



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



**Trabajo de fin de máster en
Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos**

**Evaluación del contenido de azúcares y ácidos
orgánicos en familias de cerezo mediante técnicas
cromatográficas**

**Evaluation of sugar and organic acid content in
sweet cherry populations by chromatography**

Autor

Clara Gracia Latre

Directores

Alejandro Calle Calderón

Ana Wünsch Blanco

Facultad de Veterinaria

2019-2020

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a mis tutores, Alejandro y Ana, por su dedicación y compromiso, y por enseñarme y ayudarme en todo lo necesario.

Agradecer también a los técnicos de laboratorio de la Unidad de Hortofruticultura del CITA que me han ayudado

A mi familia y amigos por la paciencia y el apoyo recibido.

Y a mis compañeros del máster por los ánimos recibidos

ABSTRACT

Sweet cherry is a fruit with high nutritional value and great economic interest. Its quality is largely determined by its organoleptic qualities. Thus, sweetness and acidity are two of the main attributes related to the acceptance of this fruit by consumers. Despite the interest of these characters, the genetic mechanisms that regulate them remain unknown in this species. This research aims to advance in the knowledge of these traits by studying the sugar and acid content in five sweet cherry populations. This work is part of a national research project that aims to advance in the knowledge of the genetic control of these characteristics through the analysis of this plant material. In this study, the titratable acidity and soluble solids content of 259 cherry trees was analysed. In addition, the extraction, identification and quantification of simple sugars and organic acids profile was carried out by means of Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC) for each individual in the sample. The results revealed titratable acidity values between 0.58-1.39% and a soluble solids content between 15-27 °Brix. Five organic acids were identified (malic, quinic, oxalic, citric and shikimic acids), with malic acid having the highest content. Moreover, a high positive correlation was also observed between this acid and titratable acidity, confirming that malic acid is the main compound related to the acidity of cherries. Similarly, four simple sugars were detected: glucose, fructose, sucrose and sorbitol. The first two sugars, glucose and fructose, were the most abundant. Furthermore, these sugars showed the highest correlation with the soluble solids content, highlighting their relevance in fruit sweetness. In most of the organic acids and simple sugars detected in individuals of the five families, a normal distribution was observed, as well as different ranges of concentrations between families. These results reveal a quantitative inheritance of these compounds in cherry, confirming observations in other species of the same genus. No correlation was observed between sugars and acids, confirming the independent regulation of both types of compounds.

RESUMEN

La cereza es una fruta de alto valor nutricional y gran interés económico. Su calidad está determinada en gran medida por sus propiedades organolépticas. Así, el dulzor y la acidez son dos de los principales atributos relacionados con la aceptación de esta fruta por parte de los consumidores. A pesar de la importancia de estos caracteres, los mecanismos genéticos que los regulan son aún desconocidos en esta especie. Este estudio tiene como objetivo avanzar en el conocimiento de estos caracteres mediante el estudio del contenido de azúcares y ácidos en cinco familias de cerezo. Este trabajo se enmarca en un proyecto de investigación nacional que pretende avanzar en el conocimiento del control genético de estos caracteres mediante el análisis de este material vegetal. En este trabajo se analizó la acidez titulable y el contenido en sólidos soluble de 259 individuos de cerezo, y además se realizó de la extracción, identificación y cuantificación del perfil de azúcares simples y ácidos orgánicos mediante cromatografía de capa líquida de alto rendimiento (UPLC) para cada individuo de la muestra. Los resultados mostraron valores de acidez titulable entre 0,58-1,39% y un contenido en sólidos solubles entre 15-27 °Brix. Cinco ácidos orgánicos fueron identificados (ácido málico, quínico, oxálico, cítrico y shikímico), siendo el ácido málico el que presentó un contenido más alto. Además se observó una elevada correlación positiva de este ácido y la acidez titulable, confirmando que el ácido málico es el principal compuesto relacionado con la acidez de las cerezas. De igual forma, cuatro azúcares simples fueron detectados: glucosa, fructosa, sacarosa y sorbitol. Los dos primeros azúcares, glucosa y fructosa, fueron las más abundantes. Además, estos azúcares presentaron las correlaciones más altas con el contenido en sólidos solubles, destacando su importancia en el dulzor del fruto. En la mayoría de los ácidos orgánicos y azúcares simples detectados en los individuos de las cinco familias se observó una distribución ajustada a la normalidad, así como diferentes rangos de concentraciones entre familias. Estos resultados revelan una herencia cuantitativa de estos compuestos en cerezo, confirmando las observaciones en otras especies del mismo género. No se observó correlación entre azúcares y ácidos, confirmando la regulación independiente de ambos tipos de compuestos.

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 EL CEREZO	1
1.1.1 Taxonomía y características botánicas	1
1.1.2 Origen e historia del cultivo.....	2
1.1.3 Interés económico y cultivo en España	3
1.1.4 Mejora del cultivo.....	5
1.2 LA CEREZA.....	5
1.2.1 Calidad del fruto y aceptación.....	5
1.2.2 Características fisicoquímicas	6
1.2.3 Composición nutricional.....	8
1.2.4 Genética y mejora de la calidad de fruto	11
2 OBJETIVOS	13
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1 MATERIAL VEGETAL	14
3.2 FENOTIPADO DEL CONTENIDO EN SÓLIDOS SOLUBLES, ACIDEZ TITULABLE, AZÚCARES SIMPLES Y ÁCIDOS ORGÁNICOS	15
3.2.1 Preparación de la muestra	15
3.2.2 Determinación del contenido en sólidos solubles y acidez titulable	15
3.2.3 Extracción de azúcares simples y ácidos orgánicos	16
3.2.4 Análisis cromatográfico.....	17
3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS	18
4 RESULTADOS.....	19
4.1 ACIDEZ TITULABLE Y CONTENIDO EN ÁCIDOS ORGÁNICOS.....	19
4.1.1 Acidez titulable.....	19
4.1.2 Ácidos orgánicos	19
4.1.3 Análisis de distribución de la acidez titulable y ácidos orgánicos	22
4.2 CONTENIDO EN SÓLIDOS SOLUBLES Y AZÚCARES SIMPLES.....	24
4.2.1 Contenido en sólidos solubles	24
4.2.2 Azúcares simples	25
4.2.3 Análisis de distribución del contenido en sólidos solubles y los azúcares simples.....	27
4.3 ANÁLISIS DE CORRELACIONES	29
5 DISCUSIÓN	32
5.1 ACIDEZ TITULABLE Y ÁCIDOS ORGÁNICOS	32
5.1.1 Acidez titulable.....	32
5.1.2 Ácidos orgánicos	32
5.2 CONTENIDO EN SÓLIDOS SOLUBLES Y AZÚCARES.....	35
5.2.1 Contenido de sólidos solubles (SSC).....	35
5.2.2 Azúcares simples	36
5.3 CORRELACIONES ENTRE AZÚCARES Y ÁCIDOS	37
6 CONCLUSIÓN.....	39
7 BIBLIOGRAFÍA	40
8 ANEXOS	I
ANEXO 8.1	I
ANEXO 8.2.....	II
ANEXO 8.3.....	III
ANEXO 8.4.....	IV
ANEXO 8.5.....	V

1 INTRODUCCIÓN

1.1 EL CEREZO

1.1.1 Taxonomía y características botánicas

El cerezo (*Prunus avium* L.) pertenece a la familia *Rosaceae*, subfamilia *Amygdaloideae*, género *Prunus*, subgénero *Cerasus* (Potter *et al.*, 2007). El género *Prunus* está formado por más de 200 especies, incluidas en cinco subgéneros, entre las que se encuentran otras especies de frutales de hueso como el almendro (*Prunus dulcis* Batsch), el melocotonero (*Prunus persica* L.), el albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.) o el ciruelo europeo (*Prunus domestica* L.). Dentro del subgénero *Cerasus*, además del cerezo, se incluyen otras especies relevantes como el guindo (*Prunus cerasus* L.), el cerezo ‘Santa Lucía’ (*Prunus mahaleb* L.), usado como portainjertos, o el ancestro del cerezo y el guindo *Prunus fruticosa* Pall. (Bortiri *et al.*, 2002). Todas las especies del género *Prunus* tienen un número básico de 8 cromosomas ($x = 8$), pudiendo ser diploides, tetraploides o hexaploides. El cerezo normalmente es diploide $2n = 16$, aunque hay excepciones de individuos triploides o tetraploides (Dirlewanger *et al.*, 2007).

El cerezo es un árbol caducifolio de tronco grueso y bien definido que puede alcanzar los 20 m de altura. Las hojas, con longitud de 7-13 cm y una anchura de 3-4 cm, tienen una morfología oval-lanceolada con el margen serrado. El peciolo es largo y presenta, generalmente, un par de glándulas rojas en la zona cercana a la lámina de la hoja. Las flores son blancas, con un diámetro aproximado de 2,5 cm, presentan cinco pétalos, numerosos estambres y un pistilo lampiño. Estas están agrupadas en yemas florales que suelen presentar de 2 a 6 flores (Blanca y Díaz de la Guardia, 1997). El fruto es una drupa con forma globosa o acorazonada. Tanto el color de la piel como el de la pulpa puede variar de amarillo a rojo oscuro casi negro. El hueso también tiene forma globosa. Dentro de los frutos de hueso destaca por ser el único no climatérico, por lo que se debe recolectar en el momento óptimo de la maduración (Blanca y Díaz de la Guardia, 1997; MAPA, 2020).

El cerezo se distribuye por zonas templadas con estaciones bien diferenciadas, adaptados a bajas temperaturas invernales y veranos secos. Las condiciones climáticas limitan su producción, principalmente afectadas por la temperatura, las precipitaciones,

el viento y la radiación solar. Durante otoño e invierno, esta especie entra en un periodo de dormancia, el cual requiere del cumplimiento de un periodo de frío para retomar el crecimiento y alcanzar la floración. Durante la floración, elevadas temperaturas o heladas pueden afectar negativamente al rendimiento del cultivo. Además, al tratarse de una especie entomófila son necesarias condiciones climáticas óptimas para que las abejas lleven a cabo la polinización cruzada. La etapa de crecimiento requiere el aporte frecuente de irrigación, por el contrario, el agua excesiva durante la floración, fructificación o maduración del fruto pueden tener efectos negativos. Una excesiva precipitación durante la etapa de recolección puede producir el agrietamiento de las cerezas (Dirlewanger *et al.*, 2007).

1.1.2 Origen e historia del cultivo

Se cree que el cerezo es originario de las zonas circundantes al Mar Negro y Caspio. Hoy en día, se encuentra distribuido de forma silvestre en Europa, Asia Occidental y Cáucaso. Las primeras evidencias de su consumo datan del 5000-4000 A.C., en base a restos de huesos encontrados en excavaciones arqueológicas de casas-cueva en varias partes de Europa (Blando y Oomah, 2019; Papapetros *et al.*, 2019). Se cree que los primeros en cultivar cerezas fueron los griegos, y durante el Imperio Romano, estos lo expandieron por Europa, aunque su auténtica expansión se llevó a cabo en el siglo XVI (Watkins, 1976). La distribución del cultivo por América del Norte comenzó en el siglo XIX y se basó en las semillas y brotes de un número reducido de cultivares llevados por colonos europeos. A partir de estos cultivares originales se obtuvieron algunas variedades que aún son cultivadas hoy en día, como la variedad 'Bing' (Dirlewanger *et al.*, 2007; Iezzoni *et al.*, 2017).

En la actualidad, la cereza se cultiva en más de 40 países distribuidos entre las zonas templadas de Asia, Europa y América. Concretamente en Europa, el cultivo se extiende por toda la región templada desde la parte Oriental de Rusia hasta España (Figura 1.1) (Dirlewanger *et al.*, 2007; Euforgen, 2009). En el hemisferio norte, la campaña de cerezas se extiende desde abril (Europa de Sur) hasta agosto (Alemania o Noruega), aunque la temporada principal abarca los meses de junio y julio. En el hemisferio sur, la temporada de maduración transcurre entre diciembre y enero, donde destaca Chile como uno de los mayores productores mundiales (Bujdosó y Hrotkó, 2019).



Figura 1.1: En verde aparece representado el rango de distribución de *Prunus avium* en Europa. Las Poblaciones aisladas están marcadas con x (Euforgen, 2020).

1.1.3 Interés económico y cultivo en España

Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAOSTAT) en 2018, 432.314 ha se dedicaron al cultivo de cerezas en todo el mundo, suponiendo un incremento aproximado de 30.000 ha en los últimos ocho años. La producción mundial en el 2018 fue 2.547.944 T, lo que supone un ligero incremento respecto a la media de las cinco campañas anteriores (2.274.435 T). Esta tendencia en el crecimiento del cultivo se viene produciendo durante los últimos veinte años (FAOSTAT, 2020).

El primer país productor a nivel mundial es Turquía con 639,5 miles de toneladas en 2018 seguido de Estados Unidos de América (EEUU), aproximadamente con la mitad de producción (312,4 miles de T), y Uzbekistán en tercera posición (Figura 1.2). España se encuentra en el séptimo lugar con 106,5 toneladas, con una superficie de cultivo estimada en 27.368 ha en 2018, lo que implica un rendimiento de 38.945 Kg/ha. La tendencia de los 10 últimos años ha sido ascendente (Figura 1.3), sin embargo, en la campaña del 2018 ha habido una reducción del 11% respecto a la campaña de 2017, consecuencia de las adversidades meteorológicas que provocaron una disminución en la calidad del producto (MAPA, 2020).

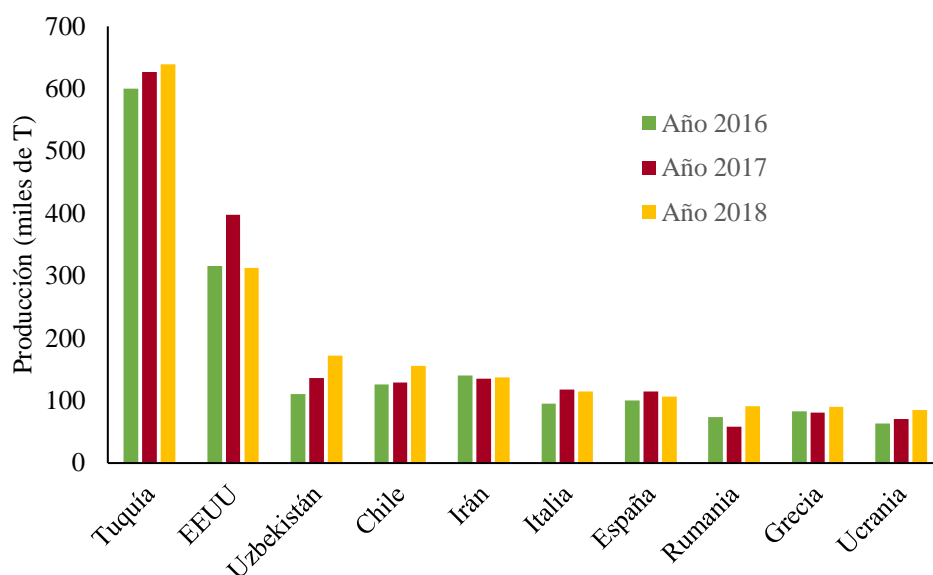


Figura 1.2: Principales países productores a nivel mundial en 2016, 2017 y 2018. Fuente: FAOSTAT, 2020.

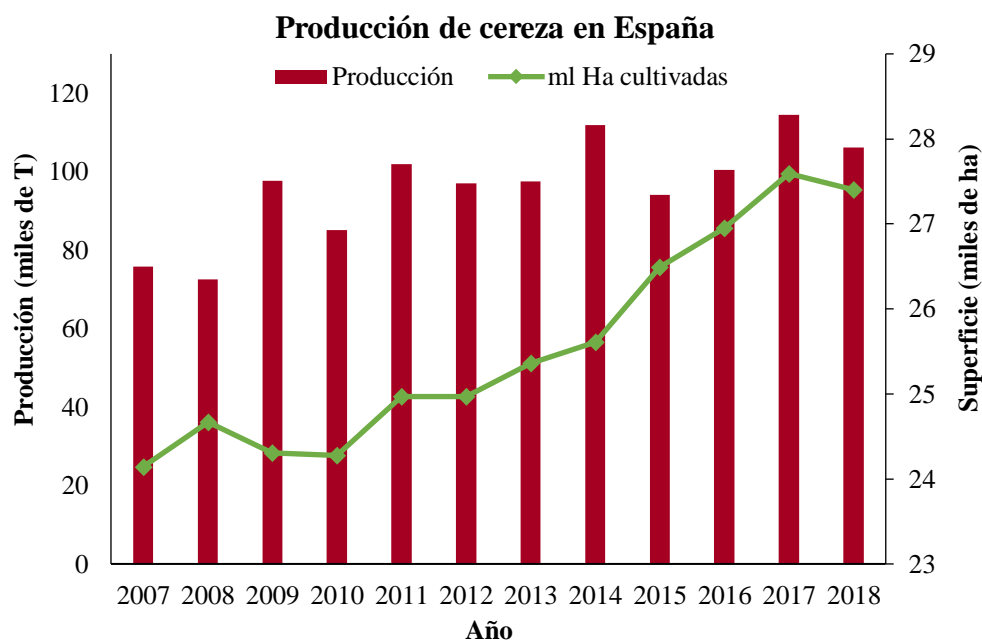


Figura 1.3: Producción de cereza (miles de toneladas) y superficie cultivada (miles de hectáreas) en España (MAPA, 2020)

1.1.4 Mejora del cultivo

Los programas de mejora del cultivo de las cerezas, al igual que en otros frutales, están dirigidos tanto a satisfacer las preferencias de los consumidores, así como las demandas de los productores. Es por ello, que la mejora genética en cerezo se ha centrado principalmente en la calidad de los frutos, la adaptación a las condiciones edafo-climáticas, la resistencia a enfermedades y el alargamiento del periodo post-cosecha (Carrasco *et al.*, 2013). Tradicionalmente, los programas de mejora conllevan mucho tiempo debido al largo periodo de juvenilidad de la especie (3-5 años). Sin embargo, durante los últimos años, la introducción de marcadores moleculares vinculados a caracteres de calidad del fruto y agronómicos, que facilitan la selección de las mejores variedades para usar en los cruzamientos, así como una selección precoz de los individuos, ha mejorado considerablemente la eficiencia de los programas de mejora (Dirlewanger *et al.*, 2007; Iezzoni *et al.* 2017).

