

Universitat Politècnica de València
Departamento de Biotecnología



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Instituto de Conservación y Mejora
de la Agrodiversidad Valenciana

TESIS DOCTORAL

**Aprovechamiento de la diversidad en *Solanum L.*
sección *Lycopersicon* para la mejora genética
de la calidad organoléptica en tomate.**

Autor

Luis Galiana Balaguer

Para optar al título de

DOCTOR POR LA UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE

VALÈNCIA València, junio de 2017

Dirigida por:

Dr. Salvador A. Roselló Ripollés (UJI)

Dr. Jaime Cebolla Cornejo (COMAV-UPV)

LOS DIRECTORES DE TESIS:

Dr. Salvador A. Roselló Ripollés, Catedrático del Área de Producción vegetal del Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural de la Universitat Jaume I de Castellón, y **Dr. Jaime Cebolla Cornejo**, Profesor Contratado Doctor, en el Departamento de Biotecnología de la Universitat Politècnica de València.

HACEN CONSTAR QUE:

La presente memoria de Tesis Doctoral, presentada por **Luis Galiana Balaguer**, titulada **“Aprovechamiento de la diversidad en *Solanum* L. sección *Lycopersicon* para la mejora genética de la calidad organoléptica en tomate”** realizada en el Departamento de Biotecnología de la Universitat Politècnica de València, reúne las condiciones necesarias para su defensa,

Fdo. Dr. Salvador Roselló Ripollés

Fdo. Dr. Jaime Cebolla Cornejo

AGRADECIMIENTOS

Cuando entré en la Universitat Politècnica de València a estudiar en la antigua ETSIA, soñaba con dedicarme a la investigación, y la providencia hizo que me encontrara con el grupo de trabajo de Fernando Nuez. Tras una interesante beca de colaboración, me dio la oportunidad de cumplir mi sueño. Por esa razón quiero que sea la primera persona a quien nombro en esta tesis. Por supuesto también quiero agradecer a mis directores de tesis, Salvador Roselló y Jaime Cebolla, su dedicación, su ánimo, su entusiasmo y su amistad.

Desde que empecé se han cruzado muchas personas en mi camino: Montaña Cámara y Esperanza Torija, de la Universidad Complutense, con quien colaboramos en los comienzos; Ángel Maquieira y José Manuel Herrero, químicos que me adentraron en el mundo de la electroforesis capilar; y los compañeros del departamento de Biotecnología, con los que tantos buenos ratos he compartido, y a quienes no nombraré por no olvidar a ninguno de ellos.

Tanto mis directores de tesis como yo, queremos agradecer la financiación recibida por parte de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, CYCIT (proyectos AGF99-0602-C02-01 y AGF99-0602-C02-02), la Generalitat Valenciana (proyecto GV00-084-3), el Ministerio de Ciencia y Tecnología (proyecto AGL2002-04224-C02-02) y de la Fundación Bancaja (proyecto P1.1 A2001-19) para el desarrollo de las investigaciones en las que se enmarca esta tesis. Así mismo, quiero agradecer al Ministerio de Educación y Cultura la beca FPU que me fue concedida en el comienzo de la tesis.

No puedo dejar de nombrar a los directivos, amigos y compañeros de la obra Salesiana San Antonio Abad que me han facilitado, concediéndome horarios extravagantes y mucho ánimo, que no me desvinculara de la UPV. Fue difícil elegir entre mis dos pasiones, investigación o trabajo con y por los jóvenes, y los salesianos supieron darme una de ellas posibilitando mantenerme en la otra.

A los amigos y a toda mi familia. A mis padres Vicente y María, y mis hermanos Vicente, María, Ana y Fina, que han hecho de mi un hombre de provecho. A Aurora y Ángel, siempre disponibles.

Y por supuesto, a mi mujer Aurora, apoyo, confidente y fuerza, y a mis hijos Nicolás y Samuel, que me han animado y llenan de sentido mis días.

Gracias en definitiva a todos aquellos que formaron y forman parte del camino de mi vida, en la que encuentras capítulos tan apasionantes como el que ahora me dispongo a cerrar.

Gracias a todos.

A Aurora, Nicolás y Samuel

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
RESUMEN.....	1
RESUM.....	3
ABSTRACT.....	5
INTRODUCCIÓN.....	7
1.- De la revolución neolítica a la globalización en la gestión agrícola.....	9
2.- El tomate en el contexto agrícola.....	12
3.- El tomate: objetivo de mejora genética.	16
4.- La calidad del tomate.....	19
5.- Factores que afectan a la calidad del fruto.....	24
5.1.- Factores ambientales y agronómicos.....	25
6.- Dificultades en la mejora del sabor del tomate.....	29
7.- Logros en la mejora de la calidad organoléptica de tomate.....	31
7.1.- Mejora mediante ingeniería genética.....	32
7.2.- Mejora convencional.....	33
8.- Bibliografía.....	38
OBJETIVOS.....	57
CAPÍTULO 1: Simultaneous quantification of the main organic acids and carbohydrates involved in tomato flavour using capillary zone electrophoresis.	61
Abstract	63
Key words.....	63
Introduction.....	64
Experimental.....	65
Results and discussion.....	66
Conclusions.....	71
References.....	72
CAPÍTULO 2: Breeding for flavour of fresh market tomato: sources for increasing acid content.....	77
Key words.....	79
Abstract.....	79

Introduction	80
Material and Methods.....	80
Results	81
Discussion	81
References	85
CAPÍTULO 3: Internal quality characterization of fresh tomato fruits.	87
Additional index words.....	90
Abstract	90
Materials and methods	92
Results	94
Discussion	102
Literature cited.....	105
CAPÍTULO 4: Characterization and selection of balanced sources of variability for breeding tomato (<i>Lycopersicon</i>) internal quality.	107
Abstract.....	109
Key words.....	109
Materials and Methods.....	112
Results	116
Discussion.....	127
References	128
CAPÍTULO 5: Potential of germplasm in <i>Solanum</i> section <i>Lycopersicum</i> for breeding tomato taste.	133
Abstract.....	135
Keywords.....	135
1. Introduction.....	136
2. Materials and methods.....	137
3. Results.....	140
4. Discussion.....	152
5. Conclusions.....	155
References.....	155
DISCUSIÓN GENERAL.....	159
Bibliografía	168
CONCLUSIONES.....	173

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación del tomate en la versión de 1698 de la obra de Matthiolus (1544).....	11
Figura 2. El tomate sufrió dos fuertes pérdidas de diversidad genética, una previa a la domesticación y otra a su llegada a Europa.....	12
Figura 3. Evolución de la superficie y producción mundial dedicada al cultivo en tomate y distribución por países de la producción en 2014	13
Figura 4. Distribución de la producción española de hortalizas en 2014	14
Figura 5. Distribución del valor de la exportación española de hortalizas (%) en 2016 y principales destinos por valor económico en 2016	14
Figura 6. Aportación relativa de genes de resistencia o tolerancia a enfermedades y plagas del acervo genético primario y secundario de tomate	16
Figura 7. La estructura y textura del fruto pueden llegar a ser muy importantes.	20
Figura 8. Germoplasma utilizado en la mejora del sabor en tomate.	32

.



RESUMEN

El desarrollo de cultivares comerciales de tomate se sucede de forma vertiginosa en los últimos tiempos, ayudado por el conocimiento cada vez mayor de su base genética. No obstante, estos cultivares modernos, en general, no satisfacen las expectativas organolépticas de los consumidores, ya que los objetivos de mejora que han guiado su desarrollo no han incluido un carácter tan complejo como la calidad organoléptica. La creciente decepción de los consumidores con este aspecto y su demanda de tomates más sabrosos ha aumentado el interés por el estudio de los factores que condicionan este carácter tan complejo para poder acometerlo de forma eficaz en programas de mejora. La presente tesis pretende contribuir al abordaje de este objetivo de mejora desde el punto de vista del aprovechamiento de la variabilidad natural presente en el género *Solanum* sección *Lycopersicon* para aumentar el contenido en compuestos implicados en la percepción por el gusto.

Para ello, inicialmente ha sido necesario poner a punto una metodología que permita analizar, de forma precisa, la gran cantidad de muestras que se suelen manejar en un programa de mejora. Así, se ha desarrollado un método de electroforesis capilar zonal para muestras de tomate y especies relacionadas que permite cuantificar de forma simultánea ácidos orgánicos como el oxálico, málico y cítrico y azúcares como la glucosa, fructosa y sacarosa que determinan, en mayor medida, la percepción del gusto en tomate con límites de detección inferiores a 2 y 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ respectivamente. Su elevada automatización de las series de análisis y reproducibilidad, así como su escasa preparación de muestra, tiempo de carrera inferior a 20 minutos y reducido coste de ejecución, han permitido aplicarlo de forma generalizada en ensayos de evaluación de características de calidad organoléptica en germoplasma de tomate.

El siguiente paso ha sido evaluar germoplasma por compuestos responsables del gusto para detectar fuentes de variabilidad potencialmente útiles en mejora. Los materiales estudiados han sido entradas y variedades no mejoradas de tomate cultivado de diferentes orígenes, así como entradas silvestres y de especies silvestres relacionadas (*Solanum lycopersicum*, *S. pimpinellifolium*, *S. habrochaites*, *S. pennellii* y *S. peruvianum*). Los resultados permiten concluir que, en algunos casos, entre los materiales recolectados existe gran variabilidad y contenidos muy elevados en compuestos responsables del gusto en tomate. Se han identificado entradas del grupo *Lycopersicon*, que incluye las especies silvestres filogenéticamente más próximas a la cultivada, que casi triplican los contenidos en azúcares y ácido málico y duplican el de ácido cítrico de las variedades comerciales tomadas como control, lo que facilitará su uso en planes de mejora de la calidad organoléptica que busquen incrementos equilibrados del gusto. Aunque más alejadas filogenéticamente, se han identificado dos entradas de *S. habrochaites*, del grupo *Eriopersicon*, con contenidos en ácido málico y cítrico siete y nueve veces mayores que el mejor de los controles, que pueden ser útiles cuando se busque obtener materiales con matices de sabor más ácido.

Finalmente, dado que el efecto del ambiente puede influir de forma importante en la acumulación de los compuestos mayoritariamente responsables del gusto en tomate, no solo directamente, sino también destapando efectos genéticos específicos debidos a la interacción del genotipo con el ambiente de cultivo, se ha desarrollado un estudio multi-ambiente como herramienta de evaluación amplia y precisa del potencial genético real de diversas entradas para la mejora del gusto de tomate. En este estudio, se han evaluado réplicas clonales de los mismos genotipos en tres ambientes diferentes para estimar con mayor precisión la contribución del ambiente, el genotipo y la interacción genotipo x ambiente en la acumulación de compuestos relacionados con el gusto. El efecto del ambiente se ha estimado a partir de la contribución a la acumulación de estos compuestos de la radiación fotosintéticamente activa (PAR) y la temperatura a lo largo del periodo de estudio, observándose que la radiación afecta en mayor grado al contenido en azúcares y la temperatura a la acumulación de ácidos. A partir de las predicciones de contribución genotípica y de interacción genotipo x ambiente se han identificado dos entradas, una de *S. habrocahites* y otra de *S. pimpinellifolium*, que pueden ser interesantes como fuentes de variabilidad para incrementar el gusto con matiz ácido por su elevado contenido en ácidos málico y cítrico y por su estabilidad en la acumulación de estos compuestos. La identificación de materiales con distinto perfil de acumulación de los ácidos cítrico, málico y glutámico será también útil en el estudio de la regulación de los ciclos de los ácidos tricarbónicos y del *GABA shunt*. Por otro lado, se ha puesto de manifiesto la necesidad de evaluar un número elevado de plantas para aprovechar correctamente la variación intra-poblacional.

RESUM

El desenrotllament de cultivars comercials de tomata se succeïx de forma vertiginosa en els últims temps, ajudat pel coneixement cada vegada major de la seua base genètica. No obstant això, estos cultivars moderns, en general, no satisfan les expectatives organolèptiques dels consumidors, ja que els objectius de millora que han guiat el seu desenrotllament no han inclòs un caràcter tan complex com la qualitat organolèptica. La creixent decepció dels consumidors amb este aspecte i la seua demanda de tomates més saboroses ha augmentat l'interés per l'estudi dels factors que condicionen este caràcter tan complex per poder escometre'l de forma eficaç en programes de millora. La present tesi pretén contribuir a l'abordatge d'este objectiu de millora des del punt de vista de l'aprofitament de la variabilitat natural present en el gènere *Solanum* secció *Lycopersicon* per a augmentar el contingut en compostos implicats en la percepció pel gust.

Per això, inicialment ha sigut necessari posar a punt una metodologia que permeta analitzar, de forma precisa, la gran quantitat de mostres que se solen manejar en un programa de millora. Així, s'ha desenrotllat un mètode d'electroforesi capil·lar zonal per a mostres de tomata i espècies relacionades que permet quantificar de forma simultània àcids orgànics com l'oxàlic, màlic i cítric i sucres com la glucosa, fructosa i sacarosa que determinen, en major mesura, la percepció del gust en tomata amb límits de detecció inferiors a 2 i 25 µg ml⁻¹ respectivament. La seua elevada automatització de les sèries d'anàlisi i reproductibilitat, així com la seua escassa preparació de mostra, temps de carrera inferior a 20 minuts i reduït cost d'execució, han permès aplicar-lo de forma generalitzada en assajos d'avaluació de característiques de qualitat organolèptica en germoplasma de tomata.

El següent pas ha sigut avaluar germoplasma per compostos responsables del gust per a detectar fonts de variabilitat potencialment útils en millora. Els materials estudiats han sigut entrades i varietats no millorades de tomata cultivada de diferents orígens, així com entrades silvestres i d'espècies silvestres relacionades (*Solanum lycopersicum*, *S. pimpinellifolium*, *S. habrochaites*, *S. pennellii* i *S. peruvianum*). Els resultats permeten concloure que, en alguns casos, entre els materials recol·lectats hi ha gran variabilitat i continguts molt elevats en compostos responsables del gust en tomata. S'han identificat entrades del grup *Lycopersicon*, que inclou les espècies silvestres filogenèticament més pròximes a la cultivada, que quasi tripliquen els continguts en sucres i àcid màlic i dupliquen el d'àcid cítric de les varietats comercials preses com a control, la qual cosa facilitarà el seu ús en plans de millora de la qualitat organolèptica que busquen increments equilibrats del gust. Encara que més allunyades filogenèticament, s'han identificat dos entrades de *S. habrochaites*, del grup *Eriopersicon*, amb continguts en àcid màlic i cítric set i nou vegades majors que el millor dels controls, que poden ser útils quan es busque obtindre materials amb matisos de sabor més àcid.

Finalment, atés que l'efecte de l'ambient pot influir de forma important en l'acumulació dels compostos majoritàriament responsables del gust en tomata, no sols directament,

sinó també destapant efectes genètics específics deguts a la interacció del genotip amb l'ambient de cultiu, s'ha desenrotllat un estudi multi-ambient com a ferramenta d'avaluació àmplia i precisa del potencial genètic real de diverses entrades per a la millora del gust de tomata. En este estudi, s'han avaluat rèpliques clonals dels mateixos genotips en tres ambients diferents per a estimar amb més precisió la contribució de l'ambient, el genotip i la interacció genotip x ambient en l'acumulació de compostos relacionats amb el gust. L'efecte de l'ambient s'ha estimat a partir de la contribució a l'acumulació d'estos compostos de la radiació fotosintèticament activa (PAR) i temperatura al llarg del període d'estudi, i s'observa que la radiació afecta en major grau al contingut en sucres i la temperatura a l'acumulació d'àcids. A partir de les prediccions de contribució genotípica i d'interacció genotip x ambient s'han identificat dos entrades, una de *S. habrocahites* i una altra de *S. pimipinellifolium*, que poden ser interessants com a fonts de variabilitat per a incrementar el gust amb matís àcid pel seu elevat contingut en àcids màlic i cítric i per la seua estabilitat en l'acumulació d'estos compostos. La identificació de materials amb distint perfil d'acumulació dels àcids cítric, màlic i glutàmic serà també útil en l'estudi de la regulació dels cicles dels àcids tricarboxílics i del GABA xunt. D'altra banda, s'ha posat de manifest la necessitat d'avaluar un nombre elevat de plantes per a aprofitar correctament la variació intra- poblacional.

ABSTRACT

The development of commercial cultivars of tomatoes has taken place in recent times, aided by an increasing knowledge of its genetic base. However, these modern cultivars generally do not meet the organoleptic expectations of consumers, since the improvement objectives that have guided their development have not included a character as complex as the organoleptic quality. The growing disappointment of consumers with this aspect and their demand for tastier tomatoes has increased the interest in studying the factors that condition this complex character in order to be able to tackle it effectively in breeding programs. The present thesis aims to contribute to the approach of this breeding objective from the point of view of the use of the natural variability present in the genus *Solanum* section *Lycopersicon* to increase the content in compounds involved in the perception by the taste.

To do this, it was initially necessary to develop a methodology enabling a precise analysis of the large number of samples that are usually handled in a breeding program. Thus, a capillary zone electrophoresis method has been developed for tomato samples and related species, allowing simultaneous quantification of organic acids such as oxalic, malic and citric, and sugars such as glucose, fructose and sucrose, which determine the taste of tomato, with detection limits lower than 2 and 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ respectively. Its high automation of the series of analysis and reproducibility, as well as its simple sample preparation, running time of less than 20 minutes and a low execution cost, have made it possible to apply it in a generalized way in tests of evaluation of organoleptic quality characteristics in tomato germplasm.

The next step has been to evaluate germplasm considering taste-related compounds to detect sources of variability potentially useful. The materials studied have been accessions and landraces of cultivated tomato from different origins, as well as wild accessions and accessions from wild species (*Solanum lycopersicum*, *S. pimpinellifolium*, *S. habrochaites*, *S. pennellii* and *S. peruvianum*). The results allow to conclude that, in some cases, among the collected materials there is great variability and very high contents in compounds responsible for tomato taste. Accessions from the *Lycopersicon* group, including the phylogenetically closest wild species to the crop, have been identified with nearly triple the content of sugars and malic acid and double that of citric acid of that of the commercial varieties used as controls. The genetic proximity of these materials will facilitate its use in breeding programs of the organoleptic quality targeted to balanced improvement of taste. Although more phylogenetically distant, two accessions of *S. habrochaites* from the *Eriopersicon* group have been identified with malic and citric acid contents seven and nine times greater than the best controls, which may be useful when looking for materials with shades of acidic taste.

Finally, since the effect of the environment can significantly influence the accumulation of compounds responsible for tomato taste, not only directly, but also by uncovering specific genetic effects due to the interaction of the genotype with the growing environment, we have developed a multi-environment study as a tool for extensive and

accurate evaluation of the actual genetic potential of various accessions for improving tomato taste. In this study, clonal replicates of the same genotypes were evaluated in three different environments to more accurately estimate the contribution of the environment, genotype and genotype x environment interaction in the accumulation of taste-related compounds. The effect of the environment has been studied considering the contribution to the accumulation of these compounds of the photosynthetically active radiation (PAR) and temperature throughout the study period, observing that the radiation affects to a greater extent the content in sugars and the temperature to acid accumulation. From the predictions of genotypic contribution and genotype x environment interaction, two accessions have been identified, one from *S. habrocahites* and another from *S. pimipinellifolium*, which may be interesting as sources of variability to increase taste with acid nuance due to its high content of malic and citric acids and their stability in the accumulation of these compounds. The identification of materials with different profile of citric, malic and glutamic acid accumulation will also be useful in the study of the regulation of tricarboxylic acid and GABA shunt cycles. On the other hand, the need to evaluate a large number of plants has been shown to take advantage of intra-population variation.

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.- De la revolución neolítica a la globalización en la gestión agrícola.

El origen de la agricultura constituyó la base para el desarrollo de la civilización (Rindos, 2013). Los primeros asentamientos de cazadores-recolectores al inicio del Holoceno representaron la base necesaria para que se posibilitara la aparición de la agricultura (Bar-Yosef y Belfer-Cohen, 1989). Para que este avance tecnológico pudiera consolidarse fue necesario además un cambio cultural complejo. Así, el origen de la agricultura pudo consolidarse sólo en poblaciones en las que coevolucionara la domesticación de los cultivos con el desarrollo de la propiedad privada (Bowles, S. y Choi, JK., 2015), en las que se produjeron transiciones desde sociedades igualitarias a jerárquicas y desde estructuras organizacionales comunales a familiares (Weisforf, 2005). La agricultura aparecería así, no sólo en diversas partes del mundo, sino incluso como un mosaico de orígenes dentro de cada zona de aparición, como se ha propuesto en el caso de Oriente Próximo (Fuller et al., 2011), contribuyendo al desarrollo cultural, social y económico. Desde aquella primera ocasión en que el hombre sembró y fue capaz de recoger el grano, hasta el sistema productivo agrícola actual han pasado miles de años. Durante este periodo se ha asistido a una larga transición desde la selección inconsciente de los primeros agricultores y el intercambio en sociedades con emergente propiedad privada, hasta la compleja selección genómica actual en un mundo globalizado (Pérez-de-Castro y Cebolla-Cornejo, 2015).

Los primeros cultivos domesticados acompañaron a los hombres en sus migraciones como grandes tesoros y parte de sus recursos. De hecho, fueron ambicionados por distintas culturas y, ya desde Sargón en Acadia o Hatshepsut en Egipto, se crearon expediciones con el principal objetivo de conseguir cultivos ambicionados (Juma, 2014). Desde entonces, las especies cultivadas no han dejado de extenderse por el mundo en distintas fases y gracias a distintas culturas e imperios: fenicios, griegos, romanos, españoles, británicos...

Este intercambio de cultivos ha ido acompañado de continuos cambios en los sistemas de cultivo y avances en la tecnología agrícola. Por otro lado, las relaciones comerciales se fueron haciendo cada vez más complejas. Así, por ejemplo, la imposición de impuestos en la Antigua Roma espoleó el comercio internacional como requisito para hacer frente a estos nuevos gastos (Hopkins, 1980).

Los avances en los medios de comunicación, y la disminución de sus costes, propiciaron los intercambios comerciales cada vez más fluidos y a la vez complejos (Herranz Loncán, 2005). Por ejemplo, el desarrollo del ferrocarril propiciaría a mediados del siglo XIX cambios en la ratio entre el precio unitario del transporte ferroviario y su alternativa, bajando hasta 0,30 en Estados Unidos y hasta 0,14 en España (Capel, 2007). Este abaratamiento daría lugar a una intensificación de cultivos

en determinadas regiones que comenzarían a acceder al mercado mundial, contribuyendo a una fuerte especialización de la economía.

En el contexto local daría lugar a una reorganización de la producción. Por ejemplo, si bien Joseph Cavanilles (1795) señalaba el cultivo de cereales en las huertas de Valencia a finales del siglo XVIII, un siglo más tarde su cultivo había descendido críticamente al ser más rentable obtenerlo de Castilla. Por otra parte, la ampliación del comercio daría lugar a una subida de precios en el interior para equipararse progresivamente a los mayores precios de la costa (Barquin Gil, 1999). A nivel internacional también aparecen estos cambios, por ejemplo, en el caso de los cítricos. España, liderada por la Comunidad Valenciana, se establecía a principios del siglo XX como primer exportador (82,3%) a Reino Unido, que representaba el 41% del comercio exterior mundial (Garrido, 2010). Esto hizo que desde finales del siglo XIX se presenciara en la zona un aumento muy importante de la superficie dedicada a este cultivo.

Estos cambios acabaron produciendo, efectivamente, una reordenación de cultivos y variedades. En el caso del tomate, por ejemplo, tradicionalmente las variedades de colgar o de penjar en España con el alelo *alcobaça* de gen *nor* (Casals et al., 2012), con maduración retrasada, se recogía a final de agosto y permitía el consumo de tomate hasta el inicio del año siguiente. Sin embargo, su uso decayó con el auge del comercio desde Canarias y el cultivo fuera de estación en Murcia y Almería. En efecto, la globalización en el campo agrícola llega a suponer poder consumir cualquier producto agrícola fresco en cualquier lugar del mundo y en cualquier momento del año. Hace tan solo cinco décadas existían todavía cultivos claramente estacionales, que era raro encontrar en otra época del año: frutas como el fresón, el caqui o el níspero, y hortalizas como la alcachofa, la col y las habas. Este hecho lleva a que cultivos, antaño rentables, no lo sean tanto en la actualidad y deban plantearse nuevas opciones (Wong y Navarro, 2014). Puede observarse ese aspecto muy claramente en el mercado frutícola, ya que los países del Hemisferio Sur pudieron penetrar en importantes mercados contraestacionales, facilitando en algunos países latinoamericanos una reestructuración económica neoliberal en la década de los 60 y 70 (Murray, 1999). La comercialización de productos de diferentes orígenes y en hemisferios diferentes permite, por otro lado, el descubrimiento de nuevos productos para zonas que anteriormente los desconocían y, en especial, el consumo de productos conocidos en la zona pero en la temporada, en apariencia opuesta, y que tienen su origen productivo en el otro hemisferio al de consumo. Ejemplo de esto último es el consumo de cítricos de origen sudafricano en julio o de cerezas de origen chileno en Navidad.

España también se ha beneficiado de las crecientes complejas relaciones comerciales agrícolas internacionales. En la actualidad la exportación agrícola es un hecho importante, en especial de productos de calidad, y que cultivados en condiciones protegidas, y adelantados a su temporada natural, supone unos ingresos importantes para los agricultores de nuestros días. Así, España es uno de los países con mayor exportación agrícola en el mundo. Segundo a nivel mundial de frutas, el tercero en legumbres y otras hortalizas, el quinto en aceites y grasas vegetales y animales, el sexto en carnes y el séptimo en bebidas (Grande y Morales, 2015, 2016; Clar Martin-

Portillo y Pinilla 2016). De hecho, en el seno de la Unión Europea, España es el país con mayor competitividad en las exportaciones en el sector en el mercado global (Bojnec y Ferto, 2016).

Por otro lado, el desarrollo del mercado globalizado ha condicionado completamente la evolución del mercado varietal en el mundo. En este sentido, dentro del desarrollo varietal fue crucial el poder disponer de cierta adaptación a la mecanización, que permitiera abaratar costes de producción en regiones de cultivo intensivo especializadas, y por otro lado aumentar la vida útil del producto y su resistencia al manejo y transporte. Consecuentemente, el esfuerzo de los mejoradores se ha plasmado en la identificación de genes que respondan a estas nuevas necesidades. El éxito de las primeras variedades que los incorporaron llevó a su utilización como base en el desarrollo del mercado varietal.

Sirva como ejemplo el caso del tomate. El uso de los genes *self-pruning*, que da lugar a la conversión prematura del ápice vegetativo simpodial en una inflorescencia terminal (Pnuelli et al., 1998) y el *jointless*, que suprime la identidad simpódica meristemática e impide el desarrollo de articulación y capa de abscisión en el pedúnculo (Szymkowiak e Irish, 2006), fueron básicos en el avance del mercado de tomate procesado. Así se obtuvieron plantas de porte arbustivo que no es necesario entutorar y en el que las hojas impiden el planchado del fruto por el sol. Por otro lado, los frutos se separan del cáliz durante la recolección mecanizada, evitando esta tarea manual. Del mismo modo, los genes *ripening inhibitor*, *rin*, y *non-ripening*, *nor*, que retrasan la maduración del fruto han sido fundamentales para el mercado de tomate en fresco. Ambos genes operan aguas arriba de la biosíntesis del etileno y su uso en heterocigosis se ha extendido, tanto en variedades de tamaño grande (especialmente con el gen *rin*) como en variedades tipo cherry (con el gen *nor*), para retrasar la maduración otorgando mayor vida post-cosecha y aumentando la firmeza y su resistencia al manipulado (revisado por Paran y van der Knaap, 2007).

La globalización del comercio agrícola, también ha conllevado como efecto colateral la globalización de las enfermedades (Marchoux et al., 2001). Con el auge del comercio mundial, el transporte de frutas, hortalizas y material vegetal lleva acoplado el transporte de patógenos que viven en ellos. Aparecen así nuevas patologías fuera de su hábitat usual, como el caso de la enfermedad Tomato Yellow Leaf Curl Disease o el *Tomato Spotted Wilt Virus* en tomate, y plagas invasoras como el picudo en el cultivo de la palmera (*Rhynchophorus ferrugineus* Olivier), el minador de los cítricos (*Phyllocnistis citrella* Staiton) o el barrenador del tomate (*Tuta absoluta* Meyrick) (Gabarra et al., 2014; Nentwig y Vaes-Petignat, 2014). Las enormes pérdidas ocasionadas han condicionado el interés por explorar la introducción de resistencias en las nuevas variedades (Soler et al., 2001; Julian et al., 2013; Lima et al., 2015). Así, temporalmente va surgiendo la resistencia a patologías o plagas exóticas como nuevo objetivo en los programas de mejora.

Pero no sólo se globalizan el mercado agrícola, las plagas y las enfermedades, sino que la globalización también afecta al mercado de semillas y por tanto condiciona el desarrollo varietal a nivel mundial. El proceso de adquisición y fusión en las últimas

tres décadas ha sido vertiginoso y, como consecuencia, hoy en día tan sólo cuatro firmas controlan el 40% del mercado mundial de semillas (Howard, 2016).

En definitiva, la globalización comentada en sentido amplio condiciona en la actualidad los objetivos de mejora abordados en el desarrollo de nuevas variedades. En el inicio de la agricultura, el incipiente agricultor seleccionaba inconscientemente los genotipos más adaptados al entorno modificado por el hombre. Hoy en día, se ponen de manifiesto las complejas relaciones entre los distintos agentes de la cadena producción-consumo, en las que casas de semillas, productores, comercializadores a gran escala y al por menor y el consumidor, luchan por imponer sus prioridades. En efecto, la existencia de multitud de intermediarios desde que el producto es sembrado hasta que el consumidor paladea el producto, cruza intereses y plantea diferentes objetivos de mejora, a veces encontrados.

2.- El tomate en el contexto agrícola.

El tomate (*Solanum lycopersicum L.*), no escapa a esta encrucijada de intereses. Su origen se sitúa en América, donde las culturas precolombinas ya lo utilizaban desde mucho antes de la llegada de los europeos. Desde allí, los primeros exploradores lo importaron al viejo continente, probablemente a principios del siglo XVI, aunque no figura explícitamente en los primeros diarios de Colón, y que en 1544 ya había llegado a Italia, donde ya se había consolidado como plato habitual (Matthioli, 1544).

Siempre la domesticación de una especie supone la reducción de la variabilidad genética. En el momento en que el hombre empieza a modificar el ambiente para hacer crecer una planta, que ya aprovechaba como silvestre, lo hace a partir de poblaciones muy concretas, por lo que indirectamente está descartando gran cantidad de diversidad genética.



Figura 1. Representación del tomate en la versión de 1698 de la obra de Matthioli (1544).

