

**ANÁLISIS METABOLÓMICO DE DIFERENTES GENOTIPOS DE TOMATE Y  
ESPECIES SILVESTRES RELACIONADAS PARA DEFINIR LA VARIABILIDAD  
DISPONIBLE EN PERFILES DE VOLÁTILES**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**Presentado por:**

**Kristty Stephanie Ortiz Beltrán.**

**Director:**

**Antonio Granell Richart**

**Co-director:**

**José Luis Rambla Nebot**



**MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR  
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**

**ANÁLISIS METABOLÓMICO DE DIFERENTES GENOTIPOS DE TOMATE Y  
ESPECIES SILVESTRES RELACIONADAS PARA DEFINIR LA VARIABILIDAD  
DISPONIBLE EN PERFILES DE VOLÁTILES**

Memoria presentada por KRISTTY STEPHANIE ORTIZ BELTRAN realizada en Plant Genomics and Biotechnology Lab. del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas para optar al grado de Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas por el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de la Universidad Politécnica de Valencia.

Valencia, a 09 de Diciembre de 2015



KRISTTY STEPHANIE ORTIZ BELTRAN

D. ANTONIO GRANELL RICHART, Doctor en Ciencias Químicas y Profesor de Investigación del CSIC y  
D. JOSÉ LUIS RAMBLA NEBOT, Ingeniero Agrónomo y Diploma de Estudios Avanzados por la UPV

**EXPONEN:**

Que el presente Trabajo Fin de Máster 'ANÁLISIS METABOLÓMICO DE DIFERENTES GENOTIPOS DE TOMATE Y ESPECIES SILVESTRES RELACIONADAS PARA DEFINIR LA VARIABILIDAD DISPONIBLE EN PERFILES DE VOLÁTILES' realizado por KRISTTY STEPHANIE ORTIZ BELTRAN para optar al grado de Máster se ha llevado a cabo bajo su dirección en el Plant Genomics and Biotechnology Lab. del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de la Universidad Politécnica de Valencia, y por la presente

**AUTORIZA:**

La presentación de la memoria adjunta a los efectos académicos oportunos.

Valencia, a 09 de Diciembre de 2015



DR. D. ANTONIO GRANELL RICHART



D. JOSÉ LUIS RAMBLA NEBOT

El Trabajo Fin de Máster está dedicado a la memoria de mi querida abuela Celsa y a las personas que me apoyan incondicionalmente, mi abuelo Bernabé, mi madre Leyla y mi hermana Andrea.

### **Agradecimientos:**

Quiero agradecer a todas las personas que de una u otra manera han estado conmigo y me han ayudado durante el TFM. Desde mi Director, Co-Director y que me han orientado y guiado, hasta mi familia y amigos que siempre me brindan su cariño y apoyo.

Primero quiero agradecer a Dios por permitirme viajar a España a continuar mis estudios.

A mi Director Antonio Granell, a mi Co-Director José Luis Rambla, quiero agradecerles por la oportunidad de trabajar con ustedes en el laboratorio. Muchas gracias por orientarme, enseñarme y permitirme aprender y profundizar técnicas y conceptos en su laboratorio. También quiero agradecer a la Teresa por estar pendiente de mí y darme sus tips para manipular los equipos del laboratorio.

A mi familia, muchas gracias por el apoyo, el cariño y por siempre estar pendientes de mí. Sé que ha sido un año difícil para todos pero les agradezco que a pesar de nuestro momento de duelo, siempre me envíen buena energía para motivarme y terminar mis estudios.

A mis amigos y amigas, muchas gracias por estar pendientes de mí y valorar tanto mi amistad. Gracias por estar en las buenas y en las malas.

A la familia Leal Gavarrón, muchas gracias por abrirme las puertas de su casa y ser tan buenas personas conmigo.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	7
1.1. Importancia del tomate y su cultivo. ....	7
1.2. Ubicación del género <i>Solanum</i> y relaciones filogenéticas con otras especies. ....	7
1.3. El consumo y sabor del tomate actual. ....	8
1.4. Comprensión del sabor del fruto y su diversidad química.....	9
1.5. Los compuestos volátiles y su papel en el sabor de los frutos de tomate.....	10
1.6. Bases sobre la metabolómica.....	10
1.7. Características de los compuestos volátiles.....	11
1.8. Biosíntesis de los compuestos asociados con el sabor y su determinación analítica. ....	11
1.9. Análisis metabolómico. ....	13
1.9.1 Análisis dirigido. ....	13
1.9.2 Perfiles metabólicos. ....	13
1.9.3 La huella digital metabólica.....	13
1.10. La metabolómica y los QTLs.....	14
1.11. Traditom.....	14
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	16
<b>3. METODOLOGÍA</b> .....	17
3.1. Material vegetal. ....	17
3.2. Extracción de volátiles.....	17
3.3. Análisis y tratamiento de datos obtenidos experimentalmente. ....	18
3.3.1. Análisis de cromatogramas y espectros de masas.....	18
3.3.2. Tratamiento de los datos obtenidos mediante GC-MS.....	18
3.3.3. Análisis de la variabilidad de los niveles volátiles en las muestras. ....	19
3.3.4. Análisis estadístico. ....	19
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	20
4.1. Análisis de agrupamiento jerárquico (HCA).....	20
4.1.1. Agrupamiento de compuestos volátiles.....	20
4.1.2. Agrupamiento de los genotipos analizados. ....	23
4.2. Diferencias en el perfil metabólico de los diferentes genotipos. ....	29
4.3. Análisis de los volátiles que afectan el sabor en los tomates frescos.....	34

4.4. Amplitud de la variación en los niveles de volátiles y distribución según los distintos genotipos y especies. ....	36
4.5. Análisis de PCAs.....	41
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>46</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>47</b>

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. Importancia del tomate y su cultivo.

El tomate es una de las hortalizas de mayor consumo en el mundo junto con las patatas. En 2011 la producción mundial de tomate llegó a casi 160 millones de toneladas, y se considera el séptimo cultivo más importante después del maíz, el arroz, el trigo, la patata, la soja y la yuca. Por esta razón, el área dedicada al cultivo y producción de tomate se ha duplicado durante los últimos 20 años (Bergougnoux, 2014).

### 1.2. Ubicación del género *Solanum* y relaciones filogenéticas con otras especies.

El tomate (*Solanum lycopersicum*) pertenece al género *Solanum* en el que también se incluyen otras especies ampliamente consumidas como la patata (*S. tuberosum* L.) y la berenjena (*S. melongena*), así como otras de menor que contienen compuestos secundarios tóxicos o que son medicinalmente útiles, siendo por tanto un género de gran importancia económica. *Solanum* es el género más grande de la familia de las Solanáceas, al que pertenecen unas 1250 – 1700 especies. Las especies del género *Solanum* son características de continentes templados y tropicales, presentando diversidad morfológica y ecológica (Weese & Bohs, 2007).

El tomate cultivado (*S. lycopersicum*) (SL), se encuentra en la familia de las Solanáceas, en el género *Solanum* L., sect *lycopersicum*. Sus parientes silvestres son nativos de Sudamérica occidental, incluyendo las Islas Galápagos (*S. galapense* y *S. cheesmaniae*). La especie *S. pimpinellifolium* (PIM) se considera el antepasado más cercano del tomate silvestre cultivado (José Blanca et al., 2015). La especie cultivada *S. lycopersicum* tiene su forma silvestre *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* y existen ocho especies silvestres relacionadas con esta, incluyendo *S. pimpinellifolium*, *S. cheesmaniae*, *S. chmielewskii*, *S. chilense*, *S. parviflorum*, *S. peruvianum* (Foolad, 2007). La especie *S. peruvianum* se divide en especies del norte y del sur; estas especies son: *S. arcanum*, *S. huaylasense*, *S. peruvianum* y *S. corneliomulleri*. A continuación, en la **Tabla 1** se puede observar las diferentes especies de tomate silvestre, de acuerdo con sus relaciones en el género *Solanum*. (Bergougnoux, 2014).

**Tabla 1.** Clasificación de las diferentes especies de tomate silvestre, de acuerdo con sus relaciones en el género *Solanum* (Bergougnoux, 2014).

Species ( <i>Solanum</i> name)	<i>Lycopersicon</i> equivalent	Distribution and habitat	Fruit color	Reproductive system	Importance for breeding purposes
<i>S. cheesmaniae</i>	<i>L. cheesmaniae</i>	Endemic to the Galapagos Islands, Ecuador; wide variety of habitat; sea level to 500 m	Yellow, orange	SC, exclusively At	Salt tolerance; Lepidoptera and virus resistance
<i>S. galapogense</i>	<i>L. cheesmaniae</i> var. <i>minor</i>	Endemic to the Galapagos Islands; mostly occurring on coastal lava to within 1 m of high tide mark within range of sea spray, but occasionally inland; sea level to 50 m	Yellow, orange	SC, exclusively At	Salt tolerance; Lepidoptera and virus resistance
<i>S. lycopersicum</i>	<i>L. esculentum</i>	Known only from cultivation or escapes; world-wide in a variety of habitats, many escaped plants have smaller fruits ("cerasiforme"); sea level to 4000 m	Red	SC, facultative At	Moisture-tolerance, resistance to wilt, root-rotting, and leaf-spotting fungi
<i>S. pimpinellifolium</i>	<i>L. pimpinellifolium</i>	Central Ecuador to central Chile; dry coastal habitats; 0-500 m but exceptionally up to 1400 m	Red	SC, At, facultative At	Color and fruit quality; resistance to insect, nematode and disease
<i>S. chilense</i>	<i>L. chilense</i>	S Peru to N Chile; in hyper-arid rocky plains and coastal deserts; sea level to 3250 m	Green, purple stripes	SC, At	Drought resistance
<i>S. chmielewskii</i>	<i>L. chmielewskii</i>	S Peru to N Bolivia; high dry Andean valleys; 1600-3200 m	Green	SC, facultative At	High sugar content
<i>S. hirsutum</i>	<i>L. hirsutum</i>	Central Ecuador to Central Peru, on the western slopes of the Andes; in a variety of forest types from premontane forest to dry forests; (40)-200-3300 m	Green	SI	Cold and frost tolerance; resistance to insects due to their glandular hairs
<i>S. pernellii</i>	<i>L. pernellii</i>	N Peru to N Chile; dry rocky hillside and sandy areas; sea level to 2300 m	Green	SI	Drought resistance; resistance to insects
<i>S. neorickii</i>	<i>L. peruvianum</i>	S Ecuador to S Peru; dry inter-Andean valleys, often found trailing over rocky banks and roadsides; (320)-1950-2600 m	Pale green	SC, At	
<i>S. peruvianum</i> north	<i>S. arzonum</i>	<i>L. peruvianum</i> var. <i>hirsutum</i>	Green	Typically SI, At, rare population	Resistance to virus, bacteria, fungi, aphid and nematode
	<i>S. huaylaense</i>	<i>L. peruvianum</i>	Green	SC, At with a trend to reduce variability in Northern races	
<i>S. peruvianum</i> south	<i>S. peruvianum</i>	<i>L. peruvianum</i>	Green		
	<i>S. comelouaellieri</i> var. <i>glabratum</i>	<i>L. peruvianum</i> var. <i>glabratum</i>	Green		

V. Bergougnoux / Horticulturae 12 (2016) 170–180

### 1.3. El consumo y sabor del tomate actual.

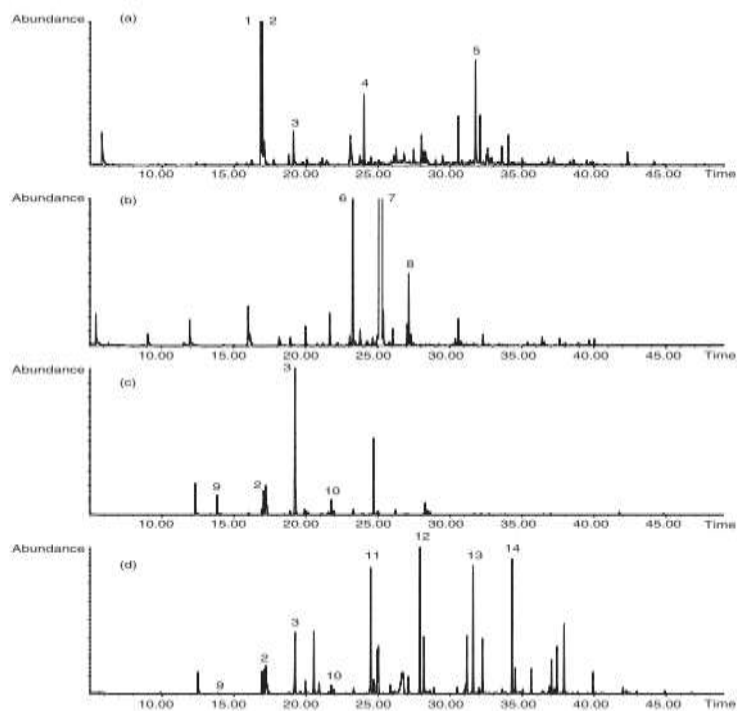
Durante más de una década, los consumidores en Europa, EE.UU. y Australia se han quejado del sabor del tomate, y por esta razón la investigación sobre este fruto en los últimos años se ha orientado hacia formas de mejora su sabor (Zanor et al., 2009). Un alto contenido de azúcar aumenta el sabor del fruto fresco. Por esta razón, los programas de cultivo de tomate se han enfocado en el aumento del contenido de sólidos en el fruto. El fruto contiene dos tipos de sólidos: los sólidos solubles (SS) que representan el 75% del contenido total de sólidos, el 25% restante representa sólidos insolubles (ISS). Los principales componentes de los SS son los azúcares reductores de glucosa y fructosa. También la sacarosa está presente aunque en cantidades inferiores. Algunas especies silvestres de tomate, incluyendo *S. hirsutum* y *S. chmielewskii*, tienen una mayor concentración de sacarosa. Los contenidos de los SS de los cultivares comerciales de tomate se han estimado en un rango entre el 4,6% (en su mayoría variedades para el mercado fresco) y el 6,3% (sobre todo en variedades destinadas al procesamiento) del peso fresco. Sin embargo, en las especies silvestres afines de tomate, incluyendo *S. pimpinellifolium*, *S. chmielewskii* y *S. cheesmaniae*, presentan concentraciones mucho más altas de SS (~9-15%) (Foolad, 2007). El contenido en ácidos orgánicos (citrato y malato), así como la relación entre el contenido en sólidos solubles y ácidos, son importantes determinantes del sabor. Pero sin duda el sabor típico del tomate no está determinado únicamente por los niveles de azúcares y ácidos, sino por los niveles de volátiles (Rambla & Granell, 2014). Sin embargo, cuáles de los más de 300 volátiles que se pueden detectar en frutos de tomate son los más importantes para el sabor del tomate es aún objeto de debate y se han propuesto modelos que permiten predecir su importancia (Klee et al., 2014; Carrera et al., 2012).



#### 1.4. Comprensión del sabor del fruto y su diversidad química.

Una forma para comprender el sabor de un alimento y las diferentes variantes en las que se presenta consiste en utilizar la diversidad genética y bioquímica dentro de una especie. Si existe suficiente diversidad en la composición química de sus frutos, se pueden establecer correlaciones entre la composición y preferencias de los consumidores. Los niveles de metabolitos primarios, tales como glucosa, fructosa, citrato o malato, pueden presentar pequeñas variaciones, mientras que las concentraciones de compuestos volátiles pueden variar en más de tres órdenes de magnitud entre las variedades silvestres. Dentro de las variedades comerciales de tomate de élite, también hay una variación química sustancial de los niveles de volátiles (Klee & Tieman, 2013).

Los frutos tienen una gran diversidad química que incluye a los compuestos volátiles. Esta diversidad abarca incluyen diferentes grupos funcionales tales como, aldehídos, cetonas, alcoholes, ésteres, ácidos orgánicos, furanonas, o terpenoides. Las diferencias en el perfil de volátiles, es decir, la composición química cuantitativa y cualitativa, entre diferentes especies también son drásticas. Aunque los frutos, pueden compartir muchos de los compuestos volátiles que producen, su abundancia relativa varía ampliamente, incluso entre especies muy cercanas y dentro de la misma especie. En la **Figura 1**, se puede observar la diversidad en el perfil volátil entre algunos frutos cultivados (Granel & Rambla, 2013).



**Figura 1.** Perfiles de los compuestos volátiles de frutos maduros homogeneizados de diferentes especies mediante la microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía gases-espectrometría de masas. (a) tomate (*Solanum lycopersicum*); (b) mandarina (*Citrus clementina*); (c) fresa (*Fragaria x ananassa*); (d) fresa silvestre (*Fragaria vesca*). Algunos de los picos diferenciales que se destacan: **1**, 1, (Z)-3-hexenal; **2**, Hexanal; **3**, (E)-2-hexenal; **4**, 6-methyl-5-

hepten-2-one; **5**, Methyl salicylate; **6**, Myrcene; **7**, Limonene; **8**, Linalool; **9**, Methyl butanoate; **10**, Methyl hexanoate; **11**, Ethyl hexanoate; **12**, 2-nonanone; **13**, Octyl acetate; **14**, 2-undecanone.

### 1.5. Los compuestos volátiles y su papel en el sabor de los frutos de tomate.

Desde el punto de vista del consumo humano, los compuestos volátiles tienen un papel relevante en la calidad del fruto, puesto que desempeñan un papel fundamental en el sabor (Granell & Rambla, 2013). En la percepción humana del sabor está implicada la integración de múltiples señales que provienen de acción combinatoria de los receptores del gusto y olfativos. En la mayoría de los frutos, como por ejemplo el tomate, el sabor también depende en gran medida del contenido de azúcares y ácidos (relación de azúcares/ácidos). Sin embargo, mientras que los receptores del gusto responden relativamente a pocas señales, los receptores olfativos responden a miles de compuestos químicos, por lo que se les atribuye la responsabilidad de la gran cantidad de sabores que percibe el ser humano. Por ejemplo, en los frutos de tomate frescos, se han identificado más de 300 compuestos orgánicos volátiles, de los cuales entre 15 y 20 se cree que constituyen el sabor de los tomates frescos. Estos volátiles generalmente son derivados de diversos precursores como ácidos grasos, carotenoides, y aminoácidos. Sin embargo, la definición exacta de las vías de biosíntesis de muchos de ellos sigue siendo difícil de elucidar (Zanor et al., 2009).