1.2 LA CEREZA

1.2.1 Calidad del fruto y aceptación

Las cerezas son una de las frutas cultivada en las zonas templadas más apreciadas por los consumidores. Son consumidas principalmente como frutos frescos, por lo que su aceptación se basa mayoritariamente en la calidad de éstos (Yue *et al.*, 2014). Entre los principales caracteres que determinan la calidad de las cerezas se incluyen el color, la firmeza, el tamaño, la dulzura, la acidez y la aptitud post-cosecha (Serrano *et al.*, 2005; Ballistreri *et al.*, 2013). Otros caracteres como el contenido en compuestos volátiles o fenólicos que contribuyen al sabor, color y aroma también están considerados como elementos de la calidad de las cerezas (Serradilla *et al.*, 2012). Por parte de los consumidores, los principales atributos usados para la elección de las cerezas se basan en el color, la dulzura, el tamaño, la forma, la ausencia de defectos, el sabor y la interacción entre estos (Crisosto, Crisosto y Metheney, 2003; Chauving, Withing y Ross, 2009).

La dulzura y la acidez son características esenciales en la aceptación de las cerezas (Chauving, Withing y Ross, 2009; Whiting, Ophardt y McFerson, 2006). El contenido en estos compuestos varía durante el periodo de maduración de los frutos, así como a nivel de cultivar (Blando y Oomah, 2019; Cao *et al.*, 2015). A pesar de la importancia de la concentración de ambos compuestos, estudios llevados a cabo sobre la aceptación de

cultivares de cerezo mostraron que la preferencia de los consumidores se debía principalmente a la concentración de azúcares (Crisosto, Crisosto y Metheney, 2003), debido a la mayor variación del contenido de éstos que de ácidos a lo largo de la maduración.

Además del contenido de azúcares y ácidos, el color y la firmeza de los frutos son aspectos muy importantes en la aceptación de las cerezas ya que se encuentra asociado al estado de maduración. Durante la maduración se produce un aumento exponencial en el contenido de antocianinas, principal compuesto relacionado con la coloración de las cerezas (McCune *et al.*, 2011; Serradilla *et al.*, 2017), siendo el color un indicativo claro del estado de maduración. Además, el color también se encuentra relacionado con otros caracteres de calidad, ya que generalmente, las cerezas más oscuras presentan un porcentaje mayor en la relación azúcar/ácido y suelen contener mayor cantidad de polifenoles (Blando y Oomah, 2019).

Otros compuestos, como es el caso de los compuestos fenólicos, también se han relacionado con la calidad de las cerezas, ya que es conocido que una alta concentración de estos afecta al sabor de los frutos (Faniadis, Drogoudi y Vasilakakis, 2010). Además, determinados compuestos volátiles afectan directamente al olor y sabor de las frutas, y por lo tanto a la calidad de los frutos, aunque estos compuestos se encuentran altamente afectados por las condiciones de almacenamiento postcosecha (Cozzolino *et al.*, 2019).

1.2.2 Características fisicoquímicas

Las características fisicoquímicas de las cerezas son uno de los atributos más importantes para garantizar la calidad y la aceptación por parte de los consumidores (Dirlewanger *et al.*, 2007). Estos atributos sensoriales y químicos muestran una gran variabilidad entre cultivares (Usenik, Fabčič y Štampar, 2008), y pueden verse alterados por diversos factores como la fecha de maduración, las prácticas agrícolas y/o las condiciones ambientales (Crisosto, Crisosto y Metheney, 2003). Algunas características físicas del fruto son el color, la firmeza y el tamaño (Calle y Wünsch, 2020). El color se utiliza para la determinación de la madurez y la clasificación de la cereza dentro de los mercados. Hay una amplia gama de tonos, desde los rojos oscuros hasta los amarillentos, siendo las cerezas con tonos oscuros las que tienen mayor aceptación en la mayoría de mercados (Sooriyapathirana *et al.*, 2010). El tamaño, al igual que el color, también se

utiliza para la clasificación de los frutos en el mercado (Campoy *et al.*, 2015), ya que la mayoría de las cerezas se comercializa como frutos enteros. Además, este parámetro está altamente correlacionado con el peso, por lo que influye considerablemente en la rentabilidad del cultivo (Calle y Wünsch, 2020). Por su parte, la firmeza está relacionada con la susceptibilidad de la fruta a los daños mecánicos sufridos en el periodo post-cosecha (Campoy *et al.*, 2015), y dado que la ausencia o presencia de magulladuras es una característica de la calidad del fruto (Chauving, Withing y Ross, 2009), la firmeza es de gran importancia en su aceptación, al igual que el tamaño (Calle y Wünsch, 2020; Campoy *et al.*, 2015). El aumento de ambas características está asociado a la domesticación del cultivo (Cai *et al.*, 2019; De Franceschi *et al.*, 2013). Las principales características químicas en las cerezas son el contenido en sólidos solubles (SSC), la acidez titulable (AT) y el índice de maduración (SSC/AT).

El dulzor es una de las características que más contribuye a la calidad de las cerezas. Este carácter está relacionado con el SSC, siendo uno de los factores más importantes que determinan la aceptabilidad de las cerezas por parte del consumidor. Un alto SSC se ha asociado con una alta preferencia del consumidor (Crisosto, Crisosto y Metheney, 2003; Serradilla *et al.*, 2016). De esta manera, la mayoría de los cultivares comerciales tienen un porcentaje de SSC entre el 15 al 19% (Serradilla *et al.*, 2016), sin embargo, han sido identificados cultivares de cerezo con rangos que varían entre 12 y 24% (Papapetros *et al.*, 2019; González-Gómez *et al.*, 2010).

Otro de los atributos relacionados con la aceptabilidad de los consumidores es la acidez titulable (AT). La cereza se considera una fruta de acidez media, con un pH entre el 3,7 y 4,2 (Serradilla *et al.*, 2017) y con un porcentaje de acidez que varía entre 0,3 y 1,3% en la mayoría de los cultivares más consumidos (Papapetros *et al.*, 2019). Este atributo, a pesar de ser dependiente del estado de maduración y de las condiciones climáticas, está relacionado fuertemente con el cultivar (Serradilla *et al.*, 2015).

La relación entre ambos parámetros, SSC/AT, se denomina índice de madurez. Este índice juega un papel importante en la calidad y la aceptación de la cereza, ya que es un indicativo del estado óptimo de madurez del fruto y del sabor de la fruta (Crisosto, Crisosto y Metheney, 2003; Blando y Oomah, 2019). Generalmente, el SSC aumenta durante la maduración mientras que la AT disminuye, por lo que el índice de maduración se utiliza como indicador del tiempo de cosecha, debido a la gran influencia que tiene en el sabor. Este índice es dependiente de cada cultivar y varía entre 20 y 30, aunque hay

algunos cultivares que pueden alcanzar valores de 40 (Serradilla *et al.*, 2016; Chockchaisawasdee *et al.*, 2016).

1.2.3 Composición nutricional

Las cerezas son consideradas una excelente fuente de numerosos nutrientes (McCune *et al.*, 2011), siendo una de las principales razones del incremento de su consumo en la dieta humana. A continuación, se describe la composición nutricional de las cerezas centrándose en los azúcares y los ácidos, principales compuestos que determinan el sabor de la fruta (Girard y Kopp, 1998).

1.2.3.1 Azúcares

Las cerezas presentan un alto contenido en azúcares, pudiendo suponer hasta un cuarto del peso total del fruto (Papapetros *et al.*, 2019). Los azúcares mayoritarios en las cerezas son: glucosa, fructosa, sorbitol, sacarosa y maltosa, en los que la glucosa y la fructosa representan aproximadamente entre el 80-90% del total (Ballistreri *et al.*, 2013; Blando y Oomah, 2019). Esto supone una cantidad de azúcares en torno a 110 g/Kg en peso fresco (PF) (Papapetros *et al.*, 2019).

La glucosa es el azúcar predominante en una gran variedad de cultivares entre los que se incluyen ‘Ferprime’, ‘Burlat’, ‘Van’, ‘Bing’, ‘Lapins’ o ‘Sweetheart’. Su contenido varía entre el 60-100 g/Kg en PF (Serradilla *et al.*, 2016; Blando y Oomah, 2019). La mayoría de variedades se ajustan a este rango pudiendo llegar a alcanzar hasta los 180 g/Kg en PF (Usenik, Fabčič y Štampar, 2008; Serradilla *et al.*, 2011; Ballistreri *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2015; Papapetros *et al.*, 2018 y 2019). Excepcionalmente, en algunos cultivares, como ‘13S-43-48’, ‘13S-20-30’, ‘Beyrudi’, ‘Kısa ap’ y ‘Uzun’, contenidos menores de 60 y mayores de 200 g/Kg en PF han sido reportados (Serradilla *et al.*, 2016; Blando y Oomah, 2019).

La fructosa es el segundo azúcar más abundante con un contenido entre 40 - 80 g/Kg en PF (Girard y Kopp, 1998; Ballistreri *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2015; Serradilla *et al.*, 2016; Blando y Oomah, 2019). En algunos cultivares griegos, se han encontrado cultivares con menos de 30 g/Kg en PF de este azúcar (Papapetros *et al.*, 2018 y 2019). Generalmente, las variedades con altos niveles de glucosa contienen altos niveles de

fructosa (Ballistreri *et al.*, 2013). Sin embargo, en algunos cultivares tipo ‘Picota’, como es el cultivar ‘Ambrunés’, en las últimas etapas de maduración predomina la fructosa por encima de la glucosa, pudiendo alcanzar hasta 120 g/Kg en PF (Serradilla *et al.*, 2011).

Las concentraciones de sorbitol y sacarosa son más bajas, representando aproximadamente entre el 0,1 – 0,2% del total de azúcares (Serrano *et al.*, 2005). En el caso del sorbitol, su concentración oscila entre 1 – 40 g/Kg PF, cantidad similar a la observada en otras frutas como manzana, pera, melocotón o ciruela (Usenik, Fabčič y Štampar, 2008; Ballistreri *et al.*, 2013; Serradilla *et al.*, 2017). La sacarosa es el azúcar minoritario en las cerezas con concentraciones que varían entre 3-11 g/Kg en PF (Usenik, Fabčič y Štampar, 2008).

1.2.3.2 Ácidos orgánicos

La acidez total está determinada por la cantidad de ácidos orgánicos (Serradilla *et al.*, 2017). En las cerezas, el ácido málico es el predominante, pudiendo suponer entre el 94 - 98% del total de ácidos orgánicos (Girard y Kopp, 1998; Serradilla *et al.*, 2017; Blando y Oomah, 2019). No obstante, a pesar de ser el predominante, su contenido varía altamente entre cultivares, con cantidades que oscilan desde 3,5 g/Kg de PF en ‘Burlat’ hasta los 14,1 g/Kg en PF de ‘Puntalazzese’ (Girard y Kopp, 1998; Esti *et al.*, 2002; Usenik, Fabčič y Štampar, 2008; Ballistreri *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2015; Serradilla *et al.*, 2016).

Otros ácidos orgánicos se han identificado en las cerezas, aunque en concentraciones menores que el ácido málico. Este es el caso de los ácidos cítrico y shikímico, cuyas concentraciones son inferiores a 0,05 g/Kg de PF, o el ácido fumárico cuya concentración no supera 0,001 g/Kg de PF (Usenik, Fabčič y Štampar, 2008; Ballistreri *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2015; Serradilla *et al.*, 2016).

1.2.3.3 Agua, carbohidratos, proteínas y lípidos

El agua es el componente predominante en las cerezas con un 80 - 83%, un poco menor en comparación a otras frutas de hueso (Serradilla *et al.*, 2017). El principal macronutriente de la cereza son los carbohidratos (12 - 17%), que se dividen en fibra dietética que representa entre 1 y 2% del total de este compuesto y azúcares simples que

suponen entre 11 - 15% dependiendo del clima y cultivar (Blando y Oomah, 2019). A pesar de que el contenido en fibra no es muy relevante (21 g/Kg PF), esta confiere a las cerezas propiedades beneficiosas para la salud (McCune *et al.*, 2011). El contenido en proteínas varía entre 0,8 - 1,4%, no obstante, pese a su bajo contenido, todos los aminoácidos esenciales se han encontrado en las cerezas. Las proteínas de las cerezas son ricas en ácido aspártico, ácido glutámico y lisina. Además, son buena fuente de indolaminas como el triptófano, la melatonina y la serotonina. El contenido en lípidos es bajo (2 a 7 g/Kg PF) donde predominan los ácidos grasos (Serradilla *et al.*, 2016).

1.2.3.4 Minerales y vitaminas

La cereza destaca por ser una buena fuente de potasio, con concentraciones que varían entre 1,6 - 2,6 g/Kg de PF. El fósforo es el segundo mineral más abundante con un contenido entre 0,24 - 0,28 g/Kg. En menor cantidad se encuentran el calcio, el magnesio y el sodio (McCune *et al.*, 2011; Serradilla *et al.*, 2016; Papapetros *et al.*, 2019).

El contenido en vitaminas no es alto, sin embargo, tiene un contenido de ácido ascórbico (vitamina C) que varía entre 0,04 y 0,27 g/Kg dependiendo del cultivar. También, contiene tiamina, folatos y provitamina A. Entre las vitaminas liposolubles destaca la vitamina E (McCune *et al.*, 2011; Serradilla *et al.*, 2016).

1.2.3.5 Compuestos fenólicos

La cereza es una excelente fuente de compuestos fenólicos, entre los que principalmente destacan los flavonoides, ácidos fenólicos y carotenoides (Serradilla *et al.*, 2017). La cantidad de los compuestos fenólicos varía en función del cultivar y las condiciones climáticas (Usenik, Fabčič y Štampar, 2008; Ballistreri *et al.*, 2013). Entre los principales compuestos fenólicos destacan, los flavonoides, un tipo de metabolitos secundarios generados por la planta, que les sirven para protegerse de la radiación ultravioleta (Serradilla *et al.*, 2017). Los principales flavonoides son las antocianinas, responsables junto con los carotenoides del color rojo de los frutos y determinados órganos de la planta (Acero *et al.*, 2019). Otros flavonoides también importantes en la coloración rojiza de los frutos son los flavonoles y los flavan-3-oles (Serradilla *et al.*, 2017; Acero *et al.*, 2019). Además de los flavonoides, las cerezas se caracterizan por

presentar altos contenidos de ácidos fenólicos, que se dividen a su vez en dos grupos; los ácidos hidroxibenzoles y los ácidos hidroxicinámicos, siendo los segundos los que presentan un contenido más alto en las cerezas (Serradilla *et al.*, 2017).

Estos compuestos fenólicos y volátiles presentan diversos efectos beneficiosos para la salud como reducir el riesgo de cáncer, enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares (Ballistreri *et al.*, 2013). Además, también se cree que el consumo de cerezas alivia la artritis y los dolores de gota (Faniadis, Drogoudi y Vasilakakis, 2010; González-Gómez *et al.*, 2010; Serradilla *et al.*, 2012; Nuñez-Lillo *et al.*, 2019).

1.2.4 Genética y mejora de la calidad de fruto

Varios estudios en cerezo se han centrado en el estudio de la genética de las características físicas de la cereza. Estudios de tamaño, firmeza, color y peso de fruto han permitido avanzar en el conocimiento del control genético de estos caracteres (Calle *et al.*, 2020a; Cai *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2010; Campoy *et al.*, 2015; Sooriyapathirana *et al.*, 2010). Esta información es de utilidad para la mejora del cultivo y la obtención de nuevas variedades.

Sin embargo, existen pocos trabajos que hayan estudiado la regulación de otros compuestos importantes en la calidad de fruto y el contenido nutricional de las cerezas. Concretamente, a pesar de la importancia del contenido en azúcares y ácidos de las cerezas, muy pocos estudios se han encontrado en la regulación genética de estos caracteres en cerezo (Calle y Wünsch, 2020). No obstante, si existen estudios en otras especies de pertenecientes al género *Prunus* (Etienne *et al.*, 2002; Eduardo *et al.*, 2010; Hernández-Mora *et al.*, 2017; Salazar *et al.*, 2020). Calle y Wünsch (2020) fueron los primeros en analizar QTLs de regulación para SSC y la AT en cerezo. Ambos caracteres presentaron una distribución normal, indicando la naturaleza cuantitativa de ambos caracteres como se observó previamente en melocotonero (Etienne *et al.*, 2002; Eduardo *et al.*, 2010). El análisis genético permitió identificar *loci* en el grupo de ligamiento (GL) 6 asociados con variaciones en la AT (Calle y Wünsch, 2020). Estudios similares en melocotonero identificaron *locus* en los GLs 2, 3, 4, 5 y 6, destacando el GL5 como responsable principal en la regulación de la acidez (Zeballos *et al.*, 2016; Etienne *et al.*, 2002; Hernández-Mora *et al.*, 2017). Para el SSC se ha descrito un *locus* en GL4 en cerezo (Calle y Wünsch, 2020), *loci* en los GLs 2, 4 y 5 en melocotón (Quilot *et al.*, 2004;

Zeballos *et al.*, 2016) y en los GLs 4 y 6 en albaricoque (Salazar *et al.*, 2013). En cerezo, cabe destacar la alta correlación observada entre la fecha de maduración y el SSC, mostrando ambos caracteres *loci* en la misma región del GL4 (Calle y Wüsnch, 2020).

2 OBJETIVOS

Este trabajo tiene como objetivo identificar y cuantificar los azúcares y ácidos orgánicos en familias de cerezo con el fin de estudiar la variabilidad de estos compuestos en dichas familias. Este estudio es la primera etapa del trabajo que se enmarca en el proyecto de investigación ‘Genetics, genomics and breeding in sweet cherry. Phenology and fruit quality’ (Agencia Estatal de Investigación, 2020-2023). Uno de los objetivos de este proyecto es avanzar en la comprensión de la genética y el mecanismo biológico que regula el contenido de estos y otros compuestos en cerezo. Para este trabajo se utilizaron familias de cerezo que provienen de cruzamientos de material vegetal local con cultivares de mejora. Este material está siendo utilizado para estudiar también otros caracteres de interés en la mejora de cerezo (Calle *et al.*, 2020a y 2020b; Calle y Wünsch 2020).