El tomate no resultó diferente en este aspecto. Los agricultores precolombinos sometieron, de forma consciente o inconsciente, a las primeras poblaciones de tomate al llamado síndrome de domesticación. El proceso comenzaría partiendo de un ancestro representado por un pequeño tomatillo, que según unos sería la antigua

variedad cerasiforme de *S. lycopersicum* y según otros sería *Solanum pimpinellifolium* L. En esta selección, se aumentaría el tamaño del fruto y se diversificaría la forma y los colores.

Ya antes, el tomate sufre la primera pérdida de diversidad genética, cuando, previa a la domesticación, su ancestro fue llevado de forma desconocida de los Andes, dónde radica la diversidad silvestre de la sección *Lycopersicon* del género *Solanum* (Peralta et al., 2008), a América Central, donde sería domesticado (Figura 2). Más tarde, cuando los españoles trajeron al viejo mundo las primeras semillas de tomate, sometieron de nuevo al cultivo a un segundo estrechamiento de la base genética (Bai y Lindhout, 2007), ya que partiendo del cultivo ya domesticado, seleccionan y traen a Europa una cantidad limitada de poblaciones, menor a la existente en América y, por tanto, de menor base genética.

Algunos estudios como el de Blanca et al. (2015), por otro lado, apuntan a una doble domesticación, en la que la variedad cerasiforme surgiría en la zona de Ecuador como una primera selección a partir de *S. pimpinellifolium*. Y desde allí, esa primera forma domesticada migraría a Mesoamérica. En ese tránsito se reduciría mucho la diversidad genética (que dentro de las poblaciones de cerasiforme de los Andes es mucho mayor), tras el que se produciría la domesticación del tomate cultivado. Uno de los primeros cambios que se fijaría es el aumento de la tasa de autogamia en *S. lycopersicum* respecto a *S. pimpinellifolium*. El aumento de dicha tasa la dio una mutación en el promotor del gen *style-2.1*, cuya regulación negativa durante el desarrollo de la flor da lugar a la inserción del estigma al reducir la elongación celular en el estilo (Chen et al., 2007).

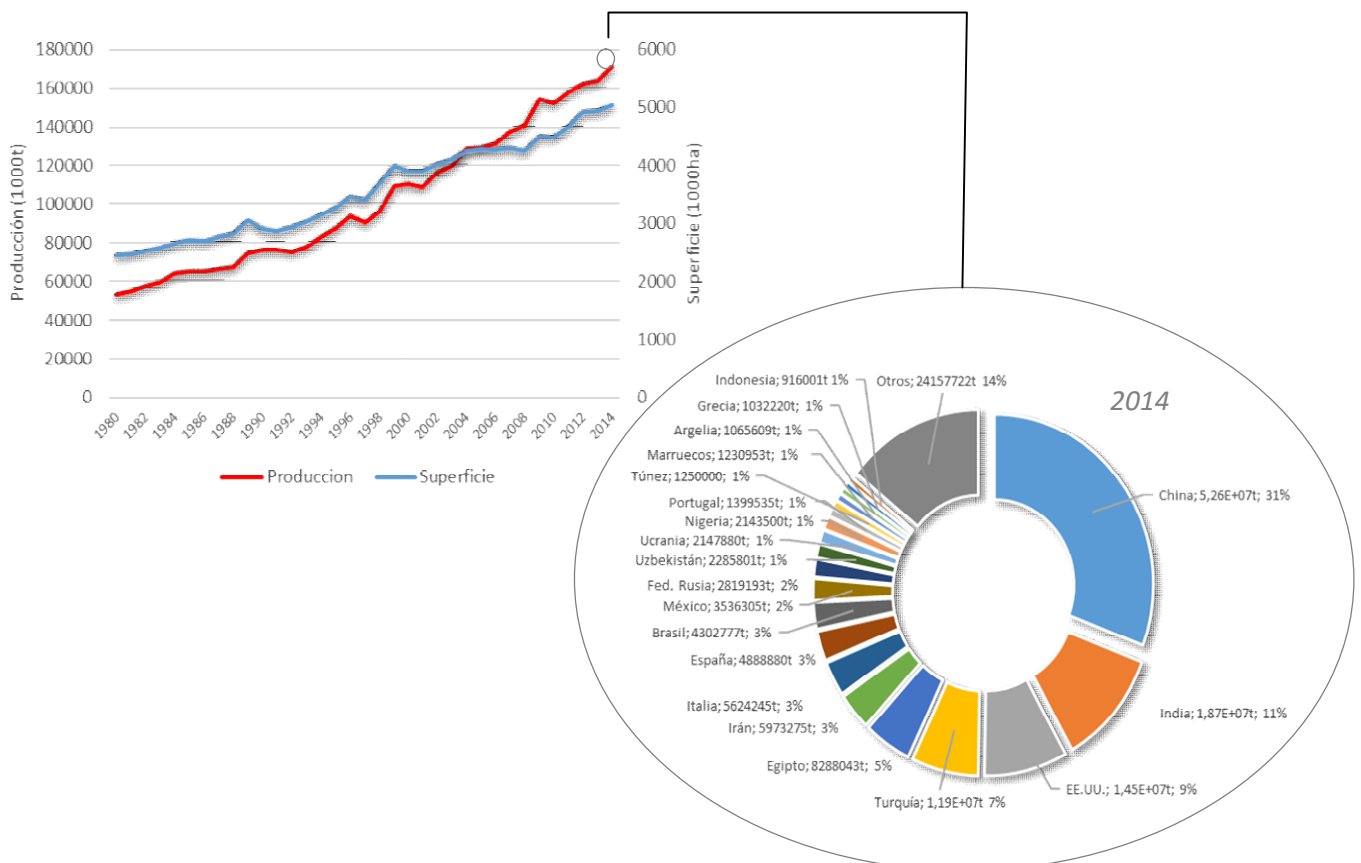


Figura 2. El tomate sufrió dos fuertes pérdidas de diversidad genética, una previa a la domesticación y otra a su llegada a Europa.

La domesticación sería relativamente más fácil que en otros cultivos, ya que, aunque afecta a caracteres cuantitativos como el tamaño de fruto o la forma, se ha comprobado que el control genético de estas características tiene una componente simple. En el caso del tamaño de fruto se seleccionaría fácilmente por los efectos provocados por los genes que afectan a la división celular como *fruit-weight 2.2*, *fw2.2*, (Frary et al., 2000), que surgiría probablemente en la zona de los Andes (Nesbitt y Tanksley, 2002). Otros aspectos que acabaron fijándose afectan al número de carpelos, como *locule-number (lc)* o *fasciated (fas)*, con un efecto mayor y que fueron seleccionados al final del proceso de domesticación (Lippman y Tanksley, 2001; Cong et al., 2008). Por otro lado, el aumento del tamaño del fruto desenmascararía el efecto de genes que afectan a la forma y que ya podrían haber estado presentes, pero

ocultos, antes de la domesticación, como los genes *ovate*, *sun* y *fruit-shape-8.1* (Tanksley, 2004). Finalmente, gran variedad de colores habrían surgido como consecuencia de distintas mutaciones en genes correspondientes a pasos específicos de la ruta de síntesis de los carotenoides, que fácilmente dan lugar a colores desde rojo intenso a naranja, amarillo o blanco. Los colores rosados se conseguirían gracias a la mutación *yellow* que impide la acumulación de naringenin chalcona de color amarillo en la piel, dejando que ésta quede transparente y que, con carne roja, da lugar a tonos rosados (revisado por Martí et al., 2016). Estas mutaciones ya estarían presentes en la especie cultivada precolombina, y de hecho en el diccionario náhuatl de Molina (1571) ya se traduce el término *xitomatl* como “tomates grandes, colorados, amarillos y blancos”, reflejando la diversidad de coloraciones existentes ya entonces.

Como llegaría a Europa no se sabe, ya que, al contrario que otros cultivos como el pimiento, del que se conoce que Colón llevó a España en su primer viaje de vuelta (López de Gómara, 1553), en el caso del tomate su llegada no está documentada. En cualquier caso, lo cierto es que a mediados del siglo XVI ya se había introducido en la dieta del Sur de Europa, lo que indica la gran aceptación que debió tener para extenderse por el continente y popularizarse en menos de 50 años. Esa popularidad la sigue teniendo hoy en día. En los últimos 35 años la superficie y producción de cultivo ha aumentado de forma continuada, especialmente la última desde principios del siglo XXI (Figura 3).



En la actualidad el tomate supone en torno al 15% de la producción mundial de hortalizas (FAO, 2017), detrás de la patata, y supone la más importante hortaliza en la industria alimentaria a la que en 2014 se destinó el 23,4% de la producción (FAO, 2017; WPTC, 2017). China es el principal productor, seguido de la India, USA, Turquía, Egipto, Irán, Italia y España, que es el octavo productor a nivel mundial (Figura 3).

Para el sector agrícola español, el tomate es fundamental, ya que supone el cultivo mayoritario entre las hortalizas, entre las que representa en torno al 35% de la producción (Figura 4).

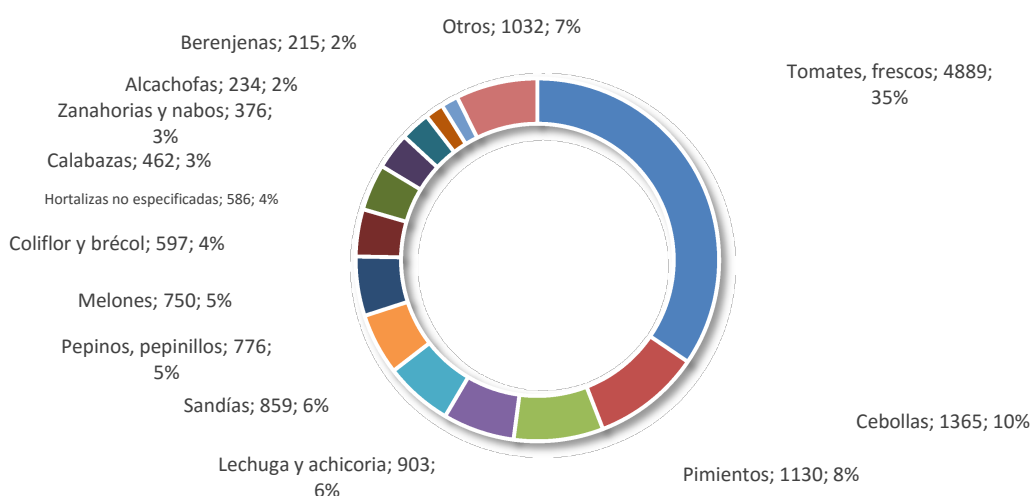


Figura 4. Distribución de la producción española de hortalizas en 2014 (miles de t; porcentaje de la producción española de hortalizas; FAO, 2017).

Dentro del sector hortícola, el tomate cobra además especial importancia por sus exportaciones, ocupando el primer puesto en valor económico de las mismas, siendo Alemania, Reino Unido y Francia los principales destinos de la exportación (figura 5).

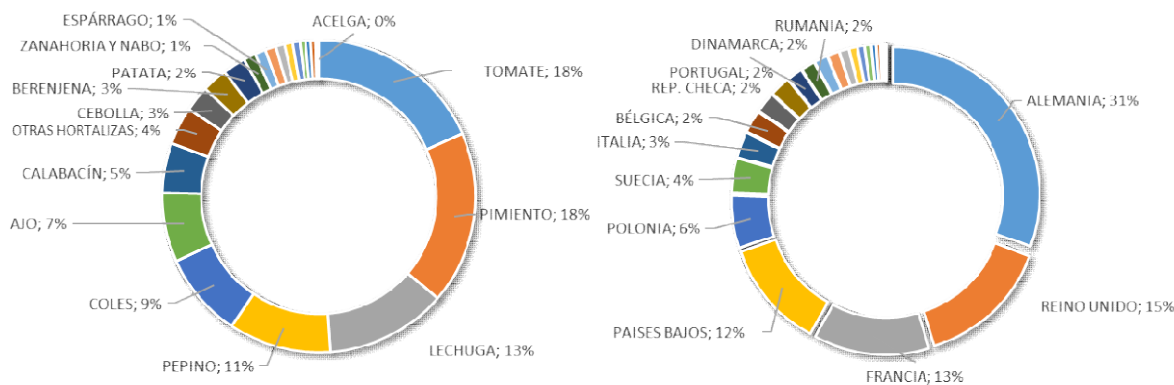


Figura 5. Distribución del valor de la exportación española de hortalizas (%) en 2016 (izquierda) y principales destinos por valor económico en 2016 (derecha). Fuente FEPEX, 2017.

3.- El tomate: objetivo de mejora genética.

El tomate no sólo es importante en la actualidad, sino que lo ha sido desde su introducción en Europa. Baste decir que en el siglo XVIII Joseph Quer (1784) decía de ellos "...entre nosotros no tienen comparación con otro vegetable en las suntuosas y delicadas mesas todo el tiempo que duran, sazonando los más sabrosos manjares, y formando la delicada salsa, que da agradable sainete al cocido y otros platos".

Por ello, no es de extrañar que las casas de semillas pusieran gran interés en este cultivo. De hecho, aún siendo una especie autógena, el tomate fue una de las primeras hortalizas en que se implantó la comercialización de híbridos F1, con el objetivo de recuperar y aumentar los gastos de desarrollo varietal, más que con el objetivo de explotar la heterosis. No obstante, el primer estudio sobre el posible vigor híbrido en tomate es coetáneo con los trabajos sobre heterosis de Shull en maíz (Hedrick y Booth, 1907). En las siguientes dos décadas seguiría explorándose la posibilidad de aplicar el desarrollo de híbridos, llegando esta preocupación a Europa en los años 30 del siglo pasado (Alabouvette y Tittard, 1933), y ya en 1946, sólo unos años después de iniciarse la comercialización de híbridos de maíz, aparecía el primer híbrido de tomate en Holanda, el *single cross* (Dorst, 1946).

Desde entonces, los beneficios obtenidos, al tener el agricultor que comprar la semilla todas las campañas, hicieron que la inversión aumentara y los logros de la mejora se sucedieran rápidamente.

Si bien inicialmente el objetivo fundamental fue aumentar la productividad, en los años 30 del siglo pasado la preocupación ya se había centrado en tratar de reducir las pérdidas de producción debidas a la incidencia de enfermedades. Para entonces el acervo genético de la especie cultivada ya parecía haber agotado posibilidades de utilización para cubrir este objetivo de mejora y el foco se puso en las especies silvestres afines. De este modo, en los años 40 aparecería la primera resistencia incorporada en tomate desde germoplasma silvestre que hacía frente a la raza 1 de *Fusarium* (Rick., 1986). Desde entonces el uso de germoplasma silvestre se impondría en tomate para cubrir este objetivo de mejora, y se dice que desde 1981 hasta 1995 se ha descrito una resistencia en germoplasma silvestre al año, lo que permitió multiplicar el rendimiento de tomate por cuatro entre la década de los 40 y la de los 90 (Rick y Chetelat, 1995). Este éxito ha dejado su marca sobre el genoma de las variedades modernas de tomate, ya que se dice que probablemente sea el cultivo con mayor número de introgresiones de germoplasma silvestre (Hajjar y Hodgkin, 2007). Entre las especies de fruto rojo *S. pimpinellifolium* ha sido la que ha aportado un mayor número de genes de resistencia especialmente frente a bacterias, siendo la aportación de *Solanum cheesmaniae* (Riley) Fosberg restringida. Por el contrario, en la lucha frente a hongos, virus y plagas y nematodos las más destacadas han sido las más alejadas y de fruto verde: *Solanum chilense* (Dunal) Reiche, *Solanum peruvianum* L., *Solanum habrochaites* Knaap & Spooner y *Solanum chmielewskii* (Rick, Kesicki, Fobes & Holle) Spooner, Anderson & Jansen, por delante de *Solanum neorickii* (Rick, Kesecki, Fobes & Holle) Spooner, Anderson & Janse o *Solanum pennellii* Correll (figura 6).

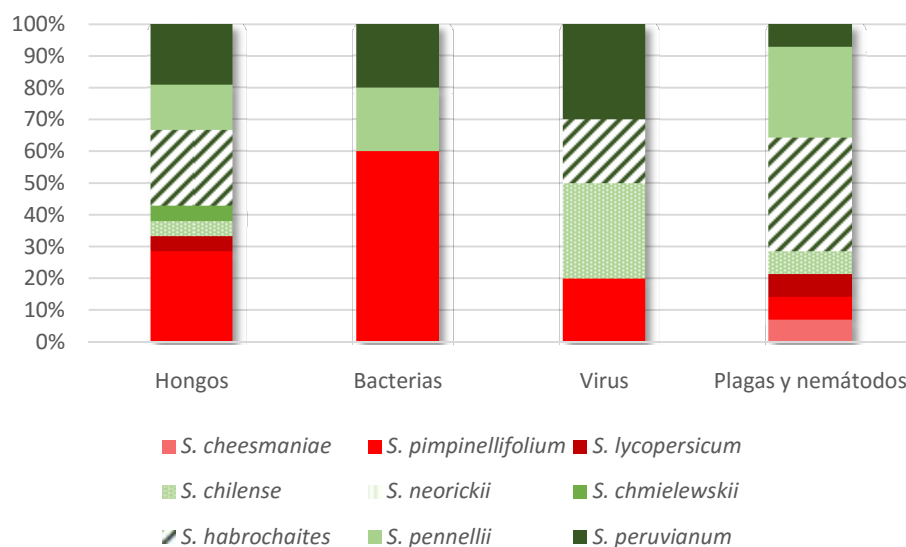


Figura 6. Aportación relativa de genes de resistencia o tolerancia a enfermedades y plagas del acervo genético primario y secundario de tomate (información adaptada de Ebert y Schaffneitner, 2015).

Si bien la resistencia a enfermedades desde entonces fue un objetivo prioritario, el uso de germoplasma silvestre también se empleó para cubrir otros objetivos como la resistencia a artrópodos, la mejora de la calidad, la tolerancia a estreses ambientales (temperaturas extremas, sequía, exceso de humedad, salinidad o problemas edáficos) o el propio potencial productivo (Stevens et al., 1991; Rick y Chetelat, 1995; Gur y Zamir, 2004; Bai y Lindhout, 2007; Hajjar y Hodgkin, 2007; Vidavski et al., 2008).

Hasta los años 60 la prioridad en la mejora del tomate se basó en aumentar el potencial productivo y disminuir las pérdidas de producción debidas a estreses bióticos o abióticos. Se satisfacía así las demandas de dos de los agentes más importantes en aquel entonces de la cadena producción-consumo. Por un lado, el agricultor aumentaba la producción final y por otro, el aumento de la producción y por tanto de la oferta, permitía al distribuidor-comercializador reducir los costes de compra.

Sin embargo, en los años 60 se da un auge de distribuidores e intermediarios en la cadena, y la globalización del mercado agrícola genera el problema causado por el transporte a otras regiones lejanas distintas al lugar de producción. En este momento, el distribuidor-comercializador gana preponderancia a la hora de establecer objetivos de mejora y demanda una mayor vida postcosecha que permita reducir las pérdidas de materiales no comercializados, y mayor firmeza para resistir el manipulado y transporte. Se impone, por tanto, la necesidad de alterar el proceso de maduración del tomate y comercialmente esto se consiguió con la identificación de los ya comentados genes *nor* y *rin*.

En este punto, la mejora para tomate en fresco y para industria diverge, ya que los objetivos a cubrir son completamente diferentes. Esta diferenciación se consigue gracias al peso del tomate de industria en el mercado, que supone alrededor de la cuarta parte de la producción mundial (Tomato News, 2014). En tomate de industria el

agente que determina el rumbo de la mejora es la propia industria, es decir, el procesador. En este campo los objetivos están claros y se centran en reducir al máximo los costes de producción y procesado. En el caso de la producción la solución pasa por facilitar la mecanización. Este punto es de hecho tan importante que en Estados Unidos, el principal productor mundial de tomate procesado (Gould, 2013) a pesar de que los mayores procesadores preferirían descentralizar la producción de tomate fuera de California (85% de la producción de EE.UU.), la siguen manteniendo allí gracias al bajo coste que propicia el alto grado de latifundismo y de mecanización en la zona (Stevens, 2012). Como se comentó anteriormente, la importancia de la mecanización condicionó la generalización de los genes *jointless* y *self-pruning* en estos materiales, así como la selección de variedades lo más firmes posible.

Por otro lado, en la producción de pasta de tomate o tomate triturado es importante llevar a cabo un proceso de condensación que conlleva costes energéticos importantes. Para minimizarlo es crucial que el contenido en sólidos solubles y la viscosidad del tomate triturado sea lo más alta posible (Young et al., 1993). Por tanto, estos fueron objetivos de mejora importantes. Se añade que desde los años 60 del siglo pasado se autorizó el uso de ácidos y edulcorantes para potenciar el sabor (Gould, 2013), por lo que el incremento varietal de ambos reduce el uso de aditivos y abarata costes. Por último, estas variedades de tomate para procesado deben tener un pH inferior a 4,4 para impedir el desarrollo de hongos, ya que un pH por encima de 4.4 da problemas con organismos termofílicos, significa mayores intervalos de calentamiento y menor calidad de los tomates procesados (Stevens, 1972; Saimbhi et al., 1995). Por todo esto, los mejoradores focalizaron su esfuerzo en el tomate de industria en aumentar la producción, los sólidos solubles y disminuir el pH, obteniendo notables éxitos (Grandillo et al., 1999).

La particularidad de los objetivos de mejora en el tomate para procesado, ha condicionado que desde el punto de vista genómico diverja claramente de las variedades de tomate en fresco (Deynze et al., 2007). Precisamente el elevado grado de presión de selección aplicado sobre el contenido en sólidos soluble totales ha hecho que prácticamente todo el cromosoma 5 represente una firma genómica de los tomates de industria (representa el 90,53% de la divergencia respecto a tomate fresco), ya que en él se concentran *loci* como *ssc5.1*, *ssc5.2* y *ssc5.3*, relacionados con elevado contenido en sólidos solubles (CSS) y *fir5.1*, relacionado con la firmeza (Lin et al., 2014).

En tomate para consumo en fresco desde los años 60 pesaron mucho las exigencias del gran distribuidor-comercializador. Es más, en aquel momento el consumidor aparece como el final de la cadena, último eslabón que recibe un producto en el que parece que no tiene qué opinar, sino simplemente que consumir. Con el objetivo de dirigir ese consumo, el comercializador demanda tomates uniformes y de color uniforme que satisfacen en un primer momento los deseos del consumidor en el momento de la compra y que se basaban en aspectos visuales. Esta tendencia ya se arrastraba de unos años atrás, desde los años 40, y condicionó la generalización del uso del gen *uniform ripening*, *u*, en estos materiales. Este gen provoca la ausencia de hombros verdes dando lugar a frutos de color rojo muy uniforme en madurez (Kinzer et al., 1990). Lamentablemente su uso conllevó un efecto colateral, y es que hoy en día

sabemos que en los hombros verdes se concentra una mayor cantidad de cloroplastos. Por ello, su uso reduce la capacidad fotosintética y la acumulación de azúcares, afectando negativamente al sabor (Powell et al., 2012).

La priorización de objetivos de mejora condicionó que las variedades modernas fueran perdiendo sabor frente a variedades tradicionales. Así, un exceso de presión de selección hacia elevadas productividades, que provocan un efecto de dilución en los fotoasmiliados (Bertin et al., 2000), el uso de genes implicados en el retraso de la maduración, que tienen como consecuencia una menor acumulación de carotenoides y de compuestos volátiles relacionados con el aroma (McGlasson et al., 1987; Baldwin et al., 2000), y el uso de *uniform ripening*, han concluido en una disminución en la acumulación de azúcares (Powell et al., 2012). A esta evolución se sumaron otros aspectos fitotécnicos como el cultivo intensivo, fuera de estación o la recolección excesivamente temprana, y todo ello llevó a que en los años 90 se generalizaran las quejas sobre el sabor en tomate (Bruhn et al., 1991) y en parte se recuperaran mercados de calidad vinculados a variedades tradicionales (Cebolla-Cornejo et al., 2012).

Es cierto que el consumidor puede decidir una primera compra en base a la uniformidad y el color, e incluso le puede satisfacer que los tomates duren más tiempo en el frigorífico, pero la repetición de compra depende cada vez más de la satisfacción del proceso gustativo. Llegados a este punto, no pasa desapercibido el hecho de que los objetivos de mejora han cambiado. Ya no sólo se planifica la mejora dirigida a maximizar la producción, minimizando costes de forma que se satisface a determinados consumidores que valoran uniformidad color, durabilidad y bajo precio (Lê y Ledauphin, 2006; Causse et al., 2010), sino que aparece un segmento de mercado focalizado en la calidad del sabor. Para ello, se requiere una nueva aproximación a tomates de calidad organoléptica en una mejora del tomate, para el que habrá que definir el concepto de calidad plena o completa. Ello supondrá añadir nuevos caracteres, o recuperar caracteres perdidos en los programas de mejora realizados hasta el momento, y que gran cantidad de variedades tradicionales habían logrado después de años de interesante y dedicada selección por parte de los agricultores.

4.- La calidad del tomate

Ante el objetivo de un mejorador de obtener un tomate de calidad, supondrá la definición de ésta una primera dificultad. Si en la cadena desde la producción hasta el consumo de un tomate preguntáramos a todos los agentes que intervienen nos describirían un concepto de calidad diferente.

Para el agricultor una variedad de calidad sería aquella que le suponga una alta producción, en un momento en que los precios le proporcionen el mayor de los beneficios, y que presente las resistencias a enfermedades, plagas y factores ambientales adversos que minimicen las pérdidas y los insumos que deba aportar para completar el ciclo productivo. Realmente la calidad entendida como sabor no suele ser

importante y realmente queda condicionada por las posibilidades de comercialización. Es decir, en muchos casos es el comercializador/distribuidor el que acaba fijando qué materiales quiere comprar y normalmente el agricultor responde a esa demanda. Esto es especialmente importante en tomate de industria, donde es la industria la que fija que materiales quiere procesar.

Para el comercializador, intermediario, mayorista o responsable de las cadenas de supermercados, será de gran importancia que el coste para el agricultor sea el más bajo posible para poder conseguir un mayor margen comercial, y que el tomate tenga una vida larga y resistencia a la manipulación, para minimizar las pérdidas de manipulado y maximizar el tiempo del producto en perfecto estado en sus instalaciones, para racionalizar sus stocks y adaptarlos a la demanda concreta de sus clientes.

Dado que la apariencia del fruto es uno de los principales factores que condicionan la decisión de compra (Weaver y Luloff, 1992), ésta constituye una exigencia básica para este agente. De hecho, el concepto de calidad dirigida por el producto se adapta mejor a las preferencias del distribuidor, y se centra en enfatizar la apariencia, vida postcosecha y bajo precio aún a costa del sabor (Shewfelt, 1999). Este concepto de calidad fue abrazado mayoritariamente por el mercado americano en los 90, y, por tanto, condicionaría los objetivos de mejora. Por el contrario, la calidad dirigida por el consumidor tuvo una menor cabida en el sector (aunque hoy en día está en aumento), ya que enfatiza el sabor a costa de la apariencia, una vida postcosecha más corta y precios más altos.

Para el consumidor, por tanto, la calidad es mucho más compleja. De hecho, no puede hablarse de un único perfil de consumidor, hay que hablar de consumidores en plural. Los consumidores requieren un producto de aspecto agradable pero sus expectativas, su lugar de origen, su comportamiento respecto al medio ambiente, su poder adquisitivo, su estilo de vida, su posible dieta vegana, orgánica, tradicional... hacen que aparezca una gran cantidad de tipos de consumidor. Para todos ellos puede llegar a desarrollarse una variedad que satisfaga sus expectativas, a un precio que, en ocasiones, puede llegar a ser alto pero que puede permitirse un sector del mercado potencial.

El consumidor demanda frutos que tengan un sabor intenso y equilibrado, pudiendo renunciar, en parte, a la gran uniformidad lograda en este momento. De hecho, en mercados de calidad puede aceptar variación en forma y tamaño, aunque no tolera bien defectos cosméticos en los frutos (Weaver y Luloff, 1992). De este modo pasan a ser interesantes posibles variedades con caracteres nutritivos/funcionales concretos (mayor concentración en vitaminas y provitaminas, antioxidantes,...) y que resalten valores que puedan escapar a los meramente atribuibles al sabor: respetuosas con el medio ambiente, respetuosas socialmente por incentivar los mercados locales o que supongan salvaguardar la historia y las variedades locales.

A pesar de la gran variedad de tipos de consumidor existente, si se evalúan las actitudes de consumidores de diferentes culturas, tradiciones y cocinas, se observan patrones de segmentación similares (Causse et al., 2010), en los que la apariencia

sigue teniendo un papel importante a la hora de definir la preferencia. No siempre los consumidores se centran en la valoración del sabor. Precisamente en este estudio en el segmento más numeroso los consumidores aprecian prioritariamente el precio y se suelen decantar por tomates tipo *beef*. Es cierto, no obstante, que otro segmento sí tiene más en cuenta el sabor, decantándose por tomates dulces, jugosos con sabor a tomate. Otro segmento tiene en cuenta prioritariamente el tamaño y la firmeza, mientras que el último segmento, de importancia variable según el país, se decanta por matices ácidos, pero valorando el precio y origen de los frutos.

Otros estudios también obtienen distinciones similares. Por ejemplo, en un estudio sobre tomates cherry, evidenciaron la segmentación del mercado entre consumidores que valoraban el color y el dulzor, y aquellos que priorizaban la acidez y aspectos texturales (Pagliarini et al., 2001). Por otro lado, en el estudio de Oltman et al. (2014), que incluye materiales de diferentes tipos, se distinguen cuatro segmentos. En general todos ellos valoran que el consumidor demanda que el tomate sea rojo, firme, de tamaño medio a pequeño, crujiente, carnoso, jugoso, sabroso y con pocas semillas, pero priorizan en cada caso la jugosidad, la firmeza, el color y se distingue entre los que valoran el valor funcional del tomate, a la hora de prevenir enfermedades, o aquellos que lo usan sólo como condimento secundario, por ejemplo, como relleno en sándwich.

Considerando todos estos matices, a la hora de valorar la calidad interna del tomate, se debería tener en cuenta la firmeza, la textura y jugosidad, entre las características físicas, y el sabor, compuesto por gusto y aroma, y el valor nutricional/funcional, entre las características químicas.