Además de los componentes químicos de calidad del fruto, los componentes físicos relacionados con la textura son de crucial importancia para el consumidor. La textura del fruto se compone de muchos rasgos incluyendo firmeza de la pulpa, harinosidad, jugosidad y frescura. Durante la maduración del fruto, se producen importantes cambios en la textura. El ablandamiento del fruto tiene un gran impacto en muchos aspectos de la fisiología de pos-cosecha, incluido el transporte, la vida útil y la resistencia a enfermedades (Zanor et al., 2009).

### 1.6. Bases sobre la metabolómica.

La metabolómica es una de las más recientes y emergentes de las ciencias ómicas, que ha aparecido en estas últimas décadas. Esta ciencia se encarga del estudio sistemático del perfil de metabolitos en un determinado proceso, y permite una mejor comprensión de las complejas interacciones moleculares que ocurren en los sistemas biológicos (Bino et al., 2004). Al identificar y cuantificar todos los posibles metabolitos de una muestra biológica, se pueden definir los niveles de estado estacionario de los intermedios de las redes metabólicas que constituyen el fenotipo metabólico. Por medio de esta ómica, actualmente se pueden realizar estudios para profundizar en el conocimiento de la composición bioquímica del fruto de tomate. De hecho, el fruto del tomate se considera un sistema modelo para estudios genómicos relacionados con frutos (Rolin et al., 2015).

### 1.7. Características de los compuestos volátiles.

Los compuestos volátiles, por lo general, son moléculas pequeñas de baja polaridad y tienen un peso molecular por debajo de 250-300 Da. Los volátiles tienen presiones de vapor relativamente altas lo que les permite atravesar las membranas y ser liberados a la atmósfera en ausencia de una barrera de difusión. Los volátiles constituyen aproximadamente el 1% de los metabolitos secundarios conocidos de plantas. Se sabe que los volátiles emitidos por las plantas están involucrados en la defensa contra patógenos y herbívoros, en respuesta a estrés abiótico, en la simbiosis micorrícica y también en la atracción de los polinizadores y dispersores de semillas. La biosíntesis y la emisión de compuestos volátiles en los frutos es un proceso que está regulado por el desarrollo y que ocurre durante la maduración. Durante la maduración, el perfil volátil del fruto cambia drásticamente. Los niveles de algunos compuestos permanecen casi constantes, otros incluso disminuyen, pero la mayoría de ellos se elevan bruscamente durante la maduración, por lo que se considera que es parte del mecanismo de atracción de dispersores de semillas (Granel & Rambla, 2013).

### 1.8. Biosíntesis de los compuestos asociados con el sabor y su determinación analítica.

Retomando el punto de vista químico, las moléculas asociadas con el sabor conforman un grupo de compuestos de cadena lineal, de cadena ramificada, aromáticos y heteroaromáticos que llevan cadenas principales de diversos grupos químicos tales como hidroxilo, carbonilo, carboxilo, éster, lactona, amina, y las funciones tiol. Se han identificado y catalogado alrededor de 700 compuestos químicos del sabor. La mayoría de estos pertenecen a diversas familias de plantas, siendo los principales componentes de los aceites esenciales. Las vías de biosíntesis de compuestos volátiles de plantas importantes han sido rastreadas hasta intermediarios del metabolismo primario. Se ha demostrado que los hidratos de carbono, ácidos grasos, carotenoides y aminoácidos representan la mayor parte de los precursores naturales para los compuestos del sabor. A continuación, en la **Figura 2** se puede observar rutas fundamentales para la producción de compuestos del sabor (Schwab, Davidovich-Rikanati, & Lewinsohn, 2008).

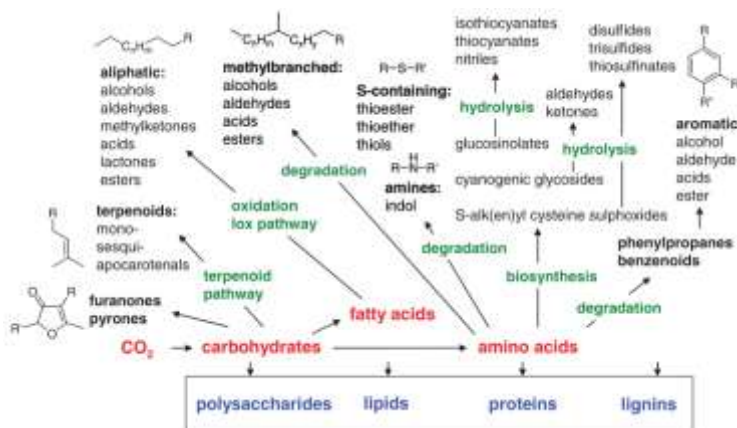


Figura 2. Diagrama de las rutas principales para la producción de compuestos del sabor (Schwab et al., 2008).

Inicialmente y a partir del análisis de volátiles de frutos maduros frescos de tomate, utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, se determinaron una serie de compuestos que parecían tener una alta probabilidad de influir en el sabor total del tomate, debido a presentar concentraciones superiores al umbral de sensibilidad humano. Compuestos como, (Z)-3-Hexenal,  $\beta$ -Ionone o Hexanal, entre otros (**Tabla 2**), pertenecen a ese selecto grupo de volátiles que podrían influenciar el sabor del fruto del tomate (Buttery, 1993).

**Tabla 2.** Concentraciones y umbrales de olor de los principales componentes de tomates maduros frescos.

	<u>Concentration (nl/l)</u>	<u>Threshold (nl/l)</u>	<u>Aroma (log units)</u>
(Z)-3-hexenal	12000	0.25	3.7
$\beta$ -ionone	4	0.007	2.8
Hexanal	3100	4.5	2.8
$\beta$ -damascenone	1	0.002	2.7
1-penten-3-one	520	1	2.7
2+3-methylbutanal	27	0.2	2.1
(E)-2-hexenal	270	17	1.2
2-isobutylthiazole	36	3.5	1.0
1-nitro-2-phenylethane	17	2	0.9
(E)-2-heptenal	60	13	0.7
Phenylacetaldehyde	15	4	0.6
6-methyl-5-hepten-2-one	130	50	0.4
(Z)-3-hexenol	150	70	0.3
2-phenylethanol	1900	1000	0.3
3-methylbutanol	380	250	0.2
Methyl salicylate	48	40	0.08

\* Los compuestos con valores positivos (log units) tienen una alta probabilidad de contribuir al aroma total del fruto.

El análisis de los metabolitos se divide en dos partes: el análisis instrumental (analítica) y el análisis de datos (bioinformática). Ambos análisis deben ser lo más completos posible, con el fin de obtener amplios perfiles metabólicos y poder realizar análisis comparativos de la situación bioquímica del metaboloma que se analiza (Tikunov et al., 2005). El muestreo con el espacio de cabeza (Head-Space (HS)) del metaboloma volátil es muy utilizado, especialmente acoplado a la cromatografía de gases y espectrometría de masas (Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)). Una versión del HS utiliza la microextracción en fase sólida (Solid-Phase microextraction (SPME)) para atrapar directamente la fracción volátil en equilibrio con una muestra sólida o líquida utilizando para ello una fibra de sílice recubierta con un sorbente específico que permite realizar el muestreo, la extracción, la concentración y la desorción de la muestra en un sistema libre de disolvente. En su disposición más habitual, el HS se encuentra integrado al SPME lo que permite realizar el muestreo en un solo paso antes de la GC-MS (Kuehnbaum & Britz-Mckibbin, 2013). Posteriormente a la desorción de los metabolitos en el GC-MS, estos se separan por cromatografía, se ionizan y fragmentan y son detectados en el espectrómetro de masas como iones moleculares o fragmentos de molécula cargados. Cada metabolito produce un espectro único del fragmento molecular de este que tiene una masa específica y una abundancia relativa fija.

Esta huella digital única se puede utilizar para el reconocimiento y la identificación de los metabolitos (Tikunov et al., 2005).

### 1.9. Análisis metabolómico.

Existen tres enfoques principales utilizados en los estudios de metabolómica: 1. El análisis dirigido (targeted analysis), 2. Perfiles metabólicos (metabolite profiling) y 3. La huella digital metabólica (fingerprinting profiling).

#### 1.9.1 Análisis dirigido.

El análisis dirigido es el enfoque analítico más utilizado. Generalmente, se utiliza para medir la concentración de un número limitado de metabolitos conocidos. Para llevar a cabo el análisis específico, se debe conocer la estructura del metabolito a analizar y tener desarrollado un método analítico para medir adecuadamente su concentración en la muestra. El análisis dirigido es un verdadero enfoque cuantitativo y ofrece límites muy bajos de detección de metabolitos conocidos. También se puede utilizar en un modo de alto rendimiento, dependiendo del analito de interés. Una de las grandes limitaciones del análisis dirigido para la metabolómica es que requiere conocimiento a priori de los compuestos de interés, y éstos deben estar disponibles en forma purificada (Shulaev, 2006).

#### 1.9.2 Perfiles metabólicos.

Los perfiles metabólicos determinan los niveles de una serie de metabolitos situados en diferentes rutas metabólicas en una muestra. Estas mediciones generalmente se llevan a cabo en las ciencias biomédicas, y se utilizan de manera rutinaria en fluidos biológicos en forma de diagnóstico que permite la caracterización del estado de salud de un paciente. Estos perfiles se componen de un número de metabolitos que varía desde varias decenas a centenares. Recientemente se ha estado prestando más atención a los perfiles metabólicos como una extensión de la genómica funcional y se ha propuesto que los perfiles de metabolitos del estado interno de células podrían ser útiles en la identificación de la función de los genes, especialmente cuando los genes mutantes no tienen ningún fenotipo aparente (Shulaev, 2006). En la investigación de plantas, esta aproximación ha permitido estudiar la contribución de diferentes rutas metabólicas al desarrollo y maduración de órganos, respuesta a estrés, etc. (Zanor et al., 2014).

#### 1.9.3 La huella digital metabólica.

La huella metabólica no trata de identificar o cuantificar con precisión todos los metabolitos en la muestra. Es considerada como un patrón único que caracteriza una toma instantánea del metabolismo en una línea de células o tejido. Las herramientas de reconocimiento de patrones se utilizan para clasificar las huellas dactilares e identificar las características específicas del perfil que son características para cada patrón. La huella digital metabólica tiene mayor utilidad en el descubrimiento de biomarcadores y diagnósticos (Shulaev, 2006).

El procesamiento de datos obtenidos en un análisis metabolómico es un paso difícil y consume mucho tiempo. Generalmente, el procesamiento de un conjunto de cromatogramas implica la reducción de ruido, deconvolución espectral, detección de los picos, la alineación del cromatograma, la identificación de compuestos y su cuantificación. En el análisis metabolómico, los datos se analizan con una amplia gama de algoritmos estadísticos y de aprendizaje automático. Estos se pueden clasificar en dos grandes clases: los algoritmos no supervisados y supervisados. Algunos ejemplos de métodos no supervisados que se han utilizado de forma rutinaria en el análisis de datos de la metabolómica son la agrupación jerárquica, análisis de componentes principales (PCA) y los mapas de auto-organización. Y los métodos supervisados incluyen ANOVA, mínimos cuadrados parciales (PLS) y análisis de función discriminante (DFA) (Shulaev, 2006).

#### 1.10. La metabolómica y los QTLs

Los datos metabólicos pueden estar relacionados con otros datos obtenidos mediante tecnologías de genómica funcional (Tikunov et al., 2005). Aunque es de gran importancia la comprensión mecanicista de una vía metabólica entera, también se necesita tener conocimiento de los genes que controlan el producto final. El camino más directo a esos genes es empírico. Las poblaciones de plantas que contienen variaciones naturales o inducidas a la mutación en su composición química son herramientas necesarias para identificar los genes que regulan la síntesis de productos químicos de destino. Por ejemplo, las líneas de introgresión (ILs) que contienen segmentos fijos de los genomas de los parientes silvestres de tomate son una fuente rica de QTL que afectan a metabolitos primarios y secundarios (Cagas, Lee, Nemoto, & Sugiyama, 2008). Debido a su importancia agronómica, el tomate es una de las primeras especies de plantas que los investigadores comenzaron a mapear loci de rasgos cuantitativos (Quantitative Trait Loci, QTL) utilizando marcadores moleculares. Se han podido identificar más de 50 QTL asociados a los volátiles responsables del sabor. Los alelos de estos QTLs probablemente sean marcadores asociados al sabor, lo que permitirá llevar a cabo una mejora en el tomate actual (Klee & Tieman, 2013). La finalidad de este trabajo es describir los datos de los perfiles metabolómicos de cada especie, para en una siguiente fase correlacionarlos con las distintas variantes en la secuencia de su genoma e identificar QTLs que puedan ser introgresadas en las líneas comerciales de tomate y evitar que el sabor tradicional se pierda, cumpliendo así con los requerimientos de los productores y consumidores de tomate.

#### 1.11. Traditom.

Nuestro grupo lidera un proyecto de investigación financiado por la UE, TRADITOM, que tiene como objetivo valorizar la diversidad genética presente en variedades tradicionales de tomate muy apreciadas por su sabor, con la finalidad de valorizarlas, evitar que se pierdan e incluso puedan sustituir, al menos localmente, a las variedades modernas más productivas. Este trabajo se integra dentro de TRADITOM y consiste en un análisis metabolómico que permita aportar información sobre los metabolitos volátiles en un amplio número de variedades tradicionales,

evaluando y comparando el perfil de volátiles de cada variedad y correlacionarlos de manera que en una siguiente fase se puedan mapear QTLs asociados a la producción de estos compuestos.

## 2. OBJETIVOS.

El objetivo fundamental de este trabajo es explorar y analizar la diversidad en compuestos volátiles disponible en una amplia colección de entradas de tomate y especies relacionadas y valorar su utilidad para mejorar el sabor del tomate.

Este objetivo general se desglosa en tres objetivos específicos:

1. Analizar y obtener el perfil metabólico de 451 entradas de tomate *S. lycopersicum* y especies silvestres relacionadas con el mismo.
2. Estudiar las correlaciones entre los compuestos volátiles identificados.
3. Comparar los perfiles metabólicos de estas 451 entradas, utilizando análisis de componentes principales y análisis de agrupamiento jerárquico.



### 3. METODOLOGÍA.

#### 3.1. Material vegetal.

Se analizaron 494 muestras correspondientes a 450 entradas distintas de especies del género *Solanum*: 340 *S. lycopersicum var lycopersicum*, 63 *S. lycopersicum var cerasiforme* y 45 *S. pimpinellifolium*, 1 *S. galapaguense* y 1 *S. cheesmaniae*. Las plantas se cultivaron en invernadero utilizando las prácticas convencionales de cultivo. Se recolectaron los frutos en el estadio de rojo maduro, se tomó una sección del pericarpio de cada fruto, se congeló inmediatamente con nitrógeno líquido y se guardó en congelación a -80°C. Cada muestra consistió en una mezcla de varios frutos con el fin de que fuera representativa de cada genotipo en particular. Posteriormente las muestras se trituraron en un molinillo criogénico y el polvo resultante se guardó a -80°C hasta el momento del análisis.

#### 3.2. Extracción de volátiles.

Se realizó el análisis de volátiles utilizando una metodología similar descrita por (Rambla et al., 2015). Previamente al análisis, se preparó una muestra de referencia, que estaba compuesta por una mezcla de 200 mg de cada muestra. Los compuestos volátiles se capturaron mediante microextracción en fase sólida (headspace solid phase microextraction (HS-SPME)) y se separaron y detectaron por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC / MS)).

El experimento analítico se llevó a cabo durante 36 días, la secuencia de inyección de muestras se diseñó de manera que por día se inyectaran 3 muestras de referencia (Al inicio, en medio y al final de la secuencia) y entre 12-15 muestras. Para el análisis se utilizaron 500 mg de cada muestra pulverizada, utilizando un vial de 7mL para almacenarla, cada vial fue incubado a 37°C durante 10 minutos en un baño de agua. Al vial se le añadieron 500 mL de una solución de EDTA 100 mM, pH 7,5 y 1,1 g de CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O, se mezcló y sonicó durante 5 minutos. 1 mL de la solución resultante se transfirió a un vial de 10mL que tenía tapón de rosca con espacio de cabeza con un septum de silicona/ PTFE y se llevó a cabo su análisis. Los compuestos volátiles se extrajeron del espacio de cabeza mediante una fibra de microextracción en fase sólida de 65 µm PDMS/DVB (SUPELCO). Desde este paso en adelante, el proceso es totalmente automatizado. El proceso de extracción de volátiles consistió en la incubación de los viales a 50°C durante 10 min con agitación a 500 rpm. A continuación, la fibra se expuso al espacio de cabeza del vial durante 20 min manteniendo las mismas condiciones de temperatura y agitación, y para ello se utilizó un CombiPAL autosampler (CTC Analytics). Los volátiles que la fibra adsorbió fueron desorbidos a 250°C durante 1 min en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases 6890N (Agilent Technologies).

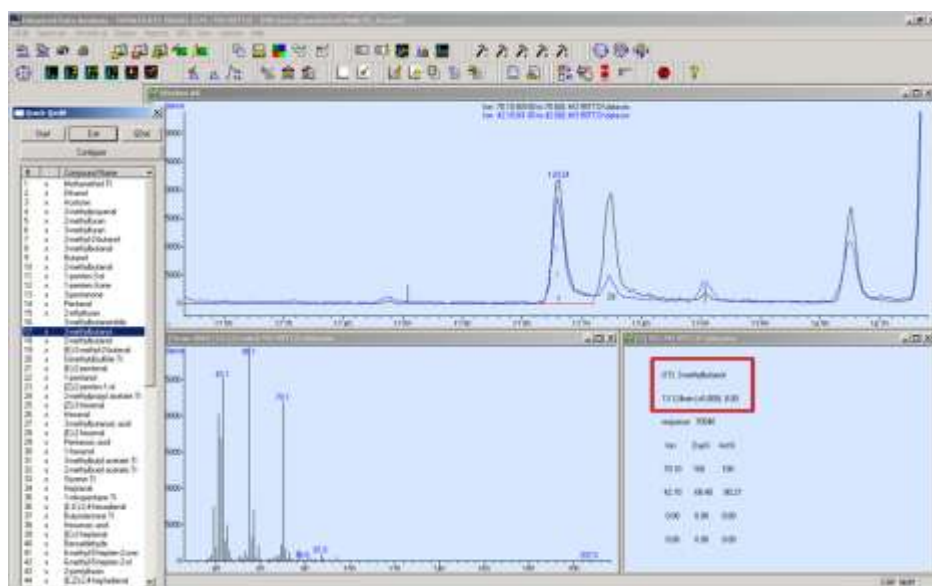
Después de la desorción, la fibra se colocó en una unidad de acondicionamiento (CTC Analytics) a 250°C durante 5 min utilizando un flujo de helio para su limpieza, con el fin de evitar contaminaciones cruzadas.

