

Agrupamiento jerárquico de compuestos individuales de aroma en melón "Piel de Sapo" y la línea casi isogénica SC3-5-1

L.A. Chaparro- Torres, J.P.Fernández-Trujillo

Departamento de Ingeniería de Alimentos y Equipamiento Agrícola. Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). Campus Paseo Alfonso XIII, 48. ETSIA. 30203. Cartagena (Murcia).

RESUMEN

El melón (*Cucumis melo* L.), se ha convertido en un sistema modelo debido a que presenta cultivares con comportamiento fisiológico climatérico o no climatérico, lo que lo hace ideal para estudios genéticos relacionados con calidad de fruto. Este trabajo busca encontrar los aromas diferenciales de un parental no climatérico tipo "Piel de sapo" –PS- y la línea casi isogénica climatérica SC3-5-1, así como su agrupamiento en clústers mediante un análisis jerárquico. El método de cromatografía de gases-masas tras micro-extracción de la fase sólida en espacio de cabeza identificó en zumo de melón un total de 129 y 111 compuestos volátiles individuales en dos campañas sucesivas, la mayoría de ellos ésteres acetato o no acetato, aldehídos, alcoholes, y derivados azufrados. Un total de 56 compuestos volátiles individuales diferenciaron a la línea casi isogénica SC3-5-1 de su parental 'Piel de Sapo'. Tras el análisis jerárquico de los aromas se localizaron un total de 5 y 4 clústers para la primera y segunda campaña, respectivamente, con una agrupación jerárquica asociada a la correlación que presentan los compuestos característicos y diferenciadores de SC3-5-1 y el parental PS para cada año, que parecen ser éster acetato o no acetato derivados de distintos amino ácidos y ésteres azufrados con metionina de precursor (predominantes en la línea climatérica) y aldehídos simples C7 -C9 y otros (para la no climatérica).

Palabras clave: Aromas volátiles; clúster, calidad de fruto; climaterio; cromatografía de gases-masas; *Cucumis melo* L.

1. Introducción

El melón se ha convertido en un fruto modelo de interés y está siendo objeto de investigación debido al fenotipo climatérico y no-climatérico que presenta. Esta característica ayuda a conocer las diferencias moleculares responsables de las diferencias en la maduración regulada por la síntesis de etileno, la cual provoca cambios en el aroma del melón (1)

El aroma del melón se caracteriza por el equilibrio de los compuestos volátiles que están determinados por combinaciones únicas y complejas determinantes en la calidad del melón (2). Los análisis de compuestos aromáticos en diferentes variedades de melón son estudiados en variedades climatéricas en las cuales se ha detectado el predominio de ésteres (1; 2), derivados de azufrados (3), sesquiterpenos, norisoprenoides, aldehídos y alcoholes (1). En variedades no climatéricas se reportan presencias de niveles bajos de volátiles totales, en su mayoría conformados por compuestos saturados, no saturados (alcoholes y aldehídos de C9) y ésteres generalmente a niveles bajos o ausentes (1; 4).

Actualmente estas combinaciones únicas se están estudiando mediante el uso de diseños estadísticos con un enfoque reduccionista (5; 6). Este análisis reduccionista se representa mediante dendogramas de agrupamiento jerárquico (HCA). Estos análisis se basan en correlaciones entre mediciones cuantitativas las cuales es posible representarlás usando mapa de calor (6).

Estos estudios reduccionistas se emplean como parte del análisis de su calidad y para estudios de las interacciones metabólicas del fruto (5; 7).

En este estudio se ha empleado un método reduccionista para el análisis de los resultados de compuestos volátiles obtenidos de un análisis comparativo de aromas entre una línea casi isogénica climatérica y su parental control no climatérico. El objetivo es agruparlos en clúster y de este modo poder seleccionar los más representativos de cada grupo o una característica común definitoria de cada grupo para análisis estadísticos posteriores.