La firmeza es una propiedad mecánica de los tomates relacionada con su resistencia al manejo y la efectividad en su comercialización. Depende de la estructura de la pared celular y la unión entre células. Es la acción de las pectinasas la que ablanda los frutos al descomponer las pectinas y hemicelulosas produciendo una debilitación de las paredes del fruto. Las variedades actuales de tomate presentan una firmeza bastante aceptable. Los programas para conseguir tomates con buen aspecto y buen comportamiento



Figura 7. La estructura y textura del fruto pueden llegar a ser muy importantes. Muchas variedades tradicionales, como el tomate valenciano se caracterizan por su gran carnosidad.

en los mercados han dado como resultado tomates firmes y de larga vida (Al Falluji et al., 1980; 1982) . La textura es el resultado de la percepción en la boca de la pulpa, la presencia de gel en los lóculos, y el grosor y la elasticidad de la piel. La percepción de frutos jugosos está relacionada directamente con la cantidad de gel; cuando los tomates están maduros esta cantidad es el 20-30% del peso fresco en tomates de

tamaño medio. Otros aspectos que pueden conferir caracteres negativos a la calidad física interna son una piel demasiado gruesa, la harinosidad y la existencia de fibras en la pulpa o el eje vascular central. La harinosidad, fibrosidad y la cantidad de jugo hacen que las percepciones físicas en su consumo sean más aceptadas o menos por los consumidores a la hora de ingerir y paladear el producto. La estructura del fruto, la relación entre la placenta y el pericarpo y la relación entre la placenta y el corazón, son parte importante en la percepción de la textura y, como se comentará más adelante, puede condicionar la cantidad de azúcares y ácidos global del fruto. De hecho variedades tradicionales muy apreciadas como el tomate valenciano (Cebolla-Cornejo et al., 2007) se caracterizan por la mayor cantidad de pulpa y más carnosas (Figura 7), que hacen que sea percibida como una variedad de calidad, aparte de por otras características.

El sabor está condicionado por la percepción del gusto y el olfato y la interrelación entre ellos. Está por tanto relacionado con la composición química (soluble o volátil) de los frutos (Yilmaz, 2001), y los estímulos que estos compuestos provocan. En el tomate el sabor es especialmente complicado, entre otras cosas por la complejidad de su aroma. De hecho, se encuentra entre los sabores de difícil reproducción al contrario de frutos como el plátano, melocotón, la frambuesa o la uva, en los que un compuesto volátil dominante, respectivamente el 3-metil-butil-acetato, γ -undecalactona, 4-(4-hidroxifenil)-butan-2-ona y 1-*p*-menteno-8-tiol, permite emular su sabor (Baldwin, 2002).

Entre los compuestos percibidos por el gusto destacan los azúcares y ácidos orgánicos y la relación entre ellos (Stevens et al., 1977). Los azúcares suponen entre el 1 y el 4,5% del peso fresco del fruto, lo que supone el 50% de la materia seca y el 65% del CSS. Precisamente, por su alta representación en el CSS, la determinación de los grados Brix ($^{\circ}$ Brix) por refractometría ha sido un método tradicional de selección en los programas de mejora, especialmente en tomate de industria.

El tomate cultivado tiene fructosa y glucosa en concentraciones similares. La sacarosa es el azúcar que utiliza la planta para transportar fotoasimilados, pero rara vez sobrepasa el 0,1% del peso fresco en estado rojo maduro (Davies, 1966). Paneles sensoriales, formados por expertos entrenados, han detectado correlaciones positivas entre el dulzor de los frutos y el contenido en azúcares de estos, en tomates analizados (Saliba et al., 1998). Sin embargo, el distinto poder edulcorante de cada uno hace que su importancia relativa en la definición del dulzor sea distinto (Stevens et al., 1977). Así, se obtienen mayores correlaciones entre los equivalentes de sacarosa, calculados multiplicando la concentración de cada azúcar por su poder edulcorante y la percepción del dulzor (Baldwin et al., 1998). Efectivamente, la fructosa tiene un peso mayor en esta característica sensorial al tener un poder edulcorante de 1,73, mayor que la sacarosa, que es 1, o la glucosa 0,74 (Koehler y Kays, 1991).

Respecto al contenido en ácidos orgánicos, principalmente cítrico y málico, suele estar entre el 0,3 y el 1% del peso fresco y más del 10% del peso seco (Davies, 1966; De Bruyn et al., 1971; Mahakun et al., 1979). El ácido cítrico suele ser unas diez veces más concentrado que el ácido málico, por lo que tiene mayor peso a la hora de definir el matiz ácido del sabor. Hay que tener en cuenta, no obstante, que entre ambos, el

ácido málico se percibe un 14% más agrio (Stevens et al., 1977), por lo que también se pueden calcular los equivalentes de ácido cítrico de forma similar a los equivalentes de sacarosa.

Cuanto mayor es el contenido en azúcares y ácidos, el sabor a tomate se percibe como más intenso (Stevens et al., 1977), aunque si la relación ácidos/azúcares sobrepasa un umbral, se empieza a percibir negativamente (Malundo et al., 1995). Por otro lado, compuestos volátiles como la geranilacetona pueden afectar de forma considerable a la percepción del dulzor (Baldwin et al., 2000), por lo que matizan las aportaciones de azúcares y ácidos y la relación entre ellos.

Desde hace algunos años, se tiene en cuenta también al ácido glutámico, no por su contribución a la percepción de la acidez, sino porque ratios elevadas entre equivalentes de azúcares y ácido glutámico parece que mejoran la aceptabilidad del tomate (Bucheli et al., 1999; Fulton et al., 2002). Un resultado curioso, dado que normalmente el glutámico se emplea como potenciador del sabor. A este respecto Bucheli et al. (1999) sugirieron que el rol potenciador del glutámico se maximiza en rangos de pH entre 5,5 y 8, muy por encima del pH habitual en tomate, alrededor de 4-4,6, por lo que perdería este efecto.

Además de por el gusto, el sabor está también relacionado y condicionado por el aroma, que forma parte fundamental de la percepción del sabor a tomate, y que como ya se ha anticipado, en esta especie es muy complejo. Se han llegado a detectar hasta 400 compuestos volátiles a concentraciones muy bajas, incluso menores a 0.0003% del peso fresco (Petro-Turza, 1986). A pesar de las bajas concentraciones, estos compuestos son detectados por los órganos del olfato y del gusto y otorgan al fruto el característico aroma a tomate (Pyne y Wick, 1965). Pertenecen a diferentes grupos de compuestos orgánicos: alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas, ácidos, aminas, amidas, etc. y provienen del metabolismo de los ácidos grasos y aminoácidos o son productos de la descomposición de los carotenoides. De ellos, 20 han sido considerados especialmente importantes, por presentar concentraciones superiores al umbral olfativo de detección, destacando hexanal, (E)-2-hexenal, (Z)-3-hexenal, 1-hexanol, (Z)-3-hexen-1-ol, 2-isobutiltiazol, 6-metil-5-hepten-2-ona, geranil-acetona y β -ionona (Buttery, 1993). Un listado que se actualiza continuamente, añadiéndose compuestos como 1-penten-3-ona, (E,E) y (E,Z)-2,4-decadienal, 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona (furanol), metional, fenilacetaldeído o 2-feniletanol (Mayer et al., 2008). Igualmente, también se ha cuestionado el rol de algunos de los compuestos considerados tradicionalmente como importantes (revisado por Rambla et al., 2014).

No sólo el elevado número de compuestos con concentraciones superiores al umbral olfativo complican el estudio del aroma del tomate, sino que la percepción de cada compuesto puede cambiar en función de interacciones con el resto de volátiles, los azúcares, ácidos y la propia matriz biológica (Tandon et al., 2000; Tandon et al., 2001). Por otro lado, al igual que en el caso del gusto, en este caso el contenido en ácidos y azúcares influye sobre descriptores olfativos como notas verdes, a hierba o a frutadas (Tandon et al., 2003; Baldwin et al., 2008).

En general, se ha propuesto como objetivo de mejora la selección positiva para aumentar los contenidos en compuestos que contribuyen a notas florales como la 6-metil-5-hepten-2-ona y la β -ionona, a notas afrutadas, como el cis-3-hexenal y geranilacetona y notas frescas como el 3-metilbutanol y 1-penten-3-ona. Así como una selección negativa encaminada a reducir compuestos que contribuyen a notas rancias como el hexanal, trans-2-hexenal y 3-metilbutanal, notas pungentes como el 2-isobutylthiazole y alcohólicas como el 2-phenylethanol (Tandon et al., 2000). No obstante, el complicado panorama de la percepción olfativa del tomate, junto con el elevado coste de análisis, basado en cromatografía de gases-espectrometría de masas, y el elevado tiempo de análisis, prácticamente hace irrealizable el desarrollo de programas reales de mejora basados en el aroma.

5.- Factores que afectan a la calidad del fruto.

La calidad del tomate, como cualquier otro fenotipo, está determinada por el genotipo, el ambiente y la interacción entre ambos. En este caso el ambiente no sólo se ciñe al momento del cultivo, sino que los componentes de calidad organoléptica continúan cambiando tras la cosecha (Moya et al., 2009; Klee y Tieman, 2013).

El genotipo determina el potencial de acumulación de los compuestos que condicionan la calidad organoléptica del tomate. El estudio de la variación fenotípica dentro del mismo ambiente puede dar una idea del nivel de variación que puede aportar este factor, aunque muchas veces los rangos de variación descritos puedan verse afectados por efectos microambientales. Esta es una limitación importante, ya que realmente hay pocos estudios que aborden una descomposición real del efecto del genotipo y de la interacción genotipo ambiente, separándola completamente de efectos ambientales.

En cualquier caso, varios estudios han confirmado la variabilidad existente en las variables relacionadas con la percepción del sabor. Davies y Hobson (1981) establecieron que el contenido en materia seca puede oscilar según el genotipo entre un 5% y algo menos de un 10%, aunque señalaron que la mayoría de los tomates cultivados presentan contenidos entre un 5% y un 7,5%. Causse et al. (2006) situaron el contenido en sólidos solubles en torno a 4,5°Brix, valor en torno al cual se encuentran estudios realizados en diferentes lugares el mundo (Sestras et al., 2006; Ben Aoun et al., 2013; Kaur et al., 2013).

Del contenido en materia seca, casi la mitad son azúcares reductores, siendo un poco mayor el contenido en fructosa que en glucosa, ya que, como se ha comentado, la sacarosa se encuentra en trazas en estado rojo maduro en tomate cultivado. Otra cuarta parte de la materia seca la constituyen ácido cítrico, málico, amino ácidos dicarboxílicos, lípidos y minerales. Petró-Turza (1986) establece el contenido en azúcares entre un 1,7 y un 4,7% del peso fresco en función de la variedad y el de ácidos superior al 10% del peso seco, representando el cítrico alrededor del 9% y el málico el 4%.

Durante el crecimiento del fruto es mayor el ácido málico, pero una vez llegado a la madurez el cítrico es mayoritario, suponiendo entre un 45 y un 90% de la acidez total, según el cultivar analizado (Davies y Hobson, 1981; Petró-Turza, 1986). Al contrario de lo que ocurre con la ratio glucosa a fructosa, la ratio ácido málico a cítrico es muy dependiente de la variedad. Otros autores sitúan el contenido en ácidos orgánicos alrededor del 0,3% del peso fresco (Davies y Hobson, 1981; Causse et al., 2006), mientras que estudios más recientes establecen rangos entre el 0,25 y 0,7% (Kathiva et al., 2013; Kaur et al., 2013).

La estructura varietal puede contribuir a establecer el perfil de azúcares y ácidos del fruto, ya que el pericarpio tiende a presentar mayores contenidos en azúcares (Davies y Kempton, 1975), mientras que el gel locular presenta mayores contenidos en ácidos (Davies y Hobson, 1981).

El ácido glutámico, el ácido gamma-aminobutírico y la glutamina representan el 65% de los aminoácidos presentes en el fruto (Dorais y Papadopoulos, 2001), presentando el primero contenidos entre 0,5 y 3 g kg⁻¹ en peso fresco (Davies y Hobson, 1981).

Se han desarrollado diversos estudios que analizan los contenidos en ácidos y azúcares de materiales tradicionales (Cebolla-Cornejo et al., 2013) y antiguas o *heirloom* (Tiemann et al., 2012), poniendo todos ellos de manifiesto la gran diversidad existente desde el punto de vista del genotipo. Por ejemplo, en el estudio de Tiemann et al. (2013) en variedades antiguas se describen contenidos en glucosa entre 3 y 25,1 mg g⁻¹ en peso fresco (pf), de fructosa entre 1,5 y 34,6 mg g⁻¹ pf, de la ratio azúcares a ácidos ente 1,7 y 21, de ácido málico entre 0,11 y 1,19 mg g⁻¹ pf, de ácido cítrico entre 1,3 y 9,1 mg g⁻¹ pf y de la ratio entre los ácidos cítrico y málico entre 1,5 y 31,6.

Uno de los problemas que hay que abordar a la hora de comparar el efecto de distintos genotipos en el mismo ambiente reside en minimizar el ruido provocado por el microambiente y por la propia maduración. No todos los genotipos presentan frutos en el mismo estado en un mismo momento, por lo que es muy difícil eliminar este ruido. En cualquier caso hay que considerar que el contenido en azúcares reductores al inicio de la maduración es muy bajo y que irá aumentando hasta el estado de rojo maduro. Una evolución similar presentan los ácidos cítrico y glutámico, mientras que el málico es más elevado en el estado verde inmaduro y va disminuyendo progresivamente. Una evolución que parece necesaria ya que el málico se relaciona con el contenido en almidón al influir sobre el enzima sintasa ADP glucosa pirofosforilasa, de forma que su evolución es inversa al del contenido en hexosas (Klee y Giovannoni, 2011).

El contenido en compuestos volátiles también varía en función del genotipo, como muestran algunos estudios (Brauss et al., 1988; Tikunov et al., 2005; Cebolla-Cornejo et al., 2011). De hecho, incluso comparando condiciones ambientales muy distintas, el efecto del genotipo sigue siendo muy marcado (Cebolla-Cornejo et al., 2011; Lahoz et al., 2016).

5.1.- Factores ambientales y agronómicos.

No se puede considerar que únicamente el componente genético afecte a la calidad organoléptica del tomate, aunque claramente sea muy importante. El ambiente, entendido como la suma de componentes climáticos (iluminación, temperatura, humedad, etc.) y agronómicos (riego, abonado, etc.) es otro gran factor que afecta a la calidad del fruto, sin olvidar posibles efectos negativos puntuales provocados por plagas, enfermedades y desórdenes fisiológicos como el agrietamiento, planchado o la pudrición apical.

Dentro del efecto del ambiente, la temperatura juega un papel importante (Adams et al., 2001; Muholland et al., 2003; Saltveit, 2005; Fleisher et al., 2006; Gautier et al., 2008; Znidarcic et al., 2010). Concretamente, temperaturas entre 10 y 20°C parecen incrementar el contenido en sólidos solubles y reducir la acidez total (Znidarcic y Pozrl, 2006), mientras que las altas temperaturas podrían aumentar la acidez (Sakiyama, 1968; Ilic et al., 2012). No obstante, los cambios podrían estar determinados por las temperaturas y niveles de radiación considerados. Así, Gautier et al. (2008) determinaron que un ascenso de temperaturas desde 21°C hasta 26°C reducía la acidez total valorable un 25%, lo que relacionaron con la reducción del 50% en el contenido en ácido málico detectada por Lobit et al. (2006) al pasar de 15°C a 25°C.

La iluminación condiciona la tasa fotosintética y por tanto la cantidad de fotoasimilados y su reparto, aunque Guan y Janes (1991) sugirieron que las diferencias en radiación no afectarían tanto a la capacidad fotosintética como al potencial efecto sumidero de los frutos. El uso de mallas, cubiertas o invernaderos puede cambiar de forma importante las características de la radiación que incide en las plantas (Yahia et al., 2005). Cebolla-Cornejo et al. (2011) observaron que el cultivo protegido suponía una reducción del 26,7% de la radiación y un aumento del 3,8% de la temperatura, lo que conlleva una reducción de la acumulación de fructosa y glucosa, manteniendo niveles similares de los ácidos cítrico, málico y glutámico. Adicionalmente, aumenta la variación en la acumulación de estos compuestos, probablemente por aumentar las diferencias microambientales.

En este sentido Davies y Hobson (1981), en su revisión, concluyeron que la radiación solar sería probablemente el factor ambiental que más determina la acumulación de azúcares. De hecho, así lo confirman experiencias que comparan tomates cultivados al aire libre con tomates cultivados en ambiente protegido, que mostraron un 25-30% menos de azúcares (Davies y Hobson, 1981; Beckmann et al., 2006; Caliman et al., 2010). Valorando el contenido en sólidos solubles, algunos estudios muestran una reducción en condiciones protegidas de un 15-35% en °Brix (Caliman et al., 2010; Ilic et al., 2014).

Del mismo modo, Ilic et al. (2012) tampoco observaron un efecto claro de la radiación sobre la acidez. Ésta no está claro que se vea afectada por la iluminación, y Dorais et al. (2001), en su revisión sobre la calidad en tomate de invernadero, determinaron que el efecto del cultivo protegido, y la consiguiente reducción de iluminación, no tendría efectos sobre la acumulación de ácidos. Por el contrario, Yanagi et al. (1995) concluyeron que tanto en ciclos de invierno como de verano, la reducción de radiación

por sombreado provocaba un incremento en la acumulación de ácido cítrico, aunque sólo evaluaron un cultivar y sus resultados no son generalizables. En cualquier caso, si se mantuvieran los niveles de ácidos pero disminuyeran los de azúcares, disminuirían las relaciones entre ambos, dando lugar a una probable reducción de la preferencia (Cebolla-Cornejo et al., 2011).

Uno de los condicionantes que representan el efecto de la radiación y la temperatura sobre la calidad del fruto es que afecta seriamente a cómo se debe realizar el muestreo. Así, frutos recogidos de diferentes racimos deben presentar diferente acumulación de azúcares y ácidos, en tanto que las condiciones de luz y temperatura durante el desarrollo de los frutos sería distinto. En este sentido, Fanasca et al. (2007) comparando frutos de los racimos quinto y décimo, concluyeron que la concentración de cítrico no se vería afectada por la posición, mientras que los contenidos en fructosa y glucosa aumentarían en los últimos racimos especialmente con cargas mayores de frutos. Por tanto, a la hora de comparar genotipos y disminuir efectos de ruido, es fundamental muestrear siempre en un periodo de tiempo reducido de racimos similares. Evidentemente, este procedimiento dificulta la toma de muestras e impide cribados demasiado grandes del material vegetal.

En cuanto al sistema de cultivo, el riego es uno de los factores más influyentes sobre la calidad. En ocasiones el efecto es más bien indirecto. Así, un aumento de riego puede conllevar aumentos de la producción que den lugar a una disminución en la calidad organoléptica del tomate (Colla et al., 2001; Blaesing et al., 2006; Favati et al., 2009), por el efecto dilución entre otras causas (Dorais et al., 2001). No obstante, algunos estudios muestran que aumentar las dosis de riego sobre las recomendadas para cubrir 100% de la ETc no conllevan un aumento de la producción ni un efecto claro sobre el CSS, pero pueden diluir el contenido en volátiles (Lahoz et al., 2016), afectando tanto al aroma como a la percepción del dulzor.

Por otro lado, el estudio de técnicas de riego deficitario, ha puesto de manifiesto que éste puede ser una manera de incrementar la calidad organoléptica de los frutos sin reducir significativamente la producción, si se hace en el periodo vegetativo adecuado. El equilibrio se ha encontrado en reducir a la mitad el riego exclusivamente en el momento en que los frutos viran a rojo (Favati et al., 2009; Patanè et al., 2011). Valcárcel et al. (2015) redujeron el riego en un 50% cuando los frutos ya se encontraban desarrollados para evitar pérdidas en la cosecha, encontrando que los contenidos en fructosa, ácido cítrico y ácido málico no se veían afectados. Solo la concentración en glucosa aumentaba. Concluyeron que era más importante el efecto del cultivar, que puede estar atenuado por el efecto localidad, y que, por tanto, la reducción del riego en los últimos estadios del cultivo permite una mejor gestión de los recursos hídricos que sólo puede llevar a una mejora de la calidad de los frutos.

Además del riego, el abonado también conlleva un efecto importante, estando por otra parte ambos factores también relacionados (Romero, 2007). La fertilización nitrogenada adecuada asegura el desarrollo vegetativo, si bien hay resultados contradictorios al comparar diferentes dosis de abonado y su efecto sobre el contenido en ácidos y sólidos solubles. Algunos autores concluyen que el contenido en ácidos (Kuscu et al., 2014) o el CSS (Fandi et al., 2009) aumenta con la dosis de nitrógeno;

mientras que otros autores que trabajaron con tomate de industria (Warner et al., 2004) o consumo en fresco (Benard et al., 2009) concluyen que no afecta a los sólidos solubles. Dorais et al. (2008) por su parte, en su revisión sobre cultivo de tomate en invernadero, concluyeron que dosis excesivas de abonado nitrogenado tienen un efecto de dilución sobre el contenido en azúcares y puede aumentar la acidez, mientras que dosis excesivamente bajas también tendrían un efecto negativo al reducir el desarrollo vegetativo y por tanto la capacidad fotosintética.

Otros nutrientes tienen efectos diversos. La fertilización fosfórica parece no afectar a los contenidos en componentes de sabor del tomate (Oke et al., 2005; Liu et al., 2011). El potasio, en cambio, sí se ha visto un factor a tener en cuenta (Liu et al., 2011), ya que dosis bajas reducen el contenido en azúcares y ácidos por estimular el potasio el transporte y la conversión de asimilados (Balliu e Ibro, 2002). Otras fertilizaciones como la carbónica también mejora la calidad organoléptica del tomate. Zhang et al. (2014), han realizado experiencias en que los contenidos en carotenos, vitamina C, licopeno, azúcares, acidez, y la relación azúcares/ácidos aumentaban significativamente, así como el color, la firmeza y el aroma.

El tipo de abonado, bien mineral, bien orgánico, o dicho de otro modo, el sistema de cultivo ecológico, también puede afectar a la calidad organoléptica. En este sentido, hay trabajos que indican que el sistema de cultivo ecológico supone un aumento en CSS en comparación con el cultivo convencional (Chassy et al., 2006; Pieper y Barret, 2008; Vinha et al., 2014). Por otro lado, en tomate para procesado, el cultivo ecológico, sin presentar un efecto importante sobre la acumulación de azúcares (si bien depende del ambiente y en condiciones de elevada radiación y temperatura sí puede hacerlo), sí que tiende a aumentar los contenidos en ácidos cítrico y glutámico, aumentando los ratios entre azúcares y ácidos (Lahoz et al., 2016b).

Por otro lado, el momento de recolección y la conservación hasta la venta también influyen en la calidad del tomate. Verheul et al. (2015) concluyeron que la firmeza del fruto, el contenido en sólidos solubles, y la acidez total de tomates cherry recolectados en rama eran un 30, 55 y 11% superior que el de los tomates cosechados en estado pintón o rojo maduro. Además la temperatura, la luz, la radiación ultravioleta o el etileno durante los cuatro días de transporte afectan a la calidad del tomate y las diferencias persisten durante las tres semanas de conservación en el supermercado.

La evolución de la calidad del fruto, una vez adquirido, también debe contemplarse. Schouten et al. (2016) analizaron la evolución de los componentes del sabor en tomates conservados en frío en postcosecha. Concluyeron que la metabolización de las hexosas es mayor en los tomates rojos y que la conversión de malato en hexosas es mayor en el estado verde. La gluconeogénesis era más importante en el tomate cherry estudiado por la ruptura más rápida de hexosas y malato. Pero el comportamiento era diferente en el cultivar redondo, donde los niveles de malato eran superiores por la ruptura más rápida del citrato y menor del malato. La cantidad de almidón y sacarosa no parecían afectar significativamente los niveles de azúcares y ácidos durante la postcosecha.

En pocos casos se puede estudiar la evolución del contenido en azúcares y ácidos más allá de un mes de conservación, pero en variedades tradicionales tipo “de penjar” esto sí es posible y Cebolla-Cornejo et al. (2015) observaron que se producía un descenso en el contenido de glucosa, fructosa y ácido cítrico, mientras que aumentaban el contenido de ácidos málico y glutámico, que confiere un perfil de sabor diferente, pero apreciado por el consumidor local.

Por la evolución de los parámetros de calidad que acaban de comentarse, se hace necesario también estandarizar el momento de recolección y procesado de muestras. La elección del estado rojo maduro se estima el más idóneo, ya que es cuando resulta más estable en el contenido de los compuestos implicados en el sabor, y el procesado de muestras no debe alargarse en el tiempo para evitar variabilidad innecesaria.

6.- Dificultades en la mejora del sabor del tomate.

Es cierto que muchos programas de mejora genética del tomate seguirán centrados en obtener la máxima producción, mientras que otros, dirigidos a desarrollar materiales para selectos mercados de calidad, prestarán mayor atención a la calidad organoléptica. Pero, en cualquier caso, el descontento de los consumidores, hace necesario reevaluar la necesidad de incorporar la selección por calidad organoléptica en los programas de mejora genética.

Independientemente de la estrategia seguida o del diferente énfasis puesto en la selección por calidad, lo cierto es que varios grandes escollos aparecen en los programas de mejora de la calidad organoléptica (Causse et al., 2006):

1. Muchos caracteres han de tenerse en cuenta simultáneamente.
2. La mayor parte de caracteres están controlados por varios genes e influenciados ambientalmente.
3. La mejor estima de calidad organoléptica es a través de paneles de catadores que evalúan aspectos sensoriales, si bien esto impide la evaluación de grandes cantidades de muestras. Por ello, es crucial poder estimar la calidad a través de los contenidos en los compuestos que influyen dichos valores sensoriales.

Por ello el planteamiento de cualquier programa de mejora en este sentido debiera resolver dos aspectos importantes:

- i) La dificultad de obtención de forma rápida, completa y precisa de una caracterización de los componentes del sabor de tomate.
- ii) La gran influencia ambiental y de otro tipo de factores que afectan al cultivo y afectan a la expresión del sabor de tomate.

Como se ha indicado anteriormente el sabor del tomate es muy complejo, y muy difícil encontrar los criterios para caracterizarlo. Hay muchos compuestos involucrados, y no es solo la cantidad que hay de cada uno de ellos, sino también la relación que hay entre el contenido en cada uno de ellos. La percepción más fiable es la que nos da el

consumo del tomate. Ese criterio lo aportaba el agricultor cuando consumía su propia producción y en función de ese consumo guardaba sus semillas. Era subjetivo, largo y tedioso, aunque muy efectivo. En la actualidad se usan paneles de expertos, pero tienen que entrenarse, y el análisis de muchas muestras siguiendo este modelo es costoso y complicado. A lo que hay que añadir que muchas veces, los propios panelistas representan la mayor fuente de variación (Causse et al., 2001). Por eso, no puede renunciarse a este tipo de análisis, pero debe reservarse para un limitado número de muestras. Por tanto, la evaluación sensorial puede emplearse en fases finales a la hora de evaluar un número reducido de líneas finalistas, pero es inviable a lo largo de un programa de mejora.

Los mejoradores deben, por tanto, recurrir a métodos químicos, rápidos, fiables y reproducibles para realizar ese tipo de análisis y establecer criterios de selección para caracteres de calidad interna. Tradicionalmente se emplearon valores de CSS estimados como °Brix por refractometría, acidez total valorable y pH, que están relacionados con la intensidad del sabor (Stevens et al., 1977). Sin embargo, todas estas medidas, como se ha comentado, no son precisas ya que son el resultado de la unión del contenido de muchas y muy diferentes sustancias que componen el fruto. Es imposible distinguir matices de sabor ácido o dulce, que dan compuestos muy diferentes pero que contribuyen de manera muy similar en medidas como los °Brix, el pH o la acidez. Por ello, cada vez más estudios se han desarrollado desde la década de los 90 para correlacionar la respuesta sensorial con la acumulación de compuestos individuales (Baldwin et al., 1998; Bucheli et al., 1999; Causse et al., 2001, Fulton et al., 2002, etc).

Por ello, es necesario contar con métodos de análisis químico precisos y rápidos, que permitan conocer la composición y el contenido en cada una de las sustancias involucradas en el sabor del tomate. Esto implica poder conocer el contenido en azúcares y ácidos individuales y volátiles implicados en el aroma. Entre todos ellos, los métodos basados en cromatografía de gases necesarios para la cuantificación de volátiles siguen siendo demasiado costosos y tediosos y además la compleja relación que se establece entre ellos, así como la dificultad de determinar el grado en que afectan al olfato (Tieman et al., 2012) hacen inviable su utilización en programas de mejora comerciales.

Por ello, el objetivo se centra en la cuantificación de azúcares y ácidos individuales. Para ello, existen métodos fiables y precisos para la determinación del contenido en esos compuestos como la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y la electroforesis capilar zonal (ZCE). Además suponen la caracterización precisa del sabor del tomate, aunque sean necesarios instrumental caro y personal cualificado.

La determinación mediante HPLC se consigue en dos pasos: primero la cuantificación de los ácidos orgánicos (Blanco-Gomis, 2000) y después la cuantificación de carbohidratos utilizando HPLC con intercambio de aniones mediante índice de refracción (Yang et al., 1981) o detección amperométrica pulsada (Rocklin y Pohl, 1983; Honda, 1984; Martens y Frenkenberger, 1990; Soga et al; 1992; Corradini et al., 1993). Como consecuencia del doble análisis, el tiempo de las determinaciones es largo. Además, el instrumental necesita a menudo largos periodos para el equilibrado

de la columna que es concreta para los análisis y que tiene un coste considerable. La utilización de algún método que analizara ambos compuestos al mismo tiempo simplificaría y acortaría el proceso.

La cromatografía de gases también ha sido utilizada para la determinación de ácidos y azúcares, y de forma simultánea (Court y Hendel, 1986; Chapman y Horvat, 1989; Morvai et al., 1991; Adams et al., 1999). Este método requiere a menudo un pretratamiento de la muestra laborioso, derivatización y largos periodos de separación. Además muchos carbohidratos no son volátiles o volátiles por calentamiento y a menudo se forman diversos estereoisómeros en el proceso de derivatización que complican la identificación.

La necesidad de un procedimiento más rápido y sencillo que determine el contenido en azúcares y ácidos y que no requiera una preparación de la muestra laboriosa, es fundamental para la gestión y análisis de la gran cantidad de muestras que supone realizar un programa de mejora de la calidad del sabor en tomate.

En ese sentido, la electroforesis capilar aparece como una técnica de separación potente que tiene las ventajas de ser simple, rápida, muy eficiente y selectiva. Debido a la falta de absorbancia en la región ultravioleta de los ácidos orgánicos los trabajos publicados de electroforesis capilar zonal, han utilizado la detección indirecta con radiación ultravioleta utilizando para ello electrolitos de fondo (Klampfl y Buchberger, 1997; Doble y Haddad, 1999). Los azúcares por su parte se han determinado por derivatización (Honda et al., 1989; Guttman, 1997; El Rassi, 1997) o detección indirecta (Hoffstetter-Khun et al., 1991; Lee y Lin, 1996; Soga y Heiger, 1998). Pero también se ha descrito un método de electroforesis capilar zonal que determina simultáneamente, y sin derivatizar, aniones inorgánicos, aniones orgánicos, amino ácidos y carbohidratos (Soga y Ross, 1999). Por lo que obtener un método que consiguiera esas determinaciones simultáneamente para los frutos de tomate y especies relacionadas sería de gran ayuda en el desarrollo de planes de mejora de calidad.