Este objetivo principal se ha dividido en los siguientes subobjetivos:

- Cuantificación del contenido en sólidos solubles y la acidez de todos los individuos.
- Extracción de los azúcares simples y ácidos orgánicos de 259 individuos de cerezo pertenecientes a 5 familias y los correspondientes parentales.
- Identificación y cuantificación del perfil de azúcares y ácidos orgánicos de cada individuo mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (UPLC).
- Análisis de la variabilidad, segregación y correlación de estos compuestos en todo el material y por familia.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

En este trabajo se han utilizado 259 individuos provenientes de cinco familias de cerezo junto con sus respectivos parentales (N=5) y ancestros (N=5) (Figura 3.1). Tres de las familias han sido obtenidas por polinización cruzada; ‘Lambert’ × ‘Cristobalina’ (L×C; N=9), ‘Vic’ × ‘Cristobalina’ (V×C; N=143) y ‘Ambrunés’ × ‘Cristobalina’ (A×C; N=39). Las dos familias restantes provienen de la autopolinización de ‘Cristobalina’ (C×C; N=35) y de ‘BC-8’ (BC88; N=23). ‘BC-8’ es un individuo seleccionado de la familia ‘Brooks’ × ‘Cristobalina’. Todos los individuos provienen de cruzamientos y autopolinizaciones realizados entre los años 2008 y 2010 y junto con los parentales y ancestros se encuentran situados en las parcelas experimentales del CITA de Aragón en Zaragoza (España).

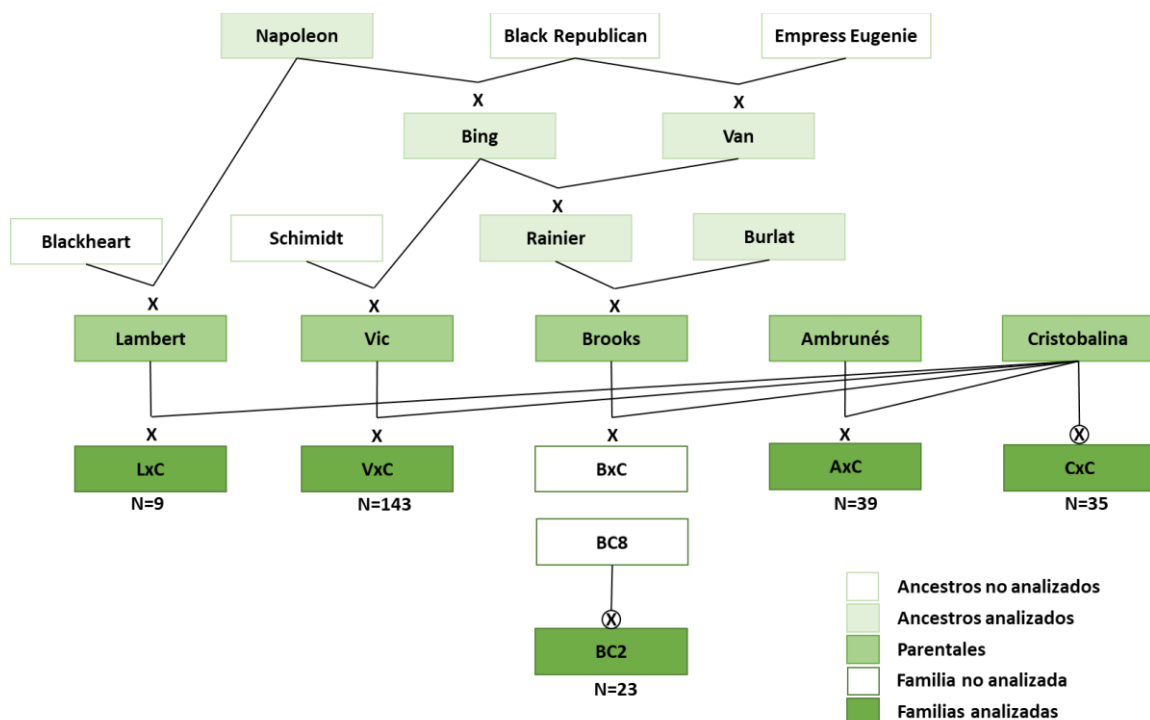


Figura 3.1: Familias, parentales y ancestros usados en este trabajo. Número de individuos (N) en cada familia está indicado.

Los cultivares seleccionados engloban tanto cultivares de mejora ('Vic' y 'Lambert') como cultivares tradicionales españoles ('Cristobalina' y 'Ambrunés') y franceses ('Burlat'). 'Ambrunés' es un cultivar tipo 'Picota', cultivado tradicionalmente en el Valle del Jerte (Cáceres), que se caracteriza por su maduración tardía y su alta firmeza y calidad organoléptica (Alique *et al.*, 2005). 'Cristobalina', que está involucrado en el pedigrí de todas las familias, es originaria de la Costa Mediterránea (Sierra de Espadán, Castellón) y se caracteriza por presentar muy bajos requerimientos de frío, y floración y maduración extra-temprana. Además, 'Cristobalina' es autocompatible (Wünsch y Hormaza, 2004), lo que ha hecho posible el desarrollo de las primeras poblaciones F₂ en la especie (Calle *et al.*, 2020a).

3.2 FENOTIPADO DEL CONTENIDO EN SÓLIDOS SOLUBLES, ACIDEZ TITULABLE, AZÚCARES SIMPLES Y ÁCIDOS ORGÁNICOS

3.2.1 Preparación de la muestra

Previamente a la elaboración de este TFM, 50 frutos de cada individuo fueron recogidos en 2019 (mayo – junio) en su estado óptimo de maduración en base al color, sabor y firmeza del fruto. De estos, se seleccionaron 15 frutos por individuo que fueron deshuesados y almacenados a -20 °C hasta su análisis. Durante este trabajo, para la realización de las extracciones y determinaciones, cada muestra fue descongelada y homogeneizada usando un polytron (POLYTRON ® KINEMATICA; CH-6010Kriens/Lusern) hasta conseguir una muestra homogénea de los 15 frutos.

3.2.2 Determinación del contenido en sólidos solubles y acidez titulable

El contenido en sólidos solubles y la acidez total se determinó para cada muestra usando el homogeneizado de sus frutos. La determinación del contenido en sólidos solubles se llevó a cabo mediante un refractómetro digital (ATAGO; PAL-1) usando una gota del homogenizado. El resultado fue expresado en °Brix.

La acidez total se determinó mediante la valoración con NaOH (0,5N) de 5 g del homogenizado inicial de cereza disueltos en 50 mL de agua destilada usando un valorador automático (Metrohm, Herisau, Swiss) hasta alcanzar un pH final 8,5. La acidez total fue expresada en % de acidez usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ácida} = \frac{\text{mL NaOH} \times N_{\text{NaOH}} \times \text{Peso equivalente ácido málico}}{\text{g de homogenizado}} \times 100$$

3.2.3 Extracción de azúcares simples y ácidos orgánicos

La extracción de los azúcares simples y ácidos orgánicos se realizó siguiendo los protocolos descritos por Sturm, Koron y Štampar (2003) y Usenik, Fabčič y Štampar (2008) con algunas modificaciones. Inicialmente, 5 g de homogenizado y 20 mL de agua ultrapura (MiliQ) fueron mezclados en un tubo Falcon de 50 mL. Esta solución se agitó durante 1 minuto en un vortex, seguida de 1 minuto en el ultraturrax y posteriormente fue sometida durante 5 minutos a ultrasonidos usando un sonicador (BACTOSOMIC 14.2). La solución posteriormente se centrifugó durante 20 min a 9500 rpm (Sigma 3K15). La fase líquida se traspasó a un tubo Falcon limpio y la fase sólida restante fue usada para realizar una segunda extracción añadiendo 10 mL de H₂O MiliQ, siguiendo los mismos pasos que en la primera extracción (1 min de vortex, 1 min de ultraturrax, 5 min de ultrasonidos y 20 min de centrifugado). Finalmente, las fases líquidas de la primera y segunda extracción fueron mezcladas y centrifugadas durante 20 min a 9500 rpm (Figura 3.2).

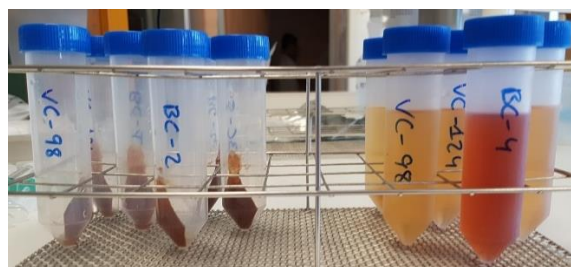


Figura 3.2: Fase sólida (izquierda) y líquida (derecha) obtenidas durante el proceso de extracción

Para terminar de extraer los azúcares, 2 mL de la fase líquida obtenida fueron filtrados con un doble filtro de jeringuilla de poliéster (PET) 1,0/0,45 μm seguido de otro filtro de 0,20 μm a vial de UPLC (Figura 3.3). Para los ácidos orgánicos, la fase líquida obtenida de la extracción se pasó por una columna Supelclean™ LC-SAX SPE 57017 para eliminar impurezas y retener los ácidos. Esta columna fue inicialmente acondicionada con 2 mL de metanol, seguido de 2 mL de agua MiliQ. Una vez acondicionada la columna, se añadieron 3 mL de la fase líquida de extracción previamente

filtrada con un doble filtro de jeringuilla de poliéster (PET) 1,0/0,45 μm . Los ácidos orgánicos retenidos en la columna se fueron eluidos con una disolución tampón 20 mM NaH_2PO_4 y se filtraron utilizando un filtro de 0,20 μm a un vial UPLC. Los viales UPLC con las extracciones de ácidos y azúcares fueron almacenados a -20°C hasta el análisis cromatográfico.

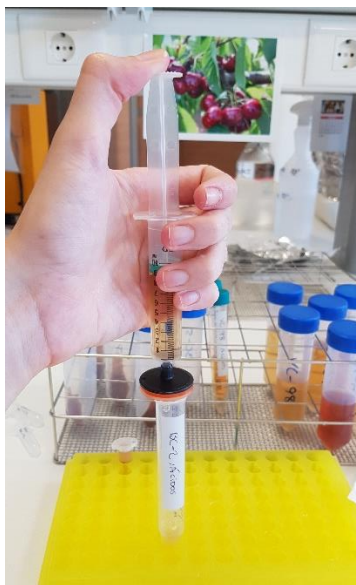


Figura 3.3: Filtración de la fase líquida con un doble filtro de jeringuilla de poliéster (PET) 1,0/0,45 μm .

3.2.4 Análisis cromatográfico

El perfil de azúcares simples y ácidos orgánicos de cada muestra se determinó mediante cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC) usando el equipo Acquity UPLC H-Class (Waters). El análisis cromatográfico de las muestras se realizó en el Parque Científico Tecnológico de Aula Dei en Zaragoza (PCTAD) por personal de la propia institución.

Para la separación de los azúcares simples se utilizó una columna polimérica Flavour Green Ca^{2+} (8 μm , 8 x 8 x 300 mm), con Agua Hipersolv Chomanom calidad UPLC a un flujo de 0,8 mL/min como fase móvil. Para los ácidos orgánicos, se usó una columna ACCQUITY UPLC HSS (1,8 μm , 2,1 x 100mm), y una fase móvil consistente en una disolución tampón 20 mM NaH_2PO_4 a un flujo de 0,2 mL/min. La detección de los azúcares simples se realizó mediante un detector de índice de refracción (IR; Water), mientras que para los ácidos orgánicos se usó un detector de matriz de diodos (ACQUITY

UPLC PDA, Waters). Los compuestos identificados fueron cuantificados frente a estándares externos y su concentración se expresó en g por Kg de peso fresco (PF). Los tiempos de retención aproximados para los azúcares y ácidos analizados se encuentran reflejados en las Tablas 3.1 y 3.2, respectivamente (Sturm, Koron y Stampar 2003; Usenik, Fabčič y Štampar, 2008).

Tabla 3.1: Tiempo de retención de los azúcares.

Azúcares	Tiempo de retención (min)
Sacarosa	6,9
Glucosa	8,2
Fructosa	10,2
Sorbitol	16,2

Tabla 3.2: Tiempo de retención de los ácidos orgánicos.

Ácidos orgánicos	Tiempo de retención (min)
Oxálico	1,2
Quínico	1,6
Málico	2,0
Shikímico	2,3
Cítrico	4,0

3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS

Para cada familia fueron estimadas las medias, desviaciones típicas, máximos y mínimos de cada compuesto. Un análisis inicial de los datos fue llevado a cabo para detectar valores anómalos que fueron eliminados durante posteriores análisis. El procesamiento estadístico de los datos se realizó con el programa estadístico R (R Core Team, 2017).

La comparación de medias entre familias para cada ácido orgánico y azúcar simple identificado fue llevada a cabo mediante análisis de la varianza (ANOVA) y test de Tukey (p -valor $< 0,01$). Además, se estudió la relación entre los compuestos identificados mediante un análisis de correlación de *Spearman* (p -valor $< 0,001$) para todos los individuos de manera conjunta y para cada familia por separado. La normalidad de las distribuciones de cada compuesto en cada familia y considerando todos los individuos de manera conjunta se determinó mediante el test de Shapiro-Wilk (p -valor $< 0,01$).

4 RESULTADOS

4.1 ACIDEZ TITULABLE Y CONTENIDO EN ÁCIDOS ORGÁNICOS

La acidez titulable y la cuantificación del contenido en ácidos orgánicos se determinó en un total de 259 individuos de cerezo. Esta muestra incluyó individuos provenientes de cinco familias diferentes, así como sus respectivos parentales y los ancestros disponibles de dichos cultivares. Tras una primera inspección de los resultados, los valores de acidez titulable para dos individuos (AC-10 y LC-07) fueron eliminados ya que mostraron valores anómalos. De igual manera, los datos de los ácidos orgánicos identificados para tres individuos (AC-39, CC-008 y VC-003) de las familias fueron también eliminados para el resto de análisis. Finalmente, tras el filtrado inicial de los datos, 257 individuos fueron utilizados para los análisis de acidez total y 256 para ácidos orgánicos.

4.1.1 Acidez titulable

En los cultivares analizados (parentales y ancestros), el mayor porcentaje de acidez fue observado en ‘Van’ (1,16%) seguido de ‘Napoleon’ (1,15%) y ‘Rainier’ (1,10%), mientras que ‘Bing’ (0,72%) fue el cultivar con menor porcentaje (Tabla 4.1). A nivel de familias, no se encontraron diferencias significativas en los valores medios de la acidez total entre ellas, con valores medios que oscilaron entre 0,94% (V×C) y 1,04% (L×C) (Tabla 4.2). La familia con el rango más amplio fue V×C, con valores mínimos y máximos de 0,58% (VC-021) y 1,39% (VC-018), respectivamente (Tabla 4.2; Figura 4.1).

4.1.2 Ácidos orgánicos

El análisis de los ácidos orgánicos mediante UPLC permitió la identificación de cinco ácidos diferentes en los frutos de los cultivares y las familias analizadas. Los ácidos orgánicos identificados y cuantificados en este trabajo fueron: ácido málico, ácido quínico, ácido oxálico, ácido cítrico y ácido shikímico (Tabla 4.2; Figura 4.2). El cultivar con mayor acidez titulable, ‘Van’, presentó también la mayor concentración de ácido

málico (4,34 g/Kg PF; Tabla 4.1). Concentraciones superiores a 3 g/kg de PF de este ácido fueron cuantificadas en ‘Brooks’, ‘Napoleon’ y ‘Vic’, mientras que las más bajas se observaron en ‘Rainier’, ‘Bing’ y ‘Cristobalina’, con concentraciones que no superaron los 2 g/Kg PF (Tabla 4.1). El resto de ácidos identificados mostraron contenidos similares entre los cultivares (Tabla 4.1). No obstante, destaca el alto contenido de ácido cítrico en ‘Bing’ (2,63 g/Kg PF) y los bajos contenidos de este ácido en ‘Lambert’ (0,01 g/Kg de PF), ‘Van’ (0,03 g/Kg de PF), ‘Brooks’ y ‘Burlat’ (0,06 g/Kg PF; Tabla 4.1). También es destacable el bajo contenido de ácido oxálico en ‘Ambrunés’ (0,06 g/Kg PF) comparado con los valores observados para el resto de cultivares analizados (0,15 – 0,26 g/Kg PF; Tabla 4.1). En relación a las ratios de distribución de cada compuesto, destaca que en todos los cultivares (excepto ‘Bing’) el ácido mayoritario es el málico, seguido del quínico, oxálico, cítrico y en menor concentración el shikímico. Sin embargo, algunos cultivares como ‘Ambrunés’, ‘Bing’ o ‘Vic’ presentaron concentraciones superiores del ácido cítrico respecto al oxálico. (Tabla 4.1).

Tabla 4.1: Acidez titulable (AT) y contenido medio (g/Kg PF) de los ácidos orgánicos en diez cultivares de cerezo (parentales y ancestros de las familias analizadas).

	AT (%)	Ác. málico	Ác. quínico	Ác. oxálico	Ác. cítrico	Ác. shikímico
‘Ambrunés’	0,81	2,19	0,47	0,03	0,6	0,03
‘Bing’	0,72	1,82	0,35	0,18	2,63	0,01
‘Brooks’	0,95	3,09	0,49	0,18	0,06	0,01
‘Burlat’	0,9	2,48	0,37	0,24	0,06	0,02
‘Cristobalina’	0,77	1,93	0,51	0,25	0,26	0,01
‘Lambert’	0,92	2,59	0,29	0,22	0,01	0,02
‘Napoleon’	1,15	3,71	0,52	0,25	0,21	0,02
‘Rainier’	1,1	1,8	0,32	0,15	0,05	0,02
‘Van’	1,16	4,34	0,52	0,2	0,03	0,02
‘Vic’	0,96	3,25	0,51	0,26	0,41	0,03

Entre las familias, diferencias significativas fueron observadas en todos los ácidos identificados a excepción del ácido cítrico (Tabla 4.2). Para el ácido mayoritario (málico), los valores medios más altos fueron observados en las familias L×C y B×C2, con concentraciones medias de 2,44 y 2,49 g/Kg PF, respectivamente (Tabla 4.2; Figura 4.2). Los concentración medias más bajas de este ácido fueron observadas en C×C (1,67 g/Kg PF), al igual que el valor mínimo (0,25 g/Kg PF; CC-033), en cambio, el contenido máximo fue observado en V×C (4,12 g/Kg PF; VC-003) (Tabla 4.2).

