50. *HortScience*, 55(7), 1164–1201.
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI50register-20>
- Gasic, K, Preece, J., Karp, D., 2016. Register of New Fruit and Nut Cultivars List 48. *HortScience*, 51(6), 620–652.
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.51.6.620>
- Gasic, K, Preece, J., 2014. Register of New Fruit and Nut Cultivars List 47. *HortScience*, 49(4), 396 -421.
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.49.4.396>
- Gil-Izquierdo, A., Riquelme, M., Porras, I., Ferreres, F., 2004. Effect of the rootstock and interstock grafted in lemon tree (*Citrus limon* (L.) Burm.) on the flavonoid content of lemon juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (2), 324-331.
<https://doi.org/10.1021/jf0304775>.
- Gimeno, V., Simón, I., Martínez, V., Lidón, V., Shahid, M., Garcia-Sanchez, F., 2015. Effect if shade screen on production, fruit quality and growth parameters of 'Fino 49' lemon trees grafted on *Citrus macrophylla* and sour orange. *Acta Horticulturae*, 1065, 1845-1852.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1065.236>
- González-Mas, M., Llosa, M., Quijano, A., Forner-Giner, M., 2009. Rootstock effects on leaf photosynthesis in 'Navelina' trees grown in calcareous soil. *HortScience*, 44(2), 280-283.
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.44.2.280>

-H-

- Hao, G., Ammar, D., Duan, Y., Stover, E., 2019. Transgenic citrus plants expressing a 'Candidatus Liberibacter asiaticus' prophage protein LasP235 display huanglongbing-like symptoms. *Agri Gene*, 12 (100085), 1-10.
<https://doi.org/10.1016/j.aggene.2019.100085>
- Hartmann H., Kester D., Davies F., Geneve R., 2002. Plant propagation: principles and practices. 7th edn, Prentice Hall, Inc., Upper Saddle River, 176–328pp.

- J -

- Jiménez, R., Zamora, V., 2010. Principales cultivares y patrones utilizados en la citricultura. Taller Regional sobre viveros de cítricos. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, La Habana, Cuba. 44pp.
<http://riacnet.net/wp-content/uploads/2014/11/Conf-1-Cultivares.pdf>

- K -

- Khan, M., Ghani, F., Bostan, N., Nabi, G., Muhammad, H., Ali, A., Amin J., Khalid, S., 2018. The influence of timing and position of scion on graft take success of lemon. *Pure and Applied Biology*, 7(1), 330-337.
<http://dx.doi.org/10.19045/bspab.2018.70040>
- Khoe, L., 2016. Early performance of 'Duong' mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) on three rootstock under acid sulfate soil fields at Mekong Delta of Vietnam. *International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology*, 6(1), 10-15. ISSN: 2088-5334.
<http://dx.doi.org/10.18517/ijaseit.6.1.645>
- Kotsias, D., 2004. Influence of *Citrus aurantium* L. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Rootstocks and nutrient spray son granulation of Valencia sweet orange (*C. sinensis* (L.) Osbeck) fruits. *European Journal of Horticultural Science*, 69(6), 244-249. ISSN: 16114434. https://www.pubhort.org/ejhs/2004/file_18921.pdf

- L -

- Legua, P., Martínez-Cuenca, M., Bellver, R., Forner-Giner, M., 2018. Rootstock's and scion's impact on lemon quality in southeast Spain. *International Agrophysics*, 32 (3), 325-333.
<https://doi.org/10.1515/intag-2017-0018>
- Levy, Y., Lifshitz, J., 1995. Alemow (*Citrus macrophylla* Wester.), compared with six other rootstocks for nucelar 'Minneola' tangelo (*Citrus paradisi* Macf. x *Citrus reticulata* Blanco). *Scientia Horticulturae*, 61(1-2), 131-137.
[https://doi.org/10.1016/0304-4238\(94\)00735-X](https://doi.org/10.1016/0304-4238(94)00735-X)