7.- Logros en la mejora de la calidad organoléptica de tomate

Hasta el momento actual se han seguido dos abordajes en la mejora de la calidad organoléptica del tomate. La primera consiste en explotar la variabilidad natural presente en el género *Solanum*, seleccionando los parentales donantes entre el germoplasma silvestre o cultivado tras su cribado para caracteres de calidad. A partir de esos materiales, se pueden entonces comenzar planes de mejora convencionales, basados en cruce y selección, que pueden ser asistidos por herramientas biotecnológicas. Una segunda forma de abordar la mejora implica la utilización de ingeniería genética, mediante la que se modificaría la expresión de genes concretos, se introducirían nuevas variantes alélicas o nuevos genes.

7.1.- Mejora mediante ingeniería genética

El progreso en este campo ha sido destacado. Entre otras aproximaciones, se han obtenido tomates con diversos edulcorantes. Por ejemplo mediante el gen que codifica la taumatina, una proteína de sabor dulce proveniente de *Thaumatococcus daniellii* Benth., que da un sabor valorado por los catadores como característico y dulce al expresarse en tomate (Bartoszewski et al., 2003) o sintentizando la miraculina proveniente de *Richadella dulcifica* (Schuach & Tonn.) Baehni (Ezura y Hiwasa-Tanase, 2016) o la monelina proveniente de *Dioscoreophyllum cumminsii* Diels (Reddy et al., 2015; Akter et al., 2016).

También se han modificado enzimas de la ruta de síntesis o metabolismo. Por ejemplo empleando la sacarosa-fosfato sintasa, que conduce a un aumento de la sacarosa en el fruto, que podría ser el resultado de un cambio en la partición del carbono entre el almidón, la sacarosa y compuestos iónicos (aminoácidos) más que de un aumento de la fotosíntesis (Laporte et al., 1997, 2003), aunque este efecto no siempre se ha conseguido (Lunn et al., 2003). Respecto a los ácidos, la transformación con la glutamato deshidrogenasa procedente de *Aspergillus nidulans* aumentaba el contenido en aminoácidos libres, doblando el contenido en glutamato al comparar con los controles (Kisaka y Kida, 2003). Por otro lado, líneas transgénicas (que introgresaban genes de *S. pennelli*) obtenidas con una construcción antisentido de *SIACO3b*, uno de los genes que codifica la enzima aconitasa citosólica, presentaron niveles aumentados de ácido cítrico y málico, hasta conseguir un 50% más de ácidos en la madurez (Morgan et al., 2013).

Una forma alternativa de aumentar los niveles de azúcar sin efectos secundarios sobre el crecimiento de la planta ha consistido en emplear la represión de traducción inducida por sacarosa (SIRT). En este sentido Sagor et al. (2016) han conseguido tomates más dulces (un 50%) empleando los factores de transcripción *SibZIP1* y *SibZIP2* con el promotor específico de fruto *E8*.

Por otro lado, se ha actuado sobre el propio proceso de maduración. Por ejemplo, la transformación con un ARN antisentido de la proteína de membrana asociada a la maduración (TRAMP) redujo el ARNm de dicha proteína en un 94%, alterando el patrón de acumulación de ácidos y azúcares, aumentando los primeros y reduciéndose los segundos (Chen et al., 2001).

En cualquier caso, a pesar de los avances registrados, en zonas como Europa la opinión pública ha condicionado políticas muy restrictivas respecto a los organismos modificados genéticamente (Malyska et al., 2016), por lo que esta aproximación es más académica que comercial. No obstante, el desarrollo de métodos de edición genética de última generación ponen a prueba la legislación existente, ya que técnicamente no se trataría de plantas “transgénicas”. De hecho, ya se comercializan en Estados Unidos variedades de colza no transgénicas editadas genéticamente que desafían a la legislación existente (Nature Ed. Office, 2015). De esta forma, a nivel comercial se han impuesto los avances obtenidos mediante mejora convencional.

7.2.- Mejora convencional

El tomate presenta, en la zona andina de origen, un amplio espectro de especies silvestres relacionadas, que suponen y han supuesto un material muy importante en la mejora genética del tomate desde los años 30 (Rick, 1986).

En el caso de la calidad organoléptica, se han utilizado diferentes especies (Figura 8) en la mejora de la calidad del fruto (Fernie et al., 2006). En algunas entradas primitivas de *S. lycopersicum* y *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* se ha encontrado una variabilidad importante en el CSS con valores entre el 4 y el 10% del peso fresco, así como en *S. pimpinellifolium* (de 4.9% a 9.2%), *S. chmielewskii* (hasta un 10%), *S. cheesmaniae* forma *typicum* (entre un 5% y un 10%) y forma *minor* (entre un 10% y un 15%) (Lambeth et al., 1966; Rick, 1974) y *S. pennellii* (hasta un 15%) (Fridman et al., 2000).

Paradójicamente, las variedades de tomate de industria, con menor precio de venta, lideraron los programas de mejora de la calidad organoléptica. Estos programas pioneros se iniciaron hace unos sesenta años, con el objetivo de intentar aumentar el CSS (°Brix) y disminuir el pH en tomate para industria por las ventajas que ello supone en el procesado, el rendimiento y la eficiencia en proceso industrial. Así, se consiguió un CSS del 6,9% cruzando diferentes entradas de *S. cheesmaniae* forma *minor* en programas de mejora por retrocruzamiento que intercalaban generaciones de autofecundación (Hewitt et al., 1987; Triano y StClair, 1986).



Figura 8. Germoplasma utilizado en la mejora del sabor en tomate. De izquierda a derecha *S. lycopersicum*, *S. lycopersicum* antigua var. *cerasiforme*, *S. pimpinellifolium*, *S. cheesmaniae*, *S. chmielewskii*, *S. pennellii* (fotos cortesía de J.V. Valcárcel, COMAV).

Este tipo de programas de mejora han tenido, no obstante, un éxito relativo, pese al alto potencial de los materiales seleccionados como donantes. El CSS y el pH suponen la cuantificación conjunta de muchos compuestos que pueden variar de forma muy diferente a lo largo de un programa de mejora. Por otro lado, esta aproximación aborda la intensidad de sabor, pero no los matices del mismo. El CSS se ha relacionado tradicionalmente con el dulzor, pero otros estudios lo han relacionado con la acidez, astringencia y amargor (Baldwin et al., 1998). Además, un alto pH y otros caracteres no deseados agrónomicamente, como la reducción en la cosecha y el menor tamaño del fruto, parecen estar ligados a altos CSS, lo que ha retrasado los resultados y hecho difícil el diseño de planes de mejora (Ibarbia y Lambeth, 1969;

Paterson et al., 1988; Tanksley y Hewitt, 1988; Paterson et al., 1991; Goldman et al., 1995).

Otra alternativa que se ha seguido encaminada a ofertar variedades de alta calidad no ha consistido en la mejora del sabor en sí, sino en la mejora de resistencia a enfermedades en variedades tradicionales que ya se caracterizaban por su excelente sabor. Esta mejora se ha considerado necesaria dado que la elevada incidencia de enfermedades víricas dificultaba en gran medida el cultivo de este tipo de materiales (Cebolla-Cornejo et al., 2007).

Siguiendo esta vía se han desarrollado variedades tradicionales de “Muchamiel” y “de la Pera” que introgresaban genes de resistencia a virus (García-Martínez et al., 2014, 2015, 2016). No obstante, se ha comprobado que de los tres genes más utilizados en este tipo de programas, el *Tm2-2*, *Sw-5* y *Ty-1*, el de resistencia a la enfermedad TYLCD solo debería considerarse en situaciones de alto riesgo debido a su efecto negativo, que afecta especialmente al rendimiento de las líneas que lo introgresan (Rubio et al., 2016).

Los programas tradicionales también han intentado reducir el efecto que las condiciones ambientales y factores agronómicos tienen sobre los caracteres a mejorar. La selección asistida por marcadores moleculares aparece como una herramienta potente que permite la selección de poblaciones segregantes, siempre que estén ligados a loci que determinen caracteres de calidad (QTLs). Para ello primero deben identificarse los marcadores y genes a los que se asocian, pero una vez identificados permiten la selección no influenciada por factores ambientales y en estadíos de desarrollo vegetativo de la planta mucho más tempranos, acortando así la duración de los programas de mejora (Bucheli et al., 1999; 2001). Los primeros trabajos se desarrollaron en la década de los noventa buscando RFLPs ligados a CSS (Ibarbia y Lambeth, 1969; Paterson et al., 1988; Paterson et al., 1991; Garvey y Hewitt, 1992; Goldman et al., 1995, Grandillo y Tanksley, 1996). Así se identificaron algunos RFLPs en cruces de tomate con *S. cheesmaniae* y *S. chmielewskii* que contribuían al CSS en 8 cromosomas diferentes. Sin embargo, estos estudios realizados en familias F2 y F3 presentaban errores experimentales elevados, por lo que fue necesario acudir al uso de recombinant introgression lines, RILs para optimizar la identificación de *Quantitative Trait Loci*, QTLs (Goldman et al., 1995). Aun así, la mayor parte de los QTLs identificados mostraron efectos favorables para la mejora del CSS pero desfavorables para tamaño de fruto, por lo que dificultó un uso eficiente de los mismos.

Mejores resultados en incrementar el contenido en azúcares se consiguieron con *Solanum pennellii*. El estudio de líneas de introgresión en la especie cultivada llevó a la identificación del QTL *Brix-9-2-5* en el cromosoma 9, con niveles elevados de CSS. Concretamente la introgresión *Brix-9-5-2* aumenta el CSS alrededor de un 15%-25% (Fridman et al., 2002) y específicamente los contenidos en fructosa en 18% y glucosa en 28% (Fridman et al., 2000)

El mapeo de esta introgresión la localizó en un área de 484 pb desde el exón 3 al 4 de la invertasa apoplástica LIN5 (Fridman et al., 2000). Una de las mutaciones detectadas

en el lugar catalítico facilita la cinética de la enzima, lo que supone una actividad aumentada de la invertasa en los frutos, lo que lleva a una capacidad mayor para tomar sacarosa del floema aumentando así los niveles de hexosas en el fruto maduro (revisado por Matsukura, 2016).

Por otro lado, Barrantes et al. (2016) identificaron dos QTL en el cromosoma 2 y 9 en una línea de introgresión de *S. pimpinellifolium* que aumentan el contenido en sólidos solubles sin efectos colaterales en el tamaño del fruto. Precisamente en RILs de esta misma especie se han identificado QTLs relacionados con una mayor concentración de volátiles derivados de carotenoides, que tienen un efecto positivo sobre la percepción del sabor (Rambla et al., 2016).

Más allá de la búsqueda de QTLs asociados a CSS, se trató de identificar loci asociados a mayores contenidos de compuestos individuales. Para ello, se realizaron catas con paneles de expertos y análisis de ácidos y azúcares para relacionar ambos aspectos. Los resultados sensoriales se unieron a los datos bioquímicos y se identificaron hasta 251 QTLs. Entre 3 y 27 QTLs significativos fueron identificados para cada uno de los 15 caracteres. Este tipo de aproximación ha permitido identificar QTLs significativamente relacionados con caracteres del tipo sabor a tomate, °Brix, ácido cítrico, glutámico, azúcares totales y la relación azúcares/ácido glutámico, entre otros (Bucheli et al., 1998, 2000; Fulton et al., 2002).

También se ha obtenido un mapa saturado de AFLPs, RFLPs y RAPDs en un cruce intraespecífico (Saliba et al., 1999, 2001; Causse et al., 2001, 2002). Los resultados se han cruzado con paneles de expertos y algunas regiones de los cromosomas 2, 3, 4, 8, 9, 11 y 12 parecen explicar la variabilidad encontrada en caracteres físicos y químicos. Los QTLs más importantes para caracteres de calidad organoléptica se encontraron para firmeza, harinosidad y seis aromas del fruto. QTLs de peso y contenido en azúcares o peso y materia seca se identificaron colocalizados con frecuencia en el cromosoma 2. Sin embargo, un QTL de CSS y materia seca se encontró en el cromosoma 9 en una región sin QTLs relacionados con el peso.

Estudios posteriores realizados en RILs procedentes de un cruce con *S. pimpinellifolium* han permitido identificar QTLs de similares características. El mapeo obtuvo 353 marcadores, cuyo análisis genético indica que los caracteres de calidad exhiben segregación transgresiva y efectos aditivos y epistáticos fundamentalmente, con interacción con el ambiente. El QTL de tamaño de fruto *FrW7* se colocalizó con el contenido en sólidos solubles, vitamina C y glucosa, peso seco/peso fresco y el gen de la sacarosa fosfato sintasa, sugiriendo que el polimorfismo de este gen puede influir en la variación genética de diversos caracteres de calidad (Capel et al., 2015).

Por otro lado, Liu et al. (2016) concluyen que 185 metabolitos, muchos de ellos relacionados con el sabor del tomate, cambiaron significativamente al analizar una línea que introgresaba segmentos de *S. pennelli* del cromosoma 4.

También se ha trabajado con entradas de *S. pimpinellifolium* que mostraron elevados contenidos en compuestos volátiles orgánicos, llegando a identificar unos 40 QTLs que han demostrado mantener su efecto una vez introgresados en *S. lycopersicum* (Rambla et al., 2017). Los QTLs de aromas son importantes en cuanto a que pueden

afectar, como se ha comentado, a la percepción del dulzor. De hecho, se piensa que un factor adicional implicado en la pérdida de sabor de las variedades modernas, puede ser la fijación de alelos no deseados en genes involucrados en la síntesis de volátiles debido a no incluir el aroma como criterio de selección en programas de mejora (Tieman et al., 2017).

Otra estrategia contemplada es evitar los caracteres indeseados que las especies silvestres pudieran introducir en los cruces llevados a cabo en los planes de mejora. Un QTL relacionado con el contenido en 2-feniletanol y fenilacetaldehído, de aroma muy desagradable que causa náuseas si su contenido es mayor a 0.005ppm, se encontró en el brazo corte del cromosoma 8 de una línea que había sido cruzada con *S.pennelli* (Tadmor et al., 2002).

Más allá de los estudios de identificación de QTLs. En las especies silvestres relacionadas se han encontrado genes concretos que alteran el metabolismo de los azúcares. Por ejemplo, la especie *S. chmielewskii* acumula sacarosa en vez de hexosas en el fruto. Este carácter está controlado por el gen *sucr* (acumulador de sacarosa) que se ha introgresado en tomate y que supone un silenciamiento transcripcional de la invertasa vacuolar en el fruto del tomate, permitiendo la acumulación de sacarosa (Chetelat et al., 1993; Klann et al., 1993). Sin embargo, también ha supuesto efectos no tan deseados como la reducción en el peso del fruto y la cosecha de frutos maduros (Chetelat et al., 1995a, 1995b).

La especie *Solanum habrochaites* también se ha utilizado para cambiar la ratio fructosa a glucosa que normalmente ronda la unidad en tomate y en esta especie es superior a 1.5. Este carácter pudiera ser interesante ya que el sabor endulzante de la fructosa es mayor. Tiene un carácter poligénico, aunque se ha descrito un locus principal *Fgr* en el cromosoma 4, con efecto de dosis alélica (Levin et al., 2000). En estudios posteriores se identificó un locus que interactuaba con éste último. Este locus situado en el cromosoma 6, codifica la Fructokinasa2. Ambos genes tienen comportamiento epistático, obteniendo los ratios mayores con las combinaciones *Fgr^{HH}* y *Fk2^{HH}*. En presencia del alelo *Fgr habrochaites* el alelo *Fk2 habrochaites* aumenta la relación, más que aditivamente. Con el alelo *Fgr sculentum* se observa un pequeño inconsistente efecto aditivo para *Fk2 habrochaites* (Levin et al., 2004, 2006). El uso de estos genes no aumenta el contenido total de azúcares (Schafer et al., 1999)

Pese a todos estos descubrimientos, la búsqueda de variación y nuevas fuentes que permitan obtener distintos perfiles de sabor se hace necesaria en la mejora del sabor del tomate. Además nuevas posibilidades ante el estudio de las enzimas del metabolismo de los azúcares, como la invertasa ácida, o los estudios recientes sobre la acción de los transportadores de azúcares, la enzima de biosíntesis de almidón o la enzima de procesamiento vacuolar (Matsukura, 2016), parecen abrir nuevas expectativas en el cribado de germoplasma.

Ante los resultados obtenidos hasta el momento y con el conocimiento adquirido, la búsqueda de nuevos materiales que permitan la mejora en caracteres de calidad se hace imprescindible, independientemente de cuál sea el abordaje seleccionado para la mejora. La posibilidad de incrementar contenidos en los compuestos relacionados con

la calidad, alterar el metabolismo de sus rutas, introducir genes que expresen compuestos de especies incluso no relacionadas o aumente la fuerza como sumidero de los frutos, sólo puede abordarse desde el cribado y caracterización de entradas tanto química como genéticamente. Por ello, se contempla el cribado como objetivo prioritario para la mejora de la calidad, así como el mapeo del genoma del tomate en relación con su sabor (Klee y Teman, 2013; Tieman et al., 2017)

8.- Bibliografía

- Adams, M.A., Chen, Z., Landman, P., Colmer, T.D., 1999. Simultaneous determination by capillary gas chromatography of organic acids, sugars, and sugar alcohols in plant tissue extracts as their trimethylsilyl derivatives. *Analytical biochemistry*, 266(1), pp.77-84.
- Adams, S.R., Cockshul, K.E., Cave, C.R.J., 2001. Effect of temperature on the growth and development of tomato fruits. *Annals of Botany* 88, 869-877.
- Akter, S., Huq, M.A., Jung, Y.J., Cho, Y.G., Kang, K.K., 2016. Application of sweet and taste modifying genes for development in plants: current status and prospects. *Journal of Plant Biotechnology*, 43(4), pp.397-404.
- Al Falluji, R.A., Lambeth, V.N., 1980. Inheritance of pericarp tissue firmness in tomato. *HortScience*, 15(3, II).
- Al Falluji, R., Trinklein, D.H., Lambeth, V.N., 1982. Inheritance of pericarp firmness in tomato by generation mean analysis. *HortScience*, 17(5), pp.763-764.
- Alabouvette, L., Tittard, A., 1933. Sur la possibilité d'utiliser dans la culture de la tomate des hybrides de première génération. *Le Sélectionneur*, 2: 11-14.
- 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), pp.1085-1094.
- Baldwin, E.A., 2002. *Fruit flavor, volatile metabolism and consumer perceptions* (pp. 89-106). En: *Fruit quality and its biological basis*. Knee, M. (ed). CRC Press: Boca Raton, FL.
- Baldwin, E.A., Scott, J.W., Einstein, M.A., Malundo, T.M.M., Carr, B.T., Shewfelt, R.L., Tandon, K.S., 1998. Relationship between sensory and instrumental analysis for tomato flavor. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123(5), pp.906-915.
- Baldwin, E.A., Scott, J.W., Shewmaker, C.K., Schuch, W., 2000. Flavor trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. *HortScience*, 35(6), pp.1013-1021.
- Baldwin, E.A., Goodner, K., Plotto, A., 2008. Interaction of volatiles, sugars, and acids on perception of tomato aroma and flavor descriptors. *Journal of food science*, 73(6), pp.S294-S307.
- Balliu, A., Ibro, V., 2002. Influence of different levels of potassium fertilizers on growth, yield and ascorbic acid content of tomato fruit grown in non-heated greenhouse. *Acta Horticulturae* 579, 385-388.

- Barquin Gil, R. 1999. El precio del trigo en España (1814-1883). *Historia agraria*, 17: 177-217.
- Barrantes, W., López-Casado, G., García-Martínez, S., Alonso, A., Rubio, F., Ruiz, J.J., Fernández-Muñoz, R., Granell, A., Monforte, A.J., 2016. Exploring new alleles involved in tomato fruit quality in an introgression line library of *Solanum pimpinellifolium*. *Frontiers in plant science*, 7.
- Bartoszewski, G., Niedziela, A., Szwacka, M., Niemirowicz-Szczytt, K., 2003. Modification of tomato taste in transgenic plants carrying a thaumatin gene from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *Plant Breeding*, 122(4), pp.347-351.
- Bar-Yosef, O., Belfer-Cohen, A., 1989. The origins of sedentism and farming communities in the Levant. *Journal of World Prehistory*, 3(4), pp.447-498.
- Beckmann, M.Z., Duarte, G.R.B., De Paula, V.A., Gonzáles-Mendes, M.A., Piel, R.M.N., 2006. Radiação solar em ambiente protegido cultivado com tomateiro nas estações verão-outono do Rio Grande do Sul. *Ciência Rural*, Santa Maria 36 (1), 86-92.
- Ben Aoun, A., Lechiheb, B., Benyahya, L., Ferchichi, A., 2013. Evaluation of fruit quality traits of traditional varieties of tomato (*Solanum lycopersicum*) grown in Tunisia. *Afr. J. Food Sci.* 7 (10), 350-354.
- Benard, C., Gautier, H., Bourgaud, F., Grasselly, D., Navez, B., Caris-Veyrat, C., Genard, M., 2009. Effects of low nitrogen supply on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruits yield and quality with special emphasis on sugars, acids, ascorbate, carotenoid and phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 57 (10), 4112-4123.
- Bertin, N., Guichard, S., Leonardi, C., Longuenesse, J.J., Langlois, D., Navez, B., 2000. Seasonal evolution of the quality of fresh glasshouse tomatoes under Mediterranean conditions, as affected by air vapour pressure deficit and plant fruit load. *Annals of Botany*, 85(6), pp.741-750.
- Blaesing, D., Murray, A., Schulz, M., Stewart, M., 2006. Nutrient management for high soluble solids production in Australian processing tomatoes. *Acta Horticulturae* 724, 75-83.
- Blanca, J., Montero-Pau, J., Sauvage, C., Bauchet, G., Illa, E., Díez, M.J., Francis, D., Causse, M., van der Knaap, E., Cañizares, J., 2015. Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. *BMC genomics*, 16(1), p.257.
- Bojnec, Š., Fertő, I., 2016. Export Competitiveness of the European Union in Fruit and Vegetable Products on Global Markets. *Agr. Econ.–Czech*.
- Bowles, S., Choi, J.K., 2015. The Neolithic agricultural revolution.
- Brauss, M.S., Linforth, R.S.T., Taylor, A.J., 1998. Effect of variety, time of eating, and fruit-to-fruit variation on volatile release during eating of tomato fruits (*Lycopersicon esculentum*). *J. Agric. Food Chem.* 46, 2287-2292.

- Bruhn, C.M., Feldman, N., Garlitz, C., Harwood, J., Ivans, E., Marshall, M., Riley, A., Thurber, D., Williamson, E., 1991. Consumer perceptions of quality: apricots, cantaloupes, peaches, pears, strawberries, and tomatoes. *Journal of Food Quality*, 14(3), pp.187-195.
- Bruyn, J.D., Garretsen, F., Kooistra, E., 1971. Variation in taste and chemical composition of the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Euphytica*, 20(2), pp.214-227.
- Bucheli, P., Voirol, E., de la Torre, R., López, J., Rytz, A., Tanksley, S.D., Pétiard, V., 1999. Definition of nonvolatile markers for flavor of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as tools in selection and breeding. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(2), pp.659-664.
- Buttery, R.G., 1993. Quantitative and sensory aspects of flavor of tomato and other vegetables and fruits. En: *Flavor science: Sensible principles and techniques*, Acree T, Teranishi, R. (eds). American Chemical Society, Washington. pp.259-286.
- Caliman, F.R.B., Da Silva, D.J.H., Stringheta, P.C., Fontes, P.C.R., Moreira, G.R.E.C., 2010. Quality of tomatoes grown under a protected environment and field conditions. *Idesia (Chile)* 28, 75-82. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/idesia/v28n2/art09.pdf>
- Capel, H. 2007. Ferrocarril, Territorio y ciudades. Biblio 3w, *Revista Bibliográfica de Geografía y Ciencias Sociales*, 717. [<http://www.ub.es/geocrit/b3w-717.htm>]
- Capel, C., Del Carmen, A. F., Alba, J. M., Lima-Silva, V., Hernández-Gras, F., Salinas, M., Boronat, A., Angosto, T., Botella, M.A., Fernández-Muñoz, R., Granell, A., Capel, J., Lozano, R., 2015. Wide-genome QTL mapping of fruit quality traits in a tomato RIL population derived from the wild-relative species *Solanum pimpinellifolium* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(10), 2019-2035.
- Casals, J., Pascual, L., Cañizares, J., Cebolla-Cornejo, J., Casañas, F., Nuez, F., 2012. Genetic basis of long shelf life and variability into Penjar tomato. *Genetic resources and crop evolution*, 59(2), pp.219-229.
- Casals, J., Martí, R., Casañas, F., Cebolla-Cornejo, J., 2015. Sugar-and-acid profile of Penjar tomatoes and its evolution during storage. *Scientia Agricola*, 72(4), pp.314-321.
- Causse, M., Saliba-Colombani, V., Lesschaeve, I., Buret, M., 2001. Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 2. Mapping QTLs for sensory attributes. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 102(2), pp.273-283.
- Causse, M., Saliba-Colombani, V., Lecomte, L., Duffe, P., Rousselle, P., Buret, M., 2002. QTL analysis of fruit quality in fresh market tomato: a few chromosome regions control the variation of sensory and instrumental traits. *Journal of experimental botany*, 53(377), pp.2089-2098.

- Causse, M., Damidaux, R., Rousselle, P., 2006. Traditional and enhanced breeding for quality traits in tomato. *Genetic improvement of Solanaceous crops*, 2, pp.153-192.
- Causse, M., Friguet, C., Coiret, C., Lépiciér, M., Navez, B., Lee, M., Holthuysen, N., Sinesio, F., Moneta, E., Grandillo, S., 2010. Consumer preferences for fresh tomato at the European scale: a common segmentation on taste and firmness. *Journal of food science*, 75(9).
- Cavanilles, J. 1795. Observaciones sobre la historia natural, geografía, agricultura, población y frutos del Reyno de Valencia. Imprenta Real, Madrid, 236 pp.
- Cebolla-Cornejo, J., Roselló, S., Valcárcel, M., Serrano, E., Beltrán, J., Nuez, F., 2011. Evaluation of genotype and environment effects on taste and aroma flavor components of Spanish fresh tomato varieties. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2440-2450.
- Cebolla-Cornejo, J., Soler, S., Nuez, F., 2012. Genetic erosion of traditional varieties of vegetable crops in Europe: tomato cultivation in Valencia (Spain) as a case study. *International Journal of Plant Production*, 1(2), pp.113-128.
- Cebolla-Cornejo, J., Roselló, S., Nuez, F., 2013. Phenotypic and genetic diversity of Spanish tomato landraces. *Scientia Horticulturae*, 162, pp.150-164.
- Chapman Jr, G.W., Horvat, R.J., 1989. Determination of non-volatile acids and sugars from fruits and sweet potato extracts as TMS derivatives by Capillary GLC. *HortScience (USA)*.
- Chassy, A.W., Bui, L., Renaud, E.N.C., Van Horn, M., Mitchell, A.E., 2006. Three-year comparison of the content of antioxidant microconstituents and several quality characteristics in organic and conventionally managed tomatoes and bell peppers. *J. Agric. Food Chem.* 54, 8244-8252.
- Chen, G.P., Wilson, I.D., Kim, S.H., Grierson, D., 2001. Inhibiting expression of a tomato ripening-associated membrane protein increases organic acids and reduces sugar levels of fruit. *Planta*, 212(5), pp.799-807.
- Chen, K.Y., Cong, B., Wing, R., Vrebalov, J., Tanksley, S.D., 2007. Changes in regulation of a transcription factor lead to autogamy in cultivated tomatoes. *Science*, 318(5850), pp.643-645.
- Chetelat, R.T., Klann, E., DeVerna, J.W., Yelle, S., Bennett, A.B., 1993. Inheritance and genetic mapping of fruit sucrose accumulation in *Lycopersicon chmielewskii*. *The Plant Journal*, 4(4), pp.643-650.
- Chetelat, R.T., DeVerna, J.W., Bennett, A.B., 1995a. Introgression into tomato (*Lycopersicon esculentum*) of the *L. chmielewskii* sucrose accumulator gene (*sucr*) controlling fruit sugar composition. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 91(2), pp.327-333.
- Chetelat, R.T., DeVerna, J.W., Bennett, A.B., 1995b. Effects of the *Lycopersicon chmielewskii* sucrose accumulator gene (*sucr*) on fruit yield and quality parameters

- following introgression into tomato. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 91(2), pp.334-339.
- Clar, E., Martín-Retortillo, M., Pinilla, V., 2016. The Spanish path of agrarian change, 1950-2005: From authoritarian to export-oriented productivism.
- Colla, G., Battistelli, A., Moscatello, S., Proietti, S., Casa, R., Lo Casco, B., Leoni, C., 2001. Effect of reduced irrigation and nitrogen fertilization rate on yield, carbohydrate accumulation and quality of processing tomatoes. *Acta Horticulturae* 542, 187-196.
- Cong, B., Barrero, L.S., Tanksley, S.D., 2008. Regulatory change in YABBY-like transcription factor led to evolution of extreme fruit size during tomato domestication. *Nature genetics*, 40(6), pp.800-804.
- Corradini, C., Cristalli, A., Corradini, D., 1993. High performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection of nutritionally significant carbohydrates. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 16(16), pp.3471-3485.
- Davies, J.N., 1966. Occurrence of sucrose in the fruit of some species of *Lycopersicon*. *Nature*, 209(5023), pp.640-641.
- Davies, J.N., Hobson, G.E., 1981. The constituents of tomato fruit. The influence of environment, nutrition and genotype. *CRC Critical Rev. Food Sci. Nutr.* 15 (3), 205-280.
- Doble, P., Haddad, P.R., 1999. Indirect photometric detection of anions in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 834(1), pp.189-212.
- Dorais, M., Papadopoulos, A.P., Gosselin, A., 2001. Greenhouse tomato fruit quality: the influence of environmental and cultural factors. *Hortic. Rev.* 26, 239-319.
- Dorais, M., Ehret, D.L., Papadopoulos, A.P. 2008. Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: from the seed to the consumer. *Phytochem. Rev.* 7, 231-250.
- Dorst, J.C.E.A., 1946. Een en twintigste beschrijvende rassenlijst voor landbouwgewassen. Wageningen: Rijkscommissie voor de samenstelling van de rassenlijst voor landbouwgewassen, Wageningen, 221 pp.
- Ebert, A.W., Schafleitner, R., 2015. Utilization of Wild Relatives in the Breeding of Tomato and Other Major Vegetables. In *Crop Wild Relatives and Climate Change* (pp. 141-172). John Wiley & Sons, Inc.
- El Rassi, Z., 1997. Recent developments in capillary electrophoresis of carbohydrate species. *Electrophoresis*, 18(12-13), pp.2400-2407.
- Ezura, H., Hiwasa-Tanase, K., 2017. Mass Production of the Taste-Modifying Protein Miraculin in Transgenic Plants. *Sweeteners: Pharmacology, Biotechnology, and Applications*, pp.1-18.