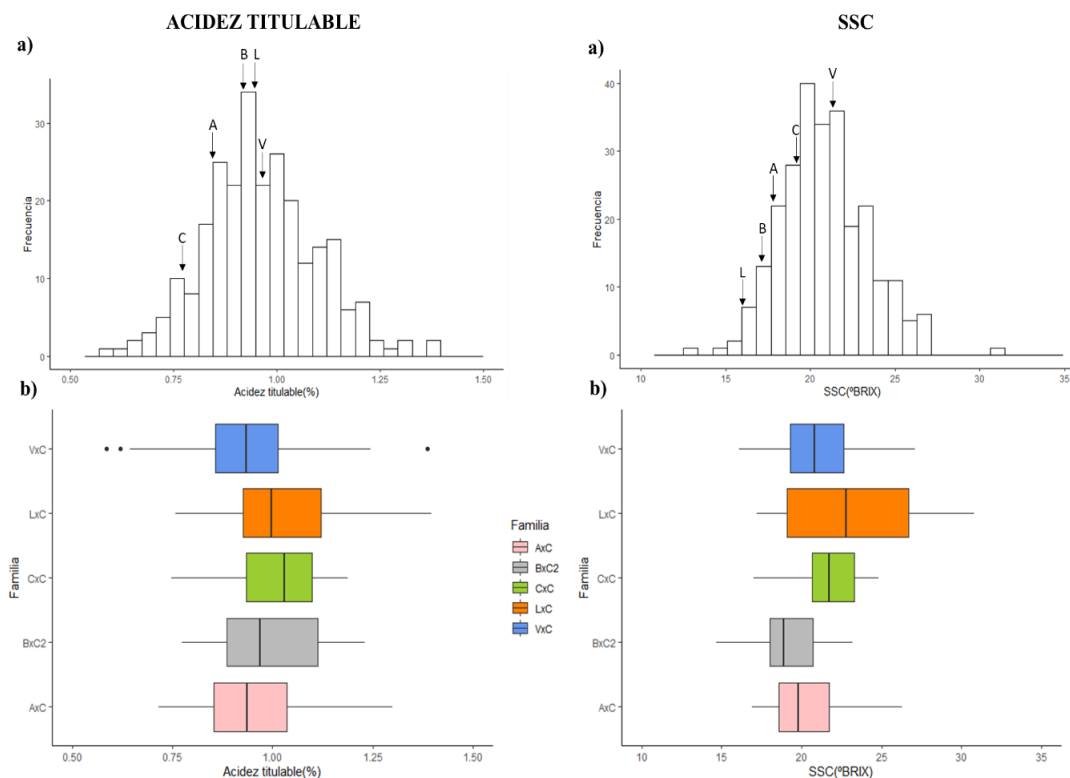


Figura 4.1: **a)** Frecuencia de distribución de la acidez titulable y el contenido en sólidos solubles (SSC) en todos los individuos analizados. Las letras encima de cada flecha indican el valor fenotípico de cada parental; ‘Ambrunés’ (A), ‘Brooks’ (B), ‘Cristobalina’ (C), ‘Lambert’ (L) y ‘Vic’ (V). **b)** Diagramas de cajas para el contenido en sólidos solubles (SSC) y la acidez titulable en cada familia. La línea central de la caja representa la mediana, y los lados izquierdos y derechos de las cajas representan el primer cuartil y tercer cuartil, respectivamente. La línea a izquierda y derecha representan valores inferiores y superiores al primer cuartil y tercer cuartil, respectivamente. Los puntos negros representan valores atípicos.

En cuanto al resto de ácidos, la familia L×C presentó el mayor contenido de ácido quínico (0,58 g/Kg PF), mientras que las concentraciones más bajas se observaron en A×C y B×C2 (0,42 y 0,40 g/Kg de PF, respectivamente) (Tabla 4.2; Figura 4.2). Asimismo, para ácido quínico, la familia L×C también presentó las mayores concentraciones (1,08 g/Kg de PF; LC-13) y A×C los más bajos (0,19 g/Kg de PF; AC-12) (Tabla 4.2; Figura 4.2). En relación al ácido oxálico, diferencias significativas fueron observadas únicamente entre C×C y el resto de familias, siendo C×C la familia que albergó los individuos con las concentraciones más altas de este ácido que llegaron a alcanzar los 0,54 g/Kg de PF (CC-005), mientras que algunos individuos de A×C y B×C2 no llegaron a superar los 0,07 g/Kg de PF (Tabla 4.2; Figura 4.2). Para el ácido cítrico, la familia V×C presentó el mayor concentración media (0,24 g/Kg de PF), siendo la única familia con individuos con valores superiores a 1 g/Kg de PF (Tabla 4.2). Además, el rango de distribución de este compuesto en V×C (0,01-3,26 g/Kg de PF) fue mucho más

amplio en comparación con el resto de familias. Por ejemplo, en la familia C×C, que presentó el segundo rango de distribución más amplio, no se observaron individuos con valores de ácido cítrico superiores a 0,40 g/Kg de PF (Tabla 4.2). Finalmente, para el ácido shikímico, al igual que como se observó en la mayoría del resto de ácidos orgánicos identificados, la familia L×C presentó la mayor concentración media (0,022 g/Kg de PF), y V×C el individuo con mayor contenido en ácido shikímico (0,044 g/Kg de PF; VC-123). La familia con menor contenido en ácido shikímico fue B×C2 (0,013 g/Kg de PF; Tabla 4.2; Figura 4.2).

Tabla 4.2: Contenido medio y desviación estándar de la acidez titulable y de los ácidos orgánicos identificados en cada familia. Los valores mínimos y máximos (Rango) y el número de individuos analizados (N) están también indicados. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,01$) entre familias para cada ácido.

		A×C	B×C2	C×C	L×C	V×C
Acidez titulable (%)	Media	0,96 ± 0,15	0,99 ± 0,14	1,01 ± 0,11	1,04 ± 0,22	0,94 ± 0,13
	Rango	0,72 - 1,30	0,77 - 1,23	0,75 - 1,19	0,76 - 1,40	0,58 - 1,39
	N	38	23	35	8	143
Ác. málico (g/Kg de PF)	Media	1,83 ± 0,65 a,b	2,49 ± 0,93 b	1,67 ± 0,70 a	2,44 ± 1,00 b	2,24 ± 0,66 a,b
	Rango	0,36 - 3,09	0,37 - 3,95	0,247 - 3,21	1,15 - 3,82	0,53 - 4,12
	N	38	23	35	8	142
Ác. quínico (g/Kg de PF)	Media	0,42 ± 0,12 a,b	0,40 ± 0,11 a	0,57 ± 0,15 b,c	0,58 ± 0,31 c	0,56 ± 0,17 b,c
	Rango	0,19 - 0,73	0,21 - 0,62	0,27 - 0,88	0,32 - 1,08	0,272 - 1,04
	N	38	23	35	8	142
Ác. oxálico (g/Kg de PF)	Media	0,23 ± 0,07 a	0,23 ± 0,05 a	0,33 ± 0,08 b	0,26 ± 0,08 a	0,27 ± 0,06 a
	Rango	0,07 - 0,42	0,11 - 0,32	0,19 - 0,54	0,15 - 0,38	0,11 - 0,45
	N	38	23	35	8	142
Ác. cítrico (g/Kg de PF)	Media	0,07 ± 0,04	0,06 ± 0,04	0,14 ± 0,09	0,06 ± 0,04	0,24 ± 0,50
	Rango	0,03 - 0,16	0,01 - 0,16	0,05 - 0,40	0,02 - 0,14	0,01 - 3,26
	N	38	23	34	9	142
Ác. shikímico (g/Kg de PF)	Media	0,016 ± 0,003 a,b	0,013 ± 0,002 a	0,015 ± 0,004 a,b	0,022 ± 0,011 c	0,019 ± 0,007 b,c
	Rango	0,007 - 0,024	0,009 - 0,017	0,008 - 0,023	0,011 - 0,038	0,008 - 0,044
	N	38	23	35	8	142

4.1.3 Análisis de distribución de la acidez titulable y ácidos orgánicos

La distribución de la acidez titulable y el ácido málico se ajustó a la normalidad en todas las familias y en la muestra total (Figura 4.1 y 4.2; Anexo 1 y 2). De igual manera, una distribución normal fue observada para el ácido oxálico en todas las familias, aunque no así al considerar los individuos de las cinco familias de manera conjunta. (Figura 4.2; Anexo 2).

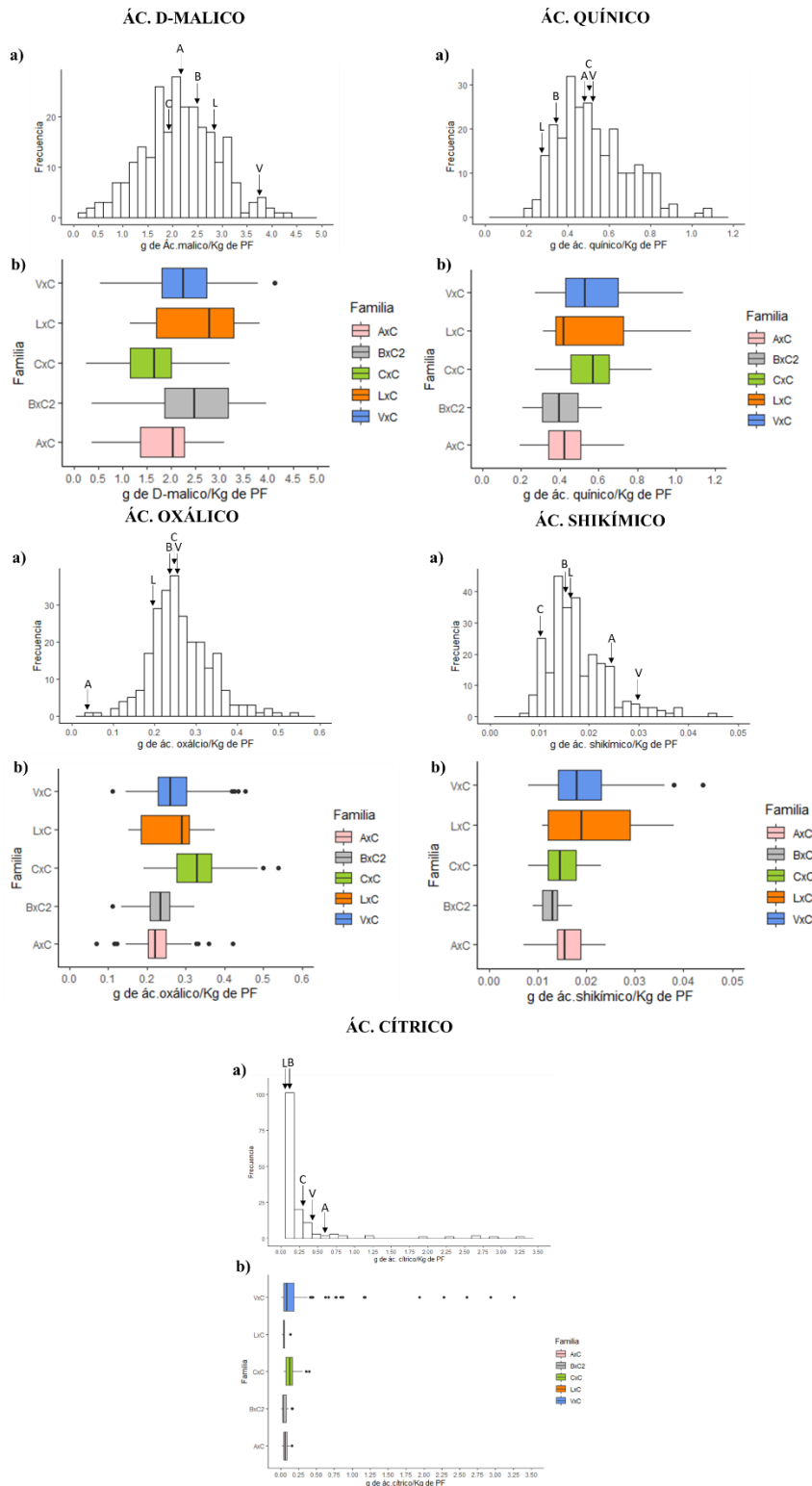


Figura 4.2: a) Frecuencia de distribución del contenido en ácidos orgánicos en todos los individuos analizados. Las letras encima de cada fecha indica el valor fenotípico de cada parental; ‘Ambrunés’ (A), ‘Brooks’ (B), ‘Cristobalina’ (C), ‘Lambert’ (L) y ‘Vic’ (V). b) Diagramas de cajas para el contenido de cada ácido orgánico en cada familia. La línea central de la caja representa la mediana, y los lados izquierdos y derechos de las cajas representan el primer cuartil y tercer cuartil, respectivamente. La línea a izquierda y derecha representan valores inferiores y superiores al primer cuartil y tercer cuartil, respectivamente. Los puntos negros representan valores atípicos.

Para el ácido quínico y el ácido shikímico, la distribución normal sólo fue observada a nivel de cada familia (exceptuando V×C), mientras que para la muestra total no se observó normalidad, ya que ambos ácidos presentan la población sesgada hacia concentraciones bajas de dichos compuestos (Anexo 2 y 4). Para el ácido shikímico, el sesgo fue más evidente, debido a los bajos valores encontrados en las familias A×C, B×C2 y C×C (Anexo 2). Finalmente, el ácido cítrico presentó una distribución muy diferente al resto de ácidos identificados en este trabajo. Ninguna de las familias ni la muestra total cumplieron la normalidad para este ácido. Destaca para este ácido la familia V×C, que presentó una distribución muy sesgada hacia bajas concentraciones, aunque 13 individuos de esta familia alcanzaron valores superiores a 0,50 g/Kg PF (Tabla 4.2; Figura 4.2; Anexo 2 y 4).

4.2 CONTENIDO EN SÓLIDOS SOLUBLES Y AZÚCARES SIMPLES

El SSC y la concentración en azúcares simples se determinó para un total de 259 individuos formados por los ancestros, los parentales y los individuos de las familias estudiadas. Tras una primera revisión de los resultados, se observó que todos los valores de SSC se encontraban dentro del rango esperado, mientras que, para los azúcares simples, 4 individuos (CC-102, VC-021, VC-084 y VC-140) de la muestra total fueron eliminados ya que presentaron valores anómalos. De esta manera, para el resto de análisis de este trabajo, 259 individuos para los SSC y 257 individuos para los azúcares simples fueron considerados.

4.2.1 Contenido en sólidos solubles

A nivel de cultivar, el rango de SSC varió entre genotipos, siendo ‘Brooks’ (22,7), ‘Bing’ (22,1) y ‘Vic’ (21,7 °Brix) los cultivares que presentaron las concentraciones más altas, mientras que el menor contenido se observó en ‘Rainier’ (12,9 °Brix; Tabla 4.3). Para los individuos de las familias, los valores mínimos y máximos oscilaron entre 14,7 (BC2-61) y 30,8 °Brix (LC-13) (Tabla 4.4; Figura 4.3). La familia con mayor contenido medio en SSC fue L×C (22,9 °Brix), mientras que B×C2 presentó la más baja (19,1 °Brix). Asimismo, el rango de distribución más amplio para el SSC se observó en la familia L×C, con un valor mínimo de 17,2 °Brix (LC- 01) y un máximo de 30,8 °Brix (LC-13) (Tabla 4.4; Anexo 3).

Tabla 4.3: Contenido en sólidos solubles (SSC) y contenido medio (g/Kg PF) de los ácidos orgánicos en diez cultivares de cerezo (parentales y ancestros de las familias analizadas).

	SSC (°Brix)	Glucosa	Fructosa	Sorbitol	Sacarosa
‘Ambrunés’	18,5	38,4	36,78	13,36	7,62
‘Bing’	22,1	22,85	19,16	12,58	6,53
‘Brooks’	22,7	47,33	44,75	17,67	10,89
‘Burlat’	17,4	34,97	31,49	8,1	5,73
‘Cristobalina’	19,3	34,2	34,66	11,87	7,31
‘Lambert’	16,5	34,18	23,43	10,32	8,99
‘Napoleon’	20,8	40,61	36,85	17,17	11,06
‘Rainier’	12,9	39,04	37,01	16,43	8,59
‘Van’	21,6	43,32	40,43	14,87	12,28
‘Vic’	21,7	45,83	36,37	17,51	10,03

4.2.2 Azúcares simples

El análisis de los azúcares simples mediante UPLC permitió la identificación de cuatro azúcares simples en los frutos de estos individuos: glucosa, fructosa, sorbitol y sacarosa (Tabla 4.4).

Tabla 4.4: Contenido medio y desviación típica del contenido en sólidos solubles (SSC) y los azúcares simples en cada familia. Los valores mínimos y máximos (Rango) y el número de individuos analizados (N) están también indicados. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,01$) entre familias para cada azúcar.