La cromatografía se realizó en una columna DB5ms (60 m, 0,25 mm, 1  $\mu$ m) (J&W Scientific) a un flujo constante de 1,2 mL/min utilizando helio como gas portador. La temperatura de la fuente de ionización del espectrómetro de masas fue de 180°C. Las condiciones de programación del horno fueron de 40°C durante 2 minutos, una rampa de 5°C/min hasta 250°C, y una retención final a 250°C durante 5 minutos. Los datos fueron registrados en un espectrómetro de masas 5975B (Agilent Technologies) en un intervalo entre 35-250 m/z, 6 scans/s, utilizando 70 eV para la ionización por impacto electrónico. Los cromatogramas se procesaron por medio de la versión de software ChemStation E.02.02 software (Agilent Technologies).

### 3.3. Análisis y tratamiento de datos obtenidos experimentalmente.

#### 3.3.1. Análisis de cromatogramas y espectros de masas.

El análisis de los datos obtenidos mediante HS-SPME GC-MS, fue un análisis dirigido para cuantificar 78 compuestos volátiles previamente identificados. La identificación de los volátiles fue realizada comparando los tiempos de retención y los espectros de masas de los estándares puros con los obtenidos experimentalmente. La comparación se revisó manualmente para verificar que se identificara correctamente cada compuesto, para ello se observó el tiempo de retención de cada compuesto, la forma del pico y su espectro de masas. Un ejemplo de lo realizado con cada pico de cada cromatograma y su respectivo espectro de masas se puede observar en la **Figura 3**.



**Figura 3.** Análisis del cromatograma y los espectros de masas de los volátiles identificados.

#### 3.3.2. Tratamiento de los datos obtenidos mediante GC-MS.

Los datos obtenidos durante los 36 días del análisis por SPME-GC-MS se trataron de la siguiente manera: las muestras de referencia se promediaron para obtener una muestra única por día. Cada

valor de las muestras fue dividido por valor promedio diario, obteniéndose un ratio como valor para realizar los análisis estadísticos.

Posteriormente hizo una transformación de los datos calculando el logaritmo en base 2, con el fin de ajustarlos a una distribución normal, requisito necesario para poder realizar los análisis estadísticos posteriores, y se revisó que solo estuviera un valor por muestra. Las muestras que se encontraban duplicadas se promediaron sus ratios y luego se calculó su logaritmo en base 2. En los casos en los que en una muestra no se detectó alguno de los volátiles, se le atribuyó a ese volátil un valor arbitrario por debajo del límite de detección. En concreto, se les asignó un valor que era 2 veces inferior al del valor menor detectado, con el fin de poder calcular su logaritmo en base 2.

### 3.3.3. Análisis de la variabilidad de los niveles volátiles en las muestras.

Para analizar la amplitud de la variabilidad en los niveles de cada compuesto a lo largo de todas las muestras analizadas, se calculó la razón (ratio) entre los valores de la muestra con los niveles mayores de ese volátil y muestra con los niveles más bajos.

### 3.3.4. Análisis estadístico.

En los análisis de agrupamiento jerárquico HCA y análisis de componentes principales (PCA), se utilizó un conjunto de datos que incluye réplicas. Todos los análisis se realizaron con el ratio de la señal relativa respecto al promedio de la señal de la muestra de referencia relación, que se transformó en el log 2.

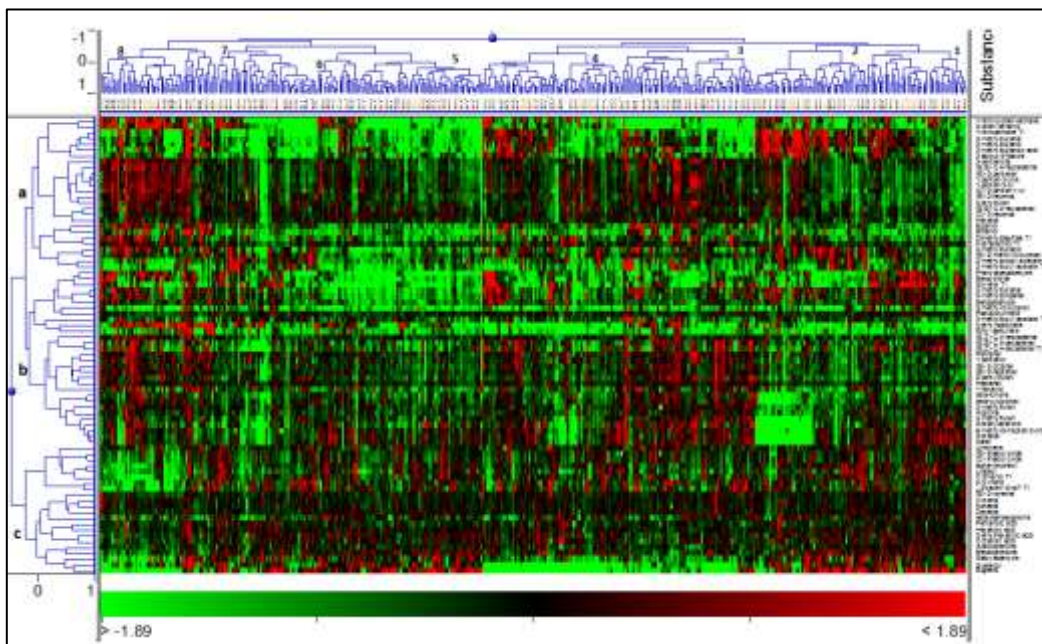
Para el análisis de agrupamiento jerárquico, se utilizó el programa Acuity 4.0 (Axon Instruments), con las medidas de distancia basados en la correlación de Pearson. Los datos se representan como un mapa de calor por medio del programa Acuity 4,0.

Los PCA se llevaron a cabo utilizando el programa SIMCA-P versión 11 (Umetrics, Umea, Sweden) con normalización a varianza unitaria.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

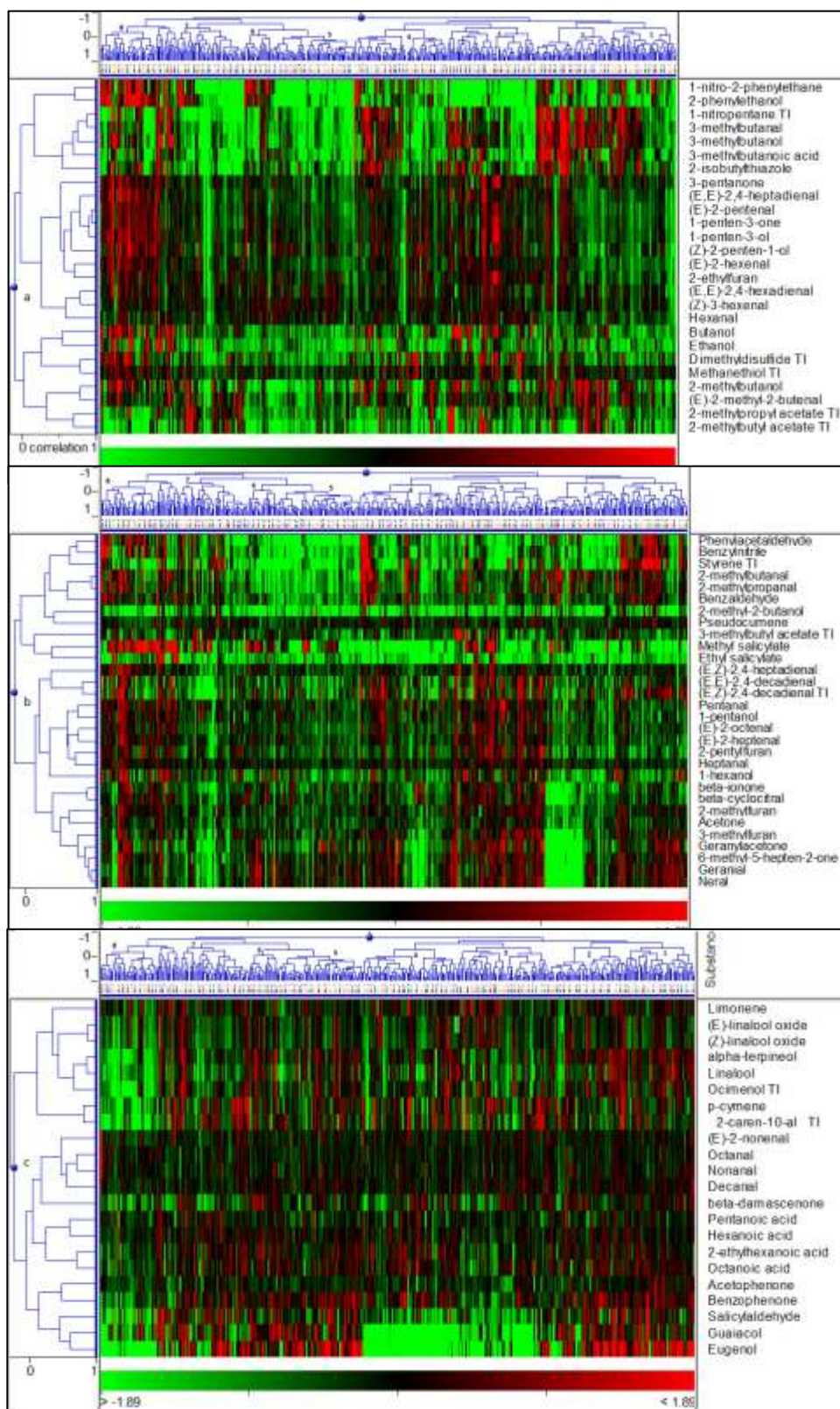
### 4.1. Análisis de agrupamiento jerárquico (HCA)

#### 4.1.1. Agrupamiento de compuestos volátiles.



**Figura 4.** Agrupamiento jerárquico HCA de los metabolitos en cada una de las muestras del fruto de tomate. Los niveles de cada compuesto se muestran en forma de mapa de calor, los valores altos están representados por el color rojo, los valores bajos con el color verde y los valores intermedios con el color negro. Los metabolitos se encuentran divididos en 3 grandes grupos a, b y c.

Un primer análisis de la variabilidad presente en las muestras analizadas se realizó mediante el análisis de agrupamiento jerárquico. En la **Figura 4** se observa que las 78 filas/ volátiles se agrupan según la matriz de correlación de esos 78 metabolitos en 451 muestras de fruto de tomate. Los 78 metabolitos se encuentran divididos en 3 grandes grupos que se nombraron a, b y c. Esos grandes grupos se conforman en base a los perfiles de acumulación que muestran a lo largo de las 451 muestras. El rango de variación se encuentra normalizado para cada volátil y oscila entre los colores verde (valores bajos) y rojo (valores altos), siendo el color negro un indicador intermedio.



**Figura 5.** Agrupamiento jerárquico HCA de los metabolitos en cada una de las muestras del fruto de tomate, divididos en a, b y c. Los niveles de cada compuesto se muestran en forma de mapa de calor, los niveles altos están representados por el color rojo, los niveles bajos con el color verde y los niveles intermedios con el color negro.

En la **Figura 5 a-c** se observan las agrupaciones basadas en las matrices de correlación de los 78 metabolitos de 451 muestras del fruto del tomate. El análisis de la matriz permitió obtener información sobre las rutas metabólicas a las que pertenecen estos compuestos. Los resultados muestran agrupamiento de compuestos fenólicos, derivados de aminoácidos de cadena ramificada, derivados de ácidos grasos, compuestos azufrados, ésteres de aminoácidos de cadena ramificada, fenilpropanoides, carotenoides, apocarotenoides y monoterpenoides. Aparte de confirmar la pertenencia a una determinada ruta biosintética, esta aproximación permite proponer la ruta metabólica de la que provienen a algunos compuestos cuya ruta hasta el momento se desconoce. Estas agrupaciones están en consonancia con resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación de análisis de agrupamiento jerárquico y de matrices de correlaciones entre volátiles a partir de poblaciones de RILs e ILs desarrolladas a partir de *S. pimpinellifolium*, los cuales suponen una confirmación adicional de la consistencia de las correlaciones aquí descritas.

En el **subgrupo a**, se observa la correlación de los derivados de ácidos grasos 3-pentanone, (E,E)-2,4-heptadienal, (E)-2-pentenal, 1-penten-3-one, 1-penten-3-ol, (Z)-2-penten-1-ol, (E)-2-hexenal, 2-ethylfuran, (E,E)-2,4-hexadienal, (Z)-3-hexenal y hexanal con el butanol. Los primeros 11 compuestos han sido repetidamente descritos como compuestos típicos de la ruta de compuestos volátiles derivados de ácidos grasos, sin embargo no así el etanol. Este resultado permite proponer la asignación a la ruta metabólica de los ácidos grasos al butanol. También se encuentran correlacionados con estos los compuestos dimethylsulfide y methanethiol, los cuales no tienen ruta metabólica asignada y cuyo agrupamiento no permite asignarle una de forma clara, por esta razón se han denominado compuestos azufrados. Esta información/clasificación puede utilizarse en un futuro para estudiar con más precisión la posible interrelación metabólica entre ellos.

Algunas correlaciones permiten confirmar la información que hasta ahora se tiene sobre las rutas metabólicas por ejemplo, se sabe que los compuestos 1-nitro-2-phenylethane y 2-phenylethanol permiten derivar la de la phenylalanine, por ende es de esperarse su correlación (Granell & Rambla, 2013). Los compuestos Geranial y Neral apocarotenoides asociados con el sabor a limón (Schwab et al., 2008). Los compuestos guaiacol y eugenol ya se habían correlacionado previamente (Zanor et al., 2009) y se encuentran asociados con la dulzura del fruto (Tieman et al., 2012). El agrupamiento de los monoterpenoides se puede asociar a que en su ruta metabólica los procesos enzimáticos que conllevan a la producción de estos compuestos necesitan primero que las enzimas interactúen con sus sustratos, y esto ocurre al haber un rompimiento o degradación de la membrana lipídica, permitiendo la entrada de las enzimas. El rompimiento o degradación de la membrana lipídica puede ocurrir tanto mecánicamente como consecuencia de la maduración del fruto (Buttery & Ling, 1993; Granell & Rambla, 2013).

En el **subgrupo b** se observa la correlación de los compuestos geranial y neral con los apocarotenoides. Aunque estos dos compuestos son monoterpenoides desde el punto de vista

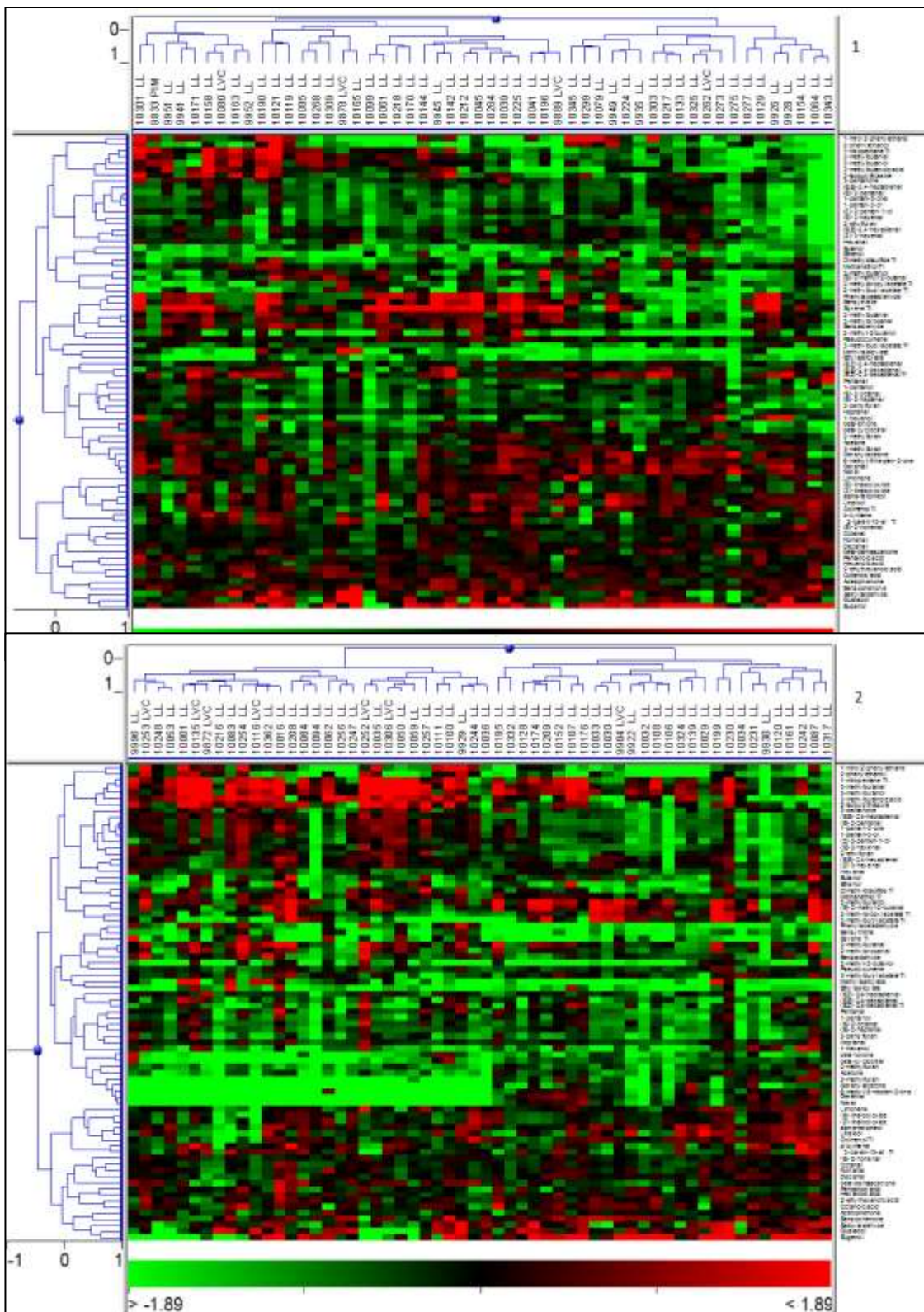
estructural, el HCA nos indica que desde el punto de vista metabólico deben ser considerados derivados de carotenoides.