- Fanasca, S., Martino, A., Heuvelink, E., Stanghellini, C., 2007. Effect of electrical conductivity, fruit pruning, and truss position on quality in greenhouse tomato fruit. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 82(3), pp.488-494.
- Fandi, M., Muhtaseb, J., Hussein, M. 2010. Effect of N, P, K concentrations on yield and fruit quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in tuff culture. *Journal Central European Agriculture* 11 (2), 179-184.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017. FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/#home> [consulta marzo 2017].
- Favati, F., Lovelli, S., Galgano, F., Miccolis, V., Di Tommaso, T., Candido, V., 2009. Processing tomato quality as affected by irrigation scheduling. *Sci. Hortic.* 122, 4, 562-571.
- FEPEX, Federación Española de Asociaciones de Productores Exportadores de Frutas, Hortalizas, Flores y Plantas Vivas. 2017. Datos del Sector. <http://www.fepex.es/datos-del-sector/exportacion-importacion-esp%C3%B1ola-frutas-hortalizas> [consulta marzo 2017].
- Fernie, A.R., Tadmor, Y., Zamir, D., 2006. Natural genetic variation for improving crop quality. *Current opinion in plant biology*, 9(2), pp.196-202.
- Fleisher, D.H., Logendra, L.S., Moraru, C., Both, A.J., Cavazzoni, J., Gianfagna, T., Lee, T.C., Janes, H.W., 2006. Effect of temperature perturbations on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) quality and production scheduling. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 81, 1, 125-131.
- Frary, A., Nesbitt, T.C., Frary, A., Grandillo, S., Van Der Knaap, E., Cong, B., Liu, J., Meller, J., Elber, R., Alpert, K.B., Tanksley, S.D., 2000. *fw2. 2*: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science*, 289(5476), pp.85-88.
- Fridman, E., Pleban, T., Zamir, D., 2000. A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), pp.4718-4723.
- Fridman, E., Liu, Y., Carmel-Goren, L., Gur, A., Shores, M., Pleban, T., Eshed, Y., Zamir, D., 2002. Two tightly linked QTLs modify tomato sugar content via different physiological pathways. *Molecular Genetics and Genomics*, 266(5), pp.821-826.
- Fuller, D.Q., Willcox, G., Allaby, R.G., 2011. Cultivation and domestication had multiple origins: arguments against the core area hypothesis for the origins of agriculture in the Near East. *World Archaeology*, 43(4), pp.628-652.
- Fulton, T.M., Bucheli, P., Voirol, E., Lopez, J., Petiard, V., Tanksley, S.D., 2002. Quantitative trait loci (QTL) affecting sugars, organic acids and other biochemical properties possibly contributing to flavor, identified in four advanced backcross populations of tomato. *Euphytica*, 127(2), pp.163-177.

- Gabarra, R., Arnó, J., Lara, L., Verdú, M.J., Ribes, A., Beitia, F., Urbaneja, A., del Mar Téllez, M., Mollá, O., Riudavets, J., 2014. Native parasitoids associated with *Tuta absoluta* in the tomato production areas of the Spanish Mediterranean Coast. *Biocontrol*, 59(1), pp.45-54.
- García-Martínez, S., Grau, A., Alonso, A., Rubio, F., Valero, M., Ruiz, J.J., 2014. UMH 1422 and UMH 1415: Two Fresh-market Tomato Breeding Lines Resistant to Tomato Mosaic Virus and Tomato Spotted Wilt Virus. *HortScience*, 49(11), pp.1465-1466.
- García-Martínez, S., Grau, A., Alonso, A., Rubio, F., Carbonell, P., Ruiz, J.J., 2015. UMH 916, UMH 972, UMH 1093, UMH 1127, and UMH 1139: Four Fresh-market Breeding Lines Resistant to Viruses Within the Muchamiel Tomato Type. *HortScience*, 50(6), pp.927-929.
- García-Martínez, S., Grau, A., Alonso, A., Rubio, F., Carbonell, P., Ruiz, J.J., 2016. New Breeding Lines Resistant to Tomato Mosaic Virus and Tomato Spotted Wilt Virus within the 'De la Pera' Tomato Type: UMH 1353 and UMH 1354. *HortScience*, 51(4), pp.456-458.
- Garrido, S., 2010. Oranges or "Lemons"? Family Farming, Product Quality in the Spanish Orange Industry, 1870-1960. *Agricultural History*, pp.224-243.
- Garvey, T.C., Hewitt, J.D., 1992. Use of molecular markers to locate quantitative trait loci linked to high soluble solids content in a hybrid of *Lycopersicon cheesmanii*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117(3), pp.497-499.
- Gautier, H., Diakou-Verdin, V., Bénard, C., Reich, M., Buret, M., Bourgaud, F., Poëssel, J.L., Caris-Veyrat, C., Génard, M., 2008. How does tomato quality (sugar, acid and nutritional quality) vary with ripening stage, temperature and irradiance? *J. Agric. Food Chem.* 56, 1241-1250.
- Goldman, I.L., Paran, I., Zamir, D., 1995. Quantitative trait locus analysis of a recombinant inbred line population derived from a *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon cheesmanii* cross. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 90(7), pp.925-932.
- Gomis, D.B., 2000. HPLC analysis of organic acids. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, pp.477-492.
- Gould, W.A., 2013. *Tomato production, processing and technology*. Elsevier.
- Grande, M.J.G., Morales, J.M.L., 2015. The Agri-Food trade in Spain: specialization and international competition.7
- Grande, M., Morales, J.M.L., 2016. Spanish agri-food contribution to world trade: evolution and explanatory factors. *Revista Española de Estudios Agrosociales y Pesqueros*, (243).

- Grandillo, S., Tanksley, S.D., 1996. QTL analysis of horticultural traits differentiating the cultivated tomato from the closely related species *Lycopersicon pimpinellifolium*. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 92(8), pp.935-951.
- Grandillo, S., Zamir, D., Tanksley, S.D., 1999. Genetic improvement of processing tomatoes: A 20 years perspective. *Euphytica*, 110(2), pp.85-97.
- Guan, H.P., Janes, H.W., 1991. Light regulation of sink metabolism in tomato fruit. I. *Growth and sugar accumulation*. *Plant Physiol*, 96, pp.916-921.
- Gur, A., Zamir, D., 2004. Unused natural variation can lift yield barriers in plant breeding. *PLoS Biol*, 2(10), p.e245.
- Guttman, A., 1997. Analysis of monosaccharide composition by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 763(1-2), pp.271-277.
- Hajjar, R., Hodgkin, T., 2007. The use of wild relatives in crop improvement: a survey of developments over the last 20 years. *Euphytica*, 156(1-2), pp.1-13.
- Hedrick, U. P., Booth, N. O., 1907. Mendelian characters in tomato. *Proceedings of the American Society for Horticultural Sciences*, 5 : 19-24.
- Hendel, J.G., 1986. Capillary gas chromatography of nonvolatile organic acids, fatty acids, and certain carbohydrates in flue-cured tobacco. *Tobacco Science*, 30, pp.56-59.
- Herranz Loncán, A. 2005. La reducción de los costes de transporte en España (1800-1936). *Cuadernos económicos de ICE*, 70: 183-203.
- Hewitt J.D., Garvey T.C. 1987. Wild sources of high soluble solids. In: "Nevins, D.J.; Jones, R.A. (Eds.) Plant Biology, vol. 4: Tomato biotechnology. Liss, New York": 45-54.
- Hoffstetter-Kuhn, S., Paulus, A., Gassmann, E., Widmer, H.M., 1991. Influence of borate complexation on the electrophoretic behavior of carbohydrates in capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 63(15), pp.1541-1547.
- Honda, S., 1984. High-performance liquid chromatography of mono-and oligosaccharides. *Analytical biochemistry*, 140(1), pp.1-47.
- Honda, S., Iwase, S., Makino, A., Fujiwara, S., 1989. Simultaneous determination of reducing monosaccharides by capillary zone electrophoresis as the borate complexes of N-2-pyridylglycamines. *Analytical biochemistry*, 176(1), pp.72-77.
- Hopkins, K., 1980. Taxes and trade in the Roman Empire (200 BC-AD 400). *The Journal of Roman Studies*, 70, pp.101-125.
- Howard, P.H., 2016. *Concentration and power in the food system: Who controls what we eat?* (Vol. 3). Bloomsbury Publishing.

- Ibarbia, E. A., Lambeth, V. N. (1969). Inheritance of tomato fruit weight. *J Amer Soc Hort Sci*.
- Ilić, Z.S., Milenković, L., Bodroža-Solarov, M., Marinković, D., Šunić, L. 2012. Tomato fruits quality as affected by light intensity using color shade nets. 47th Croatian and 7th International Symposium on Agriculture Proceedings, 414-418. Disponible en: http://scholar.google.es/scholar_url?url=http://www.researchgate.net/profile/Zoran_Ilic/publication/258847279_Tomato_fruits_quality_as_affected_by_light_intensity_using_color_shade_nets/links/00b49529398fd1d724000000.pdf&hl=es&sa=X&scisig=AGBfm0R_0VH35YOE_hlaYld8xFIHZ6iA&nossl=1&oi=scholar&ei=nmYeVfvSHcjr aMPRGcgI&ved=0CB8QgAMoADAA
- Ilić, Z.S., Kapoulas, N., Šunić, L., 2014. Tomato fruit quality from organic and conventional production, *Organic Agriculture Towards Sustainability*, Prof. Vytautas Pilipavicius (Ed.). doi: 10.5772/58239. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/organic-agriculture-towards-sustainability/tomato-fruit-quality-from-organic-and-conventional-production>.
- Julián, O., Herráiz, J., Corella, S., di-Lolli, I., Soler, S., Díez, M.J., Pérez-de-Castro, A., 2013. Initial development of a set of introgression lines from *Solanum peruvianum* PI 126944 into tomato: Exploitation of resistance to viruses. *Euphytica*, 193(2), pp.183-196.
- Juma, C., 2014. *The gene hunters: Biotechnology and the scramble for seeds*. Princeton University Press.
- Kaur, C., Walia, S., Nagal, S., Walia, S., Singh, J., Bhushan Singh, B., Saha, S., Singh, B., Kalia, P., Jaggi, S., Sarika, 2013. Functional quality and antioxidant composition of selected tomato (*Solanum lycopersicon* L) cultivars grown in Northern India. *LWT-Food Science and Technology* 50, 139-145.
- Kavitha, P., Shivashankara, K.S., Rao, V.K., Sadashiva, A.T., Ravishankar, K.V., Sathish, G.J., 2014. Genotypic variability for antioxidant and quality parameters among tomato cultivars, hybrids, cherry tomatoes and wild species. *J. Sci. Food Agric.* 94 (5), 993-999.
- Kinzer, S.M., Schwager, S.J., Mutschler, M.A., 1990. Mapping of ripening-related or-specific cDNA clones of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Theoretical and applied genetics*, 79(4), pp.489-496.
- Kisaka, H., Kida, T., 2003. Transgenic tomato plant carrying a gene for NADP-dependent glutamate dehydrogenase (gdhA) from *Aspergillus nidulans*. *Plant Science*, 164(1), pp.35-42.
- Klampfl, C.W., Buchberger, W., 1997. Determination of low-molecular-mass organic acids by capillary zone electrophoresis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 16(4), pp.221-229.

- Klann, E.M., Chetelat, R.T., Bennett, A.B., 1993. Expression of acid invertase gene controls sugar composition in tomato (*Lycopersicon*) fruit. *Plant physiology*, 103(3), pp.863-870.
- Klee, H.J., Giovannoni, J.J., 2011. Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annual review of genetics*, 45, pp.41-59.
- Klee, H.J., Tieman, D.M., 2013. Genetic challenges of flavor improvement in tomato. *Trends in Genetics*, 29(4), pp.257-262.
- Koehler, P.E., Kays, S.J., 1991. Sweet potato flavor: quantitative and qualitative assessment of optimum sweetness. *Journal of food quality*, 14(3), pp.241-249.
- Kuscu, H., Turhan, A., Ozmen, N., Aydinol, P., Osman, A., 2014. Optimizing levels of water and nitrogen applied through drip irrigation for yield, quality, and water productivity of processing tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Horticulture, Environment and Biotechnology* 55 (2), 103-114.
- Lahoz, I., Pérez-de-Castro, A., Valcárcel, M., Macua, J.I., Beltrán, J., Roselló, S., Cebolla-Cornejo, J., 2016a. Effect of water deficit on the agronomical performance and quality of processing tomato. *Scientia Horticulturae*, 200, pp.55-65.
- Lahoz, I., Leiva-Brondo, M., Martí, R., Macua, J.I., Campillo, C., Roselló, S., Cebolla-Cornejo, J., 2016b. Influence of high lycopene varieties and organic farming on the production and quality of processing tomato. *Scientia Horticulturae*, 204, pp.128-137.
- Lambeth, V.N., Straten, E.F., Fields, M.L., 1966. Fruit quality attributes of 250 foreign and domestic tomato accessions.
- Laporte, M.M., Galagan, J.A., Shapiro, J.A., Boersig, M.R., Shewmaker, C.K., Sharkey, T.D., 1997. Sucrose-phosphate synthase activity and yield analysis of tomato plants transformed with maize sucrose-phosphate synthase. *Planta*, 203(2), pp.253-259.
- Laporte, M.M., Galagan, J.A., Prasch, A.L., Vanderveer, P.J., Hanson, D.T., Shewmaker, C.K., Sharkey, T.D., 2001. Promoter strength and tissue specificity effects on growth of tomato plants transformed with maize sucrose-phosphate synthase. *Planta*, 212(5), pp.817-822.
- Lê, S., Ledauphin, S., 2006. You like tomato, I like tomato: segmentation of consumers with missing values. *Food quality and preference*, 17(3), pp.228-233.
- Lee, Y.H., Lin, T.I., 1996. Determination of carbohydrates by high-performance capillary electrophoresis with indirect absorbance detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 681(1), pp.87-97.
- Levin, I., Gilboa, N., Yeselson, E., Shen, S., Schaffer, A.A., 2000. Fgr, a major locus that modulates the fructose to glucose ratio in mature tomato fruits. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(2), pp.256-262.

- Levin, I., Lalazar, A., Bar, M., Schaffer, A.A., 2004. Non GMO fruit factories: strategies for modulating metabolic pathways in the tomato fruit. *Industrial Crops and Products*, 20(1), pp.29-36.
- Levin, I., Gilboa, N., Cincarevsky, F., Oguz, I., Petreikov, M., Yeselson, Y., Shen, S., Bar, M., Schaffer, A.A., 2006. Epistatic interaction between two unlinked loci derived from introgressions from *Lycopersicon hirsutum* further modulates the fructose-to-glucose ratio in the mature tomato fruit. *Israel Journal of Plant Sciences*, 54(3), pp.215-222.
- Lima, I.P., Resende, J.T.V., Oliveira, J.R.F., Faria, M.V., Resende, N.C.V., Filho, R.L., 2015. Indirect selection of industrial tomato genotypes rich in zingiberene and resistant to *Tuta absoluta* Meyrick. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), pp.15081-15089.
- Lin, T., Zhu, G., Zhang, J., Xu, X., Yu, Q., Zheng, Z., Zhang, Z., Lun, Y., Li, S., Wang, X., Huang, Z., 2014. Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nature genetics*, 46(11), pp.1220-1226.
- Lippman, Z., Tanksley, S.D., 2001. Dissecting the genetic pathway to extreme fruit size in tomato using a cross between the small-fruited wild species *Lycopersicon pimpinellifolium* and *L. esculentum* var. *Giant Heirloom*. *Genetics*, 158(1), pp.413-422.
- Liu, K., Zhang, T.Q., Tan, C.S., Astatkie, T., 2011. Responses of fruit yield and quality of processing tomato to drip-irrigation and fertilizers phosphorus and potassium. *Agron. J.* 103 (5), 1339-1345.
- Liu, Z., Alseekh, S., Brotman, Y., Zheng, Y., Fei, Z., Tieman, D.M., Giovannoni, J.J., Fernie, A.R., Klee, H.J., 2016. Identification of a *Solanum pennellii* Chromosome 4 Fruit Flavor and Nutritional Quality-Associated Metabolite QTL. *Frontiers in Plant Science*, 7.
- Lobit, P., Genard, M., Soing, P., Habib, R., 2006. Modelling malic acid accumulation in fruits: relationships with organic acids, potassium, and temperature. *Journal of Experimental Botany*, 57(6), pp.1471-1483.
- López de Gómara, F. 1553. Primera y segunda parte de la historia general de las Indias con todo su descubrimiento y cosas notables que han acaecido dende [sic] que se gano la Española y el Peru: con la conquista de Mexico y de la nueva España. Casa de Miguel Capilla, Çaragoça. [<http://bdh.bne.es/bnearch/detalle/bdh0000186952>]
- López, J., Voinol, E., Pétiard, V., Fulton, T.M., Tanksley, S.D., Bucheli, P., 2000, June. ANALYSIS OF QUANTITATIVE TRAIT LOCI FOR FLAVOR, AND COMPOSITIONAL AND TECHNOLOGICAL PARAMETERS LINKED TO TOMATO QUALITY IN ADVANCED BACKCROSSES OF WILD TOMATO SPECIES TO THE CULTIVATED TOMATO. In *VII International Symposium on the Processing Tomato* 542 (pp. 379-386).

- Lunn, J.E., Gillespie, V.J., Furbank, R.T., 2003. Expression of a cyanobacterial sucrose-phosphate synthase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 in transgenic plants. *Journal of experimental botany*, 54(381), pp.223-237.
- Mahakun, N., Leeper, P.W., Burns, E.E., 1979. Acidic constituents of various tomato fruit types. *Journal of Food Science*, 44(4), pp.1241-1244.
- Malundo, T.M.M., Shewfelt, R.L., Scott, J.W., 1995. Flavor quality of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as affected by sugar and acid levels. *Postharvest Biology and Technology*, 6(1-2), pp.103-110.
- Malyska, A., Bolla, R., Twardowski, T., 2016. The role of public opinion in shaping trajectories of agricultural biotechnology. *Trends in biotechnology*, 34(7), pp.530-534.
- Marchoux, G., Gebre-Selassie, K., Gognalons, P., 2001. Three factors contribute to the emergence of new viruses, ie adaptative evolution, intensification and globalization. Tomato and pepper crops as examples. *Phytoma. La Défense des Végétaux (France)*.
- Martens, D.A., Frankenberger, W.T., 1990. Determination of saccharides by high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Chromatographia*, 29(1-2), pp.7-12.
- Martí, R., Roselló, S., Cebolla-Cornejo, J., 2016. Tomato as a source of carotenoids and polyphenols targeted to cancer prevention. *Cancers*, 8(6), p.58.
- Matsukura, C., 2016. Sugar Accumulation in Tomato Fruit and Its Modification Using Molecular Breeding Techniques. In *Functional Genomics and Biotechnology in Solanaceae and Cucurbitaceae Crops* (pp. 141-154). Springer Berlin Heidelberg.
- Matthiolus, P.A., 1544. *Di Pedacio Dioscoride Anazrbeo libri cinque della historia, et materia medicinale tordote in lingua volgare Italiana*. Venecia. Italy.
- Mayer, F., Takeoka, G.R., Buttery, R.G., Whitehand, L.C., Naim, M., Rabinowitch, H.D., 2008. Studies on the aroma of five fresh tomato cultivars and the precursors of cis-and trans-4, 5-epoxy-(E)-2-decenals and methional. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(10), pp.3749-3757.
- McGlasson, W.B., Last, J.H., Shaw, K.J., Meldrum, S.K., 1987. Influence of the non-ripening mutants rin and nor on the aroma of tomato fruit. *HortScience (USA)*.
- Molina, frai Alonso de, 1571. Vocabulario en lengua castellana y Mexicana. México, Casa de Arsenio de Spinosa [<https://archive.org/details/vocabularioenlen00moli>].
- Morgan, M.J., Osorio, S., Gehl, B., Baxter, C.J., Kruger, N.J., Ratcliffe, R.G., Fernie, A.R., Sweetlove, L.J., 2013. Metabolic engineering of tomato fruit organic acid content guided by biochemical analysis of an introgression line. *Plant physiology*, 161(1), pp.397-407.

- Morvai, M., Molnár-Perl, I., Knausz, D., 1991. Simultaneous gas—liquid chromatographic determination of sugars and organic acids as trimethylsilyl derivatives in vegetables and strawberries. *Journal of Chromatography A*, 552, pp.337-344.
- Mulholland, B.J., Edmondson, R.N., Fussel, M., Basham J., Ho L.C., 2003. Effects of high temperature on tomato summer fruit quality. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 78, 365-374.
- Murray, W.E., 1999. La globalización de la fruta, los cambios locales y el desigual desarrollo rural en América Latina: Un análisis crítico del complejo de exportación de fruta chilena. *EURE (Santiago)*, 25(75), pp.77-102.
- Nature Ed. Office. 2015. Seeds of change, *Nature*, 520: 131-132.
- Nentwig, W., Vaes-Petignat, S., 2014. Environmental and economic impact of alien terrestrial arthropods in Europe. *NeoBiota*, 22, p.23.
- Nesbitt, T.C., Tanksley, S.D., 2002. Comparative sequencing in the genus *Lycopersicon*: implications for the evolution of fruit size in the domestication of cultivated tomatoes. *Genetics*, 162(1), pp.365-379.
- Oke, M., Ahn, T., Schofield, A., Paliyath, G., 2005. Effects of phosphorus fertilizer supplementation on processing quality and functional food ingredients in tomato. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1531-1538.
- Oltman, A.E., Jervis, S.M., Drake, M.A., 2014. Consumer attitudes and preferences for fresh market tomatoes. *Journal of food science*, 79(10), pp.S2091-S2097.
- Pagliarini, E., Monteleone, E., Ratti, S., 2001. Sensory profile of eight tomato cultivars (*Lycopersicon esculentum*) and its relationship to consumer preference. *Italian journal of food science*, 13(3), pp.285-296.
- Paran, I., van der Knaap, E., 2007. Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. *Journal of Experimental Botany*, 58(14), pp.3841-3852.
- Patanè, C., Tringali, S., Sortino, O., 2011. Effects of deficit irrigation on biomass, yield, water productivity and fruit quality of processing tomato under semi-arid Mediterranean climate conditions. *Sci. Hortic.* 129, 590-596.
- Paterson, A.H., Lander, E.S., Hewitt, J.D., Peterson, S., Lincoln, S.E., Tanksley, S.D., 1988. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature*, 335(6192), pp.721-726.
- Paterson, A.H., Damon, S., Hewitt, J.D., Zamir, D., Rabinowitch, H.D., Lincoln, S.E., Lander, E.S., Tanksley, S.D., 1991. Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations, and environments. *Genetics*, 127(1), pp.181-197.

- Peralta, I., Spooner, D., Knapp, S., 2008. Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; *Solanaceae*). *Systematic Botany Monographs*, 84, pp.1-186.
- Pérez-de-Castro, A., Cebolla-Cornejo, J., 2015. Biotechnological Achievements in Vegetable Crops. En: *Handbook of Vegetables Vol. 2* (Peter K.V., Hazra, P. Eds.), Studium Press LLC,
- Petro-Turza, M., 1986. Flavor of tomato and tomato products. *Food Reviews International*, 2(3), pp.309-351.
- Pieper, J.R., Barrett, D.M., 2008. Effects of organic and conventional production systems on quality and nutritional parameters of processing tomatoes. *J. Sci. Food Agric.* 89, 177-194.
- Pnueli, L., Carmel-Goren, L., Hareven, D., Gutfinger, T., Alvarez, J., Ganal, M., Zamir, D., Lifschitz, E., 1998. The SELF-PRUNING gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CEN and TFL1. *Development*, 125, pp.1979-1989.
- Powell, A.L., Nguyen, C.V., Hill, T., Cheng, K.L., Figueroa-Balderas, R., Aktas, H., Ashrafi, H., Pons, C., Fernández-Muñoz, R., Vicente, A., Lopez-Baltazar, J., 2012. Uniform ripening encodes a Golden 2-like transcription factor regulating tomato fruit chloroplast development. *Science*, 336(6089), pp.1711-1715.
- Pyne, A.W., Wick, E.L., 1965. Volatile components of tomatoes. *Journal of Food Science*, 30(2), pp.192-200.
- Quer, Joseph., 1784. Continuación de la flora española, o historia de las plantas de España (Tomo V). Joaquín Ibarra, Madrid.
- Rambla, J.L., Tikunov, Y.M., Monforte, A.J., Bovy, A.G., Granell, A., 2014. The expanded tomato fruit volatile landscape. *Journal of Experimental Botany*, 65(16), pp.4613-4623.
- Rambla, J.L., Medina, A., Fernández-del-Carmen, A., Barrantes, W., Grandillo, S., Cammareri, M., López-Casado, G., Rodrigo, G., Alonso, A., García-Martínez, S., Primo, J., 2016. Identification, introgression, and validation of fruit volatile QTLs from a red-fruited wild tomato species. *Journal of Experimental Botany*, p.erw455.
- Reddy, C.S., Vijayalakshmi, M., Kaul, T., Islam, T., Reddy, M.K., 2015. Improving Flavour and Quality of Tomatoes by Expression of Synthetic Gene Encoding Sweet Protein Monellin. *Molecular biotechnology*, 57(5), pp.448-453.
- Rick, C., 1974. High soluble-solids content in large-fruited tomato lines derived from a wild green-fruited species. *California Agriculture*, 42(15), pp.493-510.
- Rick, C.M., 1986. Germplasm resources in the wild tomato species. *Acta Horticulturae*, 190: 39-48.

- Rick, C.M., Chetelat, R.T., 1995., Utilization of related wild species for tomato improvement. *Acta horticulturae*, 412: 21-38.
- Rindos, D., 2013. *The origins of agriculture: an evolutionary perspective*. Academic Press.
- Rocklin, R.D., Pohl, C.A., 1983. Determination of carbohydrates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Journal of Liquid Chromatography*, 6(9), pp.1577-1590.
- Romajaro, F., Martínez Madrid, M.C., Pretil, M.T., 2007. Factores precosecha determinantes de la calidad y conservación en poscosecha de productos agrarios. En: www.hoticom.com/pd/imagenes/65/906/65906.pdf
- Rubio, F., Alonso, A., García-Martínez, S., Ruiz, J.J., 2016. Introgression of virus-resistance genes into traditional Spanish tomato cultivars (*Solanum lycopersicum* L.): Effects on yield and quality. *Scientia Horticulturae*, 198, pp.183-190.
- Sagor, G.H.M., Berberich, T., Tanaka, S., Nishiyama, M., Kanayama, Y., Kojima, S., Muramoto, K., Kusano, T., 2015. A novel strategy to produce sweeter tomato fruits with high sugar contents by fruit-specific expression of a single bZIP transcription factor gene. *Plant Biotechnology Journal*.
- Saimbhi, M.S., Cheema, D.S., Singh, S., Nandpuri, K.S., 1995. Physicochemical characteristics of some tomato hybrids. *Tropical Science (United Kingdom)*.
- Sakiyama, R., 1968. Effects of irrigation, temperature and shading on the acidity of tomato fruits. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 37, 67-72.
- Saliba-Colombani, V., Causse, M., Philouze, J., Buret, M., Issanchou, S., Lesschaeve, I., 1999. QTLs for organoleptic quality in fresh market tomato. In *Genetics and Breeding for Crop Quality and Resistance* (pp. 291-299). Springer Netherlands.
- Saliba-Colombani, V., Causse, M., Langlois, D., Philouze, J., Buret, M., 2001. Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 1. Mapping QTLs for physical and chemical traits. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 102(2), pp.259-272.
- Salveit, M.E., 2005. Fruit ripening and fruit quality. *Crop Production Science in Horticulture*. 13, p.145
- Schaffer, A.A., Miron, D., Petreikov, M., Fogelman, M., Spiegelman, M., Bnei-Moshe, Z., Shen, S., Granot, D., Hadas, R., Dai, N., Bar, M., 1999. Modification of carbohydrate content in developing tomato fruit. *HortScience*, 34(6), pp.1024-1027.
- Schouten, R.E., Woltering, E.J., Tijskens, L.M.M., 2016. Sugar and acid interconversion in tomato fruits based on biopsy sampling of locule gel and pericarp tissue. *Postharvest Biology and Technology*, 111, pp.83-92
- Sestras, A., Jidavu, M., Sestras, R., Apahidean, M., Hărășan, E., Tămaș, Gao, Y., 2006. The response of several tomato cultivars for processing in central Transylvania

- conditions. II. Fruits quality. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, XXXIV, 62-67. ISSN 0255-965X, online ISSN 1842-4309
- Shewfelt, R.L., 1999. What is quality?. *Postharvest Biology and Technology*, 15(3), pp.197-200.
- Soga, T., Heiger, D.N., 1998. Simultaneous determination of monosaccharides in glycoproteins by capillary electrophoresis. *Analytical biochemistry*, 261(1), pp.73-78.
- Soga, T., Ross, G.A., 1999. Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids, amino acids and carbohydrates by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 837(1), pp.231-239.
- Soga, T., Inoue, Y., Yamaguchi, K., 1992. Determination of carbohydrates by hydrophilic interaction chromatography with pulsed amperometric detection using postcolumn pH adjustment. *Journal of Chromatography A*, 625(2), pp.151-155.
- Soler, S., Cebolla-Cornejo, J., Nuez, F., 2003. Control of diseases induced by tospoviruses in tomato: an update of the genetic approach. *Phytopathologia Mediterranea*, 42(3), pp.207-219.
- Stevens, M.A., 1972. Citrate and malate concentrations in tomato fruits: genetic control and maturational effects. *Amer Soc Hort Sci J*.
- Stevens, M.A., 2012. The future of the field crop. En *The tomato crop: a scientific basis for improvement* (pp 559-580), Atherton, J. Rudich, J. (eds.). Chapman and Hall Ltd., New York.
- Stevens, M.A., Kader, A.A., Albright-Holton, M., 1977. Intercultivar variation in composition of locular and pericarp portions of fresh market tomatoes. *Journal-American Society for Horticultural Science (USA)*.
- Stevens, M.R., Scott, S.J., Gergerich, R.C., 1991. Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Euphytica*, 59(1), pp.9-17.
- Szymkowiak, E.J., Irish, E.E., 2006. JOINTLESS suppresses sympodial identity in inflorescence meristems of tomato. *Planta*, 223(4), pp.646-658.
- Tadmor, Y., 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.* 50, 2005-2009.
- 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), pp.261-268.

