

Discrimination of volatile compounds at harvest in melon identified by SPME and GC-MS

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, España.

Instituto de Biotecnología Vegetal, CMN, UPCT, Edificio I+D+i, Plaza del Hospital s/n, E-30202 Cartagena, Murcia, España. lact0@alu.upct.es

Resumen

El melón (*Cucumis melo* L.), planta modelo para la caracterización genómica y estudios de calidad. Empleada para realizar el cruzamiento de los dos cultivares de melón no climatéricos “Piel de Sapo” (PS) con el cultivar coreano “Shongwan Charmi-PI 161375”, obteniendo una población de líneas casi isogénicas (NILs), de la cual hace parte la NIL climatérica SC3-5-1 con introgresión en el grupo del ligamento III y VI empleada para estudiar la calidad a nivel de aromas, mediante la técnica de microextracción en fase sólida de espacio de cabeza (HP-SPME) acoplado al cromatógrafo de gases masas. Los grupos de aromas de tipo éster y azufrados obtenidos en la NIL en la recolección presentaron una mayor concentración total comparada con el parental PS, en las dos campañas evaluadas. Contrario al parental PS que presentó en la primera campaña mayor concentración en el grupo de aldehídos. Las diferencias en grupos de compuestos aromáticos observadas se asociaron al genotipo y en menor medida a las diferentes condiciones ambientales del cultivo en cada una de las campañas.

Palabras clave: Aromas volátiles; análisis de componentes principales, climaterio; *Cucumis melo* L.

Abstract

The melon (*Cucumis melo* L.), is a model plant for genomics characterization and quality studies. Two melon cultivars were used for breeding of cultivars of non-climacteric melon ‘Piel de Sapo’ (PS) with Korean cultivar ‘Shongwan Charmi-PI 161375’ obtaining a population of nearly isogenic line (NILs), which is part of the NIL climacteric SC3-5-1 with introgressions linkage groups III and VI. In this study, the quality characteristics of the aroma volatiles were identified using headspace solid phase microextraction (HP-SPME) coupled Gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS). The groups of esters and sulfurs type volatiles obtained for NIL SC3-5-1 shown a higher total concentration as compared with the parental PS in the two seasons evaluated while for PS presented higher concentration values of aldehydes. The main differences in groups of aromatic compounds were associated with the genotype and to a lesser extent to the different environmental conditions affecting the crop per season

Palabras clave: Aromas volatile; principal component analysis, genotype; *Cucumis melo* L.

1. Introducción

La colección de líneas casi isogénicas (NILs) de melón (*Cucumis melo* L.) ha sido importante base para contar actualmente con la secuencia completa del genoma del melón [1]. También lo ha sido para determinar QTLs asociados a parámetros de calidad instrumental (dureza, color, composición, aromas en la recolección o senescencia) y su climaterio [2–4].

Los diferentes fenotipos encontrados en estudios de perfiles aromáticos han ayudado a su asociación con las diferencias moleculares responsables de las diferencias reguladas por la síntesis de etileno, la cual provoca cambios en el aroma del melón [5, 6]. La producción de los compuestos volátiles depende de diversas

reacciones biosintéticas y de degradación en la que median diferentes enzimas. Algunas de estas rutas están muy asociadas al estado de madurez del fruto dado que en determinados puntos se activan y producen una mayor biosíntesis de los volátiles [7].

Diversas medidas de aromas en melón se han empleado para la descripción cualitativa y cuantitativa durante la maduración, diferencias en climaterio [8, 9], describiéndose como base más de 250 compuestos de aromas [10] agrupados en el fenotipo climatérico el predominio de ésteres [8] y derivados de azufrados [11]. En variedades no climatéricas en su mayoría presencia de compuestos saturados,

no saturados (alcoholes y aldehídos) y ésteres generalmente a niveles bajos o ausentes [8].

Para evaluar estas combinaciones únicas y la calidad global del fruto han estudiado previamente las características de las NILs de melón y los QTLs (*Quantitative trait loci*) implicados en las diferencias del carácter aromático [12].