-
- Limera, C., Sabbadini, S., Sweet, J., Mezzetti, B., 2017. New Biotechnological Tools for the Genetic Improvement of Major Woody Fruit Species. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1418.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01418>
- Llosá, M., Bermejo, A., Cano, A., Quiñones, A., Forner-Giner, M., 2009. The Citrus rootstocks Cleopatra mandarin, *Poncirus trifoliata*, Forner-Alcaide 5 and Forner-Alcaide 13 vary in susceptibility to iron deficiency chlorosis. *Journal of the American Pomological Society*, 63(4), 160-167.
<http://hdl.handle.net/20.500.11939/5416>
- Lusser, M., Parisi, C., Plan, D., Rodríguez-Cerezo, E., 2012. Deployment of new biotechnologies in plant breeding. *Nature Biotechnology*, 30, 231–239.
<https://doi.org/10.1038/nbt.2142>
- M -
- Machado, D., Siqueira, D., Salomao, L., Cecon, P., Silva, D., 2017. Evaluation of rootstocks for ‘Tahiti’ acid lime in northern state of Minas Gerais. *Revista Brasileira Fruticultura*, 39(1), 1-12.
<http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452017790>
- Maluenda, J., 2019. Los cítricos comunitarios llenos de incertidumbres (Veto ruso, Sudáfrica, Brexit, mercosur, arancele Trump). 1-9. En:
<https://www.agrodigital.com/wp-content/uploads/2019/09/citricosp19c.pdf>
- MARM, (Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino), 2008. Patrones de limonero. Plataforma de conocimiento para el medio rural y pesquero. 1-6.
<https://www.mapa.gob.es/app/MaterialVegetal/docs/patrones.pdf>
- Martínez-Cuenca, M., Quiñones, A., Forner-Giner, M., 2016. Screening of ‘King’ mandarin (*Citrus nobilis* Lour) x *Poncirus trifoliata* ((L.) Raf.) hybrids as citrus rootstocks tolerant to iron chlorosis. *Scientia Horticulturae*, 198, 61-69.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.10.0380304-4238>
- Mollá, M., 2020. Conselleria de Agricultura y Medio Ambiente. Las Provincias 6 de julio del 2020 en: <https://www.lasprovincias.es/comunitat/nueva-plaga-importada-citricos-20200706124208-nt.html>.
- Morales, J., Bermejo, A., Navarro, P., Forner-Giner, M.Á., Salvador, A., 2020. Rootstock effect on fruit quality, anthocyanins, sugars, hydroxycinnamic acids and flavanones content during the harvest of blood oranges ‘Moro’ and ‘Tarocco Rosso’ grown in Spain. *Food Chemistry*, 128305.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128305>
- Morales, J., Salvador, A., Besada, C., Navarro, P., Bermejo, A., 2021. Physico-chemical, sensorial and nutritional quality during the harvest season of ‘Tango’ mandarins grafted onto ‘Carrizo’ citrange and Forner Alcaide nº 5. *Food Chemistry*, 339, 127781.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127781>
- Mudge, K., Janick, J., Steven, S., Goldschmidt, E., 2009. A history of grafting. *Horticultural Review*, 35, 437-493.
<https://doi.org/10.1002/9780470593776.ch9>

- N -

Najar, A., Hamrouni, L., Bouhlal, R., Jemmali, A., Jamoussi, B., Duran-Vila, N., 2017. Viroid infection and rootstocks affect productivity and fruit quality of the Tunisian citrus cultivar Maltaise demi sanguine. *Phytopathologia Mediterranea*, 56(3), 409-420. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-21259

Navarro, L., 1992. Citrus shoot tip grafting in vitro, in: Y.P.S. Bajaj (Eds.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry 18. High-tech and Micropropagation II*. E-Publishing Springer- Verlag Berlin Heidelberg, pp. 343-354.

<https://doi.org/10.1007/978-3-642-76422-6>

Navarro L, Roistacher C., Murashige, T., 1975. Improvement of shoot tip grafting in vitro for virus-free citrus. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 100(5), 471-479.

<https://www.cabi.org/ISC/abstract/19750337830>

Navarro-García, N., Morte, A., Pérez-Tornero, O., 2016. In vitro adventitious organogenesis and histological characterization from mature nodal explants of *Citrus limon*. *In Vitro Cellular y Development Biology – Plant*, 52, 161-173.

<https://doi.org/10.1007/s11627-015-9743-4>

Novak, F., Brunner, H., 1992. Plant breeding: Induced mutation technology for crop improvement. *International Atomic Energy Agency (IAEA) BULLETIN*, 4, 25-33.

<https://www.iaea.org/sites/default/files/34405682533.pdf>

- O -

Okie, W., 2000. Register of New Fruit and Nut Varieties List 40. *HortScience*, 35(5), 812-826. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.35.5.812>

Oustric, J., Morillon, R., Luro, F., Herbette, S., Martin, P., Giannettini, J., Berti, L., Santini, J., 2019. Nutrient deficiency tolerance in Citrus is dependent on genotype or ploidy level. *Frontiers in Plant Science*, 10, 127.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00127>

- P -

Padhi, E., Maharaj, N., Lin, S., Mishchuk, D., Chin, E., Godfrey, K., Foster, E., Polek, M., Leveau, J., Slupsky, C., 2019. Metabolome and microbiome signatures in the roots of citrus affected by Huanglongbing. *Phytopathology*, 109, 2022-2032.