- Tandon, K.S., Jordan, M., Goodner, K.L., Baldwin, E.A., 2001. Characterization of fresh tomato aroma volatiles using GC-olfactometry. In *Proc Fla State Hort Soc* (Vol. 114, pp. 142-144).
- Tandon, K.S., Baldwin, E.A., Scott, J.W., Shewfelt, R.L., 2003. Linking sensory descriptors to volatile and nonvolatile components of fresh tomato flavor. *Journal of food science*, 68(7), pp.2366-2371.
- Tanksley, S.D., Hewitt, J., 1988. Use of molecular markers in breeding for soluble solids content in tomato—a re-examination. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 75(5), pp.811-823.
- Tanksley, S.D., 2004. The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. *The plant cell*, 16(suppl 1), pp.S181-S189.
- Tieman, D., Bliss, P., McIntyre, L.M., Blandon-Ubeda, A., Bies, D., Odabasi, A.Z., Rodríguez, G.R., van der Knaap, E., Taylor, M.G., Goulet, C., Mageroy, M.H., 2012. The chemical interactions underlying tomato flavor preferences. *Current Biology*, 22(11), pp.1035-1039.
- Tieman, D., Zhu, G., Resende, M.F., Lin, T., Nguyen, C., Bies, D., Rambla, J.L., Beltran, K.S.O., Taylor, M., Zhang, B., Ikeda, H., 2017. A chemical genetic roadmap to improved tomato flavor. *Science*, 355(6323), pp.391-394.
- Tikunov, Y., Lommen, A., Ric de Vos, C.H., Verhoeven, H.A., Bino, R.J., Hall, R.D., Bovy, A.G., 2005. A novel approach for nontargeted data analysis for metabolomics. Largescale profiling of tomato fruit volatiles. *Plant Physiol.* 139, 1125-1137.
- Tomato News, 2014. Tomate d'industrie: 25% de la production globale de tomate. *Tomato News 4*, 28-30. ISSN: 1145 9565.
- Triano, S.R., Clair, D.S., 1995. Processing tomato germplasm with improved fruit soluble solids content. *HortScience*, 30(7), pp.1477-1478.
- Valcárcel, M., Leiva-Brondo, M., Macua, J.I., Lahoz, I., González, A., Campillo, C., Roselló, S., Cebolla-Cornejo, J., 2014, June. Effect of deficit irrigation on the sugar and acid profile of processing tomato cultivars. In *XIII International Symposium on Processing Tomato 1081* (pp. 141-146).
- Van Deynze, A., Stoffel, K., Buell, C.R., Kozik, A., Liu, J., van der Knaap, E., Francis, D., 2007. Diversity in conserved genes in tomato. *Bmc Genomics*, 8(1), p.465.
- Verheul, M.J., Slimestad, R., Tjøstheim, I.H., 2015. From Producer to Consumer: Greenhouse Tomato Quality As Affected by Variety, Maturity Stage at Harvest, Transport Conditions, and Supermarket Storage. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(20), pp.5026-5034.
- Vidavski, F., Czosnek, H., Gazit, S., Levy, D., Lapidot, M., 2008. Pyramiding of genes conferring resistance to Tomato yellow leaf curl virus from different wild tomato species. *Plant Breeding*, 127(6), pp.625-631.

- Vinha, A.F., Barreira, S.V.P., Costa, A.S.G., Alves, R.C., Oliveira, M.B.P.P., 2014. Organic versus conventional tomatoes: Influence on physicochemical parameters, bioactive compounds and sensorial attributes. *Food and Chemical Toxicology* 67, 139-144.
- Warner, J., Zhang, T.Q., Hao, X., 2004. Effects of nitrogen fertilization of fruit yield and quality of processing tomatoes. *Canadian Journal of Plant Science* 84 (3), 865-871.
- Weaver, R.D., Luloff, A.E., 1992. Willingness-to-Pay. *Agribusiness*, 8(2), pp.131-142.
- Wong, A., Navarro, E.A., 2014. Assessment of agricultural options available for saving orange cultivation in Ribera Baixa (Valencia, Spain). *Journal of Sustainable Development*, 7(1), p.115.
- WPTC. The World Processing Tomato Council. (2017). Releases. www.wptc.to/releases-wptc.php (consulta abril 2017)
- Yahia, E.M., Hao, X., Papadopoulos, A.P., 2005. Influence of crop management decisions on postharvest quality of greenhouse tomatoes. Ramdane Dris PhD (Ed) "*Crops: Quality, Growth and Biotechnology*", pp. 379-405.
- Yanagi, T., Ueda, E., Sato, H., Hirai, H., Oda, Y., 1995. Effects of shading and fruit set order on fruit quality in single truss tomato. *Journal Japanese Society of Horticulture* 64, 291-297.
- Yang, M.T., Milligan, L.P., Mathison, G.W., 1981. Improved sugar separation by high-performance liquid chromatography using porous microparticle carbohydrate columns. *Journal of Chromatography A*, 209(2), pp.316-322.
- Yilmaz, E., 2001. The chemistry of fresh tomato flavor. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 25(3), pp.149-155.
- Young, T.E., Juvik, J.A., Sullivan, J.G., 1993. Accumulation of the components of total solids in ripening fruits of tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118(2), pp.286-292.
- Zhang, Z., Liu, L., Zhang, M., Zhang, Y., Wang, Q., 2014. Effect of carbon dioxide enrichment on health-promoting compounds and organoleptic properties of tomato fruits grown in greenhouse. *Food chemistry*, 153, pp.157-163.
- Žnidarčič, D., Ban, D., Oplanić, M., Karić, L., Požrl, T., 2010. Influence of postharvest temperatures on physicochemical quality of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *J.Food Agric. Environ.* 8(1), 21-25.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

La mejora de la calidad organoléptica se ha convertido en un objetivo prioritario de mejora en un contexto de pérdida de calidad y de la confianza de los consumidores en las variedades modernas. Aunque se han alcanzado logros notables, sigue siendo necesario continuar identificando fuentes de variación para poder desarrollar este tipo de programas. Este es esencialmente el objetivo de la tesis.

Teniendo en cuenta la complejidad del sabor de tomate, debido a la interacción entre la percepción a través del gusto y el olfato, realizar una aproximación global no sería realista. Por ello, se decidió centrar el objetivo en la identificación de germoplasma que permita abordar la mejora del contenido en azúcares y ácidos, principales compuestos relacionados con la percepción del gusto.

Para ello, fue necesario desarrollar en una primera fase una metodología de cuantificación fiable y precisa que permita abordar el análisis de gran cantidad de material en poco tiempo. Con esta herramienta, sería posible entonces realizar distintos cribados tanto en la especie cultivada como en las silvestres afines. Por otro lado, para conocer el verdadero valor del germoplasma identificado, fue necesario analizar detalladamente la contribución de cada uno de los factores que condicionan el valor fenotípico: el ambiente, el genotipo y la interacción genotipo ambiente.

En este contexto, los objetivos parciales que se plantearon fueron:

-Desarrollo de una metodología de análisis de azúcares y ácidos mediante electroforesis capilar zonal

-Evaluación de germoplasma de la sección *Lycopersicum* del género *Solanum* dirigida a la identificación de fuentes de variación para la mejora del contenido en azúcares y ácidos, estimando las contribuciones del genotipo, el ambiente y su interacción.

En el desarrollo de estos objetivos se han obtenido las siguientes contribuciones científicas:

Roselló, S., Galiana-Balaguer, L., Herrero-Martínez, J. M., Maquieira, A., Nuez, F. (2002). Simultaneous quantification of the main organic acids and carbohydrates involved in tomato flavour using capillary zone electrophoresis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(10), 1101-1106.

Mata, M. C. S., Hurtado, M. C., Ripollés, S. R., Galiana-Balaguer, L., Isasa, M. E. T., Viñals, F. N. (2000). Breeding for flavour of fresh market tomato: sources for increasing acid content. *Acta Physiologiae Plantarum*, 22(3), 250.

Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M. C., Cámara, M., Torija, M. E., Chaya, C., Galiana-Balaguer, L., Roselló, S., Nuez, F. (2004). Internal quality characterization of fresh tomato fruits. *Hortscience*, 39(2), 339-345.

Galiana-Balaguer, L., Rosello, S., Nuez, F. (2006). Characterization and selection of balanced sources of variability for breeding tomato (*Lycopersicon*) internal quality. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(5), 907-923.

Galiana-Balaguer, L., Ibañez, G., Cebolla-Cornejo, J., Roselló, S. (2017). Potential of germplasm in *Solanum* section *Lycopersicon* for breeding tomato taste. *Scientia horticultrae*, (ENVIADO).

CAPÍTULO 1:

Simultaneous quantification of the main organic acids and carbohydrates involved in tomato flavour using capillary zone electrophoresis.

Rosello, S., Galiana-Balaguer, L., Herrero-Martínez, J. M., Maquieira, A., Nuez, F. (2002).

Journal of the Science of Food and Agriculture, 82(10), 1101-1106.

Simultaneous quantitation of the main organic acids and carbohydrates involved in tomato flavour using capillary zone electrophoresis

Salvador Roselló¹, Luis Galiana-Balaguer¹, José Manuel Herrero-Martínez², Angel Maquieira³ and Fernando Nuez¹

¹ Department of Biotechnology, Genetics and C.O.M.A.V., Polytechnic University of Valencia, Camino de Vera 14, E-46022 Valencia, Spain

² Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, Doctor Moliner 50, E-46100 Burjasot, Valencia, Spain

³ Department of Chemistry, Polytechnic University of Valencia, Camino de Vera 14, E-46022 Valencia, Spain

ABSTRACT

A capillary zone electrophoresis (CZE) procedure for the simultaneous determination of the major organic acids (oxalate, malate, citrate) and carbohydrates (fructose, glucose and sucrose) in *Lycopersicon* fruits is reported. Comparison of this method with routine HPLC methods indicates that the CZE method offers several attractive features (speed, resolution, sensitivity and cost) which significantly improve the determination of these compounds. The detection limits for organic acids were better than $1.6 \mu\text{g ml}^{-1}$ and for carbohydrates from 13 to $24 \mu\text{g ml}^{-1}$, and migration time repeatabilities were better than 2.1% and between 1.4% and 7.3% for peak areas. The proposed protocol is very useful to characterize large series of tomato samples not only in breeding programs but also in systematic and routine analysis in the tomato industry.

KEY WORDS: Capillary zone electrophoresis, organic acids, carbohydrates, *Lycopersicon*, comparison of methods.

INTRODUCTION

Several studies have established that the organoleptic quality of the tomato for fresh consumption is conditioned mainly by the increase in organic acids and carbohydrates,¹⁻³ as they account for more than 60% of the dry matter and greatly influence the flavour.

Carbohydrates and organic acids are the major constituents of soluble solid content (SSC) in tomato fruits.^{4,5} Quantitation of SSC is easy and fast and it permits the analysis of a great number of samples. For all these reasons, breeding efforts to improve tomato flavour have been focussed on increasing SSC in the past. However, selection for SSC did not have the expected results because this character is complex and strongly influenced by environmental conditions.⁶⁻⁹

Today, breeding of individual components of the tomato flavour (glucose, fructose, sucrose, citric and malic acids, etc) can be a good way to improve the organoleptic quality of the tomato. This strategy is supported by the fact that some of these individual constituents of tomato flavour have a single genetic control.¹⁰⁻¹² Nevertheless, to carry out this breeding strategy, fast and precise quantitation methods for acids and carbohydrates are required.

Determination of these compounds by high-performance liquid chromatography (HPLC) is achieved using two steps: the first one, addressed to organic acids by HPLC;¹³ and the second to carbohydrates using HPLC anion-exchange with a refractive index¹⁴ or pulsed amperometric detection.¹⁵⁻¹⁹ As a result, the complete analysis of both these compound types can lead to longer analysis times. Furthermore, HPLC often needs longer times for column equilibration and the cost of a specialized column is substantial.

Also, gas chromatography (GC) has been used for simultaneous determination of organic acids and carbohydrates,²⁰⁻²³ but these methods often require laborious sample pretreatment, derivatization and long separation times. Furthermore, many carbohydrates are not volatile or are heat-volatile and often several stereoisomers of these are formed in the derivatization process complicating the identification.

Therefore, an easy and rapid simultaneous analysis method for these compounds would be of great benefit for breeding programs.

Capillary electrophoresis (CE) is a powerful separation technique that has the advantages of being simple, fast, highly efficient and selective. Due to the lack of UV absorbance of aliphatic organic acids, most published work on capillary zone electrophoresis (CZE) analysis have employed indirect UV detection using various background electrolytes (BGEs).^{24,25}

Regarding carbohydrate analysis by CE, several methods have been reported either using derivatization²⁶⁻²⁸ or indirect UV detection.²⁹⁻³¹

A CZE method with indirect UV detection for the simultaneous determination of underivatized inorganic anions, organic anions, amino acids and carbohydrates has recently been developed.³²

In this study, we have developed a CZE method in order to obtain a simple and rapid procedure for the analysis of the main organic acids (such as oxalate, malate, citrate) and carbohydrates (such as fructose, glucose and sucrose) involved in tomato flavour.

EXPERIMENTAL

Apparatus

CZE separations was performed on a Model P/ACE 5000 CE Instrument (Beckman Instruments, Fullerton, CA) and controlled by System Gold software using a IBM PS/2 computer.

Uncoated fused-silica capillaries (67 cm of total length, 60 cm of effective length, 50 μm I.D.) were obtained from Supelco (Bellefonte, PA). Prior to use, new capillaries were rinsed at 50°C as follows: 5 min with 1 M NaOH, 5 min with 0.1 M NaOH and 10 min with water. At the beginning of each working session the capillary was rinsed for 30 min with the separation buffer at 20°C.

HPLC analysis was carried out using a chromatograph (Model 625, Waters, Milford, MA) with an isocratic pump. Injections were made manually using a Rheodine 7120 injector (Cotati, CA) and a 20 μl injection loop onto a Supelcogel C-610 H column (300 \times 7.8 mm I.D., Supelco).

Reagents

Organic anion standards were prepared from their sodium salts or free acids. The chemicals used were of analytical grade purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Glucose, fructose, sucrose, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), 2,6-pyridine dicarboxylic acid (PDC) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Hexadimethrine bromide (HDM) was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). All solutions were prepared with deionized water (Elix deionizer, Millipore, Molsheim, France). Individual stock solutions were prepared at a concentration of 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for all solutes and kept at 4°C.

Plant material

The plant material was constituted by fruits of different species of the genus *Lycopersicon*, obtained from the Centro de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV). Accessions of *Lycopersicon esculentum* Mill., *L. esculentum* var *cerasiforme* (Dun.) Gray., *L. pimpinellifolium* (Jusl.) Mill., *L. hirsutum* Humb. & Bonpl. and *L. pennellii* (Corr.) D'Arcy were chosen. To select the plant material two approaches were adopted: (i) to choose fruits with notable differences in their chemical composition, as in organic acids and carbohydrates as in the matrix and; (ii) several *Lycopersicon* species with interesting characters for the improvement of the internal quality of the tomato were chosen.

Fruits were cultivated in greenhouses with the necessary watering systems, fertilization and air conditioning for their appropriate production in the spring-summer cycle. When it was necessary in certain species (*L. hirsutum* and *L. pennellii*) crossed pollination

was carried out to assure the set of fruits. Fruits were collected from the inferior floral floors (1st at 3rd) in mature state.

Sample preparation

Fruits of different accessions, previously refrigerated for 1 day, were ground and centrifuged at 3000 rpm for 5 min. The supernatant was properly diluted for each method.

CZE procedure

Before injection in the capillary, all solutions were degassed in an ultrasonic bath and forced through a filter 0.2 µm membrane filter (Pall Gelman Sciences, Michigan). Hydrodynamic injection at 3447.38 Pa × 20 s was used. Detection wavelength was 200 nm. The separation was performed at -25 kV and 20°C. Between injections, the capillary was rinsed with separation buffer for 5 min.

HPLC procedures

Carbohydrate determination was performed using the recommended protocol by Bonn³³ with refractive index detection. HPLC of organic acids was carried out according to the method proposed by Calull *et al.*³⁴ but using UV detection at 210 nm.

The liquid samples analyzed were simply filtered through a 0.45 µm syringe filter (Pall Gelman Sciences, Michigan) and injected directly onto the column.

RESULTS AND DISCUSSION

Separation conditions for organic acids and carbohydrates

The objective in this study was the separation and determination of the major organic acids and carbohydrates (oxalate, malate, citrate, glucose, fructose and sucrose) in *Lycopersicon* fruits. The initial selection of the BGE (20 mM PDC at pH 12.1) was based on a previous study.³²

Under this high alkaline pH, the anionic ionization of all compounds is ensured. While organic acids are high mobility anions migrating towards the anode; carbohydrates migrated in the opposite direction because their mobility is lower than the electroosmotic flow (EOF). This problem could be overcome by reversing the direction of the EOF using modifiers. Previous studies^{31,32} have proposed the addition of CTAB or other cationic surfactants such as EOF modifiers.

However, the addition of 0.5 mM CTAB to the BGE, led to a large variability in the migration time of solutes in the samples although they worked well with standard mixtures. Successive analyses gave standard deviations on the migration time (typically 4-8%), as shown in Table 1, but the standard deviation between days can reach 20%, with the standard deviation of carbohydrates giving the highest values. Further, the standard deviations on the inter-day peak areas were close to 15%. Sample inhomogeneity was apparently not the cause of this effect, as this was equally well observed with new dilutions or repetitions on the same diluted sample.

Table 1. Run-to-run and day-to-day variability for the migration times in real samples from different *Lycopersicon* fruits*.

Compound	Run-to-run		Day-to-day	
	Mean (min)	R.S.D. % (n = 5)	Mean (min)	R.S.D. % (n = 3)
Oxalate	5.63	4.10	5.92	7.44
Malate	6.45	5.13	6.70	8.80
Citrate	6.69	5.23	7.00	8.77
Fructose	19.34	7.23	21.79	14.1
Glucose	20.67	7.69	23.67	16.3
Sucrose	22.62	8.20	27.32	19.2

* Separation conditions: capillary, 87 cm × 50 µm I.D., BGE containing 20 mM PDC, pH 12.1, 0.5 mM CTAB. Other conditions: see Experimental section.

We decided to study the possible causes of these variations. First, we attempted to correlate this with variations in analytical conditions such as temperature, small variations in buffer composition (especially, changes in pH due to carbon dioxide from the air). This failed and forced us to conclude that the variability was produced by some type of interaction between the sample and the capillary wall.

Because hydrophobic alkylammonium salts, e.g. CTAB, have limited solubility and can form insoluble pairs with some electrolyte components or certain types of samples,³⁵ we thought that a lower concentration of EOF modifier could be beneficial analysing samples. We therefore decided on the use of HDM as EOF modifier as this polymer has been shown to be very effective in reducing and reversing the EOF at very low concentrations.^{36,37} Moreover, hemimicellar based EOF modifiers (such as CTAB) had shown relative sensitivity to pH changes and the presence of organic solvents,^{38,39} in contrast, HDM has the important advantage that it is much more stable in these conditions.

For these reasons, we decided to study the use of HDM instead of CTAB in the BGE. When the HDM concentration was increased from 0.05% to 0.5%, the migration times of analytes decreased, while efficiency of peaks remained unaffected along this series. A 0.1% HDM was selected because higher concentrations of HDM lead to a loss of resolution between organic acid peaks.

In order to reduce the analysis time, several capillary lengths (87, 77, 67 cm) were tested. Optimum separation with minimal analysis time was obtained using a 67 cm length.

Quantitation applied to *Lycopersicon* extracts

Under the optimized CZE conditions, the figures of merit for the determination of the analytes, including migration time and peak repeatabilities, and detection limits (LOD) at a signal-to-ratio of 3 were obtained (Table 2). Intra- and inter-day repeatabilities were obtained by injecting a standard mixture containing 40 µg ml⁻¹ of each analyte

three times per day over 3 days. The calibration curves were linear over the range 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for organic acids and 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for carbohydrates, with correlation coefficients better than 0.999.

Excellent reproducibilities for migration times and peak areas were obtained, as shown in Table 2. In fact, the values of standard deviation of migration times (both intra-day and inter-day) obtained with real samples are satisfactorily better in comparison with those indicated in Table 1.

The procedure was applied to quantify these analytes in fruits of several *Lycopersicon* species. Identification of analytes was performed by matching their migration times with those of a standard solution and, when it was necessary, by spiking the extracts with standard solutions. The results are given in Table 3. For several samples of *Lycopersicon*, as shown in Figure 1, well resolved peaks and flat backgrounds were obtained. The red *Lycopersicon* fruits analyzed (*L. esculentum* and *L. pimpinellifolium*) have a very different chemical composition to the green ones (*L. pennelli* and *L. hirsutum*). These differences in fruit composition have conditioned the use of distinct CZE protocols for L-ascorbic acid determinations in *Lycopersicon* species with red or green fruits.⁴⁰ However, it is interesting to point out that the proposed protocol can be used to characterize acid and sugar composition in both, red-fruited and green-fruited species of *Lycopersicon*.

Table 2. Migration times (t_m) and peak area (A) repeatabilities (%) and detection limits for S/N = 3

Parameter	Oxalate	Malate	Citrate	Fructose	Glucose	Sucrose
Repeatability of t_m (R.S.D., n = 5)						
with standards (40 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	0.24	0.25	0.23	0.37	0.45	0.52
with plant extracts*	0.53	0.53	0.49	2.6	2.5	3.3
Repeatability of A (R.S.D., n = 5)						
with standards (40 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	1.4	2.6	2.9	3.1	3.4	4.3
with plant extracts ^a	1.6	3.4	4.0	4.2	4.6	5.5
Repeatability of t_m (R.S.D., n = 5, 3 days)						
with standards (40 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	1.5	1.7	1.9	2.5	2.7	3.3
with plant extracts*	1.9	2.0	2.1	5.2	5.4	6.7
Repeatability of A (R.S.D., n = 5, 3 days)						
with standards (40 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	2.0	3.2	3.7	4.1	4.9	5.9
with plant extracts*	2.5	4.2	4.8	5.7	6.0	7.3
LOD, $\mu\text{g ml}^{-1}$	0.8	1.4	1.6	13.2	16.8	23.5

* Mean obtained with *Lycopersicon* extracts at the natural concentration levels of the analytes.

Table 3. Determination of organic acids and carbohydrates (mean \pm SE, in $\mu\text{g ml}^{-1}$) in *Lycopersicon* extracts

Species	Genotype	Oxalate	Malate	Citrate	Fructose	Glucose	Sucrose
<i>L. esculentum</i>	UPV-18318	29.1 \pm 4.7	58.6 \pm 0.6	206.4 \pm 2.7	1230.3 \pm 5.9	1436.2 \pm 37.2	ND*
<i>L. esculentum</i> var <i>cerasiforme</i>	UPV-16264	34.4 \pm 1.1	69.3 \pm 0.9	840.0 \pm 13.2	1321.2 \pm 70	1082.9 \pm 36.8	69.5 \pm 3.5
<i>L. pimpinellifolium</i>	UPV-16985	20.8 \pm 0.4	78.6 \pm 0.3	219.0 \pm 3.3	785.7 \pm 21.2	787.6 \pm 38.6	ND*
<i>L. hirsutum</i>	UPV-17042	ND*	67.2 \pm 0.2	1808.3 \pm 36.6	229.9 \pm 7.6	113.4 \pm 0.7	2425.8 \pm 105.9
<i>L. pennellii</i>	UPV-6594	44.5 \pm 1.3	110.2 \pm 1.1	479.7 \pm 5.9	410.8 \pm 5.2	211.5 \pm 2.4	3199.3 \pm 78.9

* Not detected

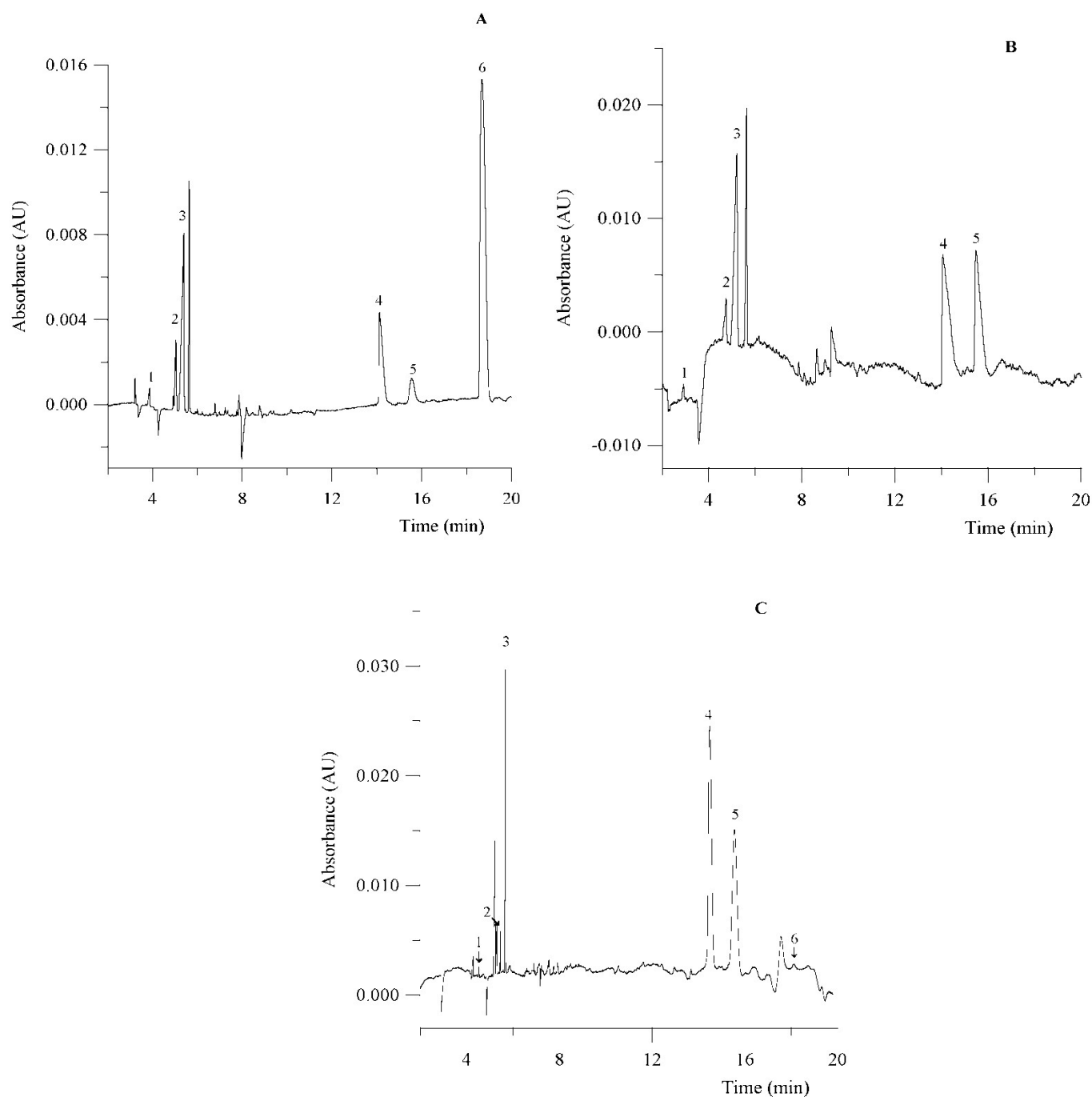


Figure 1. Electropherograms of organic acids and carbohydrates in several *Lycopersicon* species: (A) *L. pennellii* (UPV-6594); (B) *L. pimpinellifolium* (UPV-16985); (C) *L. esculentum* var. *cerasiforme* (UPV-16264). Experimental conditions: capillary, 67 cm (effective length 60 cm) \times 50 μ m I.D.; hydrodynamic injection, 3447.38 Pa \times 20 s, applied potential - 25 kV; temperature, 20°C. Peak identification: 1 = oxalate; 2 = malate ; 3 = citrate; 4 = fructose; 5 = glucose; 6 = sucrose.

Comparison of CZE and HPLC

In order to evaluate the usefulness of the CZE, five samples of *Lycopersicon* fruits were analyzed using the proposed protocol, and the results were compared with those obtained for the same analytes with HPLC methods (Table 4). The CZE and HPLC procedures yielded similar values for each sample and no significant differences at 95% confidence level were observed.

Regarding sensitivity, CZE offers better values in LODs (Table 2) than those obtained by HPLC (Table 4). Furthermore, CZE provides a far resolution between analytes to HPLC (data not shown) for the analysis of the same extracts.

Table 4. Comparison between CZE and HPLC methods for the analysis of organic acids and carbohydrates (mean \pm SE, in $\mu\text{g ml}^{-1}$) in several *Lycopersicon esculentum* fruits

Sample	Method	Oxalate	Malate	Citrate	Glucose	Fructose	Sucrose
UPV-19981	CZE	74.5 \pm 0.6	68.3 \pm 4.1	283.6 \pm 4.9	1205.6 \pm 15.6	1070.3 \pm 13.1	88.51 \pm 13.6
	HPLC (acids)	70.5 \pm 3.2	73.9 \pm 1.8	304.9 \pm 9.3	---	---	---
	HPLC (sugars)	---	---	---	1220.6 \pm 12.3	1098.3 \pm 14.2	ND*
UPV-17592 (NE-1)	CZE	15.5 \pm 0.9	31.7 \pm 0.8	201.2 \pm 3.8	541.8 \pm 3.2	510.5 \pm 4.4	179.5 \pm 5.3
	HPLC (acids)	ND*	32.9 \pm 1.1	210.4 \pm 3.0	---	---	---
	HPLC (sugars)	---	---	---	533.0 \pm 3.3	520.6 \pm 6.6	187.1 \pm 9.6
LOD ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	HPLC	24	22	23	192	185	165

* Not detected

Concerning time analysis, the HPLC analysis of organic acids and carbohydrates is frequently performed by using two procedures, with the total analysis time being c.a. 30 min (15 min each) in contrast to the single-run determination of all analytes in 18 min by CZE. Furthermore, the variance associated with a change of procedure, or with a different injection, is eliminated by using a single electrophoretic run.

An additional, non-negligible advantage, is that the cost of the analysis is dramatically lowered by switching from the expensive ion-exchange column to the simple bare silica capillary.

CONCLUSIONS

A simple and reliable CZE method for the simultaneous determination of organic acids and carbohydrates in several species of *Lycopersicon* has been developed. The proposed protocol has several advantages compared to other developed procedures; (i) carbohydrates can be analyzed without derivatization, (ii) a well defined electropherogram is obtained without other matrix interference, (iii) sample preparation is minimal, (iv) lower operational cost and (v) high separation speed. It Also provides excellent reproducibility,

good linearity and appropriate sensitivity. The present procedure can be easily applied both in screenings for internal quality in tomato breeding programs, and in routine analysis in the tomato industry.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to express their gratitude for the financial support provided by the CYCIT (project AGF99-0602-C02-01) and the Generalitat Valenciana (project GV00-084-3). L. G-B. would also like to thank the “Ministerio de Educación y Cultura” for the FPU grant. J.M. H-M. thanks the “Conselleria de Cultura, Educació i Ciència, Generalitat Valenciana”, for the FPI grant.