		A×C	B×C2	C×C	L×C	V×C
SSC (°Brix)	Media	20,5 ± 2,4 a,b	19,1 ± 2,2 a	21,8 ± 1,9 a,b	22,9 ± 4,7 b	21,0 ± 2,4 a,b
	Rango	16,9 - 26,3	14,7 - 23,2	17,0 - 24,8	17,2 - 30,8	16,1 - 27,1
	N	39	23	35	9	143
Glucosa (g/Kg de PF)	Media	37,46 ± 10,06	37,10 ± 3,78	36,62 ± 8,10	40,30 ± 7,93	40,03 ± 5,67
	Rango	23,92 - 69,86	29,96 - 44,78	19,05 - 71,59	29,82 - 50,70	23,39 - 53,41
	N	39	23	34	9	140
Fructosa (g/Kg de PF)	Media	32,50 ± 8,79 a	34,18 ± 4,68 a, b	31,06 ± 7,13 a	33,34 ± 5,30 a, b	36,55 ± 3,96 b
	Rango	20,88 - 64,16	26,03 - 44,21	16,01 - 62,87	27,48 - 39,40	23,39 - 45,75
	N	39	23	34	9	140
Sorbitol (g/Kg de PF)	Media	16,72 ± 5,52 a, b	13,61 ± 4,06 a	17,54 ± 4,77 a,b	18,40 ± 6,31 b	18,40 ± 3,94 b
	Rango	9,92 - 31,81	4,84 - 21,74	8,05 - 30,52	10,19 - 27,25	10,5 - 29,38
	N	39	23	34	9	140
Sacarosa (g/Kg de PF)	Media	6,87 ± 1,91 a	8,83 ± 2,16 b	6,56 ± 1,59 a	8,05 ± 1,48 a,b	8,93 ± 1,65 b
	Rango	3,88 - 12,69	5,16 - 11,98	3,18 - 12,88	5,33 - 10,30	4,64 - 12,58
	N	39	23	34	9	140

Los cultivares con mayor concentración de azúcares simples fueron aquellos que presentaron mayores valores de SSC (Tabla 4.3). El azúcar mayoritario en los cultivares estudiados fue la glucosa, seguido de la fructosa, sorbitol y sacarosa. Este patrón en la concentración de los azúcares identificados fue observado en todos los parentales y ancestros, a excepción de ‘Cristobalina’, que presentó similares concentraciones de glucosa y fructosa (34,2 y 34,7 g/Kg de PF, respectivamente) (Tabla 4.3). Asimismo, el mayor contenido en glucosa (47,3 g/Kg de PF) y fructosa (44,7 g/Kg de PF) lo encontramos en ‘Brooks’, igual que ocurría para el SSC. Mientras que el menor contenido para estos dos azúcares lo encontramos en ‘Bing’ (22,8 y 19,6 g/Kg de glucosa y fructosa, respectivamente). En cuanto al sorbitol, los contenidos más altos se observaron en ‘Brooks’ (17,7), ‘Vic’ (17,5) y ‘Napoleón’ (17,2 g/Kg de PF), siendo ‘Burlat’ el cultivar con menor concentración de este compuesto (8,1 g/Kg de PF; Tabla 4.3). Para la sacarosa, concentraciones ligeramente inferiores a las observadas para el sorbitol fueron cuantificadas en los cultivares analizados, con ‘Van’ (19,3) y ‘Burlat’ (5,7 g/Kg de PF) presentando las concentraciones más altas y bajas respectivamente (Tabla 4.3). Finalmente, destacar el alto contenido en todos los azúcares simples observados en ‘Brooks’ y ‘Napoleón’.

Diferencias significativas entre los valores medios de los azúcares identificados y los SSC fueron observados entre las familias, exceptuando la glucosa (Tabla 4.4). Las familias L×C y V×C presentaron el mayor contenido medio de glucosa (40,3 y 40,0 g/Kg de PF, respectivamente) y C×C el más bajo (36,6 g/Kg de PF). No obstante, no se observaron diferencias significativas en el contenido medio de glucosa entre las familias, donde C×C presentó los valores más bajos y altos en las concentraciones de este azúcar; 19,1 (CC-061) y 71,6 g/Kg de PF (CC-063), respectivamente (Tabla 4.4). Para la fructosa, la familia V×C presentó el contenido medio más elevado (36,5 g/Kg de PF) y las familias C×C y A×C las menores concentraciones (31,1 y 32,5 g/Kg de PF, respectivamente) (Tabla 4.4). Sin embargo, el máximo contenido de fructosa se cuantificó en un individuo de la familia A×C (64,2 g/Kg de PF; AC-01), mientras que el mínimo fue observado en C×C (16,0 g/Kg de PF; CC-061). A pesar de que similares valores medios de glucosa y fructosa se han identificado en este trabajo, la glucosa presentó un rango de distribución ligeramente superior al observado para la fructosa. Para el sorbitol, las concentraciones medias más elevadas se observaron en L×C y V×C (18,4 g/Kg de PF; Tabla 4.4), siendo el individuo AC-39 (A×C; 31,8 g/Kg de PF) el que presentó la mayor concentración de

dicho compuesto. Por el contrario, el individuo BC2-61 (4,8 g/Kg de PF) fue el que presentó menor concentración de sorbitol, siendo la familia B×C2 la que tuvo una menor concentración media de sorbitol (13,6 g/Kg de PF) (Tabla 4.4) Para sacarosa fueron cuantificadas concentraciones medias más bajas que las observadas para el resto de azúcares simples (Tabla 4.4). Las familias V×C (8,9) y B×C2 (8,8 g/Kg de PF) presentaron las concentraciones más altas de sacarosa, mientras que las menores concentraciones fueron observadas en las familias A×C (6,9) y C×C (6,6 g/Kg de PF), al igual que se observó para la fructosa (Tabla 4.4). El contenido máximo y mínimo de sacarosa se identificó en C×C con valores de 3,2 (CC-061) y 12,9 g/Kg de PF (CC-063), respectivamente.

4.2.3 Análisis de distribución del contenido en sólidos solubles y los azúcares simples

El SSC siguió una distribución normal considerando todos los individuos analizados en este trabajo de manera conjunta, así como a nivel de familias a excepción de A×C (Figura 4.1; Anexo 1 y 4). En esta familia (A×C) no se observó que ninguno de los azúcares identificados presentará una distribución ajustada a la normalidad, habiendo una clara segregación hacia individuos con bajas concentraciones de estos azúcares (Figura 4.3; Anexo 3 y 4). Para la glucosa, se observó una distribución ajustada a la normalidad en tres de las cinco familias (B×C2, L×C y V×C). De igual forma, la distribución de la glucosa considerando todos los individuos analizados en este trabajo de manera conjunta tampoco presentó distribución normal, habiendo una segregación sesgada hacia bajos contenidos de dicho compuesto (Anexo 3 y 4). Igualmente, para la fructosa y la sacarosa sólo presentaron distribución normal las familias B×C2, L×C y V×C, mientras que A×C y C×C presentan su población sesgada hacia la izquierda (Anexo 3). Finalmente, el sorbitol presentó una distribución normal considerando todos los individuos de manera conjunta y a nivel de familias, exceptuando C×C (Figura 4.3; Anexo 3 y 4).

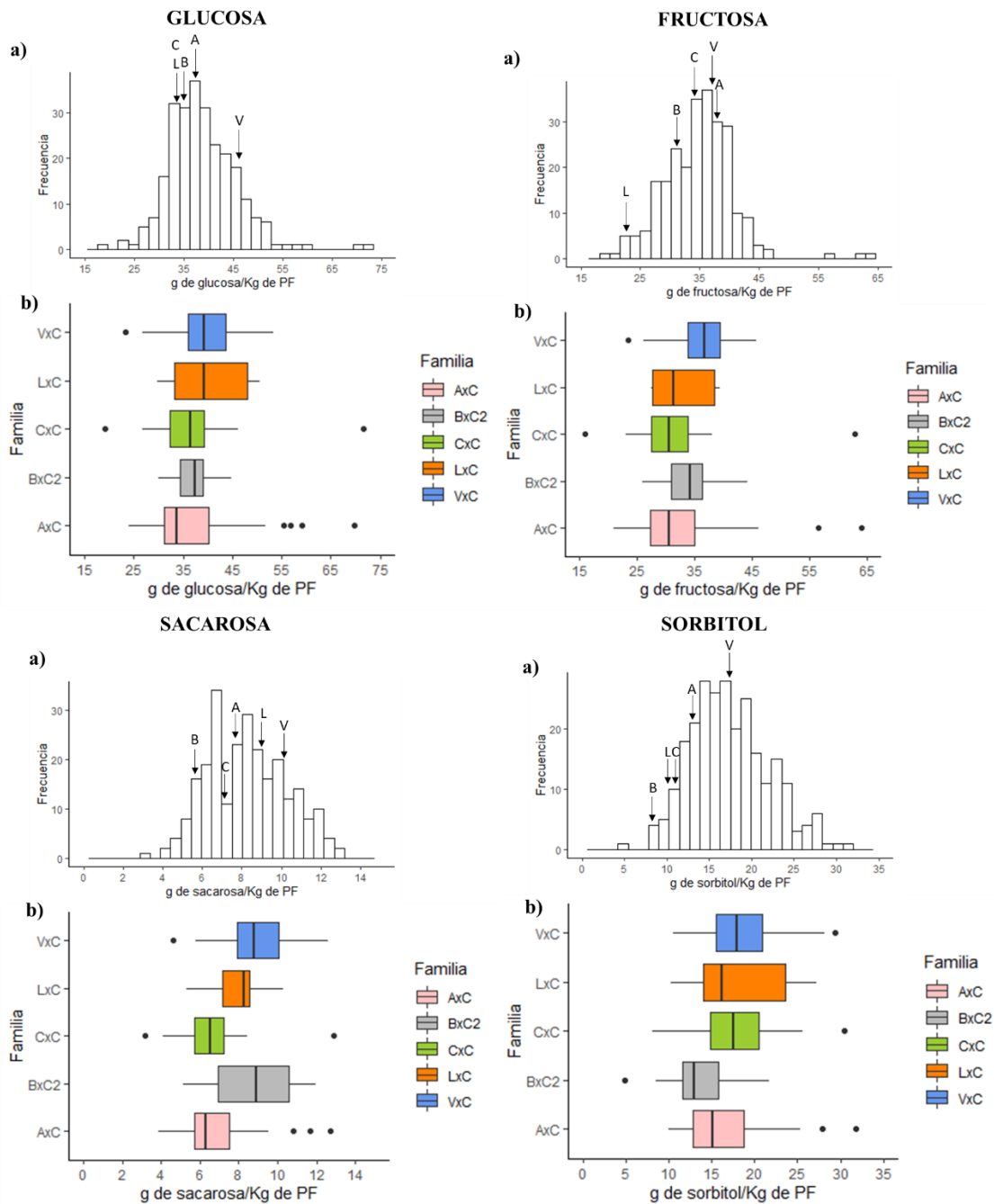


Figura 4.3: a) Frecuencia de distribución del contenido en azúcares en todos los individuos analizados. Letras encima de cada fecha indica el valor fenotípico de cada parental; ‘Ambrunés’ (A), ‘Brooks’ (B), ‘Cristobalina’ (C), ‘Lambert’ (L) y ‘Vic’ (V). b) Diagramas de cajas para el contenido en azúcares simples en cada familia. La línea central de la caja representa la mediana, y los lados izquierdos y derechos de las cajas representan el primer cuartil y tercer cuartil, respectivamente. La línea a izquierda y derecha representan valores inferiores y superiores al primer cuartil y tercer cuartil, respetivamente. Los puntos negros representan valores atípicos.

4.3 ANÁLISIS DE CORRELACIONES

El análisis de correlaciones fue llevado a cabo para todos los compuestos identificados por UPLC, así como para la AT y el SSC. Correlaciones significativas (p -valor $< 0,001$) fueron identificadas para algunos de los compuestos analizados (Figura 4.4). Los niveles de correlación (Coeficiente de correlación de *Spearman*) para aquellas correlaciones significativas variaron entre 0,200 y el 0,859 (Figura 4.4).

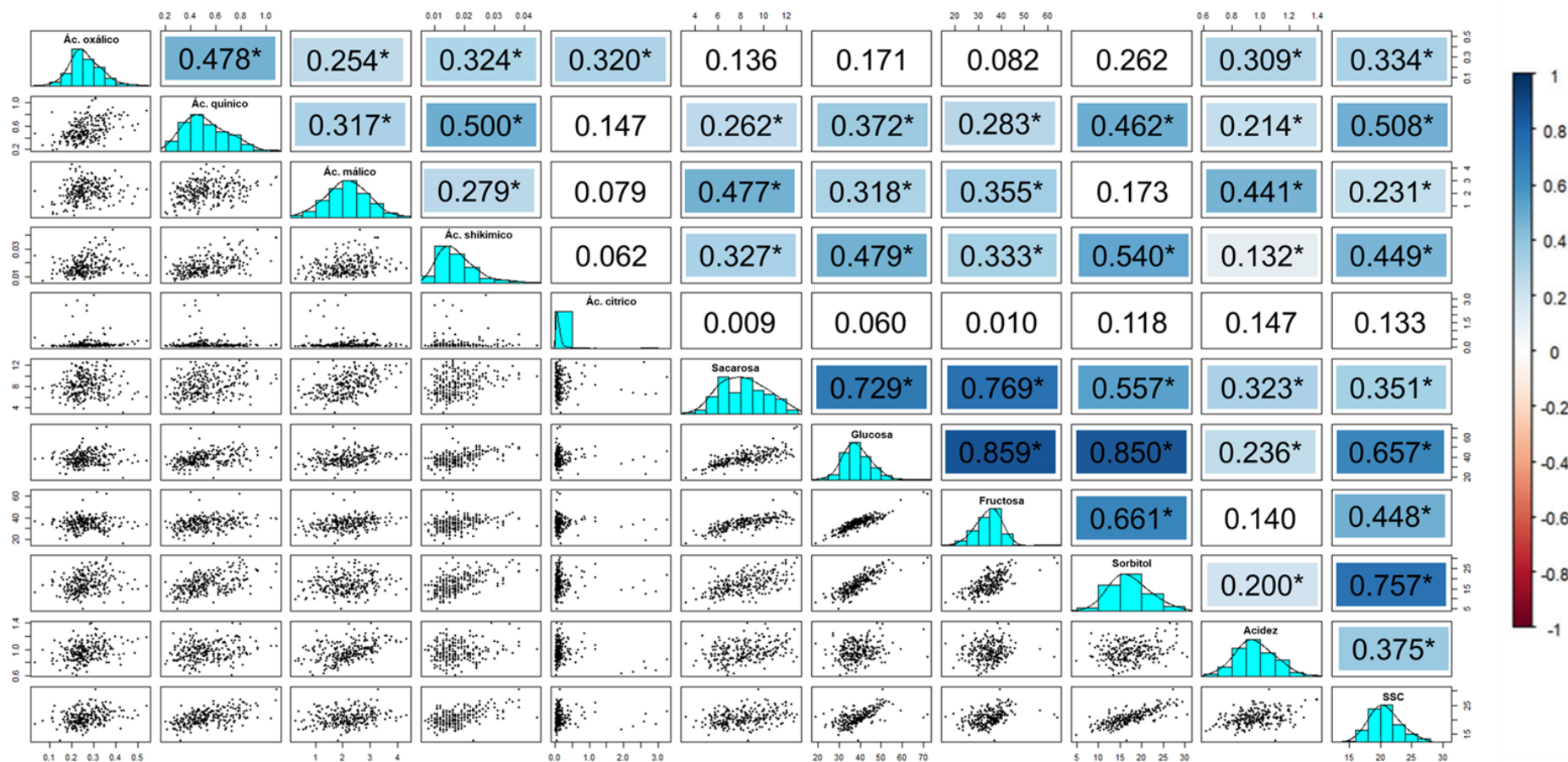
Al analizar todos los individuos de forma conjunta se observó que todos los ácidos simples detectados en este trabajo se encontraron correlacionados entre sí positivamente, a excepción del ácido cítrico que solo presentó una correlación significativa con el ácido oxálico (0,320; Figura 4.4). Entre el resto de ácidos, medios o bajos niveles de correlación fueron observados entre ellos (0,254 - 0,478; Figura 4.4). La correlación más alta entre ácidos fue observada entre el ácido quínico y shikímico (0,500). Asimismo, los ácidos málico y oxálico fueron los dos únicos correlacionados con la acidez titulable (Figura 4.4). Considerando cada una de las familias de manera individual, diferentes patrones de correlación entre ácidos simples fueron observados (Anexo 5). De estas correlaciones, cabe destacar las observadas entre los ácidos málico y oxálico (0,970) en la familia L×C, málico y quínico (0,710) en la familia B×C2, y quínico y oxálico (0,573) en la familia C×C. En la familia V×C, niveles bajos de correlación, pero significativos fueron identificados entre todos los ácidos simples excepto el cítrico (Anexo 5).

Las correlaciones más altas en este trabajo se identificaron entre los cuatro azúcares simples, especialmente entre glucosa y fructosa (0,859); y glucosa y sorbitol (0,850; Figura 4.4). Los cuatro azúcares simples también mostraron una alta correlación entre sí y con el SSC (0,351 – 0,757), especialmente entre glucosa y SSC (0,657); y sorbitol y SSC (0,757; Figura 4). Las altas correlaciones entre los azúcares se repitieron en todas las familias, al igual que ocurre entre los azúcares y los SSC excepto en C×C y L×C (Anexo 5).

Bajos o moderados niveles de correlaciones fueron detectados entre los azúcares simples y los ácidos orgánicos identificados en este trabajo (0,262 - 0,540; Figura 4). Además, destaca la ausencia de correlación entre el ácido cítrico y todos los azúcares simples (Figura 4.4). La correlación más alta entre ambos tipos de compuestos fue observada entre el sorbitol y el ácido shikímico (0,540; Figura 4.4), confirmada a nivel de familias en las poblaciones A×C y V×C (Anexo 5). A nivel de familias, el mayor

número de correlaciones entre ambos tipos de compuestos fue observado en la familia V×C (Anexo 5).

Figura 4.4: Coeficientes de correlación de Spearman, histogramas de distribución de cada compuesto, y gráficas de correlación para cada par de compuestos. Asteriscos indican correlación a nivel de significancia de $p < 0,001$. Correlaciones positivas ($p < 0,001$) están resaltadas en escala de azules.



5 DISCUSIÓN

5.1 ACIDEZ TITULABLE Y ÁCIDOS ORGÁNICOS

5.1.1 Acidez titulable

La acidez titulable representa el grado de acidez del fruto y es importante para la aceptabilidad. En este trabajo se pudo observar que hay diferencias notables entre cultivares, lo que junto con el contenido en azúcares y otros factores definen la calidad del fruto de las distintas variedades analizadas. Por ejemplo ‘Van’, ‘Rainier’ y ‘Napoleon’ tienen mayor acidez que ‘Bing’ o ‘Cristobalina’.