2. Materiales y Métodos

2.1. Material vegetal

Se obtuvieron frutos de melón (*Cucumis melo* L.) del cultivar español T111 del tipo 'Piel de Sapo' y grupo *Inodorus* (PS), con comportamiento no climatérico, y de la línea casi isogénica (NIL) SC3-5-1 con comportamiento climatérico (8; 9). El número de réplicas evaluadas (n, datos respectivos para cada campaña) fueron n=8; 9 (NIL SC3-5-1) o n= 21; 13 (parental PS). El cultivo y la recolección se realizaron en el Centro de Investigación y Experiencias Agrarias CIFEA (Torre Pacheco, Murcia) y los frutos se recolectaron según los índices de madurez descritos previamente Obando-Ulloa et al. (1).

2.2. Preparación de la muestra y condiciones de HP-SPME/GC-MS

Las muestras de zumo de melón para el análisis de aromas se obtuvieron de pulpa extraída en cilindros de los frutos. Se preparó una mezcla de zumo filtrado para análisis con de 28.5% de solución saturada de cloruro cálcico, para posteriormente realizar la extracción de volátiles mediante micro extracción de fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME), según el protocolo de Obando-Ulloa et al. (1). Las muestras gaseosas se analizaron mediante un cromatografo de gases 6890 acoplado al espectrómetro de masas 5975 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) según el método de análisis descrito en Dos-Santos et al. (4). En total se integraron 104 cromatogramas. La identificación de los compuestos se realizó mediante comparación con la librería de espectros del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST05a.L) de EEUU y se validaron mediante el cálculo del índice de retención lineal (LRI) inyectando una serie de *n*-alcanos (C6-C20) con el mismo método de análisis. Los compuestos identificados se clasificaron en grupos de compuestos químicos volátiles del tipo éster acetato o no acetato, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos, derivados azufrados, compuestos alifáticos hidrocarbonados, terpenos, otros, no identificados cuando la comparación de espectros no coincidía, o compuestos contaminantes o no típicos de melón.

2.3. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se seleccionaron los compuestos volátiles individuales con una presencia mayor al 25% en frutos y mayor al 50% del total de replicas evaluadas. Para identificar los compuestos volátiles responsables de la discriminación, se realizaron pruebas de análisis

multivariado de como el análisis discriminante parcial de mínimos cuadrados (PLS-DA) y *árboles de decisión aleatorios* (datos no mostrados) (1; 4). Los compuestos individuales obtenidos en cada año se sometieron a un análisis de agrupación jerárquica (HCA) empleando el coeficiente de correlación de Pearson. Se representaron en conjunto usando mapa de calor (*heatmap*) con el fin de asociar la jerarquía de los compuestos volátiles del fruto del melón y obtener los grupos de compuestos o clúster. En cada agrupamiento jerárquico se analizaron las características de los compuestos por su estructura química y ruta biosintética.

Resultados y Discusión

Se identificaron 129 compuestos volátiles individuales en la primera campaña y 111 en la segunda.

En la primera campaña se identificó un clúster denominado C de compuestos volátiles del tipo aldehídos derivados de ácidos grasos como nonanal, decanal, octanal, heptanal, (Z)-non-6-enal, (E)-hex-2-enal, (E)-pent-2-enal (Fig. 1, S1). Para la segunda campaña el clúster c englobó entre los aldehídos los 4 primeros citados anteriormente (Fig. 1, S2; Tabla 1) Este tipo de agrupamiento jerárquico de aldehídos presentó una correlación intermedia en ambas campañas comprada con los otros grupos de compuestos altamente correlacionados (Fig. 1 clúster c de S1 y S2). El motivo de identificar más aldehídos en la primera que en la segunda campaña pueden estar relacionado con las mejores condiciones ambientales para el cultivo del melón en la segunda campaña (4).

Los compuestos que presentaron una alta correlación se agruparon en el clúster E o d (Fig.1, S1-S2), en el que se identificaron compuestos de tipo éster acetato o no acetato derivados de distintos amino ácidos y compuestos azufrados como: metil 2-metilsulfanilacetato, 3-metilsulfanilpropil acetato, S-metil butanetioato, S-metil 3-methylbutanetioato, S-metil propanetioato, etil 3-metilsulfanilpropanoato, que son ésteres derivados del aminoácido metionina asociado a la biosíntesis de etileno del fruto (3), aunque alguno podría proceder de la cisteína.