REFERENCES

1. Stevens MA, Kader AA, Albright-Holton M, Algazi M, Genotypic variation for flavor and composition in fresh market tomatoes. *J Amer Soc Hort Sci* **102**: 680-689 (1977).
2. Stevens MA, Kader AA, Albright-Holton M, Potential for increasing tomato flavor via increased sugar and acid content. *J Amer Soc Hort Sci* **104**:40-42 (1979).
3. Baldwin EA, Scott JW, Einstein MA, Malundo TMM, Carr BT, Shewfelt RL, Tandon KS, Relationship between sensory and instrumental analysis for tomato flavor. *J Amer Soc Hort Sci* **123**:906-915 (1998).
4. Davies JN, Occurrence of sucrose in the fruit of some species of *Lycopersicon*. *Nature* **209**:640-641 (1966).
5. Thakur BR, Singh RK, Nelson PE, Quality attributes of processed tomato products: a review. *Food Rev Int* **12** 375-401 (1996).
6. Ibarbia EA, Lambeth VN, Inheritance of soluble solids in a large/small-fruited tomato cross. *J Amer Soc Hort Sci* **94**: 496-498 (1969).
7. Tanksley SD, Hewitt J, Use of molecular markers in breeding for soluble solids content in tomato – a re-examination. *Theor Appl Genet* **75**:811-823 (1988).
8. Paterson AH, Lander ES, Hewitt JD, Peterson S, Lincoln SE., Tanksley SD, Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* **344**:721-726 (1988).
9. Paterson AH, Damon S, Hewitt JD, Zamir D, Rabinowitch HD, Lincoln SE, Lander ES, Tanksley SD, Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations, and environments. *Genetics* **127**:181-197 (1991).
10. Stevens MA, Long MA, Inheritance of malate in tomatoes. *J Amer Soc Hort Sci* **96**:120-122 (1971).

11. Stevens MA, Citrate and malate concentrations in tomato fruits: Genetic control and maturational effects. *J Amer Soc Hort Sci* **97**:655-658 (1972).
12. Yelle S, Chetelat RT, Dorais M, De Verna JW, Bennett AB, Sink metabolism in tomato fruit. *Plant Physiol* **95**:1026-1035 (1991).
13. Blanco-Gomis D, *Food Analysis by HPLC*, Ed Mollet LML, Marcel Dekker, New York, pp 482-484 (2000).
14. Yang MT, Milligan LP, Mathison GW, Improved sugar separation by high-performance liquid chromatography using porous-micro-particle carbohydrate columns. *J Chromatogr* **209**:316-322 (1981).
15. Rocklin RD, Pohl CA, Determination of carbohydrates by anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J Liq Chromatogr* **6**: 1577-1590 (1983).
16. Martens DA, Frankenberger Jr WT, Determination of saccharides by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Chromatographia* **29**:7-12 (1990).
17. Soga T, Inoue T, Yamaguchi K, Determination of carbohydrates by hydrophilic interaction chromatography with pulsed amperometric detection using postcolumn pH adjustment. *J. Chromatogr* **625**:151-155 (1992).
18. Corradini C, Cristalli A, Corradini D, High-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection of nutritionally significant carbohydrates. *J Liq Chromatogr* **16**:3471-3485 (1993).
19. Honda S, High-performance liquid chromatography of mono- and oligo-saccharides. *Anal Biochem* **140**:1-47 (1984).
20. Morvai M, Molnar-Perl I, Knausz D, Simultaneous gas-liquid chromatographic determination of sugars and organic acids as trimethylsilyl derivatives in vegetables and strawberries. *J Chromatogr* **552**:337-344 (1991).
21. Adams MA, Chen Z, Landman P, Colmer TD, Simultaneous determination by capillary gas chromatography of organic acids, sugars, and sugar alcohols in plant tissue extracts as their trimethylsilyl derivatives. *Anal Biochem* **266**:77-84 (1999).
22. Chapman GW, Horvat RJ, Determination of non-volatile [organic] acids and sugars from fruits and sweet potato extracts by capillary GLC and GLC - MS. *J Agric Food Chem* **37**:947-950 (1989).
23. Court WA, Hendel JG, Capillary gas chromatography of non-volatile organic acids, fatty acids and certain carbohydrates in flue-cured tobacco. *Tob Int* **188**:58-61 (1986).
24. Doble P, Haddad PR, Indirect photometric detection of anions in capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* **834**:189-212 (1999).

25. Klampfl CW, Buchberger W, Determination of low molecular mass organic acids by capillary zone electrophoresis. *Trends in Anal Chem* **16**:221-229 (1997).
26. Honda S, Iwase S, Makino A, Fujiwara S, Simultaneous determination of reducing monosaccharides by capillary zone electrophoresis as the borate complexes of N-2-pyridylglycamines. *Anal Biochem* **176**:72-77 (1989).
27. Guttman A, Analysis of monosaccharide composition by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* **763**:271-277 (1997).
28. El Rassi Z, Recent developments in capillary electrophoresis of carbohydrate species. *Electrophoresis* **18**:2400-2407 (1997).
29. Hoffstetter-Kuhn S, Paulus A, Gassmann E, Widmer HM, Influence of borate complexation on the electrophoretic behaviour of carbohydrates in capillary electrophoresis. *Anal Chem* **63**:1541-1547 (1991).
30. Lee YH, Lin TI, Determination of carbohydrates by high-performance capillary electrophoresis with indirect absorbance detection. *J Chromatogr B* **681**:87-97 (1996).
31. Soga T, Heiger DN, Simultaneous determination of monosaccharides in glycoproteins by capillary electrophoresis. *Anal Biochem* **261**:73-78 (1998).
32. Soga T, Ross GA, Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids, amino-acids and carbohydrates by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* **837**:231-239 (1999).
33. Bonn G, High-performance liquid chromatography of carbohydrates, alcohols and diethylene glycol on ion-exchange resins. *J Chromatogr* **350**:381-387 (1985).
34. Calull M, Marcé RM, Borrull F, Determination of carboxylic acids, sugars, glycerol and ethanol in wine and grape must by ion-exchange high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *J Chromatogr* **590**:215-222 (1992).
35. Hauser PC, Renner ND, Hong APC, Anion detection in capillary electrophoresis with ion-selective microelectrodes. *Anal Chim Acta* **295**:181-186 (1994).
36. Galceran MT, Puignou L, Diez M, Comparison of different electro-osmotic flow modifiers in the analysis of inorganic anions by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* **732**:167-174 (1996).
37. Herrero-Martinez JM, Simo-Alfonso EF, Deltoro VI, Calatayud A, Ramis-Ramos G, Determination of L-ascorbic acid and total ascorbic acid in vascular and nonvascular plants by capillary zone electrophoresis. *Anal Biochem* **265**:275-281 (1998).
38. Masselter SM, Zemann AJ, Influence of organic solvents in co-electroosmotic capillary electrophoresis of phenols. *Anal Chem* **67**:1047-1053 (1995).
39. Zemann AJ, Separation of methylphenols by capillary electrophoresis with mixed

organic solvent electrolyte systems. *J Cap Elec* **2**:131-136 (1995).

40. Galiana-Balaguer L, Roselló S, Herrero-Martínez JM, Maquieira A, Nuez F, Determination of L-ascorbic acid in *Lycopersicon* fruits by capillary zone electrophoresis. *Anal Biochem* (in press) (2001).

CAPÍTULO 2:

Breeding for flavour of fresh market tomato: sources for increasing acid content

Mata, M. C. S., Hurtado, M. C., Ripollés, S. R., Galiana-Balaguer, L., Isasa, M. E. T., Viñals, F. N. (2000).

Acta Physiologiae Plantarum, 22(3), 250.

BREEDING FOR FLAVOUR OF FRESH MARKET TOMATO: SOURCES FOR INCREASING ACID CONTENT

M^a Cortes Sánchez Mata(*); Montaña Cámara Hurtado(*); Salvador Roselló Ripollés; Luís Galiana-Balaguer; M^a Esperanza Torija Isasa(*); Fernando Nuez Viñals

Biotechnology Dept. Universidad Politécnica de Valencia (UPV). Cno. Vera, 14; 46022 Valencia. Spain

(*Dpt. de Nutrición y Bromatología II. Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Ciudad Universitaria. E-28040 Madrid. Spain.

KEY WORDS

Acid content, citric acid, flavour, fumaric acid, HPLC, internal quality, *Lycopersicon cheesmanii*, *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon pimpinellifolium*, malic acid, oxalic acid.

ABSTRACT

Breeding programs in tomato for fresh consumption have concluded in very productive varieties/hybrids with an extraordinary external quality. However, internal quality has not been a priority objective in these breeding programs, so present products have a lack of important internal quality properties. Thus, internal and nutritional improvement including taste and organoleptic characteristics are important breeding objectives at present.

A screening trial to identify sources for internal quality improvement by increasing acid content has been carried out. 13 accessions of *Lycopersicon esculentum* and 7 of *L. pimpinellifolium* were tested with that purpose. Content in citric, malic, oxalic and fumaric acid by HPLC, the soluble solids content (SSC)(°Brix) by refractometry and total acidity by titration with NaOH were measured. Sources for high citric, malic and fumaric acid content have been found to begin those breeding programs. Results could possibly suggest an independent genetic control for every acid.

INTRODUCTION

The tomato is one of the most important vegetables, with a world production of almost 94 millions of tons in 1999 (FAO, 1999). A wide range of tomato variety types with high yields and extraordinary external quality are currently available on the market. However, the consumers are increasingly demanding a higher organoleptic and nutritional quality characteristics.

Tomato flavour is a complex character correlated with the increase of soluble solids content (SSC) and acids. The SSC/acidity ratio has frequently been used as an index of flavour (Saimbhi *et al.*, 1995). A high ratio was correlated with a sweet flat taste and a lower ratio was correlated with a sharp, acid flavour (Bisogni *et al.*, 1976).

However, more precise determinations of some compounds are necessary to improve efficiently the taste of tomato. Some of them have been described taking part as individual components of SSC and total acidity. Sugars (Thakur *et al.*, 1996) and acids (mainly citric and malic)(Davies, 1965; De Bruyn *et al.*, 1971; Mahakun *et al.*, 1979) are examples of it.

The developed screening trials were pointed to find sources for greater taste with slight acidity, as these are the European consumers preferred characteristics for tomatoes.

MATERIAL AND METHODS

Plant material. 12 accessions of *L. esculentum* and 8 of *L. pimpinellifolium* collected in Ecuador and Peru by the Vegetable Genetics Breeding Group (Politechnic University of Valencia) were tested (Table 1). Two tomato experimental breeding lines (NEMA-R and NE-1), two Spanish varieties of processing tomato (GEVORA and GUADAJIRA) and one commercial hybrid (CAMBRIA, Seminis Vegetable Seeds, Almeria, Spain) were used as controls. Accession LA-530 of *L. cheesmanii*, used in soluble solids content breeding works, was included in the trials for the sake of comparison with previous results.

Growing conditions. Plants were cultivated at greenhouse during spring. A complete randomized block design was used in order to minimize environmental influence. Fruits were collected of the base of the plants at complete mature stage.

Analysis. Soluble solids content (SSC) were determined with a digital refractometer (ATAGO-PR1 Tokyo, Japan) and the results are reported as °Brix at 20 °C.

Total acidity was determined immediately after blending by titrating aliquots of homogenized sample with 0.1 N NaOH and phenoftalein. (AOAC, 1990).

For organic acid determination by HPLC (Vazquez *et al.*, 1994) a portion of 3 g of homogenated tomato was extracted with 30 mL of 4.5 % metaphosphoric acid, under magnetic stirring during 15 min, and made up to 50 mL with distilled water. The extract was filtered through Whatman N° 40 paper (Maidstone, Kent, England) and 0.45 µm Millipore (Bedford, MA, U.S.A.) filter, prior to injection into the chromatographic system

Apparatus. The instrumental equipment was a Micron Analitica, S.A. (Madrid, Spain) liquid chromatograph, equipped with a PU II isocratic pump; rheodyne 20 µL injection loop; UV-visible detector (Thermo Separation Spectra Series UV100); and Biocrom 2000 1.0 software. The chromatographic column was a Sphereclone ODS (2) 250 x 4,6 mm, 5µm (Phenomenex, Torrance, CA, U.S.A.). Chromatographic conditions of analysis were: 1.8 mM H₂SO₄ in distilled water (pH = 2.6) as mobile phase; flow rate of 0.4 mL/min; UV detection at 215 nm.

RESULTS

Screened accessions have shown a wide range of variation for SSC (Table 1). *L. esculentum* SSC varied from 3.97(UPV-16907) to 7.27 °Brix(UPV-16898), and *L. pimpinellifolium* from 8.1 (UPV-14341) to 11.35 °Brix (UPV-17049). UPV-16896, UPV-14324, UPV-14382 and UPV-16898 in *L. esculentum* and all *L. pimpinellifolium* accessions had higher SSC than controls (Table 1).

Among *L. esculentum*, UPV-16902 had the lowest total acidity (0.317 g/100g) and UPV-14384 had the highest (0.73 g/100g). Among *L. pimpinellifolium* UPV-14341 had the lowest total acidity (0.58 g/100g) and UPV-17049 the highest (1.247 g/100g). *L. esculentum* UPV-14384 and UPV-14382 showed the same total acidity as the control NE-1. On the other hand, *L. pimpinellifolium* UPV-17049, UPV-14974 and UPV-1960 show greater total acidity than controls.(Table 1).

Among the tested materials, UPV-14384, UPV-14223 and UPV-16895 within *L. esculentum* and UPV-17049 and UPV-14974 within *L. pimpinellifolium* were the most interesting ones for their slightly acid taste (smaller SSC/acidity ratio) compared to commercially cultivated controls (GUADAJIRA, GEVORA and CAMBRIA). (Table 1).

In this study a liquid chromatographic analysis of organic acid fraction of tomato samples has been performed for a more complete knowledge of these.

HPLC organic acid profiles show that citric and malic are the major organic acids, followed by oxalic and fumaric acid. UPV-14384 had around 20% more citric acid and 150% more malic and oxalic acid than controls (Table 1).UPV-16895 only had slightly greater quantities than controls. UPV-14223, UPV-17049 and UPV-14974, showed low quantities of citric and malic acid in comparison with their values of total acidity, so other organic acids may be present apart from the four described. UPV-16960, showed a very low content in citric acid but its content in malic acid is 150% of controls.

DISCUSSION

The accession *L. esculentum* UPV-14384 can be used for improvement of tomato with more acid taste than commercial hybrids and processing varieties assayed, due to its similar characteristics and its higher content in malic (0.464 g/100g) and citric (1.006 g/100g) acid. Furthermore, considering those accessions with higher acid content than commercial control ones (GUADAJIRA, CAMBRIA, GEVORA) we can select *L. pimpinellifolium* UPV- 16960 as

source for high malic content (0.485 g/100g); and *L. esculentum* UPV-16896 as source of high fumaric content 0.080g/100g.

From the nutritional point of view, the main problem which arises for high oxalic content is the bioavailability of calcium in the alimentary ration (Guil, 1996). Although values for oxalic acid content in tomato fruit should be considered together with those for calcium in order to determine their bioavailability, this information will be very useful to select tomato varieties with high total acid content but low oxalic amount.

On the other hand, it seems interesting to underline the detected variability. Saimbhi (1995) reported a range of 3.2-5.2 in SSC of 47 new and old hybrids of tomato. However, the results obtained in this study show the great variability for SSC found within *L. esculentum* (between 3.97 and 8.55 °Brix). This variability is also observed in *L. pimpinellifolium* (SSC values between 8.1 and 11.35 °Brix), species which are very near and hybridize very well with the cultivated tomato.

The variability detected for total acidity it is not as great as in the case of SSC. Nevertheless, the accumulation of the studied acids (citric, malic, oxalic and fumaric) does not match a shared pattern in all the accessions, as shown by HPLC analysis. This could possibly suggest an independent genetic control for every acid, as have been published for citric and malic acid (Stevens and Long, 1971, Stevens, 1972). In that case, the breeding programs could manage those genes easily. The comparisons between total acidity and HPLC determinations of acids, point out that, in general, total acidity are lower than the individual acids addition. For that reason we consider total acidity determination as a very rough way to evaluate acid content of tomato fruit. The best way to evaluate organic acids pattern in this vegetable is HPLC analysis. As some accessions seem to accumulate important quantities of acids different from citric, malic, oxalic and fumaric acid (total acidity value higher than individual additions) further work is being conducted in order to identify and quantify other acids present in tomato. This fact may be interesting for taste and nutrition value improvement in the quality of tomato for fresh consumption.

Table 1. Results for every variety/accession (mean ± standard error)

VARIETY or ACCESSION	SPECIES	SSC (°BRIX)	TOTAL ACIDITY (g citric acid/100g)	SSC/TOTAL ACIDITY RATIO	CITRIC ACID (g/100g)	MALIC ACID (g/100g)	OXALIC ACID (g/100g)	FUMARIC ACID (g/100g)
GUADAJIRA	<i>L. esculentum</i>	5,133±0.058	0,362±0.048	14,348±1.706	0,426±0.015	0,048±0.006	0,075±0.005	0,058±0.001
GÉVORA	<i>L. esculentum</i>	5,233±0.115	0,610±0.077	9,128±0.630	0,769±0.053	0,249±0.031	0,106±0.012	0,002±0.000
NE-1	<i>L. esculentum</i>	5,300±0.000	0,786±0.026	6,749±0.223	0,804±0.009	0,290±0.012	0,061±0.002	0,035±0.005
NEMAR-R	<i>L. esculentum</i>	5,500±0.100	0,667±0.030	8,209±0.406	0,679±0.057	0,246±0.048	0,085±0.014	0,000±0.000
CAMBRIA	<i>L. esculentum</i>	5,867±0.058	0,568±0.012	10,326±0.292	0,812±0.012	0,295±0.023	0,079±0.018	0,034±0.003
LA-530	<i>L. cheesmanii</i>	13,067±0.153	0,655±0.062	18,894±0.972	0,358±0.018	0,061±0.007	0,094±0.017	0,000±0.000
UPV-16907	<i>L. esculentum</i>	3,967±0.058	0,359±0.015	11,070±0.428	0,349±0.034	0,149±0.002	0,077±0.003	0,028±0.004
UPV-14223	<i>L. esculentum</i>	4,033±0.058	0,489±0.044	8,305±0.805	0,519±0.022	0,111±0.021	0,055±0.003	0,005±0.001
UPV- 14360	<i>L. esculentum</i>	4,033±0.058	0,344±0.032	11,060±0.327	0,442±0.009	0,245±0.034	0,077±0.015	0,006±0.001
UPV-14326	<i>L. esculentum</i>	4,800±0.100	0,421±0.031	11,913±0.368	0,997±0.061	0,382±0.053	0,125±0.008	0,013±0.001
UPV-16902	<i>L. esculentum</i>	5,100±0.100	0,317±0.015	16,345±0.021	0,248±0.014	0,075±0.016	0,027±0.007	0,005±0.003
UPV-16897	<i>L. esculentum</i>	5,267±0.058	0,513±0.024	10,563±0.488	0,350±0.031	0,201±0.015	0,050±0.012	0,001±0.001
UPV-16895	<i>L. esculentum</i>	5,567±0.115	0,581±0.042	9,618±0.904	0,867±0.085	0,317±0.032	0,191±0.001	0,008±0.001
UPV-14384	<i>L. esculentum</i>	5,833±0.058	0,728±0.036	8,241±0.205	1,006±0.097	0,464±0.032	0,159±0.002	0,000±0.000
UPV-16896	<i>L. esculentum</i>	6,133±0.058	0,591±0.020	10,389±0.349	0,782±0.012	0,316±0.016	0,071±0.003	0,080±0.002
UPV-14324	<i>L. esculentum</i>	6,700±0.173	0,598±0.031	10,858±0.732	0,400±0.039	0,325±0.040	0,060±0.002	0,000±0.000
UPV-14382	<i>L. esculentum</i>	7,233±0.208	0,714±0.019	10,164±0.127	0,376±0.047	0,168±0.019	0,074±0.014	0,005±0.001
UPV-16898	<i>L. esculentum</i>	7,267±0.208	0,526±0.002	13,972±0.345	0,481±0.021	0,173±0.006	0,094±0.002	0,069±0.001
UPV-14341	<i>L. pimpinellifolium</i>	8,100±0.000	0,580±0.042	13,500±0.639	0,683±0.033	0,238±0.041	0,088±0.005	0,009±0.001
UPV-14345	<i>L. pimpinellifolium</i>	8,233±0.058	0,770±0.044	10,375±0.252	0,935±0.138	0,237±0.076	0,123±0.030	0,009±0.003
UPV-16903	<i>L. pimpinellifolium</i>	8,550±0.354	0,729±0.010	11,728±0.319	0,745±0.009	0,291±0.051	0,258±0.025	0,003±0.001
UPV-14344	<i>L. pimpinellifolium</i>	8,900±0.173	0,786±0.031	11,636±0.483	0,815±0.089	0,234±0.066	0,096±0.030	0,007±0.004
UPV-16960	<i>L. pimpinellifolium</i>	9,733±0.153	0,807±0.073	11,046±1.012	0,120±0.008	0,485±0.004	0,100±0.014	0,004±0.001
UPV-16983	<i>L. pimpinellifolium</i>	9,900±0.141	0,593±0.040	16,746±0.362	0,655±0.018	0,177±0.022	0,142±0.013	0,000±0.000

UPV-14974	<i>L. pimpinellifolium</i>	11,317±0.202	1,147±0.035	9,966±0.199	0,840±0.004	0,000±0.000	0,130±0.011	0,001±0.001
UPV-17049	<i>L. pimpinellifolium</i>	11,350±0.212	1,247±0.202	9,210±1.319	0,758±0.014	0,333±0.006	0,167±0.004	0,008±0.001

REFERENCES

- AOAC , 1990. Official methods of analysis. 15 ed. K.Herlich, Arlington.
- Bisogni,CA.; Armbruster,G.; Brecht,PE. Quality comparisons of room ripened and field ripened tomato fruits. J. Food Science 1976, 41, 333-338.
- Davies J.N, 1965. The effect of variety on the malic and citric acid content of tomato fruit. Rep. Glasshouse Crops Res. Inst. 1964: 139-141.
- De Bruyn J.W.; Garretsen F.; Kooistra E. 1971. Variation in taste and chemical composition of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Euphytica 20: 214-227.
- FAO.1999.http://apps.fao.org/lim500/nph_wrap.pl?Production.Crops.Primary&Domain=SU&servlet=1
- Güil,JL.; Torija, ME.; Gimenez,JJ.; Rodriguez-García,I.; Giménez,A.Oxalic acid and calcium determination in wild edible plants. J.Agric.Food.Chem. 1996, 44, 1821-1823.
- Mahakun N.; Leeper P.W.; Burns E.E. 1979. Acidic constituents of various tomato fruit types. J.Food.Sci. 44: 1241-1244.
- Saimbhi,MS.; Cheema, DS.; Singh,S.; Nandpuri,KS. Physicochemical characteristics of some tomato hybrids. Tropical Sciences 1995, 35, 9-12.
- Stevens, M.A. 1972. Citrate and malate concentrations in tomato fruits: Genetic control and maturational effects. J.Amer.Soc.Hort.Sci. 97: 655-658.
- Stevens M.A.; Long M.A. 1971. Inheritance of malate in tomatoes. J.Amer.Soc.Hort.Sci.96: 120-122.
- Thakur B.R.; Singh R.K.; Nelson P.E. 1996. Quality attributes of processed tomato products: a review. Food Rev.Int. 12: 375-401
- Vázquez Odériz, ML.; Vázquez Blanco, ME.; López Hernández, J.; Simal Lozano, J.; Romero Rodríguez, MA. (1994). Simultaneous determination of organic acids and vitamin C in green beans by liquid chromatography. J AOAC Int 77: 1056-1059

CAPÍTULO 3:

Internal quality characterization of fresh tomato fruits.

Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M. C., Cámara, M., Torija, M. E., Chaya, C., Galiana-Balaguer, L., Roselló, S., Nuez, F. (2004).

Hortscience, 39(2), 339-345.

Internal Quality Characterization of Fresh Tomato Fruits

Fernández-Ruiz, V.; Sánchez-Mata, M.C.; Cámara, M., Torija, M.E.

Dpto. Nutrición y Bromatología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Ciudad Universitaria s/n. 28040 Madrid. Spain.

Chaya, C.

Unidad de Estadística. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria s/n. 28040 Madrid. Spain.

Galiana-Balaguer, L. ; Roselló, S.¹, Nuez, F.²;

Centro de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV). Universidad Politécnica de Valencia. Cno. Vera, 14. 46022 Valencia. Spain.

Received for publication 12 Aug. 2002. Accepted for publication 17 Mar. 2003. We wish to thank the financial support provided by the CYCIT (projects AGF99-0602-C02-01 and AGF99-0602-C02-02) and Generalitat Valenciana (project GV00-084-3).

¹ Current address: Dpto. Ciencias Experimentales, Producción Vegetal, Universitat Jaume I, Campus de Riu Sec, 12071 Castellón, Spain

² Corresponding author, e-mail: fnuez@btc.upv.es

Additional index words. Tomato breeding, *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon pimpinellifolium*, *Lycopersicon cheesmanii*, flavor intensity, vitamin C, HPLC.

Abstract. The characterization of *Lycopersicon* germplasm for internal quality properties is essential to choose suitable donor parents for breeding programs. When donor parents belong to species of subgenus *Eulycopersicon*, which are phyletically closer to *L. esculentum* Mill., the recovery of agronomic traits is faster. When using these materials, a careful selection of donor parents which could improve several internal quality properties allows the speeding up of these breeding programs. In this work, we combine general determinations, such as soluble solid content, titrable acidity, pH, total sugars, pectic substances and total protein contents with precise high-performance liquid chromatography (HPLC), quantitations of individual compounds (vitamin C, citric, malic, fumaric and oxalic acids, glucose, fructose and sucrose), in order to obtain a deep characterization of flavor intensity and nutritional properties in *Eulycopersicon* germplasm. The multidimensional analysis of all these variables allows the classifying of several accessions of *L. esculentum* Mill. and *L. pimpinellifolium* (Jusl.) Mill., according to their usefulness for internal quality breeding programs of fresh tomato. The classification obtained and the comparison of accessions behavior with selected controls show that five of the *L. pimpinellifolium* (Jusl.) Mill. accessions tested can be of great usefulness for being used in breeding for internal quality characteristics. A flavor intensity around 625% higher than commercial hybrids was obtained in the best accession tested. Some of these *L. pimpinellifolium* (Jusl.) Mill. accessions showed better flavor intensity properties than a high SSC *L. cheesmanii* Riley control, traditionally used in internal quality breeding. Besides, three of the *L. esculentum* Mill. accessions tested with medium-to-high flavor intensity value could be useful in advanced stages of breeding programs.

Several works have established the role of soluble solid content (SSC), acids and sugars in the taste and flavor intensity of tomato fruits. It is well known that sweetness has a high correlation with SSC, pH and reducing sugars, and sourness has a high correlation with pH and, to a lesser degree, with titrable acidity (TA) (Stevens et al., 1977, 1979; Baldwin et al., 1998). This happens because the major constituents of SSC content in *Lycopersicon* fruits are all soluble sugars (Stevens, 1972; Bisogni et al., 1976) and pH and TA are good measures of all free acids and H-ion concentrations, responsible for the sourness of a solution (Stevens et al., 1977). Moreover, SSC, sugars and TA highly contribute to overall flavor intensity (Stevens et al., 1977; Baldwin et al., 1998). Nevertheless, SSC, pH and TA are ambiguous variables since the profile and content of the substances that contribute to them can vary greatly between accessions. These variations can be large if accessions of different species related to cultivated tomato are characterized. The complex nature of SSC, pH and TA has made their use for selection in internal quality breeding programs rather inefficient (Hewitt and Garvey, 1987; Triano and St Clair, 1995).

On the other hand, the main reducing sugars (glucose (G), fructose (F) plus some sucrose (S)) and organic acids (citric (CA) and malic (MA) acids mainly) of tomato have proved to contribute to the sweetness and sourness and are also important factors in overall flavor intensity (Stevens et al., 1977; Hobson and Grierson, 1993). Moreover, the accumulation of some of the main sugars or acids present in *Lycopersicon* accessions can be under single genetic control, as it has been reported for MA and CA (Stevens and Long, 1971, Stevens, 1972) and S (Yelle et al., 1991). In that case, the breeding programs could manage those genes easily. For all these reasons, the determination of individual compounds responsible for flavor could be the best way for selecting germplasm with high flavor intensity. Nevertheless, sweetness was better correlated with total sugars (TS) than with G or F; sourness was better correlated with pH or TA than with CA and MA, and total flavor intensity correlated better with TS and TA than with individual sugar and acids (G, F, CA and MA). These responses have been attributed to interactions within individual sugars or acids and between sugars and acids that do not reflect individual determinations of sugars and acids but are reflected somehow in SSC, pH and TA (Stevens et al., 1977). However, it has been reported that some *Lycopersicon* accessions accumulate important quantities of unidentified acids because the TA value shows higher values than individual acid additions (Sanchez-Mata et al., 2000). For these reasons, until characterization of *Lycopersicon* sugars and acids profile complete, the best way to characterize flavor intensity properties in *Lycopersicon* germplasm is to combine general determinations with quantifications of individual compounds.

The objective of this work is to characterize and classify several accessions of *L. esculentum* Mill. and *L. pimpinellifolium* (Jusl.) Mill., according to their usefulness for internal quality breeding programs of fresh tomato. The variables considered in this study are related to the nutritional and qualitative aspects, emphasizing the sugar and acid composition of the samples.

Materials and Methods

Plants. 12 accessions of *L. esculentum* Mill. and 8 of *L. pimpinellifolium* (Jusl.) Mill. collected in Ecuador and Perú by the Vegetable Genetics Breeding Group (COMAV, Universidad Politécnica de Valencia, Spain) were tested (Table 1). Four tomato experimental breeding lines (NE-1, Nema-R, FLA-7060 and LA-1563), two Spanish varieties of processing tomato (Gévora and Guadajira) and one commercial hybrid (Cambria) were used as controls. The controls LA-1563 (a high SSC *L. esculentum* Mill. breeding line derived from *L. chmielewskii* Rick, Kes., Fob & Holle) and LA-530 (*L. cheesmanii* Riley accession used in SSC breeding works), were included in the trials for comparison with previous results (Hewitt and Garvey, 1987; Sanchez-Mata et al., 2000).

Growing conditions. Plants were cultivated under greenhouse conditions with watering, fertilization and appropriate temperature for suitable production in the spring-summer cycle in Valencia, Spain. Environmental variability was reduced by means of a complete randomized block design.

For each sample, several fruits were harvested: for the large-fruited accessions a minimum of 5 units (around 100 g each), for the small-fruited accessions up to 120 units (around 0.5 g each). The fruits were collected from the low floral bunches (1° at 3°) at the completely mature stage.