La AT de los individuos analizados en este estudio osciló entre 0,58 y 1,39%, situándose dentro del rango descrito en la literatura (0,5-1,2%) para cultivares procedentes de diferentes áreas geográficas y adaptados a diversas condiciones ambientales (Serradilla *et al.*, 2016; Goncalves *et al.*, 2021). Este rango también se ajustó al obtenido por Chockchaisawasdee *et al.* (2016), que describió una variación de entre 0,5 y 1,3%, en los mismo cultivares que en este estudio (‘Ambrunés’, ‘Bing’, ‘Brooks’, ‘Burlat’, ‘Lambert’ y ‘Van’). En el trabajo realizado por Calle y Wünsch (2020) se analizaron los mismos cultivares y familias que en este trabajo durante dos años consecutivos (campañas 2017 y 2018). Los resultados obtenidos por estos autores son similares a los obtenidos (0,58-1,39%), no obstante, los valores de este trabajo (campaña 2019) son más elevados que en años anteriores. Estas diferencias entre los valores de la AT para un mismo cultivar o individuo han sido atribuidas a diferentes condiciones ambientales entre años (Crisosto, Crisosto y Metheney, 2003).

La segregación de la AT se ha estudiado previamente en las mismas familias (Calle y Wünsch, 2020). Como en este trabajo, en dicho trabajo se observó que para todas ellas la distribución se ajustaba a la normalidad.

5.1.2 Ácidos orgánicos

Entre los ácidos orgánicos identificados en este estudio, el ácido málico, al igual que se observó en otros trabajos de cerezo (Serrano *et al.*, 2005; Usenik, Fabčič y Štampar, 2008), fue el ácido mayoritario. En todos los cultivares analizados, a excepción

de 'Rainier', los cultivares con un mayor contenido de ácido málico mostraban un alto porcentaje de AT, al igual que se observó previamente en otras variedades de cerezo (Ballistreri *et al.*, 2013). Esta relación, confirmada por la alta correlación observada entre el ácido málico y la AT en este trabajo, indican la elevada importancia que tiene este ácido sobre la acidez total y por lo tanto sobre la calidad y la aceptación de los frutos por los consumidores. No obstante, las concentraciones de ácido málico observadas en los individuos analizados en este estudio (0,2 - 4,3 g/Kg de PF) se sitúan por debajo de los presentados en otros estudios de cerezo, en las que concentraciones oscilaron entre 3,5 y 9,5 g/Kg de PF (Girard y Kopp, 1998; Usenik, Fabčič y Štampar, 2008; Serradilla *et al.*, 2016). Hay que destacar que este trabajo analiza por primera vez individuos de varias poblaciones de cerezo, incluyendo familias que derivan de autopolinizaciones, lo que puede ser la causa de los bajos valores de ácido málico observados. De hecho, las concentraciones más bajas de este ácido se observaron en la familia C×C, que proviene de la autopolinización del cultivar tradicional 'Cristobalina', mientras que los valores más altos se observaron en los individuos provenientes de cruzamientos con cultivares de mejora como 'Vic' (Calle *et al.*, 2020b).

Para el resto de ácidos identificados, las concentraciones observadas en este trabajo fueron inferiores a las reportadas para el ácido málico. Este mismo patrón ha sido observado en otros cultivares de cerezo, donde el ácido cítrico, shikímico, oxálico y quínico han sido reportados a concentraciones muy inferiores al ácido málico (Usenik, Fabčič y Štampar, 2008; Ballistreri *et al.*, 2013; Serradilla *et al.*, 2016). El contenido de ácido cítrico fue similar al observado por otros autores como Usenik, Fabčič y Štampar (2008) en el que el rango osciló entre 0,11 - 0,54 g/Kg de PF. No obstante, individuos de la familia V×C presentaron contenidos superiores a 1 g/Kg de PF, al igual que se han observado en otros estudios para el cultivar 'Burlat' que presentó concentraciones superiores a 3,5 g/Kg de PF (Ballisteri *et al.*, 2013; Usenik, Fabčič y Štampar, 2008). Las concentraciones de ácido shikímico medidas en este trabajo (0,007 - 0,044g/Kg de PF) fueron prácticamente idénticas a las de otros estudios en los que el rango para este ácido varió entre 0,006 y 0,044 g/Kg de PF (Usenik, Fabčič y Štampar, 2008; Ballistreri *et al.*, 2013). Cabe destacar que los trabajos previos en cerezo sobre ácidos orgánicos no identificaron los ácidos quínico y oxálico reportados aquí (Serrano *et al.*, 2005; Usenik, Fabčič y Štampar, 2008; Ballistreri *et al.*, 2013). Sin embargo, en estos trabajos previos, dos ácidos más a los identificados en este trabajo fueron detectados, el ácido fumárico y

el ácido ascórbico, aunque ambos a concentraciones inferiores a 0,008 g/Kg de PF (Usenik, Fabčič y Štampar, 2008; Serrano *et al.*, 2005; Ballistreri *et al.*, 2013). Estos cuatro ácidos orgánicos (quínico, oxálico, fumárico y ascórbico) están presentes a muy bajas concentraciones en las cerezas por lo que es habitual que, dependiendo del material vegetal analizado, así como las técnicas cromatográficas usadas, éstos puedan ser detectados o no.

No se han encontrado estudios previos en la especie sobre las distribuciones y las segregaciones de los ácidos orgánicos. No obstante, en otras especies del género *Prunus*, como melocotonero, albaricoquero o ciruelo estudios de estos compuestos a nivel de familias se han llevado a cabo (Etienne *et al.*, 2002; Quilot *et al.*, 2004). En este trabajo el ácido málico presentó una distribución normal en todas las familias, no obstante, en otras especies, diferentes patrones de segregación han sido identificados. En el estudio realizado por Quilot *et al.* (2004), una distribución normal para el ácido málico fue observada, sin embargo, en otro estudio llevado a cabo también en melocotonero, ni el ácido málico ni la acidez titulable presentaron una distribución ajustada a la normalidad, ya que ambas distribuciones estaban sesgadas hacia valores bajos (Etienne *et al.*, 2002). En este trabajo, para los ácidos quínico y shikímico distribuciones normales fueron observadas en todas las familias, exceptuando V×C. Esta distribución normal también se ha visto en los estudios de familias de melocotonero (Etienne *et al.*, 2002; Quilot *et al.*, 2004). De igual forma, la fuerte segregación distorsionada hacia valores bajos observada para el ácido cítrico ha sido reportada en estudios previos en melocotonero (Etienne *et al.*, 2002; Quilot *et al.*, 2004).

Estas distribuciones normales en los ácidos mayoritarios identificados en este trabajo destacan la naturaleza cuantitativa de estos compuestos y su control poligénico. No obstante, segregaciones hacia bajas concentraciones en algunos de ellos muestran la selección natural que se ha realizado hacia cultivares con bajas acidez y que por lo tanto presentan mejores características organolépticas (Calle y Wünsch, 2020; Quilot *et al.*, 2004; Salazar *et al.*, 2013). Este hecho se observa claramente para el ácido cítrico, que ha sido relacionado como el ácido que mayor influencia tiene en el sabor ácido de la fruta, por lo que las distribuciones observadas en las familias de este trabajo muestran segregaciones hacia bajas concentraciones y por lo tanto hacia variedades con mejor sabor y calidad organoléptica.

5.2 CONTENIDO EN SÓLIDOS SOLUBLES Y AZÚCARES

5.2.1 Contenido de sólidos solubles (SSC)

Este carácter se ha descrito en la bibliografía que varía ampliamente dependiendo del cultivar, siendo uno de los principales parámetros relacionados con la calidad de las cerezas y su aceptación por parte de los consumidores (Crisosto, Crisosto y Ritenour, 2002). En este estudio, el SSC presentó un rango amplio, entre 15-27 °Brix. Varios estudios presentaron, en comparación, valores más bajos que oscilaron entre 12-20 °Brix (Papapetros et al., 2018; Hayaloglu y Demir, 2015; Serradilla et al., 2017). Mientras que los valores reportados por Gonçalves *et al.* (2021) y Chockchaisawasdee *et al.* (2016) se ajustaron más a nuestro estudio, con un rango más amplio que varió entre 12-24 °Brix. Se observaron valores similares de SSC para los mismos cultivares analizados en este estudio y en Chockchaisawasdee *et al.* (2016), a excepción de algunos cultivares como el caso de ‘Van’ y ‘Bing’ que presentaron contenidos superiores en este trabajo. También se encontraron contenidos similares de SSC en Calle y Wünsch (2020), exceptuando ‘Lambert’ y ‘Brooks’ que presentaron las mayores diferencias entre ambos trabajos. A nivel de familias, la comparación de los SSC observados en 2017 y 2018 (Calle y Wünsch, 2020) y los cuantificados en este trabajo que oscilaron entre 19,1 - 22,9 °Brix (año 2019), mostraron rangos y patrones muy similares, siendo la familia B×C2 la que obtuvo un menor contenido todos los años analizados.

Estas variaciones en los contenidos de SSC entre cultivares y años han sido relacionadas con diferentes factores. Por ejemplo, correlaciones entre el SSC y la fecha de maduración han sido encontradas en cerezo y melocotonero destacando la influencia de la fecha de maduración sobre el contenido total de azúcares (Calle y Wünsch, 2020; Etienne *et al.*, 2002). Además, otro estudio en albaricoquero también correlacionó ambos parámetros, sugiriendo que las variedades con fechas de maduración más tardías dan lugar a frutos con mayor contenido en azúcares (Salazar *et al.*, 2013). La influencia de diferentes factores ambientales en distintos años también se ha observado en otras especies de *Prunus*, como ciruelo japonés (*Prunus salicina* Lindl.), dando lugar a variaciones interanuales en el SSC (Salazar *et al.*, 2020).

En nuestro estudio, el SSC presentó una distribución normal en el conjunto de todos los individuos y en todas las familias analizadas, excepto en la familia A×C. En el estudio de Calle y Wünsch (2020), en el que analizaban las mismas familias, todas ellas

presentaron una distribución normal. La misma segregación normal fue observada en otras poblaciones de *Prunus* (Etienne *et al.*, 2002; Quilot *et al.*, 2004; Salazar *et al.*, 2013 y 2020) destacando la naturaleza cuantitativa y poligénica de este carácter.

5.2.2 Azúcares simples

Igual que en otros estudios en cerezo, la glucosa ha sido el azúcar simple presente en mayor concentración seguido de la fructosa, el sorbitol y la sacarosa (Serrano *et al.*, 2005; Usenik, Fabčič y Štampar, 2008). Sin embargo, los contenidos de glucosa y fructosa observados en este trabajo fueron inferiores a los observados previamente en otros estudios. El rango en la concentración de glucosa observado en este trabajo fue similar al reportado por Ballistreri *et al.* (2013) que varió entre 17 y 89 g/Kg de PF. Sin embargo, otros estudios mostraron concentraciones de glucosa más altas, llegando en algunos casos hasta los 160 g/Kg de PF (Usenik, Fabčič y Štampar, 2008; Girard y Koop, 1998; Hayaloglu y Demir, 2015; Papapetros *et al.*, 2018). No obstante, hay que destacar que estas concentraciones tan altas sólo se han encontrado en cultivares tradicionales griegos, ninguno de ellos presente en este estudio. De igual forma, contenidos inferiores a los descritos previamente en otros estudios de cerezo (44-76 g/Kg de PF), se han observado en ese trabajo para la fructosa (Ballistreri *et al.*, 2013; Girard y Koop, 1998; Hayaloglu y Demir, 2015). También es importante destacar que los rangos obtenidos para la fructosa son menos amplios que los que presenta la glucosa, y que aquellos genotipos que presentaban un mayor contenido de glucosa presentaban de igual manera un alto contenido en fructosa como se han observado previamente en otros estudios en cerezo (Ballistreri *et al.*, 2013; Usenik, Fabčič y Štampar, 2008).

De manera general, bajas concentración de glucosa y fructosa se han encontrado en las muestras analizadas en este trabajo. Por ejemplo, ‘Burlat’ presentó 35 y 31 g/Kg de PF de glucosa y fructosa respectivamente en este estudio, mientras que en trabajos previos hasta 80 g/Kg de PF de estos compuestos fueron cuantificados (Usenik, Fabčič y Štampar, 2008; Ballistreri, *et al.*, 2013). En otros cultivares como ‘Van’, ‘Bing’ y ‘Lambert’ hasta el doble de concentraciones a la observadas aquí se han cuantificado (Girard y Koop, 1998). Además, cabe destacar que todas las familias de este trabajo proceden de autopolinización y cruzamientos con ‘Cristobalina’, que es un cultivar tradicional de España de maduración extra-temprana y se ha visto una relación entre bajas

concentraciones de azúcares y maduración temprana (Calle y Wünsch, 2020). Estudios realizados en melocotonero correlacionaron contenidos de fructosa y glucosa con el periodo de desarrollo del fruto (Etienne *et al.*, 2002).

La sacarosa y el sorbitol, al igual que se observó en trabajos previos, presentaron concentraciones inferiores a la fructosa y glucosa. El rango obtenido para el sorbitol se ajusta a los descritos en la bibliografía 4 – 44 g/Kg (Usenik, Fabčič y Štampar, 2008; Ballistreri *et al.*, 2013), así como la sacarosa que tanto en este estudio como en trabajos previos no superó los 13 g/Kg de PF (Usenik, Fabčič y Štampar, 2008; Hayaloglu y Demir, 2015).

Estas ligeras diferencias observadas entre las concentraciones de los azúcares simples entre los mismos cultivares en diferentes años y localizaciones puedan estar relacionadas con las diferencias condiciones ambientales. Han sido varios los estudios que han mostrado el efecto que tienen la temperatura, humedad relativa y/o radiación solar sobre el contenido final de estos compuestos (Morandi *et al.*, 2008; Calle y Wünsch, 2020), dando lugar a grandes diferencias en la concentración de estos azúcares dependiendo del lugar y año.

Para el caso de algunos azúcares simples, como la glucosa y la fructosa, no se observó una distribución ajustada a la normalidad, al igual que se ha observado previamente en otros estudios del género donde distribuciones bimodales o sesgadas hacia concentraciones bajas de dichos compuestos se han encontrado (Etienne *et al.*, 2002; Quilot *et al.*, 2004).

5.3 CORRELACIONES ENTRE AZÚCARES Y ÁCIDOS

Débiles correlaciones positivas fueron observadas entre los ácidos orgánicos identificados. De ellos, el ácido málico, fue el que presentó la correlación positiva más elevada con la AT. Esta alta correlación también se ha observado en otras especies de *Prunus* (Etienne *et al.*, 2002; Salazar *et al.*, 2013), ratificando la alta influencia del ácido málico en la acidez total (Serradilla *et al.*, 2017) y por lo tanto en el sabor final del fruto. De igual manera, en este estudio todos los azúcares se encontraban correlacionados entre sí y el SSC, destacando la elevada influencia de estos azúcares sobre el dulzor de las

cerezas. Una correlación positiva entre estos mismos azúcares y el SSC ha sido descrita en otras especies del género *Prunus* (Zeballos *et al.*, 2016; Etienne *et al.*, 2002).

En este trabajo una débil correlación positiva y significativa entre la AT y el SSC fue detectada en el conjunto de todos los individuos, sin embargo, esta correlación sólo se detectó a nivel familias en V×C. Una correlación igualmente débil fue observada entre ambos caracteres para el mismo material vegetal en los años 2017 y 2018, donde una baja o nula correlación fue reportada (Calle y Wünsch, 2020). De igual manera, en otras poblaciones de cerezo, ausencia de correlación entre ambos caracteres se ha observado (Piaskowski *et al.*, 2018). En otras especies de *Prunus* se ha observado una ligera correlación negativa o la ausencia de correlación entre la AT y el SSC (Etienne *et al.*, 2002; Salazar *et al.*, 2013). De esta manera, no se ha encontrado una correlación alta entre la acidez y el SSC dentro del género *Prunus*. Esto puede ser por el diferente control genético previamente descrito en cerezo para estos compuestos (Calle y Wünsch, 2020). Para SSC se ha identificado un QTL (*Quantitative Trait Locus*) estable en el grupo de ligamiento 4, el cual explica entre el 22 - 34% de la variación fenotípica. Mientras que, para la AT se ha descrito otro QTL en el grupo de ligamiento 6 que explica hasta el 21% de la variación fenotípica (Calle y Wünsch, 2020). De esta manera, la ausencia de correlaciones entre los azúcares y los ácidos obtenidas a nivel familiar y el diferente control genético apoya la hipótesis de la independencia entre ambos tipos de compuestos.

6 CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos han evidenciado la gran variabilidad existente en el perfil de ácidos orgánicos y azúcares simples entre diferentes cultivares e individuos procedentes de cinco familias de cerezo, revelando una gran diversidad genética dentro de la especie para estos compuestos. Esta alta variabilidad, también se asocia a la distribución normal observada en la mayoría de caracteres estudiados en las familias, que sugieren una regulación cuantitativa de estos compuestos como ha sido observado previamente en otras especies del género *Prunus*.

La alta correlación observada entre el ácido málico y la acidez total, así como las altas concentraciones de este compuesto en comparación con el resto de ácidos identificados, confirman al ácido málico como principal compuesto relacionado con la acidez en las cerezas. De igual forma, las altas correlaciones entre la glucosa y fructosa con el SSC, junto con las elevadas concentraciones totales de estos dos azúcares, revelan la influencia de la glucosa y fructosa en el sabor dulce de los frutos y por lo tanto su papel en la aceptación por parte de los consumidores. Destaca la ausencia de correlación entre el SSC y la AT, que unida a las correlaciones observadas entre cada grupo de compuestos (ácidos orgánicos y azúcares simples) por separado, manifiestan diferente control genético y ruta de biosíntesis entre azúcares y ácidos.