<https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-19-0103-R>

Pérez-Jiménez, M., Pérez-Tornero, O., 2020. Improved salt-tolerance in *Citrus macrophylla* mutant rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 259, 108815.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108815>

- Pérez-Jiménez, M., Pérez-Tornero, O., 2020a. Mutants of *Citrus macrophylla* rootstock obtained by gamma radiation improve salt resistance through toxic ion exclusion. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 494-501.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.06.024>.
- Pérez-Pérez, J., Robles, J., García-Sánchez, F., Botia, P., 2016. Comparison of deficit and saline irrigation strategies to confront water restriction in lemon trees grown in semi-arid regions. *Agricultural Water Management*, 164 (1), 46-57.
<https://doi.org/10.1016/j.agwat.2015.08.015>
- Poles, L., Licciardello, C., Distefano, G., Nicolosi, E., Gentile, A., La Malfa, S., 2020. Recent advances of in vitro culture for the application of new breeding techniques in Citrus. *Plants*, 9, 938.
<https://doi.org/10.3390/plants9080938>
- R -
- Raddatz-Mota, D., Franco-Mora, D., Mendoza-Espinoza, J., Rodríguez-Verástegui, L., León-Sánchez, F., Rivera-Cabrera, F., 2019. Effect of different rootstocks on Persian lime (*Citrus latifolia* T.) postharvest quality. *Scientia Horticulturae*, 257, 108716.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108716>
- Robles, J., Botia, P., Pérez-Pérez, J., 2017. Sour orange rootstock increases water productivity in deficit irrigated 'Verna' lemon trees compared with *Citrus macrophylla*. *Agricultural Water Management*, 186, 98-107.
<https://doi.org/10.1016/j.agwat.2017.03.002>
- Rochdi, A., El Yacoubi, H., Rachidai, A., 2003. Responses to NaCl stress of Citrus aurantium, Citrange troyer and Poncirus trifoliata in callus cultures: Assessment of characters for evaluating salt stress responses in citrus rootstocks. *Agronomie*, 23(7), 643-649.
<https://doi.org/10.1051/agro:2003039>
- Rochdi, A., Lemsellek, J., Bousarhal, A., Rachidai, A., 2005. Assessment of greenhouse salinity tolerance of some citrus rootstocks: *Citrus aurantium* and *Poncirus trifoliata* two-hybrid (*Poncirus* x *Citrus sinensis* and *Poncirus* x 'Sunki' mandarin). *Biotechnology, Agronomy, society, and Environment*, 9(1), 65-73.
ISSN: 13706233
https://www.researchgate.net/publication/286062754_Assessment_of_greenhouse_salinity_tolerance_of_some_citrus_rootstocks_Citrus_aurantium_and_Poncirus_trifoliata_two-hybrid_Poncirus_x_Citrus_sinensis_and_Poncirus_x_sunki_Mandarin
- Rodríguez-Gamir, J., Primo-Millo, E., Forner, J., Forner-Giner, M., 2010. Citrus rootstock responses to water stress. *Scientia Horticulturae*, 126(2), 95-102.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.06.015>
- Rodríguez-Gamir, J., Ancillo, G., Aparicio, F., Bordas, M., Primo-Millo, E., Forner-Giner, M., 2011. Water-deficit tolerance in citrus is mediated by the down regulation of PIP gene expression in the roots. *Plant Soil*, 347, 94-104.
<https://doi.org/10.1007/s11104-011-0826-7>