En general, los compuestos volátiles discriminantes de climaterio debido a una mayor o única presencia en la NIL SC3-5-1 se identificaron en la zona de mayor intensidad en el mapa de calor (Fig. 1).

3. Conclusiones

Un total de 129 compuestos volátiles individuales se obtuvieron en la primera campaña mientras 111 en la segunda campaña. Los resultados de la jerarquización de los volátiles individuales En los dendogramas del HCA indicaron una fuerte correlación de los compuestos discriminantes característicos de la NIL climatérica SC3-5-1 o para PS en las dos campañas evaluadas.

4. Agradecimientos

A Plácido Varó y su equipo (CIFEATorrepacheco) por su manejo del cultivo. A la Dra. María José Roca (SAITUPCT) por su asistencia técnica en la cromatografía de gases-masas. Al Instituto de Investigación y Tecnologías Agroalimentarias –Centro de Investigación en Agrigenómica (IRTA-CRAG) de Barcelona por el suministro de semillas. A UE-FEDER y MINECO (proyecto AGL2010-20858) y Fundación Séneca de la Región de Murcia (proyecto 11784/PI/09) por el soporte financiero.

5. Referencias bibliográficas

[1] Obando-Ulloa, J.M., Moreno, E., García-Mas, J., Nicolai, B., Lammertyn, J., Monforte, A.J., Fernández-Trujillo, J.P. 2008. Climacteric or non-climacteric behavior in melon fruit: 1. Aroma volátiles. *Postharvest Biol. Technol.* 49: 27-37.

[2] Beaulieu, J.C., Grimm, C.C.. 2001. Identification of volatile compounds in cantaloupe at various developmental stages using solid phase microextraction. *J Agric. Food Chem.* 49: 1345-1352.

[3] Gonda, I., Lev, S., Bar, E., Sikron, N., Portnoy, V., Davidovich-Rikanati, R., Burger, J., Schaffer, A.A., Tadmor, Y., Giovannonni, J.J. 2013. Catabolism of L-methionine in the

formation of sulfur and other volatiles in melon (*Cucumis melo* L.) fruit. *Plant J.* 74: 458-472.

[4] Dos-Santos, N., Bueso, M.C., Fernández-Trujillo, J.P. 2013. Aroma volatiles as biomarkers of textural differences at harvest in non-climacteric near-isogenic lines of melon. *Food Res. Int.* 54: 1801-1812.

[5] Carli, P., Arima, S., Fogliano, V., Tardella, L., Frusciante, L., Ercolano, M.R. 2009. Use of network analysis to capture key traits affecting tomato organoleptic quality. *J. Expt. Bot.* 60: 3379-3386.

[6] Stone, E.A. Ayroles, J.F., 2009. Modulated modularity clustering as an exploratory tool for functional genomic inference. *Plos Genet.* 5: e1000479.

[7] Bernillon, S., Biais, B., Deborde, C., Maucourt, M., Cabasson, C., Gibon, Y., Hansen, T.H., Husted, S., De Vos, R.C.H., Mumm, R., Jonker, H., Ward, J.L., Miller, S.J., Baker, J.M., Burger, J., Tadmor, Y., Beale, M.H., Schjoerring, J.K., Schaffer, A.A., Rolin, D., Hall, R.D., Moing, A. 2013. Metabolomic and elemental profiling of melon fruit quality as affected by genotype and environment. *Metabolomics* 9: 57-77.

[8] Vegas, J., Garcia-Mas, J., and Monforte, A. J. 2013. Interaction between QTLs induces an advance in ethylene biosynthesis during melon fruit ripening. *Theor. Appl. Genet.* 126: 1531-1544.

[9] Eduardo, I., Arús, P., Monforte, A.J., Obando, J., Fernández-Trujillo, J.P., Martínez, J. A., Alarcón, A.L., Álvarez, J. M., van der Knaap, E. 2007. Estimating the genetic architecture of fruit quality traits in melon using a genomic library of near isogenic lines. *J Amer. Soc. Hort. Sci.* 132: 80-89.