En este estudio se tiene como objetivo comprobar que la calidad de volátiles evaluada a partir de la técnica de micro extracción de fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME) mediante el análisis de cromatografía de gases acoplado al espectrómetro de masas (GC-MS) permite la caracterización del efecto del genotipo, viendo además el posible efecto de las diferencias agroecológicas entre dos campañas entre una línea casi isogénicas climática SC3-5-1 y su parental control no climático "Piel de Sapo" (PS).

2. Materiales y Métodos

2.1. Material vegetal

Frutos de melón (*Cucumis melo* L.) cultivar español T111, grupo *Inodorus*, del tipo 'Piel de Sapo' (PS), con comportamiento no climático, y la NIL con comportamiento climático SC3-5-1 [13] fueron cultivados en dos consecutivas campañas. Se utilizaron las siguientes réplicas (*n*) para cada una de las campañas: PS (*n*= 21; 13) y SC3-5-1 (*n*=8; 9). Las plantas se cultivaron en el centro de investigación y experiencias agrarias CIFEA (Torre Pacheco, Murcia), y los frutos se recolectaron según los índices de recolección descritos en Obando-Ulloa et al. [14].

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

Se prepararon muestras de zumo para el análisis de aromas a partir de cilindros de pulpa de la zona ecuatorial de los frutos de melón. Tras extraer y filtrar el zumo, se añadió una mezcla de solución saturada de CaCl₂ al 28.5% para evitar reacciones enzimáticas en el zumo extraído y se congeló el mismo (Obando-Ulloa et al. [14]). Con zumo descongelado se extrajeron los volátiles mediante microextracción en fase sólida el análisis de GC-MS descrito en Amaro et al. [15]. La identificación de los espectros se realizó de manera comparativa con la librería del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST05a.L) [16]. Los aromas identificados fueron validados mediante el cálculo del índice de retención lineal (LRI) inyectando una serie de *n*-alcanos (C₆-C₂₀)

con el mismo método de análisis. La clasificación de los compuestos volátiles se agrupa de acuerdo a la estructura química [17].

2.3 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico primero se seleccionaron los compuestos volátiles individuales con una presencia mayor al 25% en frutos y mayor al 50% del total de réplicas evaluadas [17].

Posterior a la selección se realiza el análisis univariante aplicando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y el análisis de componentes principales (PCA), para observar las diferencias entre PS y NIL en cada campaña. La cuantificación de los volátiles se basa en la relación entre áreas de compuestos y la de 2-feniletanol como estándar interno (S.I.).

3. Resultados y Discusión

Las diferencias significativas de aroma entre el parental PS no climático y la NIL climática se observaron mediante PCA especialmente con la primera componente, que explicaron en las respectivas campañas el 62.7 y 61.2% de la varianza (Fig. 1). Las propias diferencias de comportamiento fisiológico están asociadas a las diferencias encontradas, con bajo contenido de volátiles (Fig. 2) o ausencia de ciertos compuestos en PS respecto a la NIL, mucho más diversa. Estas diferencias se asocian a las diversas reacciones de las rutas metabólicas de biosíntesis de los volátiles [7] como es el caso del grupo de los ésteres, que en la NIL SC3-5-1 presentó en ambas campañas mayor concentración total (ng.mL⁻¹) de ésteres acetato (37.5; 32.5), ésteres no acetato (5.5; 4.0) y compuestos azufrados la mayoría de tipo éster (5.7; 3.5), respectivamente (Fig. 2). Algunos de estos derivados azufrados proceden de aminoácidos como la metionina, aminoácido azufrado asociado a la biosíntesis de etileno del fruto (3).

La producción de volátiles total en el parental no climático fue menor; sin embargo el contenido de aldehídos (2,3 ng.mL⁻¹) fue mayor que la NIL en ambas campañas (Fig. 2) debido a que estos volátiles se caracterizan por sus notas verdes y están asociados a frutos inmaduros o no-climáticos donde no se produce tal nivel de conversión de aldehídos a alcoholes y ésteres [8].