En el **subgrupo c** se observa la correlación de los monoterpenoides limonene, (E)-linalool oxide, (Z)-linalool oxide,  $\alpha$ -terpineol, linalool, ocimenol, p-cymene y 2-careen-10-al, con los fenilpropanoides benzophenone, salicylaldehyde, guaiacol y eugenol. En este subgrupo la mayoría de compuestos son monoterpenoides o fenilpropanoides.

Algunas correlaciones permiten confirmar la información que hasta ahora se tiene sobre las rutas metabólicas. Por ejemplo, se sabe que los compuestos 1-nitro-2-phenylethane y 2-phenylethanol derivan de la phenylalanine (Granell & Rambla, 2013). Los compuestos geranial y neral son apocarotenoides asociados con el sabor a limón (Schwab et al., 2008). Los compuestos guaiacol y eugenol ya se habían correlacionado previamente (Zanor et al., 2009) y se encuentran asociados con la percepción de dulzura en el fruto (Tieman et al., 2012). El agrupamiento de monoterpenoides se puede asociar a que en su ruta metabólica los procesos enzimáticos que conllevan a la producción de estos compuestos necesitan primero que las enzimas interactúen con sus sustratos, y esto ocurre al haber una modificación/degradación de la membrana lipídica, permitiendo la entrada de las enzimas. La modificación/degradación de la membrana lipídica puede ocurrir tanto mecánicamente como consecuencia de la maduración del fruto (Buttery & Ling, 1993; Granell & Rambla, 2013).

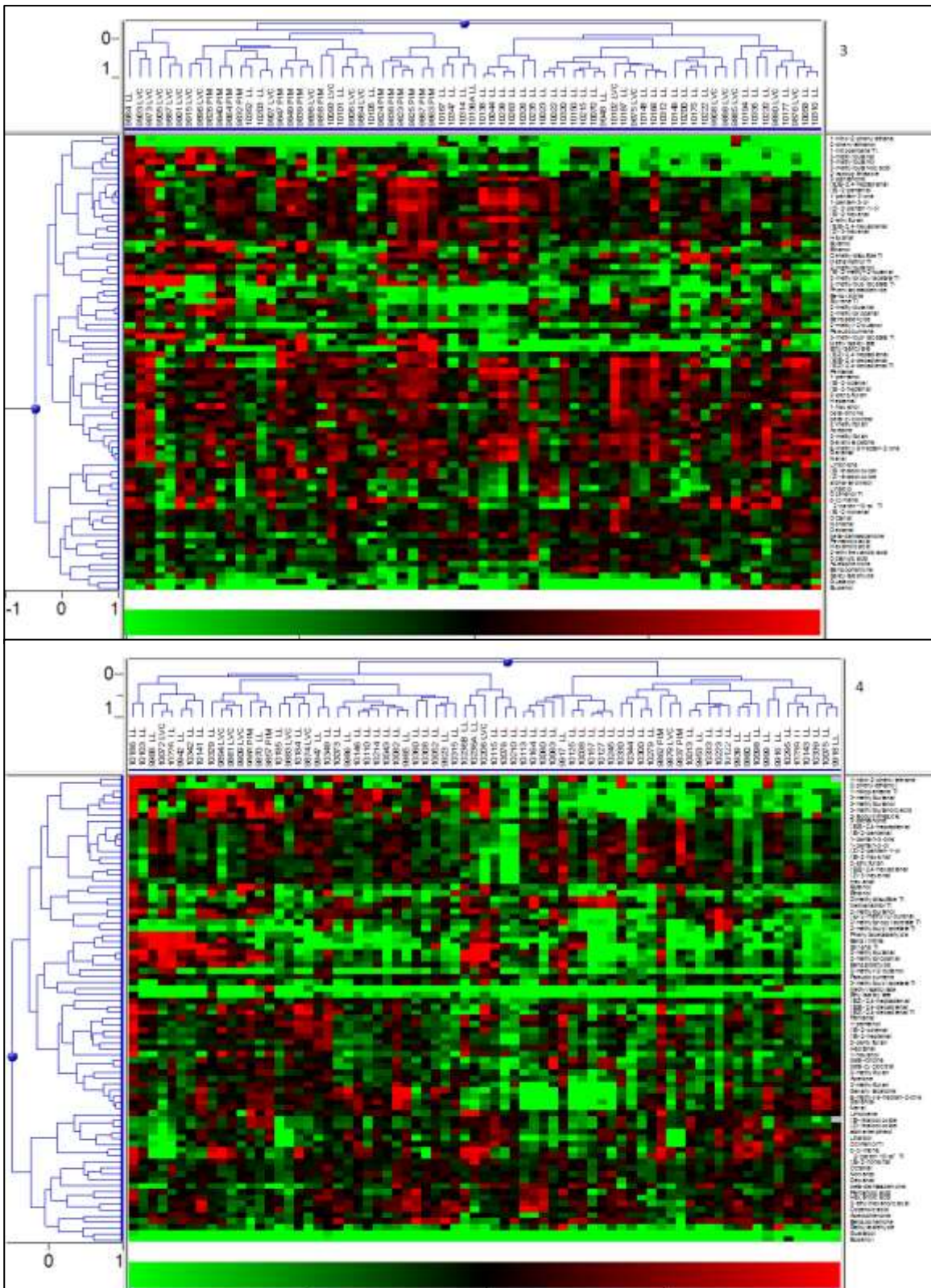
#### 4.1.2. Agrupamiento de los genotipos analizados.

El HCA también se puede utilizar para analizar las muestras en base a su perfil de compuestos volátiles. Las entradas que pertenecen a un mismo clúster deben de tener un perfil más similar. Dado que entre el grupo de muestras se encontraban diferentes especies el HCA de las entradas/muestras nos permitirá averiguar si existen perfiles de volátiles o compuestos específicos de especie o no.

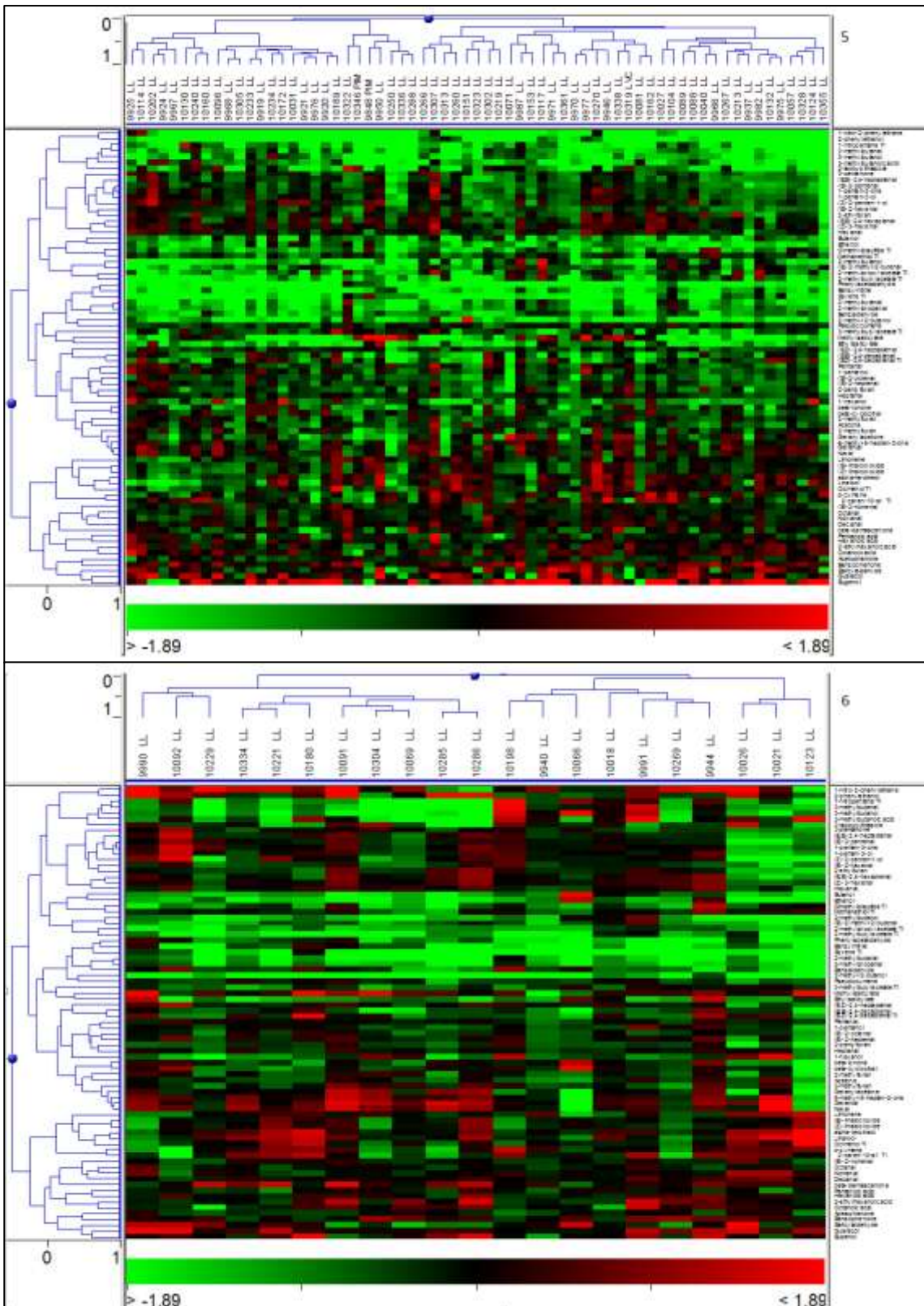


**Figura 6** Parte 1 y 2 del agrupamiento jerárquico HCA de los metabolitos en cada una de las muestras del fruto de tomate. Los niveles de cada compuesto se muestran en forma de mapa de calor, los niveles altos están representados por el color rojo, los niveles bajos con el color verde y los niveles intermedios con el color negro.





**Figura 7** Parte 3 y 4 del agrupamiento jerárquico HCA de los metabolitos en cada una de las muestras del fruto de tomate. Los niveles de cada compuesto se muestran en forma de mapa de calor, los niveles altos están representados por el color rojo, los niveles bajos con el color verde y LyLylos niveles intermedios con el color negro.



**Figura 8** Parte 5 y 6 del agrupamiento jerárquico HCA de los metabolitos en cada una de las muestras del fruto de tomate. Los niveles de cada compuesto se muestran en forma de mapa de calor, los niveles altos están representados por el color rojo, los niveles bajos con el color verde y los niveles intermedios con el color negro.

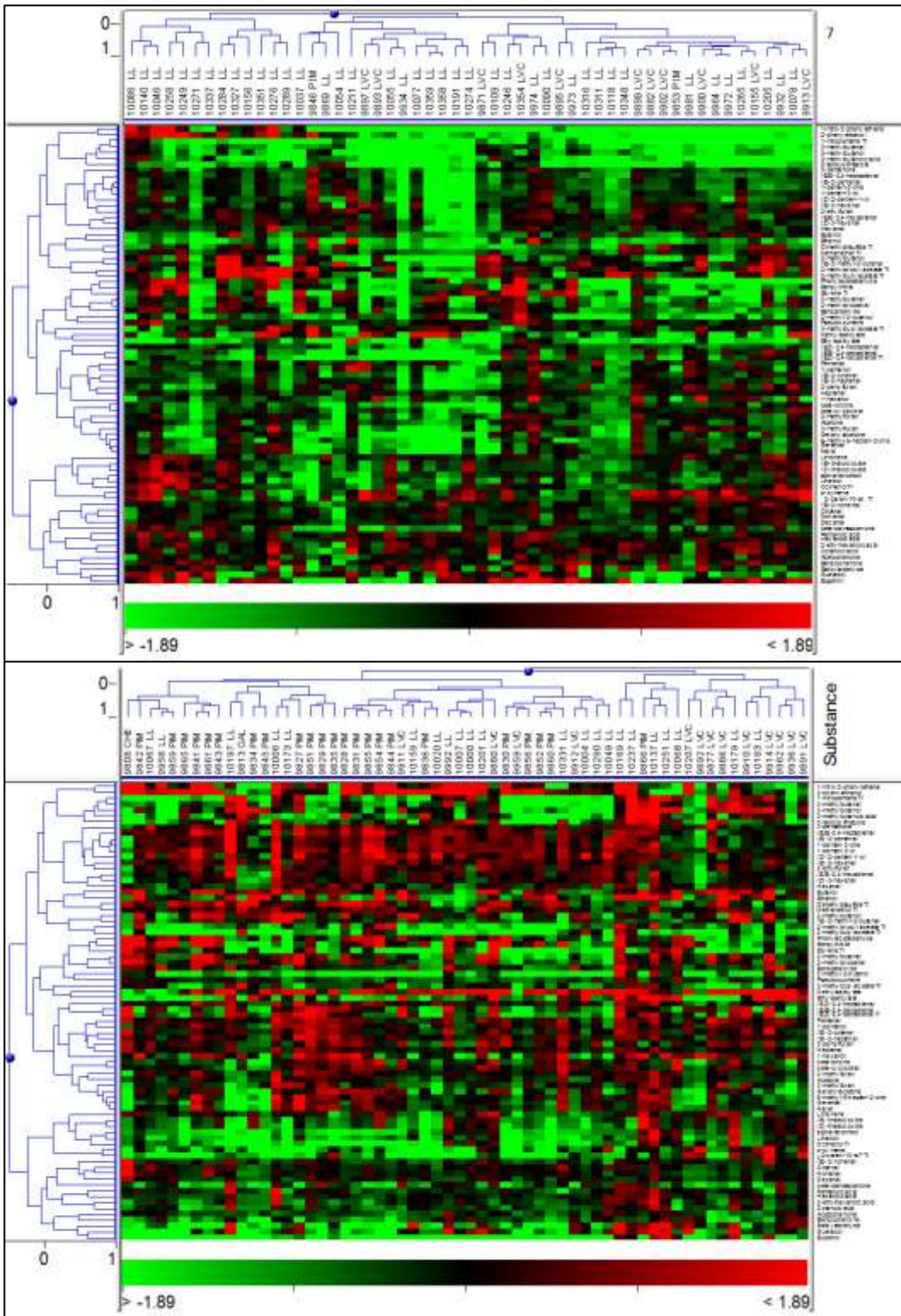


Figura 9 Parte 7 y 8 del agrupamiento jerárquico HCA de los metabolitos en cada una de las muestras del fruto de tomate. Los niveles de cada compuesto se muestran en forma de mapa de calor, los niveles altos están representados por el color rojo, los niveles bajos con el color verde y los niveles intermedios con el color negro.

En las figuras 6, 7, 8 y 9 se muestran las agrupaciones de muestras (columnas) que se conforman en base a los perfiles de volátiles y más concretamente basados en la correlación de los 78 volátiles a lo largo de las muestras. Se puede apreciar en los códigos de las muestras/entradas la especie a la que pertenece cada una de ellas y sus respectivos agrupamientos. En la figura 6 se encuentra la parte derecha de la matriz de datos. En esta parte se agruparon entradas de las dos variedades de la especie *S. lycopersicum* (SL): *S. lycopersicum var lycopersicum* (LL) y *S. lycopersicum var cerasiforme* (LVC). En la figura 7 se encuentra la parte central derecha de la matriz de datos. En esta parte se agruparon entradas de las dos variedades de la especie SL, LL y LVC y 14 entradas de la especie *S. pimpinellifolium* (PIM). En la figura 8 se encuentra la parte central izquierda de la matriz de datos. En esta parte se agruparon en su mayoría las entradas SLL, 1 entrada de LVC y 2 entradas de PIM. En la figura 9 se encuentra la parte izquierda de la matriz. En esta parte se agruparon varias entradas de LL, 1 entrada de LVC, varias entradas de PIM, la única entrada de *S. galapaguense* (GAL) y hacia la parte más izquierda la entrada de *S. cheesmaniae* (CHE).