Tabla y Figuras

Tabla 1. Número de compuestos volátiles que conforman cada grupo en el agrupamiento jerárquico (HCA) de los aromas volátiles del parental Piel de Sapo y la NIL SC3-5-1.

	Clúster ¹	Grupo clasificación ²
Campaña 1	A	ALD; KET; NAE; ALC (2*).
	B	AHA; ALC (2); ALD (2); KET (4); SDC (2).
	C	ACL; ALD (11); KET (2); NAE.
	D	ACE (4); AHA (2); ALC; NAE (7); SDC (2).
	E	ACE (23); AHA (2); ACL (9); ALD (7); KET (3); NAE (11); SDC (9).
Campaña 2	A	SDC (2); ALC (3)
	B	NAE, ALC (4), ALD
	C	ALC, ALD (6), KET (2), NAE (5); ACE (4)
	D	ACE (21), AHA (4), ALC (6), ALD (6); KET (5); NAE (12), SDC (9)

¹. Grupos de compuestos individuales en base al coeficiente de correlación de Pearson.

². Grupo de clasificación: ALD, aldehído; KET, cetona; NAE, éster no acetato; ALC, alcohol; AHA, alcano o hidrocarburo alifático; ACE, éster acetato; SDC, derivado azufrado.

*Número de compuestos individuales que pertenecen al mismo grupo de clasificación.

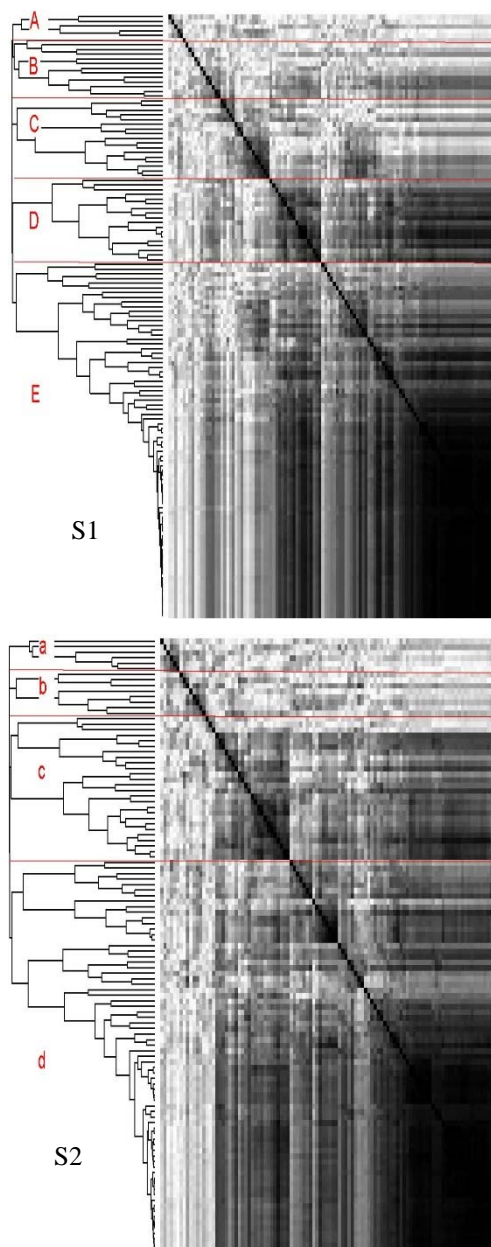


Figura 1. Dendrograma y mapa de calor del análisis de agrupamiento jerárquico (HCA) en base al coeficientes de correlación de Pearson obtenidos de los aromas volátiles individuales del parental Piel de Sapo y la línea casi isogénica SC3-5-1. S1 y S2 indican las dos campañas consecutivas de análisis.

Las letras A; a – E;d , indican los cluster seleccionados del HCA. El mapa de calor a mayor intensidad del colormayores la correlación.