Al comparar las campañas se presentaron diferencias en concentración para la NIL en los diferentes grupos de compuestos como se vio anteriormente. Pero quizás afectó más al

parental PS la diferencia, con una mayor concentración de ésteres acetato ($2.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) en la segunda respecto a la primera campaña. Ello se correlaciona bien con la tendencia opuesta en aldehídos que fue menor en la segunda campaña ($0.9 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) respecto a la primera. La respuesta de los frutos posiblemente atribuida a las diferencias en maduración provocadas por diferencias ambientales en los diferentes años [17]. Es pertinente evaluar pues en detalle identificar las diferencias cuantitativas de aromas individuales.

4. Conclusiones

Las diferencias genotípicas en el melón influyeron dramáticamente en el aroma del melón siendo notablemente mayor las concentraciones en la NIL climatérica respecto al parental no climatérico. Aunque las proporciones de los principales grupos de compuestos se mantuvieron, las condiciones de ambientales en cada campaña influyeron en la concentración del aroma del fruto.

5. Agradecimientos

A Plácido Varó y su equipo (CIFEA-Torre Pacheco) por su manejo del cultivo. A la Dra. María José Roca (SAIT-UPCT) 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.

6. Referencias bibliográficas

- [1] Garcia-Mas J., Benjak A., Sanseverino W., Bourgeois M., Mir G., González V. M., Hénaff E., Câmara F., Cozzuto L., Lowy E., Alioto T., Capella-Gutiérrez S., Blanca J., Cañizares J., Ziarsolo P., Gonzalez-Ibeas D., Rodríguez-Moreno L., Droege M., Du L., Alvarez-Tejado M., Lorente-Galdos B., Melé M., Yang L., Weng Y., Navarro A., Marques-Bonet T., Aranda M., Nuez F., Picó B., Gabaldón T., et al. 2012. The genome of melon (*Cucumis melo* L.). Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A. 109: 11872–7.
- [2] Tijssens L. M. M., Dos-Santos N., Jowkar M. M., Obando-Ulloa J. M., Moreno E., Schouten R. E., Monforte A. J., Fernández-Trujillo J. P. 2009. Postharvest firmness behaviour of near-isogenic lines of melon. Postharvest Biol. Technol. 51: 320–326.
- [3] Dos-Santos N., Jimenez-Araujo A., Rodriguez-Arcos R., Fernandez-Trujillo J. P. 2011. Cell wall polysaccharides of near-isogenic lines of melon (*Cucumis melo* L.) and their inbred parentals which show differential flesh firmness or physiological behavior. J. Agric. Food Chem. 59: 7773–84.
- [4] Fernández-Trujillo J. P., Obando J., Martínez J. A., Alarcón A., Eduardo I., Arús P., Monforte A. J. 2005. Gestión de la calidad de experimentos con frutos de una colección de líneas casi isogénicas de melón. III Virtual Iberoamer Cong Qual Lab Manag Madrid, Spain: 149–158.
- [5] Ayub R., Guis M., Ben Amor M., Gillot L., Roustan J. P., Latché A., Bouzayen M., Pech J. C. 1996. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. Nat. Biotechnol. 14: 862–6.
- [6] Flores F., Romojaro F., Ben Amor M., Pech J. C., Latché A. 2001. Differential sensitivity to ethylene of the various ripening pathways of ethylene-suppressed cantaloupe melons. Acta Hortic. 553: 151–153.
- [7] Schwab W., Davidovich-Rikanati R., Lewinsohn E. 2008. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. Plant J. 54: 712–732.
- [8] 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. Postharvest Biol. Technol. 49: 27–37.
- [9] Verzera A., Dima G., Tripodi G., Conurso C., Crinò P., Romano D., Mazzaglia A., Lanza C. M., Restuccia C., Paratore A. 2014. Aroma and sensory quality of honeydew melon fruits (*Cucumis melo* L. subsp. *melo* var. *inodorus* H. Jacq.) in relation to different rootstocks. Sci. Hortic. 169: 118–124.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Obando-Ulloa J. M., Ruiz J., Monforte A. J., Fernández-Trujillo J. P. 2010. Aroma profile of a

collection of near-isogenic lines of melon (*Cucumis melo* L.). Food Chem. 118: 815–822.