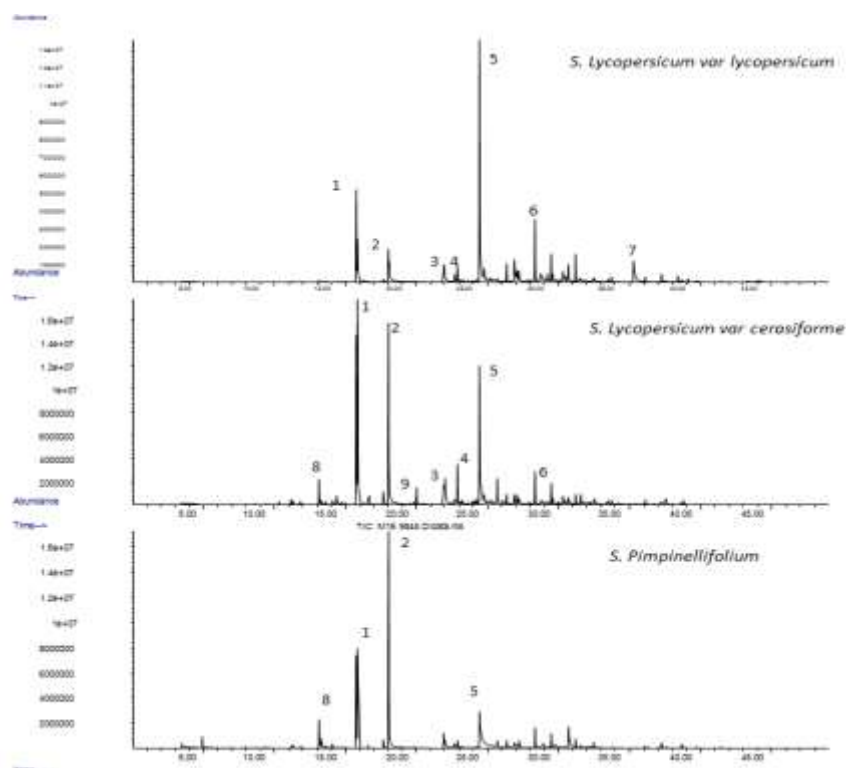
Los resultados muestran que las entradas de LL tendieron a agruparse en su mayoría con las LL y LVC y unas pocas con PIM, GAL Y CHE. La correlación entre LL y LVC es un resultado esperado ya que son variedades de la misma especie. Por otra parte, las entradas de PIM tendieron a agruparse en su mayoría con LVC y unas pocas con LL, GAL y CHE. La agrupación entre PIM y LVC es un resultado esperado ya que, aunque se trata de dos especies distintas, LVC se considera una especie silvestre al igual que PIM. La correlación de CHE y GAL con LL y PIM sugiere que aunque CHE y GAL son especies endémicas de la Isla Galápagos y han tenido una evolución diferente a LL y PIM, presentan características semejantes que permite agruparlas tanto con la especie silvestre como con la cultivada (José Blanca et al., 2015).

Cabe destacar que hay una notable variabilidad en el perfil de volátiles entre las distintas entradas de cada uno de las agrupaciones a nivel genotípico, tanto en LL como en LVC o PIM. Del mismo modo, aunque hay una clara tendencia a la agrupación de las entradas en función de su genotipo, no hay un perfil definido que permita clasificar inequívocamente cada una de las entradas en su grupo genotípico en base a su perfil de volátiles. En consecuencia, se puede observar que hay, por ejemplo, entradas de PIM más semejantes a LL o a LVC que a otras entradas de su misma especie (**Figura 8**).

Otro resultado que se infiere de la matriz de correlación es la alta prevalencia de volátiles derivados de ácidos grasos en PIM. Los derivados de ácidos grasos son considerados compuestos de relevancia en el sabor a tomate, y su síntesis está asociada con los procesos de maduración del tomate fresco (Dávila-Aviña et al., 2011). Los altos niveles de estos compuestos en PIM representan una buena oportunidad para investigar y utilizar alelos de genes implicados en la ruta que deriven de PIM en la mejora del sabor del tomate cultivado.

#### 4.2. Diferencias en el perfil metabólico de los diferentes genotipos.

La **Figura 10** muestra la comparación de los perfiles metabólicos de las especies *S. lycopersicum* var. *lycopersicum*, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* y *S. pimpinellifolium*. La comparación entre estas tres especies se realizó debido a que en la actualidad se considera a la especie *S. lycopersicum* var. *lycopersicum* (LL) la variedad de tomate cultivado, *S. pimpinellifolium* es la especie silvestre más cercana es y *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (LVC) es un antepasado reciente de la variedad cultivada (Jose Blanca et al., 2012), siendo importante observar los perfiles metabólicos de estas especies.

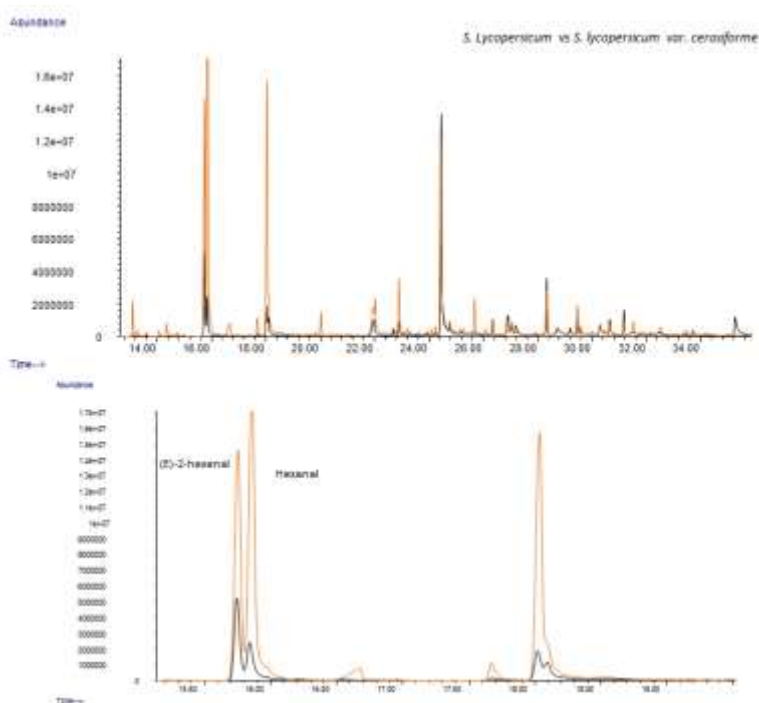


**Figura 10.** Perfiles de los compuestos volátiles de frutos maduros de tomates de tres especies diferentes: *S. lycopersicum* var. *lycopersicum*, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* y *S. pimpinellifolium*. Picos: 1. Hexanal, 2. (E)-2-Hexenal, 3. Hexanoic acid, 4. 6-methyl-5-hepten-2-one, 5. 2-Propylpentanol, 6. Ethyl-1-hexanol acetate, 7. Eugenol, 8. 3-Methylbutanol, 9. 2-Nitropentane.

Los perfiles metabólicos son diferentes, la intensidad de la mayoría de sus picos (metabolito) varía al compararse entre especies, este resultado se puede atribuir, a que como se dijo anteriormente se está comparando una especie silvestre, una especie que se considera antepasado de la variedad cultivada y la variedad cultivada. *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* y *S. pimpinellifolium* son especies que se encuentran muy implicadas en la historia del tomate y su domesticación (Jose Blanca et al., 2012). La domesticación del tomate como cultivar fue realizada en un principio desde los Andes hasta América Central y de ahí a Europa, lo que generó un cuello de botella genético. El inicio de la domesticación consistió en la selección de los genotipos preferidos del germoplasma existente. La selección de un cultivar como el tomate se hace generalmente en base a una sola

planta, donde se selecciona un pequeño número de plantas. En especies que son predominantemente endogámicas, la variación genética tiende a disminuir, incluso cuando no hay selección. Lo que genera una deriva genética, que es un proceso muy importante que reduce la variación genética (Bai & Lindhout, 2007).

Es la reducción de la variación genética la que genera los cambios en el perfil metabólico de las tres especies (**Figura 10**). Esto se debe a que desde el punto de vista evolutivo, la domesticación y los programas de mejoramiento han inducido cambios tanto fisiológicos como morfológicos y por lo general estos cambios han sido drásticos (Bergougnoux, 2014). En la **Figura 10** se puede observar la evolución de la composición de los metabolitos a través de la domesticación, donde algunos compuestos disminuyen progresivamente de la especie silvestre a la especie cultivada.

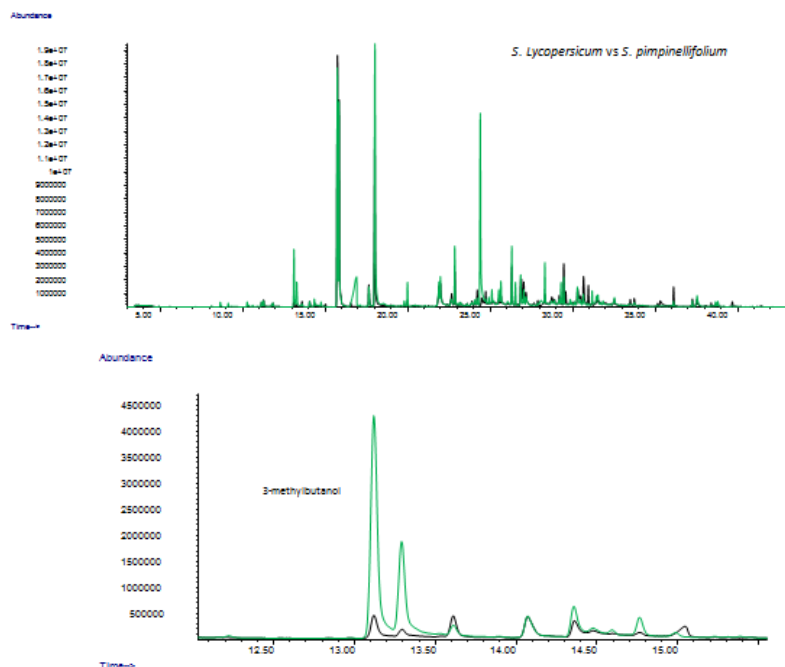


**Figura 11.** Perfiles de los compuestos volátiles de frutos maduros de tomates entre dos especies diferentes: *S. lycopersicum var. lycopersicum* vs *S. lycopersicum var. cerasiforme*.

La **Figura 11** muestra la comparación de los perfiles metabólicos de las especies *S. lycopersicum var. lycopersicum* y *S. lycopersicum var. cerasiforme*. La comparación entre estas dos especies se realizó teniendo en cuenta que *S. lycopersicum* se divide en dos variedades botánicas: *S. lycopersicum var. cerasiforme* (LVC) y *S. lycopersicum var. lycopersicum* (LL) (José Blanca et al., 2015) siendo importante observar los perfiles metabólicos de estas variedades.

Las diferencias entre los perfiles metabólicos de las dos variedades muestran en su mayoría una disminución en la cantidad de metabolito presente en el fruto de tomate para la variedad *S. lycopersicum var. lycopersicum*. Esta disminución se puede deber a los procesos de domesticación del tomate. Como se observa, la variedad LVC tiene mayor contenido de (E)-2-hexenal y hexanal. Estos dos compuestos volátiles son considerados importantes para el sabor del fruto de tomate, y

se encuentran asociados al aroma del fruto. La importancia de los compuestos volátiles está basada en su participación como componente aromático del sabor (Tandon, Baldwin, & Shewfelt, 2000). Estos resultados sugieren la pérdida del componente aromático por parte de la variedad cultivada, teniendo mejor sabor la variedad silvestre LVC.

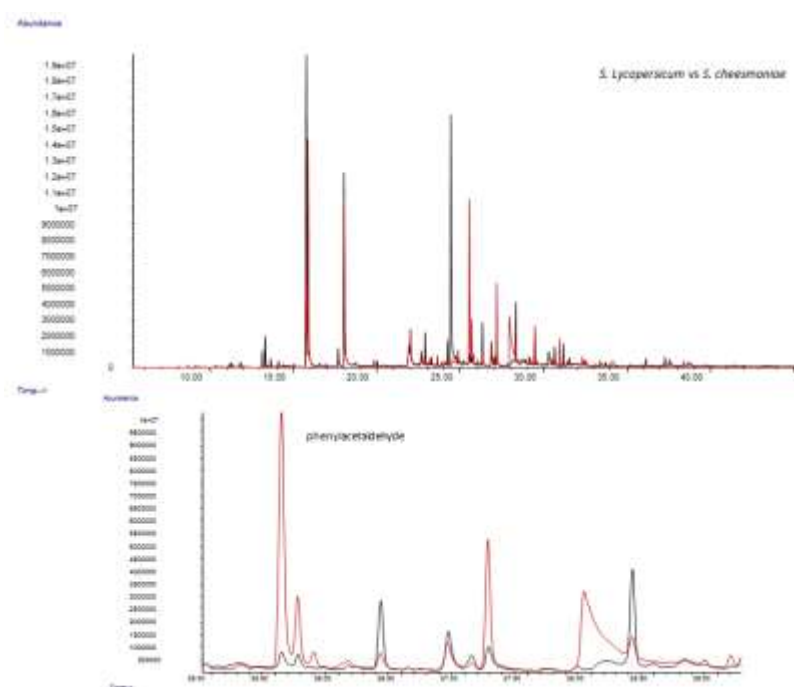


**Figura 12.** Perfiles de los compuestos volátiles de frutos maduros de tomates de dos especies diferentes: *S. lycopersicum* vs *S. pimpinellifolium*.

La **Figura 12** muestra la comparación de los perfiles metabólicos de las especies *S. lycopersicum* (SL) y *S. pimpinellifolium* (PIM). La comparación entre estas dos especies se realizó teniendo en cuenta que estas dos especies se encuentran genéticamente relacionadas, siendo especies hermanas de frutos rojos de tomates. SL es una especie que se caracteriza por tener frutos grandes y que incluye al tomate cultivado, mientras que PIM es una especie que se caracteriza porque su fruto es pequeño, por lo que se le suele denominar el tomate de grosella (Nakazato & Housworth, 2011). Teniendo en cuenta las diferencias genéticas entre estas dos especies y sus características, es importante comparar sus perfiles metabólicos.

Las diferencias entre los perfiles metabólicos de las dos especies muestran en su mayoría una disminución en la cantidad de buena parte de los metabolitos volátiles en el fruto para la especie *S. lycopersicum*. Estas diferencias se pueden atribuir al hecho de que, aunque SL y PIM tienen una estrecha relación genética, son geográficamente, ecológicamente y morfológicamente distintas. SL se encuentra en gran medida en los ambientes cálidos y húmedos de la orilla de la cuenca del Amazonas, en los Andes orientales y se encuentran en otras zonas tropicales y subtropicales mientras que PIM sólo se encuentra en ambientes templados desérticos de la costa oeste. La diferencia drástica de precipitación entre los Andes orientales y occidentales se debe a que la humedad de los vientos alisios del este de la cuenca del Amazonas se precipita a medida que

asciende en los Andes, causando altas precipitaciones en la vertiente oriental y condiciones hiperáridas en las laderas occidentales de los Andes (el efecto de sombra de lluvia). En consecuencia, PIM y otras especies de tomate en los Andes occidentales se basan en gran medida al agua de los numerosos ríos que fluyen hacia el Océano Pacífico y de la niebla pesada durante los meses de invierno (Nakazato & Housworth, 2011). Es probable que las diferencias entre los terrenos orientales y occidentales de los Andes influyeran en los condiciones del cultivo de tomate, por lo tanto los frutos presentarían diferencias en cuanto a tamaño, color y sabor. Uno de los metabolitos que se encuentra en menor cantidad en la especie *S. lycopersicum* es el 3-methylbutanol, compuesto que se encuentra asociado al sabor y a la dulzura del fruto (Tieman et al., 2012). Por lo tanto, la disminución de la cantidad de 3-methylbutanol en el fruto se podría considerar una pérdida de sabor y dulzura.



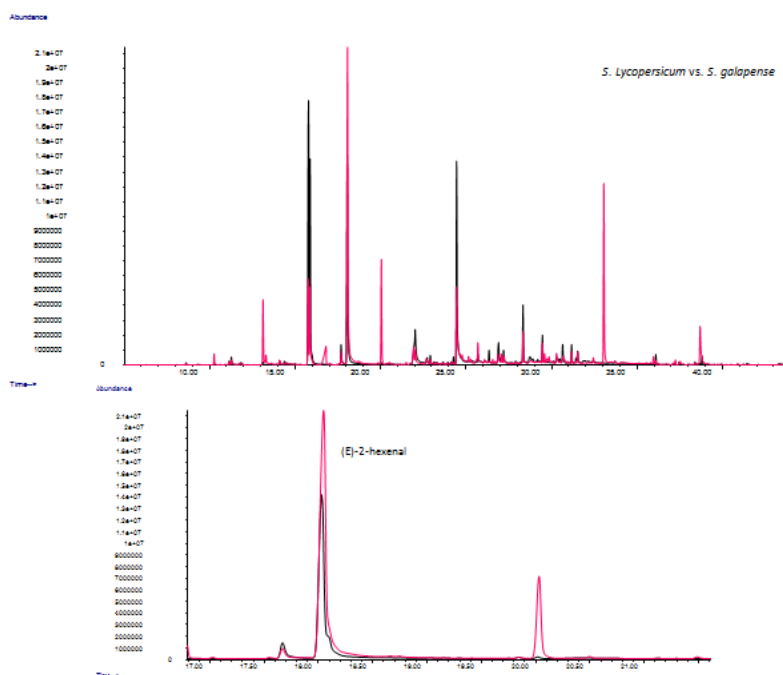
**Figura 13.** Perfiles de los compuestos volátiles de frutos maduros de tomates de dos especies diferentes: *S. lycopersicum* (negro) vs *S. cheesmaniae* (rojo).

La **Figura 13** muestra la comparación de los perfiles metabólicos de las especies *S. lycopersicum* (LL) y *S. cheesmaniae* (CHE). La comparación entre estas dos especies se realizó teniendo en cuenta que SL es una especie cultivada y se CHE es una especie endémica de la Isla Galápagos (Lucatti, van Heusden, de Vos, Visser, & Vosman, 2013).

En la **Figura 13** se puede observar que los perfiles de volátiles de las dos especies son muy diferentes, algunos volátiles disminuyen su concentración y otros la aumentan. Cabe destacar que el compuesto la cantidad phenylacetaldehyde disminuye en la especie SL. El phenylacetaldehyde es un compuesto derivado de la leucina y se encuentra en abundancia en frutas como la fresa y el tomate (Schwab et al., 2008), también está asociado con el sabor del fruto (Klee & Tieman, 2013),



por esta razón, una disminución en la cantidad de este compuesto en el fruto puede afectar su sabor.



**Figura 14.** Perfiles de los compuestos volátiles de frutos maduros de tomates de tres especies diferentes: *S. lycopersicum* (negro) vs *S. galapaguense* (rosa).