Este trabajo es parte del estudio de la herencia y la regulación genética de los azúcares simples y ácidos orgánicos en cerezo que se desarrolla en el CITA de Aragon. Los resultados de este trabajo serán la base para el mapeo de QTLs responsables de estos caracteres en este material. Estos trabajos permitirán avanzar en el conocimiento del control genético de estos caracteres y por tanto en la mejora del cultivo, aumentando la calidad de los frutos y por tanto la aceptabilidad del consumidor.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Acero, N., Gradillas, A., Beltrán, M., García, A. y Muñoz Mingarro, D. (2019). “Comparison of phenolic compounds profile and antioxidant properties of different sweet cherry (*Prunus avium* L.) varieties”. *Food Chemistry*, 279, pp. 260–271. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.008>
- Alique, R. Zamorano, J., Martínez M.A. y Alonso, J. (2005). “Effect of heat and cold treatments on respiratory metabolism and shelf-life of sweet cherry, type Picota cv ‘Ambrunés’”. *Postharvest Biology and Technology*, 35(2), pp. 153–165. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.07.003>.
- Ballistreri, G., Continella, A., Gentile, A., Amenta, M., Fabroni, S. y Rapisarda, P. (2013). “Fruit quality and bioactive compounds relevant to human health of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in Italy”. *Food Chemistry*, 140(4), pp. 630–638. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.024>
- Blanca, G. y Díaz de la Guardia, C. (1997). “Amygdaloideae”. En Castroviejo, S., Aedo, C., Laínz, M., Muñoz, F., Nieto, G., Paiva, J. y Benedí, C (coord). *Flora Ibérica* pp. 445–446). Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid. Disponible en http://www.floraiberica.es/floraiberica/texto/pdfs/06_087_28
- Blando, F. y Oomah, B. D. (2019). “Sweet and sour cherries: Origin, distribution, nutritional composition and health benefits”. *Trends in Food Science & Technology*, 86, pp.517–529. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.052>
- Bortiri, E., Oh, S.H., Gao, F.Y. y Potter, D. (2002). “The phylogenetic utility of nucleotide sequences of sorbitol 6-phosphate dehydrogenase in *Prunus* (Rosaceae).” *American Journal of Botany*, 89(10), pp. 1697–1708. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.10.1697>
- Bujdosó, G. y Hrotkó, K. (2019). “Cultivars and rootstocks in the cherry producing countries.” *Acta Horticulturae*, 1235, pp. 207-212. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2019.1235.27>
- Cai, L., Quero-García, J., Barreneche, T., Dirlewanger, E., Sasaki, C. y Iezzoni, A. (2019). “A fruit firmness QTL identified on linkage group 4 in sweet cherry (*Prunus avium* L.) is associated with domesticated and bred germplasm”. *Scientific Reports* 9, 5008. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41484-8>
- Calle, A., Balas, F., Cai, L., Iezzoni, A., López-Corrales, M., Serradilla, M.J., y Wunsch, A. (2020a). “Fruit size and firmness QTL alleles of breeding interest identified in a sweet cherry ‘Ambrunés’ × ‘Sweetheart’ population”. *Molecular Breeding* 40, pp. 86 <https://doi.org/10.1007/s11032-020-01165-1>

- Calle, A., Cai, L., Iezzoni, A., y Wünsch A. (2020b). “Genetic dissection of bloom time in low chilling sweet cherry (*Prunus avium* L.) using a multi-family QTL approach”. *Frontiers in Plant Science* 10, 1647. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01647>
- Calle, A. y Wünsch, A. (2020). “Multiple-population QTL mapping of maturity and fruit-quality traits reveals LG4 region as a breeding target in sweet cherry (*Prunus avium* L.)”. *Horticulture Research* 7, 127. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-00349-2>
- Campoy, J.A., Le Dantec, L., Barreneche, T., Dirlwanger, E. y Quero-García, J. (2015). “New insights into fruit firmness and weight control in sweet cherry”. *Plant Molecular Biology Reporter* 33(4), pp.783–796. <https://doi.org/10.1007/s11105-014-0773-6>
- Cao, J., Jiang, Q., Lin, J., Li, X., Sun, C., y Chen, K. (2015). “Physicochemical characterisation of four cherry species (*Prunus* spp.) grown in China”. *Food Chemistry*, 173, pp. 855–863. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.094>
- Carrasco, B., Meisel, L., Gebauer, M., Garcia-Gonzales, R., y Silva, H. (2013). “Breeding in peach, cherry and plum: from transcriptomic and genomic perspective”. *Biological Research*, 43 (3), pp. 219-230. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602013000300001>
- Chauving, M., Withing, M. y Ross C.F. (2009). “The influence of harvest time on sensory properties and consumer acceptance of sweet cherries”. *Horticulture Technology* 19(4), pp. 748–754. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.19.4.748>
- Chockchaisawasdee, S., Golding, J. B., Vuong, Q.V., Papoutsis, K. y Stathopoulos, C.E. (2016). “Sweet cherry: Composition, postharvest preservation, processing and trends for its future use”. *Trends in Food Science and Technology*, 55, pp.72–83. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.07.002>
- Cozzolino, R., Martignetti, A., Cefola, M., Pace, B., Capotorto, I., De Giulio, B., Montemurro, N. y Pellicano, M.P. (2019). “Volatile metabolites, quality and sensory parameters of ‘Ferrovia’ sweet cherry cold stored in air or packed in high CO₂ modified atmospheres”. *Food Chemistry*, 286, pp. 659–668. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.022>
- Crisosto, C. H., Crisosto, G. M. y Metheney, P. (2003). “Consumer acceptance of ‘Brooks’ and ‘Bing’ cherries is mainly dependent on fruit SSC and visual skin color”. *Postharvest Biology and Technology*, 28(1), pp. 159–167. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(02\)00173-4](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00173-4)
- Crisosto, C.H., Crisosto, G.M. y Ritenour, M.A. (2002). “Testing the reliability of skin color as an indicator of quality for early season ‘Brooks’ (*Prunus avium* L.) cherry”. *Postharvest Biology and Technology*, 24, pp.147. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(01\)00190-9](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00190-9)
- De Franceschi, P., Stegmeir, T., Cabrera, A., van der Knapp, E., Rosyara, U.R., Sebolt, A.M., Dondini, L., Dirlwanger, E., Quero-García, J., Campoy, J.A. y Iezzoni, A.F. (2013). “Cell

number regulator genes in *Prunus* provide candidate genes for the control of fruit size in sweet and sour cherry”. *Molecular Breeding* 32, pp. 311-326. <https://doi.org/10.1007/s11032-013-9872-6>

Dirlewanger, E., Claviere, J., Wünsch, A. y Iezzoni, A. F. (2007). “Cherry”. En Kole (Coord.) *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, Volume 4: Fruits and Nuts*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, pp. 103–116

Eduardo, I., Pacheco, I., Chietera, G., Bassi, D., Pozzi, C., Vecchietti, A., y Rossini, L. (2011). “QTL analysis of fruit quality traits in two peach intraspecific populations and importance of maturity date pleiotropic effect”. *Tree Genetics & Genomes*, 7(2), pp. 323-335. <https://doi.org/10.1007/s11295-010-0334-6>

Esti, M., Cinquanta, L., Sinesio, F., Moneta, E. y Di Matteo, M. (2002). “Physicochemical and sensory fruit characteristics of two sweet cherry cultivars after cool storage”. *Food Chemistry* 76, pp. 399–405. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00231-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00231-X)

Etienne C., Rothan C., Moing A., Plomion C., Bodénès C., Svanella-Dumas L., Cosson P., Pronier V., Monet R. y Dirlewanger E. (2002). “Candidate genes and QTLs for sugar and organic acid content in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]”. *Theoretical and Applied Genetics*, 105, pp.145-159. <https://doi.org/10.1007/s00122-001-0841-9>.

European Forest Genetic Resources Programme (2020) Barcelona: EUFORGEN. Disponible en: <http://www.euforgen.org/species/prunus-avium/> [2020]

Faniadis, D., Drogoudi, P. D., y Vasilakakis, M. (2010). “Effects of cultivar, orchard elevation, and storage on fruit quality characters of sweet cherry (*Prunus avium* L.)”. *Scientia Horticulturae*, 125(3), pp. 301–304. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.04.013>

Food and Agriculture Organization of the United Nations (2020). Database FAOSTAT. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>

Garcia-Montiel, F., Serrano, M., Martinez-Romero, D., y Albuquerque, N. (2010). “Factors influencing fruit set and quality in different sweet cherry cultivars”. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 8 (4), pp. 1118-1128. <http://doi.org/10.5424/sjar/2010084-1238>

Girard, B. y Kopp, T.G. (1998). “Physicochemical characteristics of selected sweet cherry cultivars”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(2), pp. 471–476. <https://doi.org/10.1021/jf970646j>

Gonçalves, A.C., Campos, G., Alves, G., Garcia-Viguera, C., Moreno, D.A. y Luís R. Silva, L.R. (2021). “Physical and phytochemical composition of 23 Portuguese sweet cherries as conditioned

by variety (or genotype)". *Food Chemistry*, 335.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127637>.

González-Gómez, D., Lozano, M., Fernández-León, M. F., Bernalte, M. J., Ayuso, M. C., y Rodríguez, A. B. (2010). "Sweet cherry phytochemicals: Identification and characterization by HPLC-DAD/ESI-MS in six sweet-cherry cultivars grown in Valle del Jerte (Spain)". *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6), pp. 533–539. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.02.008>

Hayaloglu A.A. y Demir N. (2015). "Physicochemical characteristics, antioxidant activity, organic acid and sugar contents of 12 sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in Turkey". *Journal of Food of Science*, 80(3), pp.564-70. Doi:10.1111/1750-3841.12781.

Hernández Mora, J.R., Micheletti, D., Bink, M., Van de Weg, E., Cantín, C., Nazzicari, N., Caprera, A., Dettori, MT., Micali, S., Banchi, E., Campoy, J.A., Dirlwanger, E., Lambert, P., Pascal, T., Troglio, M., Bassi, D., Rossini, L., Verde, I., Quilot-Turion, B., Laurens, F., Arús, P. y Aranzana, M.J. (2017). "Integrated QTL detection for key breeding traits in multiple peach progenies." *BMC Genomics* 18(1), p-404. Doi: 10.1186/s12864-017-3783-6.

Iezzoni, A., Wunsch, A., Höfer, M., Giovannini, D., Jensen, M., Quero-García, J., Campoy, J., Vokurka, A. y Barreneche, T. (2017). "Biodiversity, germplasm resources and breeding methods". En: Quero-García, J., Iezzoni A. y Palawska, L.G. (Coord) *Cherries: Botany production and Uses* (CAB International): pp.36-57.

McCune, L. M., Kubota, C., Stendell-Hollis, N. R. y Thomson, C. A. (2011). "Cherries and health: A review." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(1), pp. 1–12.
<https://doi.org/10.1080/10408390903001719>

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2020). *Composición nutricional Cereza*. Madrid: MAPA. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/cereza_tcm30-102359.pdf [2020]

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2020). "Fruta de hueso: análisis de campaña 2018". Madrid: MAPA. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/181219analisisexpostfdh_2018tcm30-500906.pdf [2020]

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2019). "Superficies y Producciones de Cultivo". *Anuario de estadística agroalimentaria 2017, Capítulo 7*. Madrid: MAPA. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/2018/default.aspx?parte=3&capitulo=07&grupo=9&seccion=9> [2020]

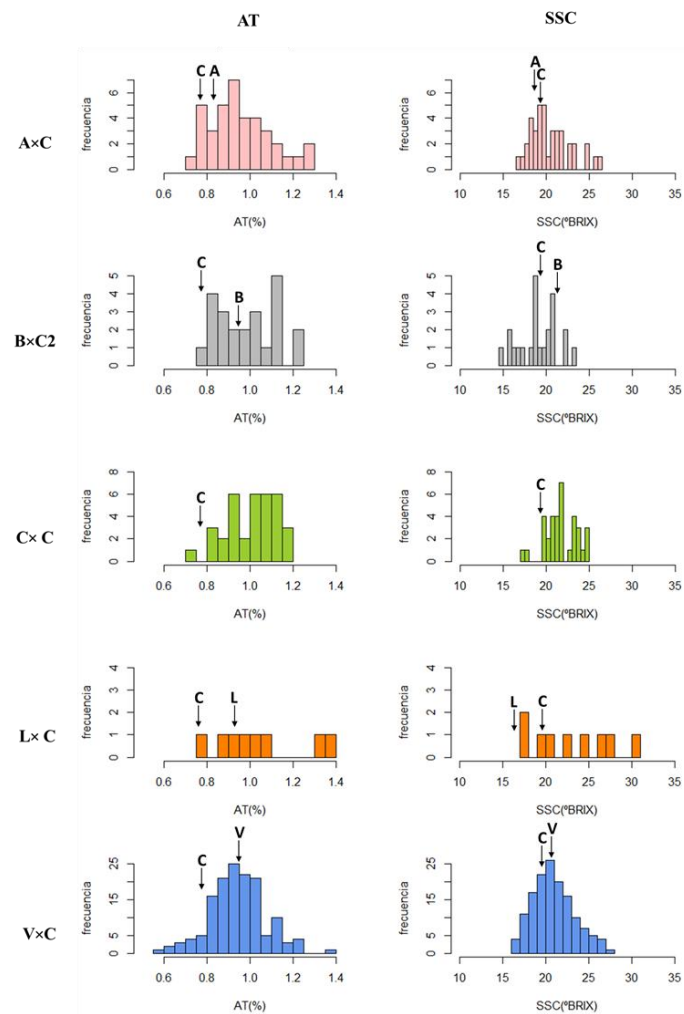
- Morandi, B., Corelli Grappadelli, L., Rieger, M. y Lo Bianco, R. (2008). “Carbohydrate availability affects growth and metabolism in peach fruit”. *Physiologia Plantarum*, 133, pp.229–241. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01068.x>
- Núñez-Lillo, G., Balladares, C., Pavez, C., Urrea, C., Sanhueza, D., Vendramin, E., Vendramin, E., Dettori, M.T., Arús, P., Verde, I., Blanco-Herrera, F., Campos-Vargas, R. y Meneses, C. (2019). “High-density genetic map and QTL analysis of soluble solid content, maturity date, and mealiness in peach using genotyping by sequencing.” *Scientia Horticulturae*, 257. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108734>
- Papapetros, S., Louppis, A., Kosma, I., Kontakos, S., Badeka, A., Papastephanou, C., y Kontominas, M.G. (2019). “Physicochemical, spectroscopic and chromatographic analyses in combination with chemometrics for the discrimination of four sweet cherry cultivars grown in northern Greece”. *Foods*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/foods8100442>
- Papapetros, S., Louppis, A., Kosma, I., Kontakos, S., Badeka, A., y Kontominas, M.G. (2018). “Characterization and differentiation of botanical and geographical origin of selected popular sweet cherry cultivars grown in Greece”. *Journal of Food Composition and Analysis*, 72, pp. 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.06.006>
- Piaskowski, J., Hardner, C., Cai, L., Zhao, Y., Iezzoni, A. y Peace, C. (2018). “Genomic heritability estimates in sweet cherry reveal non-additive genetic variance is relevant for industry-prioritized traits”. *BMC Genetics*, 19:23. <https://doi.org/10.1186/s12863-018-0609-8>
- Potter, D., Eriksson, T., Evans, R.C., Oh, S., Smedmark, J.E.E., Morgan, D.R., Kerr, M., Robertson, K.R., Arsenault, M., Dickinson, T.A., y Campbell, C.S. (2007). “Phylogeny and classification of Rosaceae.” *Plant Systematics and Evolution* 266, pp. 5–43. <https://doi.org/10.1007/s00606-007-0539-9>
- Quilot, B., Wu, B.H., Kervella, J., Génard M., Foulongne M. y Moreau K. (2004). “QTL analysis of quality traits in an advanced backcross between *Prunus persica* cultivars and the wild relative species *P. davidiana*.” *Theoretical and Applied Genetics*, 109, pp. 884–897. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1703-z>
- R Core Team. (2017). R: a language and environment for statistical computing (Vienna: R Foundation for Statistical Computing). <http://www.R-project.org/http://www.R-project.org/>.
- Salato, G.S., Ponce, N.M.A., Raffo, M.D., Vicente, A.R., y Stortz, C.A. (2013). “Developmental changes in cell wall polysaccharides from sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars with contrasting firmness.” *Postharvest Biology and Technology*, 84, pp. 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.04.009>

- Salazar, J.A., Pacheco, I., Zapata, P., Shinya, P., Ruiz, D., y Martínez-Gómez, P. (2020). "Identification of *loci* controlling phenology, fruit quality and post-harvest quantitative parameters in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.)." *Postharvest Biology and Technology*, 169, 111292 <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111292>
- Salazar, J. A., Ruiz, D., Egea, J., y Martínez-Gómez, P. (2013). "Transmission of fruit quality traits in apricot (*Prunus armeniaca* L.) and analysis of linked quantitative trait *loci* (QTLs) using simple sequence repeat (SSR) markers." *Plant molecular biology reporter*, 31(6), pp. 1506-1517. <https://doi.org/10.1007/s11105-013-0625-9>
- Serradilla, M. J., Aksic, M. F., Manganaris, G. A., Ercisli, S., González-Gómez, D., y Valero, D. (2017). "Fruit Chemistry, nutritional benefits and social aspects of cherries". En Quero-García J, Iezzoni A, Pulawska J and Lang G (Coord) *Cherries: Botany, Production and Uses* (CAB International): pp. 420–441.
- Serradilla, M. J., Hernández, A., López-Corrales, M., Ruiz-Moyano, S., de Guía Córdoba, M. y Martín, A. (2016). "Chapter 6 - Composition of the cherry (*Prunus avium* L. and *Prunus cerasus* L.; Rosaceae)". En Simmonds, M. S. J. and Preedy, V. R. (Coord). *Nutritional Composition of Fruit Cultivars*. San Diego (Academic Press): pp. 127–147. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408117-8.00006-4>.
- Serradilla, M. J., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Hernández, A., López-Corrales, M., y Córdoba, M. D. G. (2012). "Physicochemical and sensorial characterisation of four sweet cherry cultivars grown in Jerte Valley (Spain)". *Food Chemistry*, 133(4), pp. 1551–1559. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.048>
- Serradilla, M. J., Lozano, M., Bernalte, M. J., Ayuso, M. C., López-Corrales, M., y González-Gómez, D. (2011). "Physicochemical and bioactive properties evolution during ripening of 'Ambrunés' sweet cherry cultivar." *Food Science and Technology*, 44(1), pp. 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.05.036>
- Serrano, M., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., y Valero, D. (2005). "Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), pp. 2741–2745. <https://doi.org/10.1021/jf0479160>
- Sooriyapathirana, SS., Khan, A., Sebolt, A., Wang, D., Bushakra, J.M., Lin-Wang, K., Allan, A.C., Gardiner, S.E., Chagné, D. y Iezzoni, A. (2010). "QTL analysis and candidate gene mapping for skin and flesh color in sweet cherry fruit (*Prunus avium* L.)." *Tree Genetics and Genomes* 6, pp. 821-832. <https://doi.org/10.1007/s11295-010-0294-x>