- Romero-Trigueros, C., Cabañero, J., Tortosa, P., Gambín, J., Maestre-Valero, J., Nicolás, E., 2020. Medium-long term effects of saline reclaimed water and regulated deficit irrigation on fruit quality of citrus. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(3), 1350-1357.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.10091>.
- Ruiz, M., Pensabene-Bellavia, G., Quiñones, A., García-Lor, A., Morillon, R., Ollitrault, P., Primo-Millo, E., Navarro, L., Aleza, P., 2018. Molecular characterization and stress tolerance evaluation of new allotetraploid somatic hybrids between Carrizo citrange and *Citrus macrophylla* W. rootstocks. *Frontiers in Plant Science*, 9, 901.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00901>
- S -
- Sá, F., Brito, M., Figueiredo, L., Melo, A., Silva, L., Moreira, R., 2017. Biochemical components and dry matter of lemon and mandarin hybrids under salt stress. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 21(4), 249-253.
<http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v21n4p249-253>
- Sanabam, R., Singh, N., Handique, P., Devi, H., 2015. Disease-free khasi mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) production using in vitro microshoot tip grafting and its assessment using DAS-ELISA and RT-PCR. *Scientia Horticulturae*, 189, 208-213.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.03.001>
- Sau, S., Ghosh, S., Sarkar, S., Gantait S., 2018. Effect of rootstocks on growth, yield, quality, and leaf mineral composition of 'Nagpur' mandarin (*Citrus reticulata* Blanco.) grown in red lateritic soil of west. *Scientia Horticulturae*, 237, 142-147.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.015>
- Sharma, R., Dubey, A., Awasthi, O., Kaur, Ch., 2016. Growth, yield, fruit quality and leaf nutrient status of grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.): Variation from rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 210, 41-48.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.07.013>
- Silva, F., Brito, M., Moreira, R., Silva, L., Soares-Filho, W., Figueiredo, L., Gheyi, H., Fernandes, P., 2018. Growth and physiology of citrus rootstocks under salt stress. *Bioscience Journal*, 34 (4), 907-916.
<https://doi.org/10.14393/BJ-v34n1a2018-36553>
- Simón-Grao, S., Rivero, R., García-Sánchez, F., Nieves, M., Cámara-Zapata, J., Martínez-Nicolás, J., Fernández-Zapata, J., 2019. The Forner Alcaide N° 5 citrus genotype shows a different physiological response to the excess of boron in the irrigation water in relation to its two. *Scientia Horticulturae*, 245, 19-28.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.10.002>
- Simón-Grao, S., Simón, I., Lidón, V., Conesa, A., Manera, J., Brotons, J., Martínez-Nicólas, J., García-Sánchez, F., 2016. Effects of shade screens and mulching on the color change of fruits from 'Fino49' lemon trees irrigated with water of different salinity or irrigation regimes. *Scientia Horticulturae*, 209, 316-322.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.06.039>

Smolka, A., Li, X., Heikelt, C., Welander, M., Zhu, L., 2010. Effects of transgenic rootstocks on growth and development of non-transgenic scion cultivars in Apple. *Transgenic Research*, 19, 933 - 948.
<https://doi.org/10.1007/s11248-010-9370-0>.

- V -

Veyrat, P., 1968. Patrones para Agrios. *Agricultura Revista Agropecuaria*, 439,591-596.
https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_Agri%2FAgri_1968_439_completa.pdf

Villalba, D., 2001. Patrones y variedades de cítricos. Generalitat Valenciana, Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación. 34pp.
<http://ivia.gva.es/documents/161862582/161863614/Patrones+y+variedades+de+c%C3%ADtricos/ce05b440-e4f7-484c-947a-0fd153bff63d>

- W -

Wang, M., Dai, W., Du, J., Ming, R., Dahro, B. and Liu, J., 2019. ERF 109 of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) contributes to cold tolerance by directly regulating expression of Prx1 involved in antioxidative process. *Plant Biotechnology Journal*, 17, 1316-1332.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13056>

Warschewsky, E., Klein, L., Frank, M., Chitwood, D., Londo, J., von Wettberg, E., Miller, A., 2016. Rootstocks: Diversity, domestication, and impacts on shoot phenotypes. *Trends in Plant Science*, 21(5), 418-437.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.11.008>

Wright, G., Peña, M., 2002. Lemon rootstock trials in Arizona-2001-02. Citrus and deciduous fruit and nut research report, The University of Arizona College of Agriculture and Life Sciences, 1-10.
<http://hdl.handle.net/10150/223675>

Wu, G., Prochnik, S., Jenkins, J., Salse, J., Hellsten, U., Murat, F., et al. Rokhsar, D., 2014. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes complex history of admixture during citrus domestication. *Nature Biotechnology*, 32(7), 656-662.
<http://doi.org/10.1038/nbt.2906>

- Y -

Yu, Q., Chen, C., Du, D., Huang, M., Yao, J., Yu, F., Brlansky, R., Gmitter, F., 2017. Reprogramming of a defense-signaling pathway in rough lemon and sweet orange is a critical element of the early response to *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Horticulture Research*, 4, 17063.
<https://doi.org/10.1038/hortres.2017.63>