La **Figura 14** muestra la comparación de los perfiles metabólicos de las especies *S. lycopersicum* (LL) y *S. galapaguense* (GAL). La comparación entre estas dos especies se realizó teniendo en cuenta que SL es una especie cultivada y se GAL es una especie endémica de la Isla Galápagos, presenta variedades morfológicas, como en la forma de la hoja, está considerada como una especie con fruto rojo. GAL es una especie cercana a las especies cultivadas y se cree que al igual que SL experimentó un cuello de botella genético. Esto se pudo deber a una mayor acumulación de mutaciones potencialmente nocivos durante el cultivo y la colonización (Ichihashi & Sinha, 2014). En la **Figura 14** se puede observar que los perfiles de volátiles de las dos especies son muy diferentes, la mayoría de los volátiles disminuyen su concentración en la especie SL. El (E)-2-hexenal es uno de los volátiles que disminuye su concentración en la especie LL. EL (E)-2-hexenal es considerado como uno de los compuestos de importancia para el aroma del fruto, también se considera un compuesto verde, ya que le aporta al fruto un aroma a fresco (Tandon et al., 2000).

### 4.3. Análisis de los volátiles que afectan el sabor en los tomates frescos.

**Tabla 3.** Variación del valor relativo de cada metabolito con respecto a todos los genotipos.

Ruta	Compuesto	R Mayor/menor	Ruta	Compuesto	R Mayor/menor
apocarotenoide	Geranial	1569,42	fatty der.	(E,E)-2,4-decadienal	2237,54
apocarotenoide	Neral	1549,60	fatty der.	(Z)-2-penten-1-ol	1522,00
der. Carotenoides	Geranylacetone	4017,08	fatty der.	(E,Z)-2,4-decadienal TI	1311,57
der. Carotenoides	6-methyl-5-hepten-2-one	258,92	fatty der.	(Z)-3-hexenal	669,42
der. Carotenoides	beta-damascenone	216,61	fatty der.	3-methylfuran	233,20
der. Carotenoides	beta-cyclocitral	76,43	fatty der.	(E,E)-2,4-hexadienal	231,54
der. Carotenoides	beta-ionone	71,81	fatty der.	Octanoic acid	220,57
terpenoide	Ocimenol TI	392,35	fatty der.	1-hexanol	220,31
terpenoide	2-carene-10-al TI	346,48	fatty der.	2-methylfuran	199,02
terpenoide	(E)-linalool oxide	202,33	fatty der.	(E,Z)-2,4-heptadienal	170,54
terpenoide	Linalool	98,39	fatty der.	2-ethylfuran	144,69
terpenoide	p-cymene	61,97	fatty der.	3-pentanone	125,54
terpenoide	(Z)-linalool oxide	49,66	fatty der.	Pentanoic acid	118,05
terpenoide	alpha-terpineol	32,89	fatty der.	1-penten-3-ol	97,05
terpenoide	Limonene	27,62	fatty der.	2-pentylfuran	84,70
fenilpropanoides	Eugenol	24780,43	fatty der.	(E)-2-pentenal	80,63
fenilpropanoides	Methyl salicylate	6167,54	fatty der.	(E,E)-2,4-heptadienal	80,15
fenilpropanoides	Guaiacol	1906,74	fatty der.	(E)-2-hexenal	79,13
fenilpropanoides	Ethyl salicylate	1482,56	fatty der.	1-penten-3-one	74,18
fenilpropanoides	Salicylaldehyde	80,81	fatty der.	Nonanal	70,80
ester bca	2-methylbutyl acetate TI	15464,02	fatty der.	(E)-2-octenal	67,26
ester bca	2-methylpropyl acetate TI	1177,37	fatty der.	1-pentanol	41,27
ester bca	3-methylbutyl acetate TI	374,64	fatty der.	Hexanal	38,68
bcaa der.	2-isobutylthiazole	6020,34	fatty der.	2-ethylhexanoic acid	30,85
bcaa der.	3-methylbutanol	3214,38	fatty der.	(E)-2-heptenal	30,72
bcaa der.	2-methylbutanol	1321,72	fatty der.	Pentanal	30,25
bcaa der.	3-methylbutanal	712,35	fatty der.	Heptanal	27,02
bcaa der.	2-methyl-2-butanol	636,62	fatty der.	Octanal	19,11
bcaa der.	3-methylbutanoic acid	628,95	fatty der.	(E)-2-nonenal	17,30
bcaa der.	(E)-2-methyl-2-butenal	333,16	fatty der.	Hexanoic acid	11,00
bcaa der.	2-methylbutanal	322,74	fatty der.	Decanal	8,61
bcaa der.	Butanol	136,21	other fenolics	2-phenylethanol	36481,40
bcaa der.	2-methylpropanal	81,64	other fenolics	1-nitro-2-phenylethane	10137,68
	1-nitropentane TI	11630,29	other fenolics	Phenylacetaldehyde	2478,96
	Dimethyldisulfide TI	390,07	other fenolics	Benzyl nitrile	1595,48
	Ethanol	242,16	other fenolics	Styrene TI	1398,60
	Acetone	57,81	other fenolics	Benzaldehyde	56,72
	Methanethiol TI	20,84	other fenolics	Benzophenone	38,95
	Pseudocumene	9,24	other fenolics	Acetophenone	10,22

En la **Tabla 3** se presentan los rangos de variación de los diferentes volátiles de tomate agrupados por familias. Los volátiles que presentaron una variación de más de 10000 veces fueron: eugenol, 2-methylbutyl acetate, 1-nitropentane, 2-phenylethanol y 1-nitro-2-phenylethane. Los volátiles

eugenol, 2-phenylethanol, 1-nitro-2-phenylethane son derivados de compuestos fenólicos que se encuentran asociados con el sabor en frutos como el tomate mientras que el volátil 2-methylbutyl acetate es un éster. Aunque muchos ésteres son asociados con aromas frutales (Granell & Rambla, 2013), sin embargo algunos compuestos en particular pueden ser percibidos negativamente por el consumidor/frugívoro.

La variación de más de 10000 veces en la cantidad de estos volátiles en las muestras a lo largo de los distintos genotipos estudiados puede reflejar el diferente papel de estos compuestos en los hábitats naturales en los que estas especies crecen y se reproducen, y puede haber afectado el proceso de domesticación o mejora moderna, ya que algunos de ellos parecen tener efectos negativos en el sabor a altas concentraciones.

Los volátiles que presentaron una menor variación, del orden de 30 veces, fueron: limonene, methanethiol, pseudocumene, acetophenone, decanal, hexanoic acid, (E)-2-nonenal, heptanal y octanal. Los volátiles decanal, hexanoic acid, (E)-2-nonenal, heptanal y octanal se cuentan entre los derivados de ácidos grasos, los cuales constituyen una gran clase de compuestos, entre los que se incluyen los llamados volátiles de hoja verde, una familia de aldehídos C<sub>6</sub> alcoholes y ésteres derivados, y que se encuentran asociados con el aroma fresco típico de las hojas cuando son heridas o aplastadas (Granell & Rambla, 2013).

La menor variación (relativamente, ya que un rango de 30 no se observa para la mayoría de los compuestos de los seres vivos) cubre las muestras de las diferentes especies *S. lycopersicum* var. *lycopersicum* (LL) *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (LVC) y *S. pimpinellifolium* (PIM) nos indica que esta ruta metabólica se encuentra muy conservada. El que estos compuestos derivados de la ruta de ácidos grasos y su ruta de biosíntesis actúen como moléculas señalizadores en la respuesta al daño puede ser el motivo de su conservación de sus niveles a lo largo de las distintas especies relacionadas con el tomate.

#### 4.4. Amplitud de la variación en los niveles de volátiles y distribución según los distintos genotipos y especies.

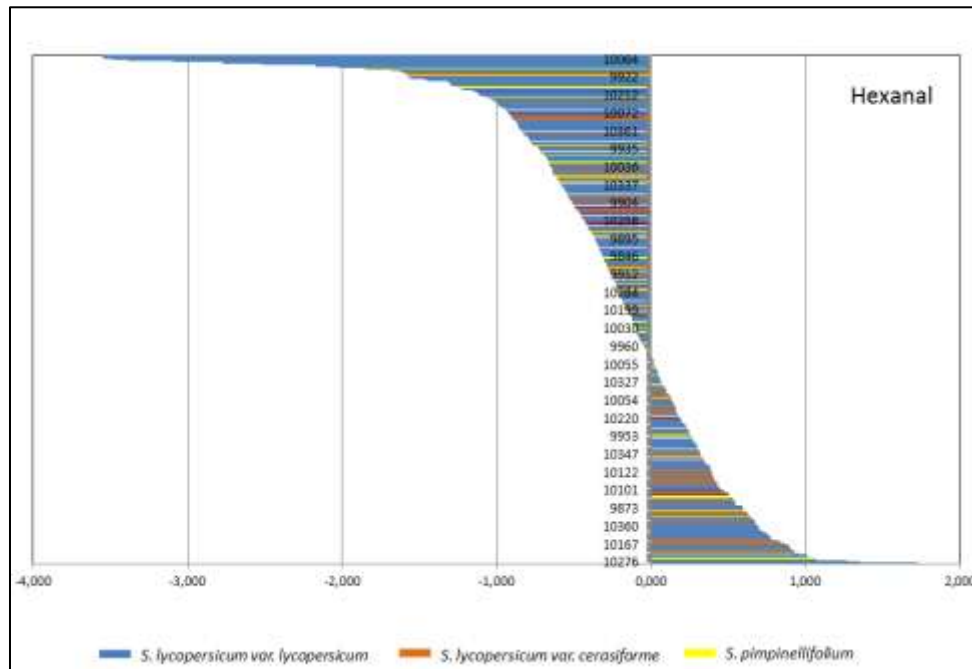
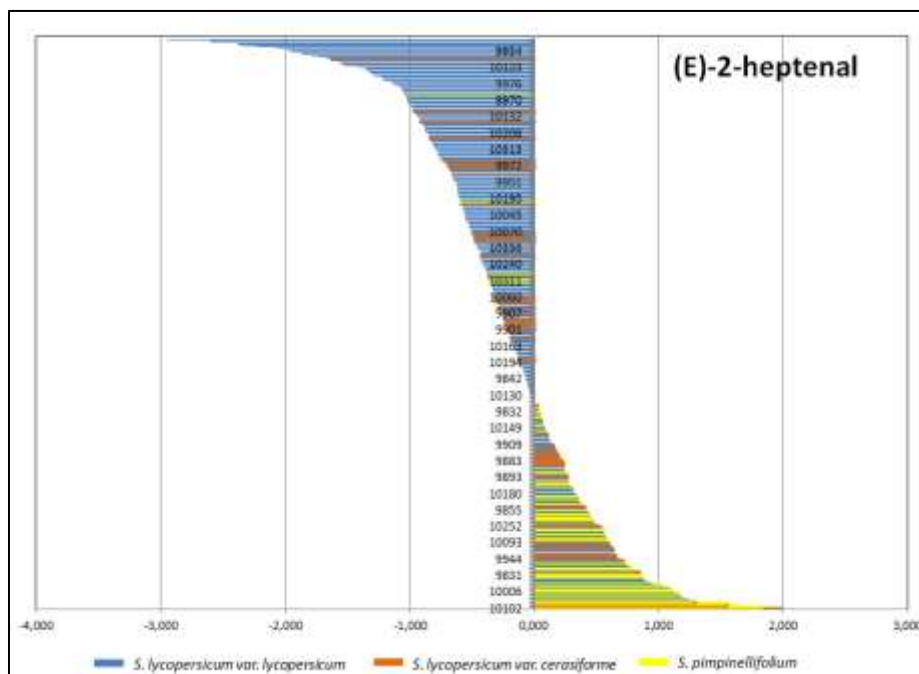


Figura 15. Perfil cuantitativo del Hexanal en cada una de las muestras de tomate.

En la **Figura 15** se puede observar el perfil cuantitativo de la composición de hexanal en cada muestra. La variación en la contribución de este volátil al perfil volátil es importante dada su contribución al aroma, dado que se considera un compuesto verde que contribuye a la percepción del mismo como fruto fresco (Tandon et al., 2000). Cómo varía su contribución en especies de *S. lycopersicum var. lycopersicum* (LL) *S. lycopersicum var. cerasiforme* (LVC) y *S. pimpinellifolium* (PIM) nos permite ver la importancia relativa dentro de cada una de ellas en comparación con las otras.

Lo primero que se observa es que hay una gran variabilidad entre las muestras. Las tres especies cuentan con entradas que poseen tanto altas como bajas concentraciones de hexanal y que son más numerosas las muestras que presentan bajas concentraciones de hexanal. Al comparar los valores entre las más altas y las más bajas se observa que es de -3 a +1 en escala log<sub>2</sub>, lo que implica que el rango de variación no es muy grande, independientemente de la especie y por lo tanto podemos decir que se ha preservado su capacidad de producción durante los procesos de domesticación y evolución.



**Figura 16.** Perfil cuantitativo del (E)-2-heptenal en cada una de las muestras de tomate.

En la **Figura 16** se puede observar el perfil cuantitativo de la prevalencia de (E)-2-heptenal en todas las muestras. Este compuesto es considerado de importancia para el sabor (Granell & Rambla, 2012). Se encuentra en el tomate maduro y sus niveles aumentan cuando el fruto es macerado o cortado (Dávila-Aviña et al., 2011). Se analizó también la variación en la prevalencia de este compuesto dentro de las especies *S. lycopersicum* var. *Lycopersicum* (LL) *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (LVC) y *S. pimpinellifolium* (PIM).

Lo primero que se puede observar es que, aunque existe variabilidad en las 3 especies, la mayoría de las PIM muestran altas cantidades, mientras que la mayoría de las LL tiene bajas cantidades de (E)-2-heptenal (aunque hay ciertas entradas concretas de LL con valores altos). Al comparar los valores entre las altas y bajas concentraciones de (E)-2-heptenal, se observa que cubren un rango de variación de unas 30 veces. Siendo la LL la especie cultivada y LVC una especie silvestre, podría decirse que debido a los procesos de domesticación las entradas de tomate LL han sufrido en general una reducción de (E)-2-heptenal y que esta pérdida pudo afectar su sabor.

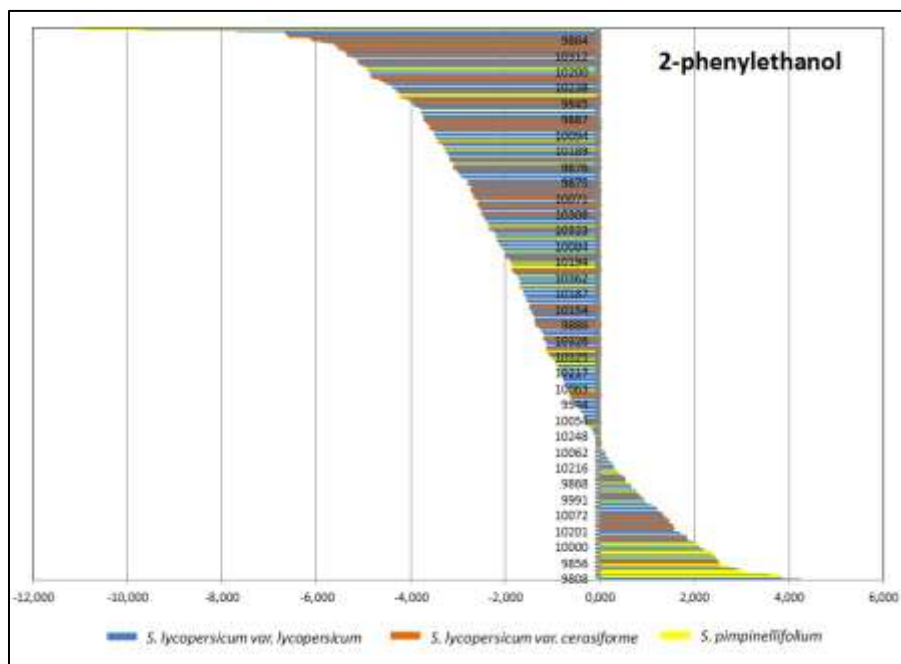
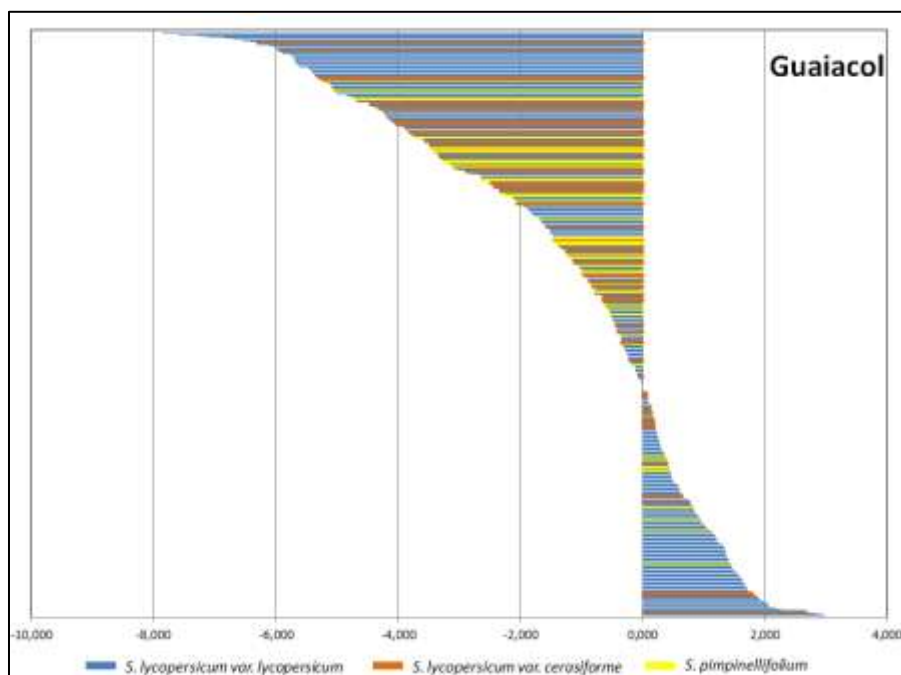


Figura 17. Perfil cuantitativo del 2-phenylethanol en cada una de las muestras de tomate.

En la **Figura 17** se puede observar el perfil cuantitativo de la composición de 2-phenylethanol en cada una de las muestras analizadas. Este volátil es considerado un compuesto de gran importancia para la percepción del sabor dulce y el aroma del fruto (Zanor et al., 2009). También se analizó la variación en la prevalencia de este compuesto dentro de las diferentes entradas de las especies *S. lycopersicum* var. *lycopersicum* (LL) *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (LVC) y *S. pimpinellifolium* (PIM).