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

[14] Obando-Ulloa J. M., Jowkar M. M., Moreno E., Souri M. K., Dos-Santos N., Sanmartin P., Bueso M. C., Kessler M., Martinez J. A., Alarcon A., Nicolai B., Lammertyn J., Garcia-Mas J., Monforte A. J., Fernández-Trujillo J. P. 2008. Near-isogenic lines of melon with different climacteric behavior as a tool to characterize fruit senescence traits. Cucurbitaceae 2008 Proc IXth Eucarpia Meet Genet. Breed. Cucurbitaceae, pp. 109–113.

[15] Amaro A. L., Fundo J. F., Oliveira A., Beaulieu J. C., Fernández-Trujillo J.P., Almeida D. P. F. 2013. 1-methylcyclopropene effects on temporal changes of aroma volatiles and phytochemicals of fresh-cut cantaloupe. J. Sci. Food Agric. 93:828–837.

[16] National Institute of Standards and Technology [http://www.nist.gov/]

[17] 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.

Figuras

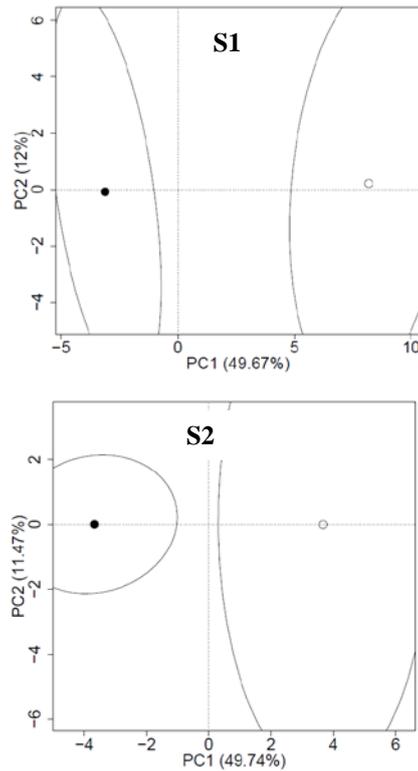


Figura 1. Análisis de componentes principales (centroides correspondientes al 95% intervalo de confianza) partiendo de los grupos de aromas volátiles principales en zumo de melón (*Cucumis melo* L.) en recolección provenientes del parental cultivar español T111 tipo 'Piel de Sapo' (PS, ●) y la línea casi isogénica (NIL SC3-5-1, ○) en dos campañas sucesivas (S1 y S2).

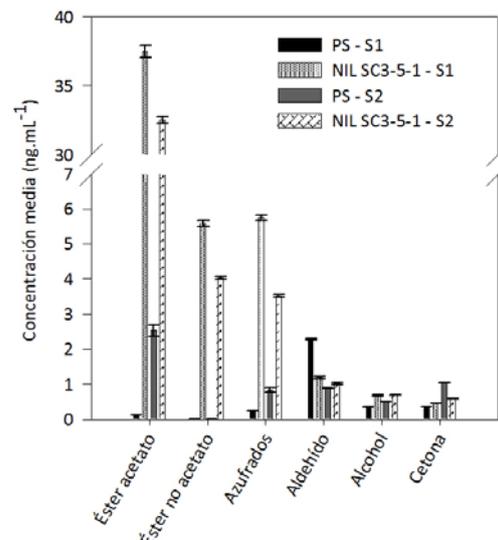


Fig. 2. Grupo de volátiles mayoritarios en el zumo de melón (*Cucumis melo* L.) del parental cultivar español T111 tipo 'Piel de Sapo' (PS) y la línea casi isogénica (NIL SC3-5-1) en dos campañas sucesivas (S1 y S2).