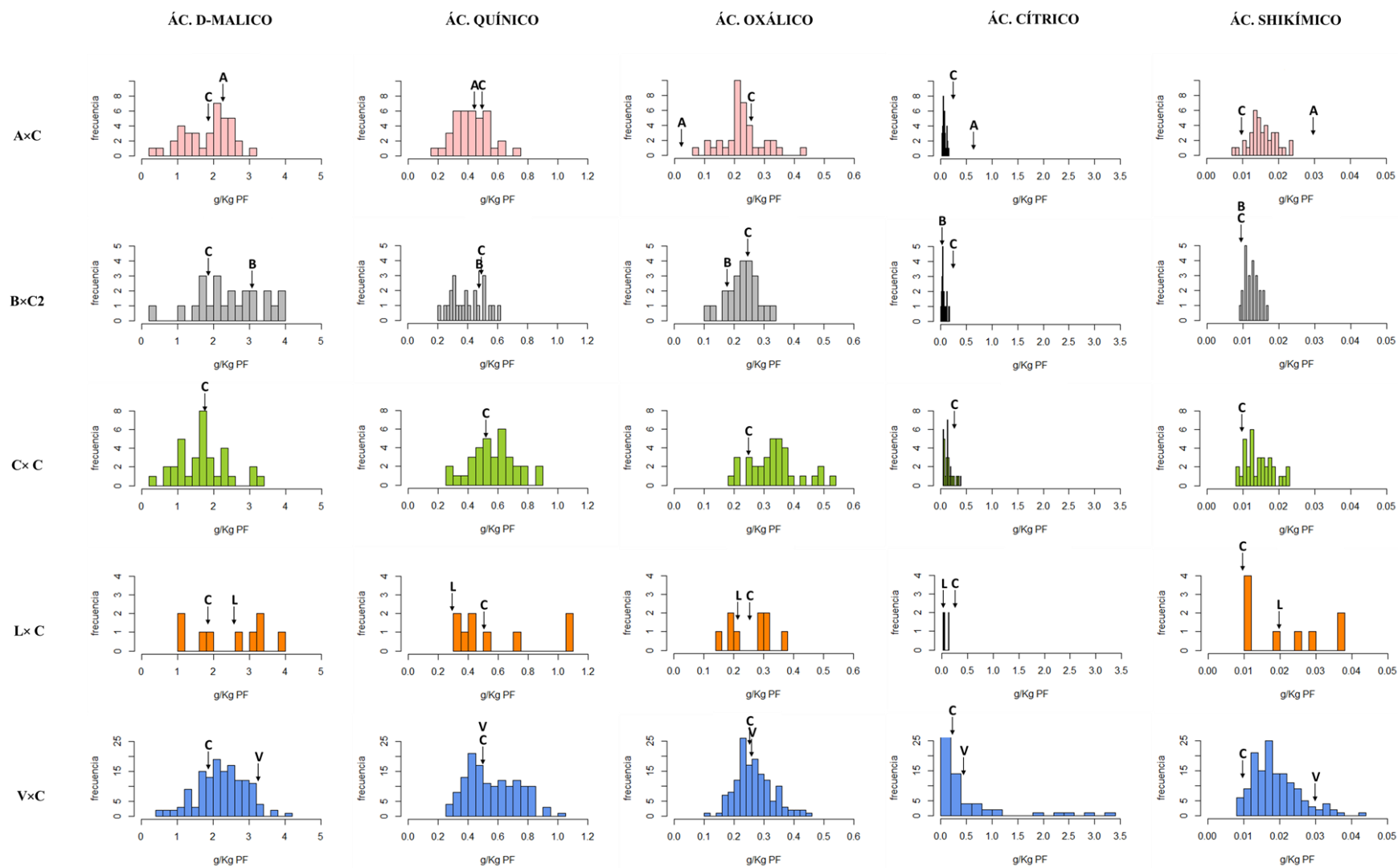
- Sturm, K., Koron, D. y Štampar, F. (2003). "The composition of fruit of different strawberry varieties depending on maturity stage." *Food Chemistry*, 83 (3), pp.417-422. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00124-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00124-9)
- Usenik, V., Fabčič, J., y Štampar, F. (2008). "Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.)." *Food Chemistry*, 107(1), 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.004>
- Watkins R. (1976) "Cherry, plum, peach, apricot and almond". *Evolution of crop plants*, pp.242-247.
- Whiting, M.D., Ophardt, D. y McFerson J.R. (2006). "Chemical blossom thinners vary in their effect on sweet cherry fruit set, yield, fruit quality, and crop value". *Horticulture Technology* 16(1), pp. 66–70. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.16.1.0066>
- Wünsch, A. y Hormaza, J.I. (2004). "Genetic and molecular analysis in 'Cristobalina' sweet cherry, a spontaneous self-compatible mutant". *Sex Plant Reprod* 17, pp.203–210. <https://doi.org/10.1007/s00497-004-0234-8>
- Yue C., Gallardo R.K., Luby J.J., Rihn A.L., McFerson J.R., McCracken V., Oraguzie N., Weebadde C., Sebolt A. y Iezzoni A. (2014). "An evaluation of U.S. tart and sweet cherry producers trait prioritization: evidence from audience surveys". *Hortscience*, 49, pp. 931–937. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.49.7.931>
- Zeballos, J.L., Abidi, W., Giménez, R., Monforte, A.J., Moreno, M.A., y Gogorcena, Y. (2016). "Mapping QTLs associated with fruit quality traits in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] using SNP maps". *Tree Genetics & Genomes*, 12 (37). <https://doi.org/10.1007/s11295-016-0996-9>
- Zhang, G., Sebolt, A.M., Sooriyapathirana, S.S., Wang, D., Bink, M.C., Olmstead, J.W. y Iezzoni, A.F. (2010). "Fruit size QTL analysis of an F1 population derived from a cross between a domesticated sweet cherry cultivar and a wild forest sweet cherry". *Tree Genetics & Genomes*, 6, pp. 25–36 (2010). <https://doi.org/10.1007/s11295-009-0225-x>

8 ANEXOS

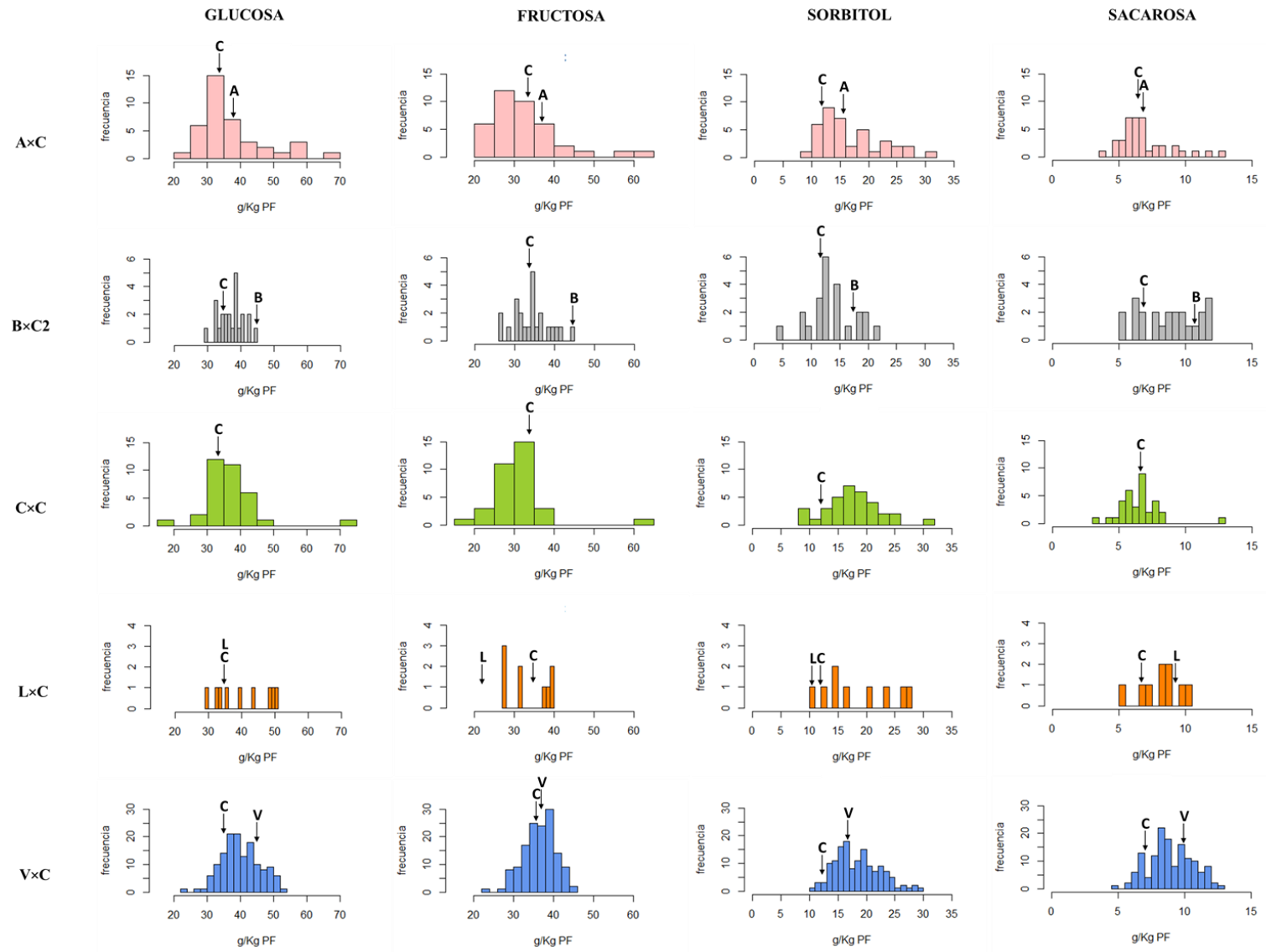
ANEXO 8.1 Frecuencia de distribución de la acidez titulable (AT) y el contenido en sólidos solubles (SSC) en cada familia.



ANEXO 8.2 Frecuencia de distribución de los ácidos orgánicos identificados en cada familia.



ANEXO 8.3 Frecuencia de distribución de los azúcares simples identificados en cada familia.



ANEXO 8.4: Prueba de normalidad utilizando Shapiro-Wilk para cada familia y el total de los individuos que componen las familias para los ácidos orgánicos y la acidez titulable (AT) (a), y los azúcares simples y el contenido en sólidos solubles (SCC) (b). Distribuciones ajustadas a la normalidad a un nivel de significación $p < 0,01$ están indicadas con asteriscos.

a)												
	ÁC. D-MALICO		ÁC. QUÍNCIO		ÁC. OXÁLICO		ÁC. CÍTRICO		ÁC. SHIKÍMICO		AT	
Familia	Estadístico	p-valor	Estadístico	p-valor	Estadístico	p-valor	Estadístico	p-valor	Estadístico	p-valor	Estadístico	p-valor
A×C	0,958	0,157	0,987	0,935	0,961	0,198	0,915	0,007*	0,982	0,783	0,960	0,191
B×C2	0,971	0,717	0,971	0,712	0,975	0,808	0,862	0,005*	0,964	0,554	0,950	0,295
C×C	0,974	0,572	0,984	0,899	0,952	0,137	0,867	0,001*	0,958	0,211	0,967	0,363
L×C	0,901	0,258	0,788	0,015	0,916	0,362	0,745	0,005*	0,837	0,054	0,930	0,516
V×C	0,993	0,751	0,964	0,001*	0,975	0,011	0,430	0,000*	0,947	0,000*	0,989	0,325
Total	0,997	0,907	0,964	0,000*	0,976	0,000*	0,365	0,000*	0,918	0,000*	0,993	0,311
b)												
	GLUCOSA		FRUCTOSA		SACAROSA		SORBITOL		SSC			
Familia	Estadístico	p-valor	Estadístico	p-valor	Estadístico	p-valor	Estadístico	p-valor	Estadístico	p-valor	Estadístico	p-valor
A×C	0,859	0,000*	0,857	0,000*	0,878	0,001*	0,895	0,002*	0,895	0,002*		
B×C2	0,985	0,975	0,976	0,819	0,948	0,265	0,968	0,641	0,968	0,641		
C×C	0,793	0,000*	0,762	0,000*	0,861	0,000*	0,983	0,853	0,983	0,852		
L×C	0,992	0,328	0,815	0,030	0,975	0,937	0,916	0,359	0,916	0,359		
V×C	0,991	0,546	0,989	0,372	0,988	0,246	0,975	0,012	0,975	0,012		
Total	0,958	0,000*	0,948	0,000*	0,985	0,010*	0,987	0,019	0,990	0,078		

ANEXO 8.5: Coeficientes de correlación de Spearman entre compuestos analizados para cada familia. Correlaciones significativas a nivel de $p < 0.001$ están indicadas con asteriscos.

	A×C									
	Ác. quínico	Ác. D-malico	Ác. shikímico	Ác. cítrico	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Sorbitol	AT	SSC
Ác. oxálico	0,377	0,442	0,135	0,110	0,085	-0,018	-0,010	0,024	-0,810	-0,234
Ác. quínico		0,271	0,317	-0,082	0,245	0,269	0,043	0,365	0,141	0,459
Ác. D-malico			0,089	-0,012	0,218	0,085	0,122	0,038	0,065	0,116
Ác. shikímico				0,077	0,342	0,412	0,273	0,570*	-0,147	0,331
Ác. cítrico					-0,095	-0,133	-0,193	-0,275	0,024	-0,310
Sacarosa						0,875*	0,808*	0,692*	0,420	0,519*
Glucosa							0,923*	0,819*	0,235	0,641*
Fructosa								0,704*	0,174	0,538*
Sorbitol									0,075	0,729
AT										0,313

	B×C2									
	Ác. quínico	Ác. malico	Ác. shikímico	Ác. cítrico	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Sorbitol	AT	SSC
Ác. oxálico	-0,097	0,155	0,104	0,063	0,123	-0,117	-0,116	-0,089	0,339	-0,209
Ác. quínico		0,710*	0,554	0,104	0,381	0,562	0,468	0,566	0,393	0,576
Ác. malico			0,462	0,251	0,350	0,457	0,357	0,199	0,709*	0,474
Ác. shikímico				-0,133	0,207	0,118	-0,012	0,211	0,455	0,181
Ác. cítrico					-0,107	0,046	-0,120	0,082	0,170	0,175
Sacarosa						0,732*	0,848*	0,624	0,540	0,548
Glucosa							0,841*	0,811*	0,445	0,915*
Fructosa								0,593	0,361	0,644*
Sorbitol									0,243	0,791*
AT										0,433

* Correlación significativa a $p < 0.001$

ANEXO 8.5: (Continuación). Coeficientes de correlación de Spearman entre compuestos analizados para cada familia. Correlaciones significativas a nivel de $p < 0.001$ están indicadas con asteriscos.

	C×C									
	Ác. quínico	Ác. malico	Ác. shikímico	Ác. cítrico	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Sorbitol	AT	SSC
Ác. oxálico	0,573*	0,425	0,382	0,384	-0,256	-0,157	-0,123	-0,283	0,123	0,035
Ác. quínico		0,332	0,404	0,080	-0,238	0,021	-0,011	0,035	-0,114	0,259
Ác. malico			0,301	0,405	0,110	-0,138	-0,027	-0,059	0,341	0,117
Ác. shikímico				-0,057	-0,177	-0,053	-0,196	0,180	-0,244	0,117
Ác. cítrico					0,029	0,151	0,200	0,024	0,323	0,123
Sacarosa						0,507*	0,490	0,491	0,467	0,234
Glucosa							0,898*	0,882*	-0,135	0,455
Fructosa								0,744*	-0,069	0,362
Sorbitol									-0,231	0,562
AT										0,076

	L×C									
	Ác. quínico	Ác. malico	Ác. shikímico	Ác. cítrico	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Sorbitol	AT	SSC
Ác. oxálico	0,826	0,970*	0,556	0,850	0,766	0,587	0,599	0,623	0,515	0,599
Ác. quínico		0,833	0,822	0,833	0,952	0,881	0,809	0,929	0,833	0,810
Ác. malico			0,626	0,810	0,761	0,619	0,619	0,667	0,619	0,690
Ác. shikímico				0,479	0,872*	0,921	0,872	0,884	0,749	0,688
Ác. cítrico					0,714	0,619	0,571	0,619	0,619	0,738
Sacarosa						0,906	0,905	0,905	0,810	0,714
Glucosa							0,952*	0,952*	0,810	0,833
Fructosa								0,857	0,762	0,762
Sorbitol									0,857	0,833
AT										0,881

* Correlación significativa a $p < 0.001$

ANEXO 8.5: (Continuación). Coeficientes de correlación de Spearman entre compuestos analizados para cada familia. Correlaciones significativas a nivel de $p < 0.001$ están indicadas con asteriscos.

	V×C									
	Ác. quínico	Ác. malico	Ác. shikímico	Ác. cítrico	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Sorbitol	AT	SSC
Ác. oxálico	0,412*	0,352*	0,468*	0,250	0,320*	0,327*	0,196	0,344*	0,454*	0,465*
Ác. quínico		0,327*	0,496*	0,060	0,264	0,363*	0,242	0,375*	0,266	0,426*
Ác. malico			0,264	0,112	0,440*	0,342*	0,299*	0,271	0,622*	0,372*
Ác. shikímico				-0,003	0,317*	0,564*	0,274	0,587*	0,298*	0,645*
Ác. cítrico					0,151	0,114	0,099	0,100	0,184	0,073
Sacarosa						0,671*	0,619*	0,589*	0,468*	0,524*
Glucosa							0,809*	0,889*	0,309*	0,817*
Fructosa								0,674*	0,251	0,621*
Sorbitol									0,272	0,832*
AT										0,408*

* Correlación significativa a $p < 0.001$