Al igual que en los casos anteriores se observa que existe una gran variabilidad para 2-phenylethanol en las 3 especies, pero las PIM presentan altas cantidades del compuesto en la mayoría de las entradas, mientras que la mayoría de las LL tienen bajas cantidades de 2-phenylethanol. Al comparar los valores entre las altas y bajas concentraciones de 2-phenylethanol, se observa que el rango de variación es mucho más grande que para los otros volátiles comentados anteriormente: 30000 veces. Este resultado, en general, indica que durante el proceso de domesticación el contenido de 2-phenylethanol fue seleccionado, de forma que preferentemente las entradas de tomate con niveles bajos de este compuesto han sido conservadas. Aunque se ha descrito que este compuesto tiene un aroma floral y aumenta la percepción de dulzura del fruto, su precursor inmediato, el phenylacetaldehyde, tiene un aroma intenso y desagradable. Se sabe que concentraciones altas de phenylacetaldehyde producen efectos nauseabundos mientras que concentraciones bajas contribuyen a la percepción del sabor. En consecuencia, es razonable pensar que durante la domesticación se haya seleccionado contra el phenylacetaldehyde e, indirectamente, también contra el 2-phenylethanol, derivado suyo. Ello es consistente con la identificación del locus "malodorous", responsable de la acumulación de altos niveles de este 2-phenylethanol y phenylacetaldehyde, y su pérdida durante la domesticación (Tadmor et al., 2002).



**Figura 18.** Perfil cuantitativo del guaiacol en cada una de las muestras de tomate.

En la **Figura 18** se puede observar el perfil cuantitativo de la composición de guaiacol en todas las muestras. El guaiacol se ha asociado al aroma medicinal o ahumado en tomate y su percepción varía desde deseado a poco deseado (Zanor et al., 2009). Además, parece que se encuentra asociado con la dulzura del fruto (Tieman et al., 2012). Se analizó la variación en los niveles de este compuesto en las muestras correspondientes de las especies *S. lycopersicum var. lycopersicum* (LL) *S. lycopersicum var. cerasiforme* (LVC) y *S. pimpinellifolium* (PIM) para ver su prevalencia relativa según las mismas.

Lo primero que se observa es el rango de la variabilidad en las concentraciones de este volátil a lo largo de las 3 especies: mientras la mayoría de las muestras PIM presenta medias/bajas cantidades, la mayoría de muestras con altas concentraciones de guaiacol pertenecen a especies LL. Al comparar los valores entre las altas y bajas concentraciones de guaiacol, se observa un rango de variación de 1000 veces. Podría decirse que debido a los procesos de domesticación la especie LL ha generado variantes que pueden producir altas concentraciones de este compuesto que pueden afectar al sabor del fruto. De hecho, nuestro grupo ha contribuido a identificar las bases moleculares de esa variabilidad, que se debe a una glicosiltransferasa que previene la liberación de guaiacol en las entradas con bajo nivel del compuesto (y de otros compuestos relacionados, como el methyl salicylate, el eugenol, y el ethyl salicylate) (Tikunov et al., 2013).

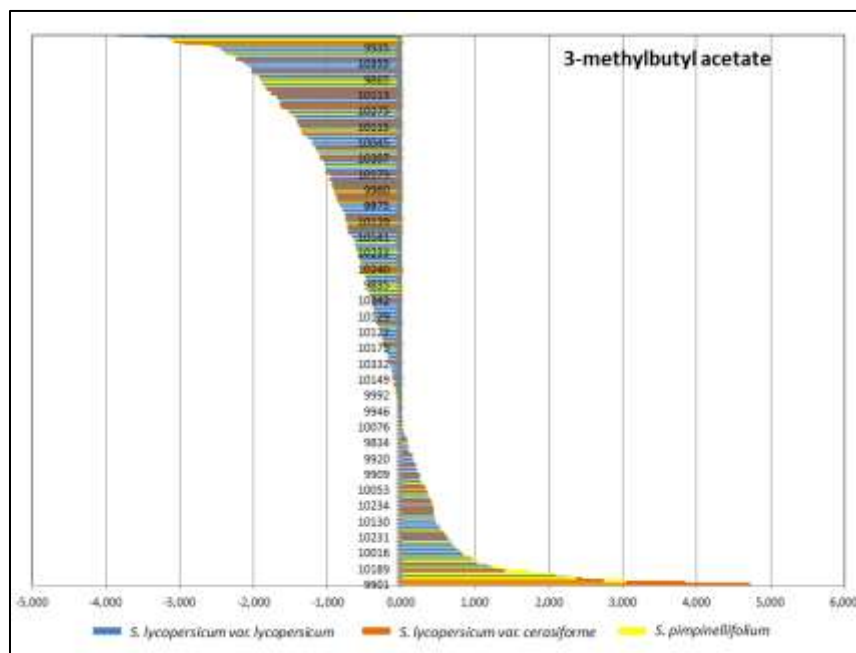


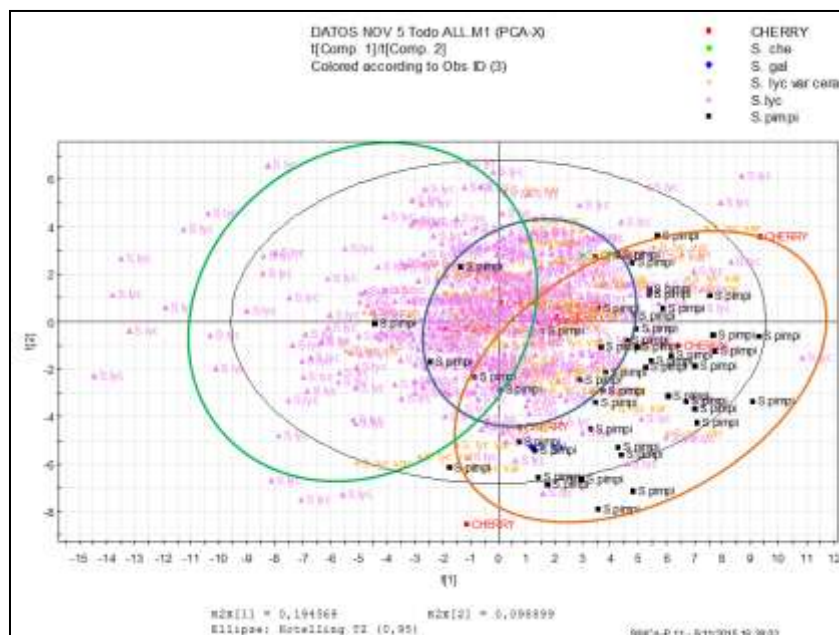
Figura 19. Perfil cuantitativo del 3-methylbutyl acetate en cada una de las muestras de tomate.

En la **Figura 19** se puede observar el perfil cuantitativo de la composición de 3-methylbutyl acetate. Este es un éster, y los ésteres son compuestos importantes que tienen umbrales de olor bajos que proporcionan aromas característicos que los seres humanos asociamos a frutos específicos, pero en ocasiones también a compuestos desagradables. En su mayoría, los compuestos volátiles de ésteres proporcionan aromas “afrutados”, y se encuentran entre los compuestos más abundantes en frutas como la manzana, la fresa, el melocotón y el banano. Su nivel en tomate suele ser muy bajo y no correlaciona con una buena percepción del sabor del mismo (Granell & Rambla, 2013).

Lo primero que se observa es la variabilidad en las concentraciones de este volátil en las 3 especies. En general, bastantes de las entradas de PIM se cuentan entre las que tienen las mayores concentraciones de este compuesto. La mayoría de muestras tanto de LL como de PIM presentan concentraciones medias o bajas de 3-methylbutyl acetate. Al comparar los valores entre las altas y bajas concentraciones de 3-methylbutyl acetate, se observa un rango de variación de 300 veces. Este resultado, indica que aunque en general hay variabilidad para este compuesto dentro de las especies de tomate que producen frutos rojos, este se encuentra en poca abundancia, y desconocemos cuál es la base de esa variabilidad. Por el contrario, se sabe que las especies silvestres relacionadas con el tomate que producen frutos verdes acumulan altos niveles de 3-methylbutyl acetate, y se ha propuesto que en el proceso evolutivo tanto las aciltransferasas como las esterasas en diferentes formas y alelos han jugado un papel importante en la evolución de los niveles de este compuesto (Goulet et al., 2012; Goulet et al., 2015).



#### 4.5. Análisis de PCAs



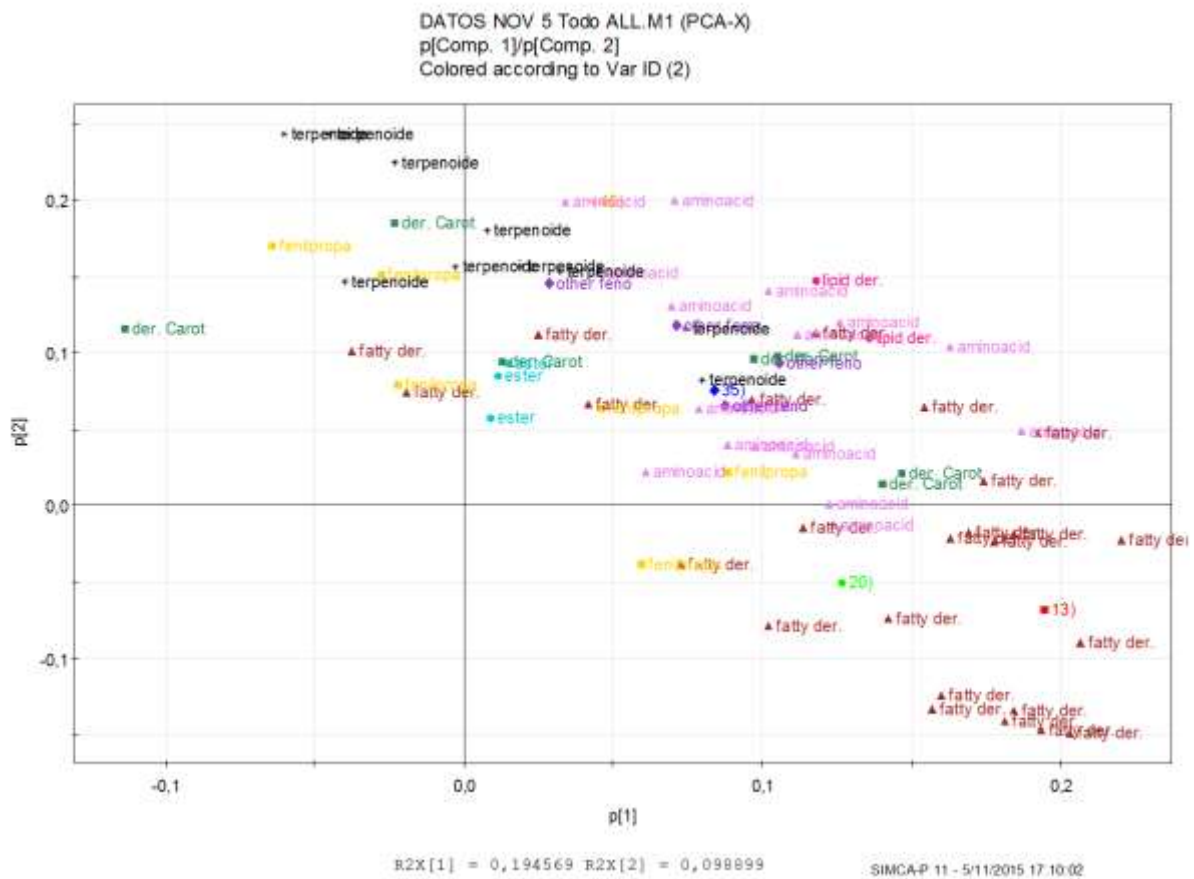
**Figura 20.** Análisis de componentes principales (PCA) de las muestras de tomate. El gráfico separa las especies *S. lycopersicum* var *lycopersicum* (*S. Lyc*), *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (*S. lyc var cera*), y *S. pimpinellifolium* (*S. pimp*).

El análisis de nuestro conjunto de datos mediante su proyección en componentes principales (PCA) nos puede permitir obtener información adicional sobre la producción de volátiles en el set de variabilidad. En la **Figura 20**, se presenta el "score plot" de las dos primeras componentes principales correspondiente a nuestras muestras analizadas para el conjunto de volátiles. El análisis revela que las muestras se encuentran agrupadas de acuerdo con su especie. Dentro del óvalo naranja se agrupan la mayoría de las muestras de la especie silvestre *S. pimpinellifolium* (*PIM*), y esta agrupación se localiza en el espacio PCA hacia la derecha. Dentro del óvalo azul se agrupan la mayoría de las entradas de *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (*LVC*) (pariente semidomesticado de *S. lycopersicum*) y se localiza en el centro del espacio PCA. Finalmente, en la parte izquierda del PCA está el óvalo verde que contiene la mayoría de las entradas de *S. lycopersicum* var *lycopersicum* (*LL*) (variedad cultivada).

El PCA muestra además que *PIM* es más semejante (solapa más o está más cerca) a *LVC* que a *LL*, lo que podría interpretarse como que las muestras se sitúan, de derecha a izquierda, en una especie de ruta de domesticación. Por otro lado, la mayor proximidad/solapamiento entre *LL* y *LVC* que entre estas y *PIM* es compatible con el hecho de ser variedades de la misma especie. La progresión hacia la izquierda entre las entradas se le puede atribuir a los procesos de domesticación y mejoramiento que ha sufrido el tomate.

Aunque los objetivos de la mejora de *LL* han estado orientados hacia la resistencia a enfermedades, la adaptación a las diversas áreas de producción, rendimiento y uniformidad de la

producción, resulta evidente que ello ha ocasionado de forma inadvertida una mayor variabilidad en la producción de compuestos volátiles. El procedimiento de mejora implicó en muchos de los casos la introducción de muchas introgresiones de PIM y otras especies del género sexualmente compatibles con el tomate pero filogenéticamente más distantes, dando lugar a una ampliación de la diversidad genética de las LL. En estos programas de mejoramiento se seleccionaron los rasgos específicos que son característicos de los productos frescos y procesados del mercado y de transformación, lo que permitió una mayor diversificación y diferenciación genética entre las clases de tomate en el mercado. Los rasgos que han sido seleccionados durante la domesticación de tomate fueron el color, el peso y la forma de la fruta. Es interesante que algunos de los genes que introducen variabilidad en color, afecten los niveles de carotenoides, lo que indirectamente ampliaría la variabilidad en los volátiles derivados de los mismos (Frusciante et al., 2014).

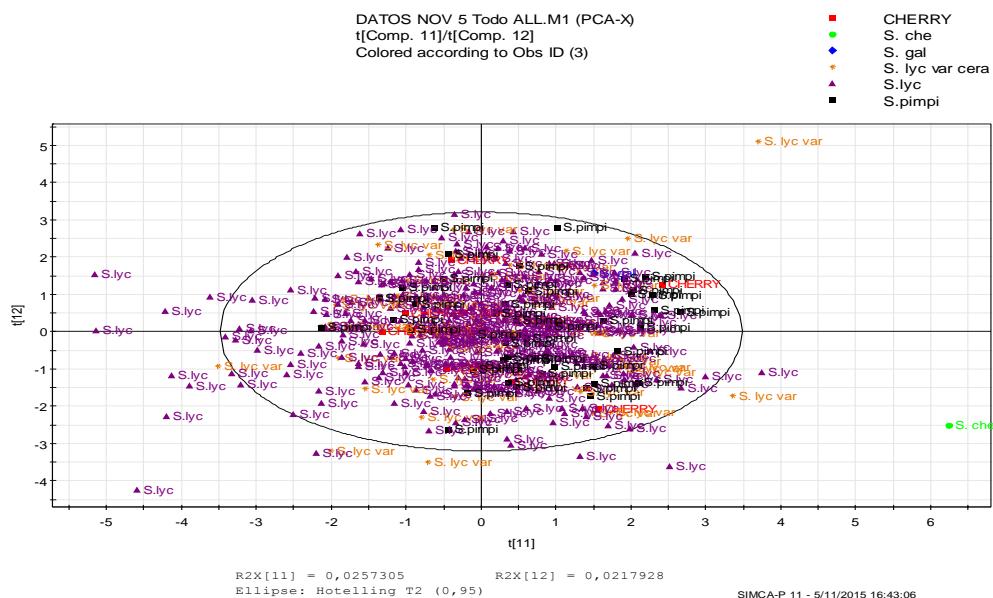


**Figura 21.** Loading plot del PCA de las muestras de tomate. El gráfico muestra que las especies *Solanum lycopersicum*, tienen mayor contenido de terpenoides y las especies *Solanum pimpinellifolium* tienen mayor contenido de derivados de ácidos grasos.

En la **Figura 21**, representa los “loading plot” del PCA anterior, y permite averiguar cuáles son los volátiles que contribuyen a agrupar las muestras de las diferentes especies y separarlas de las demás. Es decir, cuáles son los volátiles que contribuyen a agrupar las entradas de PIM en la

derecha, las de LVC en el centro, y las de LL a la izquierda del espacio PCA de la **Figura 20**. Los volátiles que más contribuyen a separar estos tres grupos son los derivados de ácidos grasos y los terpenoides. Los frutos de PIM tienen mayor contenido en derivados de ácidos grasos que LL. Los derivados de ácidos grasos son importantes para producir el aroma característico del tomate fresco, particularmente en las notas aromáticas “verdes”. Su producción ocurre por una acción enzimática que actúa fundamentalmente durante la desestructuración del fruto (Chen et al., 2004). Teniendo en cuenta la importancia de los derivados de ácidos grasos y su alto contenido en PIM y su menor contenido en LL es posible que ello haya ocasionado un efecto en el aroma/sabor de algunas de las entradas de LL.

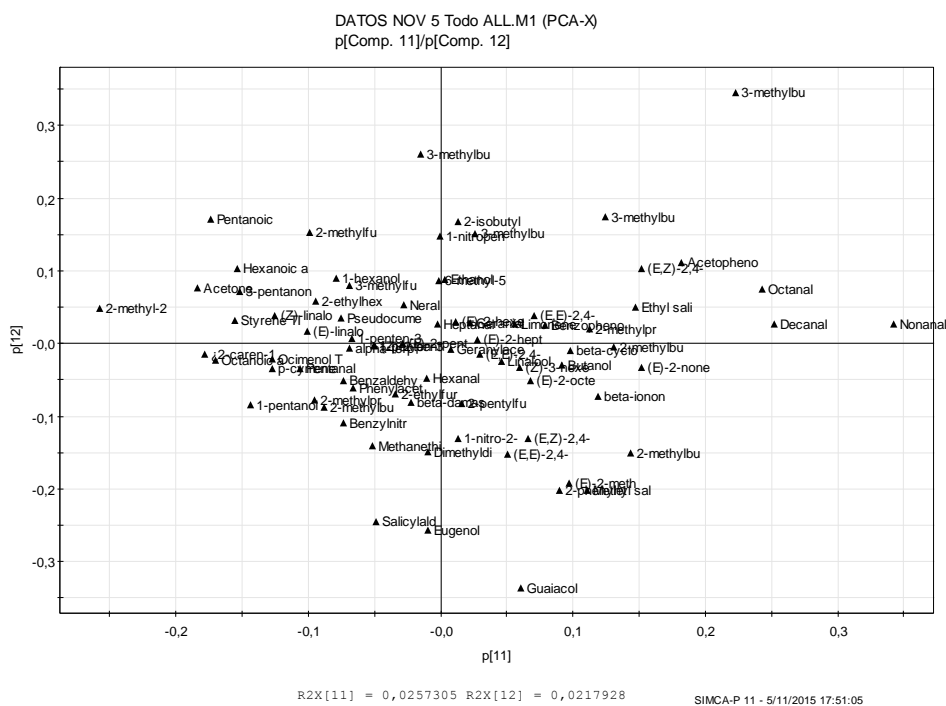
Los resultados también indican que LL tiene mayor contenido de terpenoides que PIM. Los terpenoides constituyen una de las más diversas familias de productos naturales, con alrededor de 40000 estructuras diferentes de terpenoides descubiertos por ahora. Los terpenoides volátiles: hemiterpenoides (C<sub>5</sub>), monoterpenoides (C<sub>10</sub>), sesquiterpenoides (C<sub>15</sub>) y algunos diterpenoides (C<sub>20</sub>) participan en las interacciones entre plantas y herbívoros o polinizadores y también participan en las respuestas de defensa o de estrés en general de la planta. Los terpenoides, principalmente los miembros del C<sub>10</sub> y C<sub>15</sub> de esta familia, afectan los perfiles de sabor de la mayoría de los frutos y el aroma de las flores en diferentes niveles (Schwab et al., 2008). Debido a la importancia de esta ruta metabólica y la función de sus derivados en la planta al observar los resultados en donde la especie cultivada LL tiene más cantidad de estos compuestos, podría decirse que en particular esta ruta ha sido no solo conservada, sino su importancia incluso sea mayor en LL. Queda por averiguar si el motivo para ello es que uno de los criterios de selección usados para el mejoramiento y la domesticación del cultivo de tomate haya sido la resistencia a agentes patógenos, donde estos compuestos terpenoides pueden tener un valor importante (Rambla y Granell, 2014).



**Figura 22.** Gráfica que agrupa *S. lycopersicum var lycopersicum*, *Solanum pimpinellifolium* y *S. lycopersicum var. cerasiforme*, *S. galapaguense* y separa *S. cheesmaniae*.

En la **Figura 22**, se muestran las componentes 11 y 12 del análisis de componentes principales (PCA) en la que se incluyen otras especies silvestres. Aunque estas dos componentes solo explican una pequeña parte de la variabilidad existente en el perfil de volátiles a lo largo de todas las muestras analizadas (el 2,6% y el 2,2% respectivamente), este “score plot” pone de manifiesto la existencia de un perfil de volátiles característico de *S. cheesmaniae* (CHE) que permite diferenciarla de todas las otras entradas. La muestra de *S. cheesmaniae* (CHE) corresponde a una única entrada concreta de esta especie endémica de las Islas Galápagos.

CHE al igual que la mayor parte de la fauna y flora de las Islas Galápagos, ha evolucionado en forma aislada de las demás especies del continente, adquiriendo una combinación morfológica y características fisiológicas únicas en el género, por ejemplo, las frutas de color naranja-rojo o naranja-amarillo, el follaje amarillo-verde, el tamaño de la semilla y latencia de las semillas excepcional (Nuez, Prohens, & Blanca, 2004). Así que este resultado se debe a que CHE ha tenido una evolución diferente a la de las demás especies.



**Figura 23.** Loading plot del PCA de las muestras de tomate que separa la especie *S. cheesmaniae* de las demás especies de frutos coloreados relacionados con el tomate. El gráfico muestra que la especie *S. cheesmaniae* contiene mayor cantidad de los volátiles nonanal, decanal, octanal.

En la **Figura 23**, se representa el “loading plot” correspondiente a las mismas componentes del PCA, lo que permite identificar cuáles son los volátiles que más contribuyen a la separación entre CHE (derecha) y las demás especies presentes en el “score plot” de la **Figura 22**. El contenido mayor de volátiles octanal, nonanal y decanal en CHE parece ser el principal responsable de su separación del resto de las muestras de fruto de las demás especies. El nonanal es el volátil con

más peso en la componente principal que separa CHE. De las otras entradas, y junto con el octanal y el decanal son derivados de ácidos grasos. Cabe esperar que las diferencias en el contenido de derivados de ácidos grasos afecten el aroma/sabor (Chen et al., 2004). Todo ello ofrece oportunidades para identificar las entradas con mayores niveles de los compuestos de interés para un posible programa de mejora dirigido a cada tipo de compuesto volátil. Por otra parte, la disponibilidad en nuestro grupo de investigación de información sobre la resecuenciación de estas 451 entradas, permitirá disponer de un panel de SNPs polimórficos a lo largo de todas ellas con el que realizar un estudio de GWAS (genome wide association study) y definir las regiones del genoma que afectan los niveles de cada uno de los volátiles, así como qué alelos son relevantes para cada caso.

## 5. CONCLUSIONES

1. El análisis de agrupamiento jerárquico (HCA) de los 78 metabolitos y 451 muestras de fruto de tomate, junto con HCA previos de este grupo realizados sobre poblaciones de líneas RILs e ILs, permitió la correlación de los compuestos volátiles de acuerdo con su ruta metabólica y la asignación tentativa de algunos compuestos de los que no se conoce su ruta con certeza.
2. Las muestras mostraron en general unos perfiles de volátiles que en principio son más similares entre las entradas correspondientes a la misma especie y más diferentes cuanto más alejadas filogenéticamente sean entre sí. Las muestras de frutos correspondientes a entradas de la especie PIM se caracterizaron en general por una alta concentración de volátiles derivados de ácidos grasos, lo cual podría afectar al sabor y al aroma del fruto maduro.
3. Las 451 muestras de frutos de tomate de diferentes especies analizadas mostraron una gran variabilidad en el perfil cuantitativo de cada uno de los 78 volátiles identificados. Los compuestos asociados al sabor y al aroma (como hexanal, 3-methylbutyl acetate, guaiacol, 2-phenylethanol, (E)-2-heptenal) presentaron mayor rango de variabilidad a la vez que las menores concentraciones de estos compuestos en las entradas LL.
4. Los volátiles que presentaron una variación de más de 10000 veces fueron fundamentalmente ésteres y derivados de compuestos fenólicos: eugenol, 2-methylbutyl acetate, 1-nitropentane, 2-phenylethanol y 1-nitro-2-phenylethane. Algunos de ellos parecen haber sufrido una selección negativa durante el proceso de domesticación reciente, ya que los niveles elevados de estos compuestos se asocian con sabores/olores no deseados o nauseabundos.
5. El análisis de componentes principales (PCA) agrupó las muestras de acuerdo con su especie: *S. pimpinellifolium* (PIM) (silvestre), *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (LVC) (pariente silvestre de *S. lycopersicum*) y *S. lycopersicum* var *lycopersicum* (LL) (variedad cultivada). Estas diferencias se pueden atribuir a una consecuencia indirecta de los programas de mejoramiento del cultivo de tomate que dio como resultado la introducción de muchas introgresiones de PIM y familiares de tomate más distantes, dando lugar a una ampliación de la diversidad genética de las LL e indirectamente de su perfil de compuestos volátiles
6. En general las entradas de PIM tienen mayor contenido de compuestos volátiles derivados de ácidos grasos que LL, que pueden ser relevantes para la producción del aroma característico del tomate fresco.
7. Los frutos de las entradas de LL tiene mayor contenido de terpenoides que PIM, lo que podría afectar al sabor y a la susceptibilidad/resistencia a patógenos. Dado que uno de los criterios de selección usados para el mejoramiento y domesticación del cultivo de tomate ha sido la resistencia a agentes patógenos, no es de descartar que este sea el motivo del mayor nivel de estos volátiles en LL que en PIM.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Bai, Y., & Lindhout, P. (2007). Domestication and breeding of tomatoes: What have we gained and what can we gain in the future? *Annals of Botany*, *100*(5), 1085–1094.  
<http://doi.org/10.1093/aob/mcm150>
- Bergougnoux, V. (2014). The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances*, *32*(1), 170–189. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.003>
- Bino, R. J., Hall, R. D., Fiehn, O., Kopka, J., Saito, K., Draper, J., ... Sumner, L. W. (2004). Potential of metabolomics as a functional genomics tool. *Trends in Plant Science*, *9*(9), 418–425.  
<http://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.07.004>
- Blanca, J., Cañizares, J., Cordero, L., Pascual, L., Díez, M. J., & Nuez, F. (2012). Variation Revealed by SNP Genotyping and Morphology Provides Insight into the Origin of the Tomato. *PLoS ONE*, *7*(10), e48198. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0048198>
- Blanca, J., Montero-Pau, J., Sauvage, C., Bauchet, G., Illa, E., Díez, M. J., ... Cañizares, J. (2015). Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. *BMC Genomics*, *16*(1), 257. <http://doi.org/10.1186/s12864-015-1444-1>
- Buttery, R. G. (1990). Quantitative and sensory aspects of flavor of tomato and other vegetables and fruits, in *Flavor Science: Sensible Principles and Techniques*, T.E. Acree and R. Teranishi, Eds., pp. 259–286, The American Chemical Society, Washington, DC, USA, 1993
- Buttery, R. G., & Ling, L. C. (1993). Volatile components of tomato fruit and plant parts - Relationship and biogenesis. *Bioactive Volatile Compounds from Plants (ACS 525)*, *525*, 23–34. Retrieved from \\Robsrv-05\reference manager\Articles\14316.pdf
- Cagas, C. C., Lee, O. N., Nemoto, K., & Sugiyama, N. (2008). Quantitative trait loci controlling flowering time and related traits in a *Solanum lycopersicum* × *S. pimpinellifolium* cross. *Scientia Horticulturae*, *116*(2), 144–151. <http://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.12.003>
- Carrera J, Fernández Del Carmen A, Fernández-Muñoz R, Rambla JL, Pons C, Jaramillo A, Elena SF, Granell A. Fine-tuning tomato agronomic properties by computational genome redesign. *PLoS Comput Biol*. 2012;8(6):e1002528. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002528. Epub 2012 Jun 7
- Chen, G., Hackett, R., Walker, D., Taylor, A., Lin, Z., & Grierson, D. (2004). Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (TomloxC) involved in the generation of fatty acid-derived flavor compounds. *Plant Physiology*, *136*(1), 2641–2651.  
<http://doi.org/10.1104/pp.104.041608>
- Dávila-Aviña, J. E. D. J., González-Aguilar, G. a., Ayala-Zavala, J. F., Sepúlveda, D. R., & Olivas, G. I. (2011). Compuestos volátiles responsables del sabor del tomate. *Revista Fitotecnia Mexicana*, *34*(2), 133–143. <http://doi.org/id=61018842003>
- Foolad, M. R. (2007). Genome Mapping and Molecular Breeding of Tomato. *International Journal*

- of Plant Genomics*, 2007, 1–52. <http://doi.org/10.1155/2007/64358>
- Frusciante, S., Diretto, G., Bruno, M., Ferrante, P., Pietrella, M., Prado-Cabrero, A., ... Giuliano, G. (2014). Novel carotenoid cleavage dioxygenase catalyzes the first dedicated step in saffron crocin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(33), 12246–51. <http://doi.org/10.1073/pnas.1404629111>
- Granell, A., & Rambla, J. L. (2013). Biosynthesis of Volatile Compounds. *The Molecular Biology and Biochemistry of Fruit Ripening*, 135–161. <http://doi.org/10.1002/9781118593714.ch6>
- Goulet C, Kamiyoshihara Y, Lam NB, Richard T, Taylor MG, Tieman DM, Klee HJ (2015) Divergence in the enzymatic activities of a tomato and *Solanum pennellii* alcohol acyltransferase impacts fruit volatile ester composition. *Mol Plant*. 2015 Jan;8(1):153-62.
- Goulet C, Mageroy MH, Lam NB, Floystad A, Tieman DM, Klee HJ. (2012) Role of an esterase in flavor volatile variation within the tomato clade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Nov 13;109(46):19009-14.
- Ichihashi, Y., & Sinha, N. R. (2014). From genome to phenome and back in tomato. *Current Opinion in Plant Biology*, 18(1), 9–15. <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.12.004>
- Klee, H. J., & Tieman, D. M. (2013). Genetic challenges of flavor improvement in tomato. *Trends in Genetics*, 29(4), 257–262. <http://doi.org/10.1016/j.tig.2012.12.003>
- Kuehnbaum, N. L., & Britz-Mckibbin, P. (2013). New advances in separation science for metabolomics: Resolving chemical diversity in a post-genomic era. *Chemical Reviews*, 113(4), 2437–2468. <http://doi.org/10.1021/cr300484s>
- Lucatti, A. F., van Heusden, A. W., de Vos, R. C., Visser, R. G., & Vosman, B. (2013). Differences in insect resistance between tomato species endemic to the Galapagos Islands. *BMC Evolutionary Biology*, 13(1), 175. <http://doi.org/10.1186/1471-2148-13-175>
- Nakazato, T., & Housworth, E. a. (2011). Spatial genetics of wild tomato species reveals roles of the Andean geography on demographic history. *American Journal of Botany*, 98(1), 88–98. <http://doi.org/10.3732/ajb.1000272>
- Nuez, F., Prohens, J., & Blanca, J. M. (2004). Relationships, Origin, and Diversity of Galapagos Tomatoes: Implications for the Conservation of Natural Populations. *American Journal of Botany*, 91(1), 86–99. <http://doi.org/10.3732/ajb.91.1.86>
- Rambla JL, López-Gresa MP, Bellés JM, Granell A (2015). Metabolomic profiling of plant tissues. *Methods Mol Biol* ;1284:221-35
- Rambla JL, Tukinov, Bovy A, Monforte A, Granell A (2014). The expanded tomato fruit volatile landscape. *J Exp Bot* 65: 4613-4624.
- Rolin, D., Teyssier, E., Hong, Y., & Gallusci, P. (2015). *Tomato fruit quality improvement facing the*



*functional genomics revolution. Applied Plant Genomics and Biotechnology.* Elsevier Ltd.  
<http://doi.org/10.1016/B978-0-08-100068-7.00009-4>

- Schwab, W., Davidovich-Rikanati, R., & Lewinsohn, E. (2008). Biosynthesis of plant-derived flavor compounds, 712–732. <http://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03446.x>
- Shulaev, V. (2006). Metabolomics technology and bioinformatics. *Briefings in Bioinformatics*, 7(2), 128–139. <http://doi.org/10.1093/bib/bbl012>
- Tadmor Y1, Fridman E, Gur A, Larkov O, Lastochkin E, Ravid U, Zamir D, Lewinsohn E. (2002) Identification of malodorous, a wild species allele affecting tomato aroma that was selected against during domestication. *J Agric Food Chem.* 2002 Mar 27;50(7):2005-9.
- Tandon, K. S., Baldwin, E. a., & Shewfelt, R. L. (2000). Aroma perception of individual volatile compounds in fresh tomatoes (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) as affected by the medium of evaluation. *Postharvest Biology and Technology*, 20(3), 261–268.  
[http://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00143-5](http://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00143-5)
- Tieman, D., Bliss, P., McIntyre, L. M., Blandon-Ubeda, A., Bies, D., Odabasi, A. Z., ... Klee, H. J. (2012). The Chemical Interactions Underlying Tomato Flavor Preferences. *Current Biology*, 22(11), 1035–1039. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2012.04.016>
- Tikunov YM, Molthoff J, de Vos RC, Beekwilder J, van Houwelingen A, van der Hooft JJ, Nijenhuis-de Vries M, Labrie CW, Verkerke W, van de Geest H, Viquez Zamora M, Presa S, Rambla JL, Granell A, Hall RD, Bovy AG.(2013) Non-smoky glycosyltransferase1 prevents the release of smoky aroma from tomato fruit. *Plant Cell.* 2013 Aug;25(8):3067-78. doi: 10.1105/tpc.113.114231. Epub 2013 Aug 16.
- Tikunov, Y., Lommen, A., Ric de vos, C. H., Verhoeven, H., Bino, R., Hall, R., & Bovy, A. G. (2005). A Novel Approach for Nontargeted Data Analysis for Metabolomics. Large-Scale Profiling of Tomato Fruit Volatiles. *Plant Physiology*, 139(November), 1125–1137.  
<http://doi.org/10.1104/pp.105.068130.reported>
- Weese, T. L., & Bohs, L. (2007). A Three-Gene Phylogeny of the Genus *Solanum* (Solanaceae). *Systematic Botany*, 32(2), 445–463. <http://doi.org/10.1600/036364407781179671>
- Zanor, M. I., Rambla, J. L., Chaïb, J., Steppa, A., Medina, A., Granell, A., ... Causse, M. (2009). Metabolic characterization of loci affecting sensory attributes in tomato allows an assessment of the influence of the levels of primary metabolites and volatile organic contents. *Journal of Experimental Botany*, 60(7), 2139–2154.  
<http://doi.org/10.1093/jxb/erp086>