Analytical Methods. Fresh fruits were homogenized in a laboratory blender. Aliquots were taken to analyze dry matter (DM), SSC, pH, TA, organic acids and vitamin C (VITC). For further analysis, TS, soluble sugars, pectic substances (PS) and total proteins (TP), another portion of homogenized fruit was freeze-dried. DM was determined by desiccation. SSC was measured with a digital refractometer (ATAGO-PR1, Tokyo, Japan) and the results are reported as °Brix at 20°C. The pH was determined by a pHmeter. TA was measured by titration with 0.1 N NaOH and phenoftalein, and the results were expressed as ml 0.1 N alkali (AOAC, 1990). Oxalic (OA), MA, CA and fumaric (FA) acids, and VITC were quantified by High Performance Liquid Chromatography (Vazquez et al., 1994). TS were quantified spectrophotometrically (as G) of soluble sugars and available carbohydrates, after hydrolysis of complex carbohydrates with perchloric acid, using antrona reagent (Osborne and Voogt, 1986).

For free sugar analysis, a portion of fresh fruit pulp was homogenized in 85% ethanol using Omnimixer homogenizer model 17106 (Sorval, Dupont, USA). To separate the pectin fraction, the ethanol slurry was boiled for 30 min and then centrifuged at -1°C for 15 min at 1900x g in a Gallenkamp laboratory centrifuge. Two phases were obtained: supernatant with free sugar dissolved and an alcohol-insoluble residue containing PS. Soluble sugars, F, G and S, were analyzed on supernatants by HPLC following the method previously described by Mollá et al. (1994). PS were quantified spectrophotometrically (as galacturonic acid), after hydrolysis of the alcohol-insoluble residue with sulfuric acid, using *m*-phenilphenol reagent (Ahmed and Labavitch, 1977;

Blumenkrantz and Asboe-Hansen, 1973). TP were quantified by the Kjeldahl method (AOAC, 1990).

Instrumentation. Equipment used included a Waters Associates (Mildford, MA, USA) liquid chromatograph equipped with a 6000A pump and a U6K injector.

Table 1: Origin of the controls and accessions tested

Code	Control or accession	Species	Origin
1	LA-530	<i>L. cheesmanii</i> Riley	C.M. Rick TGRC, Davis, Calif., USA
2	Guadajira	<i>L. esculentum</i> Mill.	Spanish variety of processing tomato
3	Gévora	<i>L. esculentum</i> Mill.	Spanish variety of processing tomato
4	LA-1563	<i>L. esculentum</i> Mill.	C.M. Rick TGRC, Davis, Calif., USA
5	Cambria	<i>L. esculentum</i> Mill.	Fresh tomato hybrid SEMINIS vegetable seeds, Almería, Spain
6	NE-1	<i>L. esculentum</i> Mill.	COMAV Fresh tomato breeding line, Spain
7	Nema-R	<i>L. esculentum</i> Mill.	Fresh tomato breeding line SEMINIS vegetable seeds, Almería, Spain
8	FLA-6070	<i>L. esculentum</i> Mill.	Fresh tomato breeding line SEMINIS vegetable seeds, Almería, Spain
9	UPV-14223	<i>L. esculentum</i> Mill.	Loja, Ecuador
10	UPV-16898	<i>L. esculentum</i> Mill.	Zapotebamba, Ecuador
11	UPV- 14360	<i>L. esculentum</i> Mill.	Azuay, Ecuador
12	UPV-16907	<i>L. esculentum</i> Mill.	Lambayeque, Peru
13	UPV-16902	<i>L. esculentum</i> Mill.	Huancabamba, Ecuador
14	UPV-16896	<i>L. esculentum</i> Mill.	Zapotebamba, Ecuador
15	UPV-16895	<i>L. esculentum</i> Mill.	Zapotebamba, Ecuador
16	UPV-14324	<i>L. esculentum</i> Mill.	El Oro, Ecuador
17	UPV-16897	<i>L. esculentum</i> Mill.	Zapotebamba, Ecuador
18	UPV-14384	<i>L. esculentum</i> Mill.	Morona-Santiago, Ecuador
19	UPV-14382	<i>L. esculentum</i> Mill.	Morona-Santiago, Ecuador
20	UPV-14326	<i>L. esculentum</i> Mill.	El Oro, Ecuador
21	UPV-14341	<i>L. pimpinellifolium</i> (Jusl.) Mill	Azuay, Ecuador
22	UPV-14345	<i>L. pimpinellifolium</i> (Jusl.) Mill	Cañar, Ecuador
23	UPV-14344	<i>L. pimpinellifolium</i> (Jusl.) Mill	Cañar, Ecuador
24	UPV-14974	<i>L. pimpinellifolium</i> (Jusl.) Mill	Lambayeque, Peru
25	UPV-17049	<i>L. pimpinellifolium</i> (Jusl.) Mill	Piura, Peru
26	UPV-16960	<i>L. pimpinellifolium</i> (Jusl.) Mill	Piura, Peru
27	UPV-16983	<i>L. pimpinellifolium</i> (Jusl.) Mill	Lambayeque, Peru
28	UPV-16903	<i>L. pimpinellifolium</i> (Jusl.) Mill	Lambayeque, Peru

For reducing sugar analysis, an R401 differential refractometer was used. The column used was a Waters μ Bondapak/carbohydrate analysis column. The mobile phase was acetonitrile/water (80:20). Operating conditions were a flow rate of $0.9 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and ambient temperature.

For organic acid and VITC analysis, a Spherisorb ODS2 250 x 4.6 mm C_{18} column (particle size, $5 \mu\text{m}$) with a Brownlee Labs Newguard RP-18 15 x 3.2 mm precolumn (particle size, $7 \mu\text{m}$), and an Atom 80 rotary Shaker were used. The mobile phase was LC- grade water taken to pH 2.2 with sulfuric acid. The flow rate was $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Detection was at 245 nm for VITC and OA and at 215 nm for the other organic acids. All chromatograms were recorded on a Waters Data Module 745 integrator.

Statistical methods. In order to look for some underlying dimension explaining the variability of the data, a classical Principal Component Analysis (PCA) on the standardized data has been applied (Everitt, 1980).

After the characterization of the population of tomato varieties by means of the PCA, a Cluster Analysis (CIA) was performed to examine the natural linkage of the varieties on the basis of the information provided by the analyzed variables. The procedure applied was an agglomerative hierarchic classification. Euclidean distances and the unweighted pair-group method based on arithmetic averages (UPGMA) was used in the clustering. The maximization of the resemblance coefficient range was used as grouping criterion (Romesburg, 1984). The goodness of fit of the cluster analysis to the data was tested by the cophentic correlation coefficient (Sokal and Rohlf, 1995).

Statistical analysis were performed with the program NTSYS PC 2.02 (Applied Biostatistics, Setauket, NY) for Windows.

Results

The results of the analytical determinations (average values of three determinations) show a great variability, mainly in DM, SSC, reducing sugars (G and F) and TA (Table 2). Despite the great DM variability observed ($51.0\text{-}197.9 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), the results obtained do not clearly separate *L. esculentum* Mill. accessions from *L. pimpinellifolium* (Jusl.) Mill. and *L. cheesmanii* Riley accessions, which have many more small fruits. From our results, the variability in SSC (between 3.97 and $13.07 \text{ }^\circ\text{Brix}$), F ($3.51 - 40.42 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\text{FW}$) and G ($3.19 - 43.56 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\text{FW}$) were closely related; but slight relationships were found between TA ($482.2 - 1227.1 \text{ mL } 0.1\text{N alkali}\cdot\text{kg}^{-1}\text{FW}$) and pH ($2.99 - 4.92$). F and G were found approximately in equal amounts, while S was always in very small quantities. The main organic acids detected were CA ($1.20\text{-}10.06 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\text{FW}$) and MA ($0\text{-}4.85 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\text{FW}$) and both showed great variability. The accumulation of the studied acids does not match a shared pattern in all the accessions. The correlation coefficients as well as their p-values (in brackets), between the variables on the data

were obtained (lower part of the diagonal in the Table 3). Numerous significant correlations (greater than 0.7) between the variables considered were found.

The large number of variables studied and the great variability observed in all of them makes a multivariate analysis advisable in order to characterize and classify the accessions according to flavor characteristics. The multidimensional structure of the data was reduced by performing a PCA, which provided a three-dimensional map for explaining the observed variance. Furthermore, a hierarchic classification of samples was carried out in order to group the accessions according to their similar internal quality properties.

The three components of the PCA performed explain 65% of the total variance (39% first, 14% second and 12% third principal component). As the percentages of the variance explained by the second and third principal components are very close, correct interpretation of the data variability requires considering the three first principal components.

The first principal component is highly correlated to variables responsible for tomato flavor intensity, such as SSC, TS and TA and in a minor degree to the variables F and G (positive correlation) (Table 4). It is also positively correlated to DM and TP. Technically, this is due to the high correlation coefficients between these variables (Table 3). The second principal component separates the accessions according to their acidity. The CA is the most important acid that influences the formation of the second principal component. The pH also contributes to the formation of this second principal component, showing an important and negative correlation (Table 4). Low correlation coefficients of TA to CA and to pH were observed (Table 3). Finally, the third principal component separates the accessions according to their content of S and FA (Table 4).

All *Lycopersicon* accessions are plotted on the reduced space of the three principal components. Two projections, one for the first and second principal components and the other for the first and third principal components (Fig. 1, A and B), were made. The hierarchic classification performed with all the accessions and controls (cophenetic value = 0.83) shows a good fit between the Euclidean distances of the data and the dendrogram distances. The dendrogram associated with the cluster analysis, grouped the accessions firstly according to flavor intensity, secondly to sourness and thirdly to minor compounds (FA and S). This dendrogram was cut for a wide range of the resemblance coefficient (Fig. 2) in order to obtain the most stable accession association. This cut of the dendrogram gives rise to seven groups, four of them with high flavor intensity and three with moderate to low flavor intensity. These new groups are outlined in Fig. 1 in order to clearly observe the relationship within the accessions and between accessions as well as the principal components.

Table 2: Composition (mean ± SE) controls and accessions studied. FW = fresh weight. ND = not detectable

Code	DM (g·kg ⁻¹)	SSC (°Brix)	TS ^z (g·kg ⁻¹ FW)	F (g·kg ⁻¹ FW)	G (g·kg ⁻¹ FW)	S (g·kg ⁻¹ FW)	pH	TA ^y (mL·kg ⁻¹ FW)	CA (g·kg ⁻¹ FW)	MA (g·kg ⁻¹ FW)	OA (g·kg ⁻¹ FW)	FA (mg·kg ⁻¹ FW)	VITC ^x (mg·kg ⁻¹ FW)	PS ^v (g·kg ⁻¹ FW)	TP (g·kg ⁻¹ FW)
1	173.1 ± 0.3	13.07 ± 0.09	82.69 ± 0.89	39.98 ± 2.24	42.46 ± 4.28	ND	4.63 ± 0.03	1022.0 ± 56.2	3.58 ± 0.10	0.61 ± 0.04	0.94 ± 0.10	ND	12.73 ± 0.16	3.11 ± 0.03	21.84 ± 0.22
2	71.8 ± 3.1	5.13 ± 0.03	32.06 ± 0.05	17.51 ± 0.51	15.75 ± 0.95	6.11 ± 0.29	4.17 ± 0.03	508.5 ± 38.9	4.26 ± 0.09	0.48 ± 0.03	0.75 ± 0.03	57.57 ± 0.75	15.61 ± 0.37	2.14 ± 0.14	14.55 ± 0.18
3	58.9 ± 2.3	5.23 ± 0.07	40.29 ± 0.61	16.25 ± 0.39	14.01 ± 0.46	ND	4.01 ± 0.02	951.8 ± 69.0	7.69 ± 0.31	2.49 ± 0.18	1.06 ± 0.07	1.81 ± 0.01	12.61 ± 0.27	1.03 ± 0.12	14.48 ± 0.01
4	70.5 ± 0.7	6.37 ± 0.07	37.90 ± 0.37	11.42 ± 1.19	10.57 ± 1.23	ND	4.92 ± 0.05	522.6 ± 53.2	4.72 ± 0.14	3.02 ± 0.13	0.87 ± 0.12	6.95 ± 0.26	18.71 ± 0.13	0.76 ± 0.05	15.14 ± 0.29
5	78.1 ± 0.2	5.87 ± 0.03	59.49 ± 0.95	13.49 ± 1.22	13.30 ± 1.41	ND	4.16 ± 0.02	887.4 ± 11.0	8.12 ± 0.07	2.95 ± 0.13	0.79 ± 0.11	33.51 ± 1.66	15.13 ± 0.37	2.62 ± 0.20	6.44 ± 0.11
6	68.0 ± 2.7	5.30 ± 0.00	48.54 ± 0.99	12.13 ± 1.83	11.77 ± 2.25	ND	3.86 ± 0.02	1227.0 ± 23.8	8.04 ± 0.05	2.90 ± 0.07	0.61 ± 0.01	34.94 ± 2.69	12.29 ± 0.07	1.23 ± 0.02	10.12 ± 0.14
7	64.2 ± 0.2	5.50 ± 0.06	44.57 ± 1.14	9.01 ± 0.31	8.17 ± 0.23	0.45 ± 0.05	3.98 ± 0.02	1041.6 ± 26.7	6.79 ± 0.33	2.46 ± 0.28	0.85 ± 0.08	ND	13.32 ± 0.13	1.30 ± 0.17	12.52 ± 0.23
8	75.7 ± 0.5	6.68 ± 0.04	46.51 ± 0.55	13.77 ± 0.21	13.95 ± 0.51	ND ±	4.75 ± 0.01	482.2 ± 11.4	5.78 ± 0.52	3.71 ± 0.37	0.53 ± 0.01	8.06 ± 1.18	12.66 ± 0.12	0.93 ± 0.18	14.43 ± 0.12
9	58.6 ± 0.8	4.03 ± 0.03	44.00 ± 0.95	6.10 ± 0.14	5.33 ± 0.12	ND	4.19 ± 0.01	762.7 ± 39.9	5.19 ± 0.13	1.46 ± 0.12	0.55 ± 0.02	4.68 ± 0.53	10.46 ± 0.14	0.85 ± 0.06	8.71 ± 0.18
10	93.7 ± 2.8	7.27 ± 0.12	52.10 ± 0.50	24.03 ± 1.45	24.82 ± 2.22	1.91 ± 0.15	4.20 ± 0.01	902.5 ± 2.2	4.81 ± 0.12	1.73 ± 0.04	0.94 ± 0.01	68.60 ± 0.48	31.06 ± 0.46	1.39 ± 0.07	11.46 ± 0.14
11	53.6 ± 0.2	4.03 ± 0.03	33.00 ± 1.07	5.92 ± 0.58	5.42 ± 0.55	ND	4.17 ± 0.03	536.8 ± 28.9	4.42 ± 0.05	2.45 ± 0.20	0.77 ± 0.08	5.76 ± 0.37	15.79 ± 0.09	2.09 ± 0.12	8.91 ± 0.17
12	51.0 ± 0.6	3.97 ± 0.03	29.10 ± 0.15	9.32 ± 0.67	7.87 ± 0.55	ND	4.45 ± 0.02	560.0 ± 13.3	3.49 ± 0.20	1.49 ± 0.01	0.77 ± 0.02	27.97 ± 2.33	9.62 ± 0.10	1.58 ± 0.14	9.72 ± 0.29
13	62.3 ± 1.3	5.10 ± 0.06	49.97 ± 0.60	10.35 ± 0.52	10.47 ± 1.04	ND	4.79 ± 0.01	495.7 ± 13.6	2.48 ± 0.08	0.75 ± 0.09	0.27 ± 0.04	5.09 ± 1.55	10.46 ± 0.08	1.00 ± 0.17	11.81 ± 0.31
14	85.5 ± 2.0	6.13 ± 0.03	44.36 ± 0.47	11.49 ± 0.67	12.62 ± 0.71	1.49 ± 0.30	4.12 ± 0.01	922.4 ± 18.3	7.82 ± 0.07	3.16 ± 0.09	0.71 ± 0.02	80.37 ± 1.05	26.72 ± 0.01	3.50 ± 0.29	11.06 ± 0.11
15	66.5 ± 1.3	5.57 ± 0.07	41.95 ± 1.28	8.50 ± 0.38	7.79 ± 0.55	ND	4.26 ± 0.02	907.7 ± 37.7	8.67 ± 0.49	2.12 ± 0.19	1.91 ± 0.00	7.65 ± 0.39	16.19 ± 0.03	2.11 ± 0.19	11.11 ± 0.21
16	86.3 ± 0.2	6.70 ± 0.10	64.66 ± 0.89	14.53 ± 0.11	14.71 ± 0.14	ND	4.28 ± 0.02	933.0 ± 28.0	4.00 ± 0.22	3.25 ± 0.23	0.60 ± 0.01	ND	23.57 ± 0.10	1.59 ± 0.20	18.07 ± 2.17
17	67.8 ± 0.4	5.27 ± 0.03	48.54 ± 1.07	14.35 ± 0.45	13.12 ± 0.22	ND	4.16 ± 0.01	800.5 ± 22.0	3.50 ± 0.18	2.01 ± 0.09	0.50 ± 0.07	0.82 ± 0.37	14.83 ± 0.03	2.96 ± 0.01	11.82 ± 0.03
18	84.4 ± 0.2	5.83 ± 0.03	70.59 ± 0.78	8.27 ± 0.58	8.45 ± 0.38	1.28 ± 0.22	4.13 ± 0.02	1136.4 ± 32.2	10.06 ± 0.56	4.64 ± 0.18	1.59 ± 0.01	ND	20.60 ± 0.14	2.73 ± 0.02	13.40 ± 0.19
19	102.0 ± 1.2	7.23 ± 0.12	82.69 ± 0.89	25.38 ± 0.86	31.87 ± 1.73	ND	4.30 ± 0.13	1115.0 ± 17.4	3.76 ± 0.27	1.68 ± 0.11	0.74 ± 0.08	4.76 ± 0.39	23.37 ± 0.29	2.35 ± 0.04	14.91 ± 0.52
20	62.3 ± 0.7	4.80 ± 0.06	47.53 ± 0.71	3.51 ± 0.42	3.19 ± 0.45	ND	4.23 ± 0.02	656.9 ± 27.8	9.97 ± 0.35	3.22 ± 0.31	1.25 ± 0.05	13.06 ± 0.62	14.06 ± 0.08	1.25 ± 0.09	8.00 ± 0.20
21	116.2 ± 0.3	8.10 ± 0.00	52.58 ± 0.89	13.20 ± 1.02	12.42 ± 0.88	2.03 ± 0.46	4.27 ± 0.01	905.1 ± 37.4	6.83 ± 0.19	2.38 ± 0.23	0.88 ± 0.03	9.16 ± 0.63	16.33 ± 0.30	3.58 ± 0.29	29.34 ± 0.19
22	126.5 ± 0.8	8.23 ± 0.03	89.61 ± 1.21	40.42 ± 1.83	39.31 ± 2.81	ND	4.31 ± 0.09	1202.9 ± 39.7	9.35 ± 0.80	2.37 ± 0.44	1.23 ± 0.17	8.61 ± 1.47	16.37 ± 0.12	1.56 ± 0.23	23.68 ± 0.17
23	137.0 ± 0.1	8.90 ± 0.10	93.85 ± 1.22	28.17 ± 1.94	28.43 ± 1.95	ND	4.26 ± 0.00	1227.8 ± 28.1	8.15 ± 0.51	2.34 ± 0.38	0.96 ± 0.17	7.38 ± 2.08	19.75 ± 0.23	1.50 ± 0.02	29.04 ± 1.62
24	142.9 ± 0.7	11.32 ± 0.12	55.14 ± 0.65	12.04 ± 0.37	12.14 ± 0.91	1.26 ± 0.30	4.09 ± 0.09	1790.0 ± 31.6	8.40 ± 0.02	0.00 ± 0.00	1.30 ± 0.06	0.67 ± 0.39	29.36 ± 0.28	3.60 ± 0.25	33.88 ± 0.49
25	197.9 ± 1.7	11.35 ± 0.12	88.21 ± 0.46	19.98 ± 0.26	17.74 ± 0.30	0.73 ± 0.09	4.12 ± 0.06	1946.5 ± 181	7.58 ± 0.08	3.33 ± 0.04	1.67 ± 0.02	7.51 ± 0.49	29.01 ± 0.16	3.13 ± 0.05	39.56 ± 2.48
26	133.6 ± 0.4	9.73 ± 0.09	65.32 ± 1.70	17.68 ± 0.20	13.44 ± 0.13	0.63 ± 0.08	4.13 ± 0.01	1259.9 ± 65.6	1.20 ± 0.05	4.85 ± 0.02	1.00 ± 0.08	4.19 ± 0.45	23.82 ± 0.09	2.23 ± 0.02	34.65 ± 0.71
27	150.1 ± 0.4	9.90 ± 0.08	64.17 ± 1.30	12.13 ± 1.74	11.12 ± 1.49	0.47 ± 0.05	4.24 ± 0.01	925.5 ± 35.86	6.55 ± 0.11	1.77 ± 0.13	1.42 ± 0.08	ND	16.56 ± 0.38	8.58 ± 0.76	34.05 ± 1.04
28	115.5 ± 1.9	8.55 ± 0.20	74.03 ± 0.87	30.52 ± 1.21	43.56 ± 2.01	ND	2.99 ± 0.05	1138.0 ± 9.30	7.45 ± 0.05	2.91 ± 0.29	2.58 ± 0.14	2.65 ± 0.61	25.54 ± 0.29	4.53 ± 0.46	22.22 ± 0.46

^z Expressed as glucose ^y Expressed as 0.1N alkali ^x Expressed as L-ascorbic acid ^v Expressed as galacturonic acid

Table 3: Correlation coefficients (p-values) between the variables considered on the data of the 28 accessions of the three species (lower part of the diagonal) and on the data of the 19 accessions of only *L. esculentum* Mill. (upper part of the diagonal).

	DM	SSC	TS	F	G	S	pH	TA	CA	MA	OA	FA	VITC	PS	TP
DM		0,894 (<0,001)	0,771 (<0,001)	0,703 (<0,001)	0,786 (<0,001)	0,213 (0,382)	-0,025 (0,918)	0,446 (0,056)	0,027 (0,913)	0,238 (0,327)	0,039 (0,873)	0,311 (0,196)	0,829 (<0,001)	0,389 (0,099)	0,418 (0,075)
SSC	0,960 (<0,001)		0,623 (0,004)	0,708 (<0,001)	0,750 (<0,001)	0,062 (0,802)	0,184 (0,452)	0,316 (0,188)	0,002 (0,993)	0,300 (0,212)	0,040 (0,873)	0,183 (0,454)	0,736 (<0,001)	0,123 (0,617)	0,561 (0,013)
TS	0,780 (<0,001)	0,708 (<0,001)		0,418 (0,075)	0,552 (0,014)	-0,202 (0,406)	-0,095 (0,699)	0,599 (0,007)	0,121 (0,621)	0,325 (0,174)	0,056 (0,821)	-0,207 (0,395)	0,455 (0,050)	0,277 (0,251)	0,260 (0,283)
F	0,609 (<0,001)	0,623 (<0,001)	0,725 (<0,001)		0,973 (<0,001)	0,306 (0,203)	-0,016 (0,949)	0,235 (0,332)	-0,371 (0,118)	-0,272 (0,261)	-0,214 (0,378)	0,322 (0,179)	0,544 (0,016)	0,126 (0,607)	0,476 (0,039)
G	0,551 (0,002)	0,577 (0,001)	0,711 (<0,001)	0,966 (<0,001)		0,220 (0,366)	0,008 (0,974)	0,288 (0,232)	-0,346 (0,147)	-0,219 (0,369)	-0,203 (0,405)	0,280 (0,246)	0,595 (0,007)	0,177 (0,470)	0,446 (0,055)
S	0,035 (0,858)	0,001 (0,997)	-0,227 (0,245)	-0,014 (0,943)	-0,056 (0,777)		-0,173 (0,479)	-0,121 (0,622)	-0,072 (0,770)	-0,342 (0,152)	0,036 (0,883)	0,594 (0,007)	0,254 (0,294)	0,251 (0,301)	0,208 (0,394)
pH	-0,084 (0,670)	-0,036 (0,856)	-0,142 (0,472)	-0,107 (0,589)	-0,228 (0,243)	-0,077 (0,698)		-0,704 (<0,001)	-0,460 (0,048)	-0,084 (0,733)	-0,235 (0,333)	-0,213 (0,382)	-0,098 (0,689)	-0,376 (0,112)	0,272 (0,259)
TA	0,731 (<0,001)	0,676 (<0,001)	0,647 (<0,001)	0,343 (0,074)	0,311 (0,107)	-0,048 (0,810)	-0,420 (0,026)		0,481 (0,037)	0,336 (0,160)	0,302 (0,209)	-0,005 (0,985)	0,311 (0,196)	0,327 (0,172)	0,086 (0,726)
CA	0,081 (0,681)	0,021 (0,915)	0,195 (0,321)	-0,052 (0,794)	-0,023 (0,906)	-0,054 (0,787)	-0,350 (0,068)	0,370 (0,053)		0,225 (0,249)	0,520 (0,005)	0,063 (0,798)	0,023 (0,926)	0,172 (0,481)	-0,309 (0,199)
MA	-0,034 (0,866)	-0,090 (0,650)	0,151 (0,444)	-0,160 (0,416)	-0,162 (0,410)	-0,252 (0,197)	-0,171 (0,384)	0,096 (0,628)	0,652 (0,003)		0,197 (0,316)	-0,183 (0,453)	0,216 (0,375)	0,147 (0,550)	0,088 (0,721)
OA	0,408 (0,031)	0,381 (0,046)	0,355 (0,064)	0,233 (0,233)	0,320 (0,097)	-0,035 (0,861)	-0,588 (0,001)	0,465 (0,013)	0,691 (0,001)	0,345 (0,148)		-0,091 (0,711)	0,175 (0,474)	0,178 (0,467)	-0,066 (0,788)
FA	-0,205 (0,295)	-0,239 (0,221)	-0,315 (0,102)	-0,030 (0,880)	-0,039 (0,844)	0,542 (0,003)	-0,057 (0,774)	-0,198 (0,313)	0,029 (0,883)	-0,078 (0,695)	-0,219 (0,263)		0,465 (0,045)	0,337 (0,158)	-0,221 (0,364)
VITC	0,514 (0,005)	0,502 (0,007)	0,402 (0,034)	0,253 (0,194)	0,294 (0,129)	0,215 (0,272)	-0,331 (0,086)	0,590 (<0,001)	0,106 (0,591)	0,180 (0,360)	0,406 (0,032)	0,231 (0,237)		0,279 (0,150)	0,472 (0,011)
PS	0,535 (0,003)	0,499 (0,007)	0,269 (0,167)	0,103 (0,601)	0,154 (0,435)	0,120 (0,542)	-0,315 (0,103)	0,288 (0,137)	0,120 (0,542)	-0,096 (0,625)	0,450 (0,016)	-0,082 (0,680)	0,420 (0,074)		-0,128 (0,603)
TP	0,882 (<0,001)	0,845 (<0,001)	0,594 (<0,001)	0,390 (0,040)	0,316 (0,102)	0,093 (0,637)	-0,107 (0,588)	0,690 (<0,001)	0,027 (0,892)	0,032 (0,873)	0,387 (0,042)	-0,338 (0,078)	0,323 (0,177)	0,520 (0,005)	

Table 4: Correlation coefficients between the variables and the three first principal components on the analysis performed on the data of the 28 accessions of the three species.

Variables	PC1	PC2	PC3
DM	0,93	-0,18	0,04
SSC	0,90	-0,25	0,03
TS	0,84	-0,17	-0,25
F	0,69	-0,47	0,08
G	0,68	-0,38	0,07
S	-0,02	0,05	0,86
pH	-0,34	-0,65	-0,15
TA	0,80	0,25	-0,05
CA	0,22	0,68	-0,12
MA	0,04	0,49	-0,38
OA	0,60	0,57	-0,07
FA	-0,24	0,10	0,80
VITC	0,61	0,26	0,38
PS	0,53	0,20	0,19
TP	0,82	-0,07	0,00
Variance explained (%)	39	14	12

The four high flavor intensity groups are located on the right part of the plot (Fig. 1A) and are made up of *L. pimpinellifolium* accessions and the LA-530 (1) *L. cheesmanii* Riley control. These accessions exhibit high contents on DM, SSC, TS, TP and TA. UPV-17049 (25) accession shows the highest intensity of flavor characteristics. UPV-14974 (24) accession, grouped with the former, has slightly lower flavor intensity and no MA content. The accession UPV-16903 (28) has the second highest flavor intensity value. It shows lower DM, SSC and TA than UPV-17049 (25) and UPV-14974 (24) accessions but higher content in F and G. However, this accession is isolated from the other clusters because it has the lowest pH of all the accessions. UPV-14345 (22) and UPV-14344 (23) accessions and *L. cheesmanii* Riley control LA-530 (1) have similar sugar content (TS, F and G) and TA to UPV-16903 (28), however they are not clustered with it because of its high pH. The *L. cheesmanii* Riley control LA-530 (1) is located on the lower extreme of the plot, because of its high pH and low CA content.

The three moderate-to-low flavor intensity groups are located on the left part of the plot represented by the first and second principal components (Fig. 1A) and are made up of all *L. esculentum* Mill. accessions and controls and two *L. pimpinellifolium* accessions, UPV-14341(21) and UPV-16960(26). The dendrogram splits these three groups up according to special features related to the third principal component (S and FA content) and VITC content. Guadajira (2) control do not have special flavor intensity or acidity characteristics, but are cluster isolated since it has the highest S content. UPV-16898 (10) and UPV-16896 (14) accessions are cluster isolated because of their relatively high contents in S and FA as well as their higher VITC content. The last group, six controls and ten accessions from *L. esculentum* Mill. and two *L. pimpinellifolium* (Jusl.) Mill. accessions, show quite a wide variability for flavor intensity

and acidity; however, in the longitudinal section of this dendrogram no more groups arise. Nevertheless, the next dendrogram stable section (dotted line in Fig. 2), splits the group into three sub-groups (dotted line in Fig. 1, A and B). Two of these sub-groups have intermediate flavor intensity, but higher than controls. The third sub-group includes controls and accessions with very similar characteristics. One of these sub-groups with higher flavor intensity than controls is made up of UPV-14384 (18) *L. esculentum* Mill. accession, which is cluster isolated because of its very high CA, MA and OA content. The other one is formed by UPV-14324 (16) and UPV-14382 (19) *L. esculentum* Mill. accessions and UPV-14341 (21) and UPV-16960 (26) *L. pimpinellifolium* (Jusl.) Mill. accessions, which have moderate to high VITC content and high TP content (specially *L. pimpinellifolium* (Jusl.) Mill. accessions).

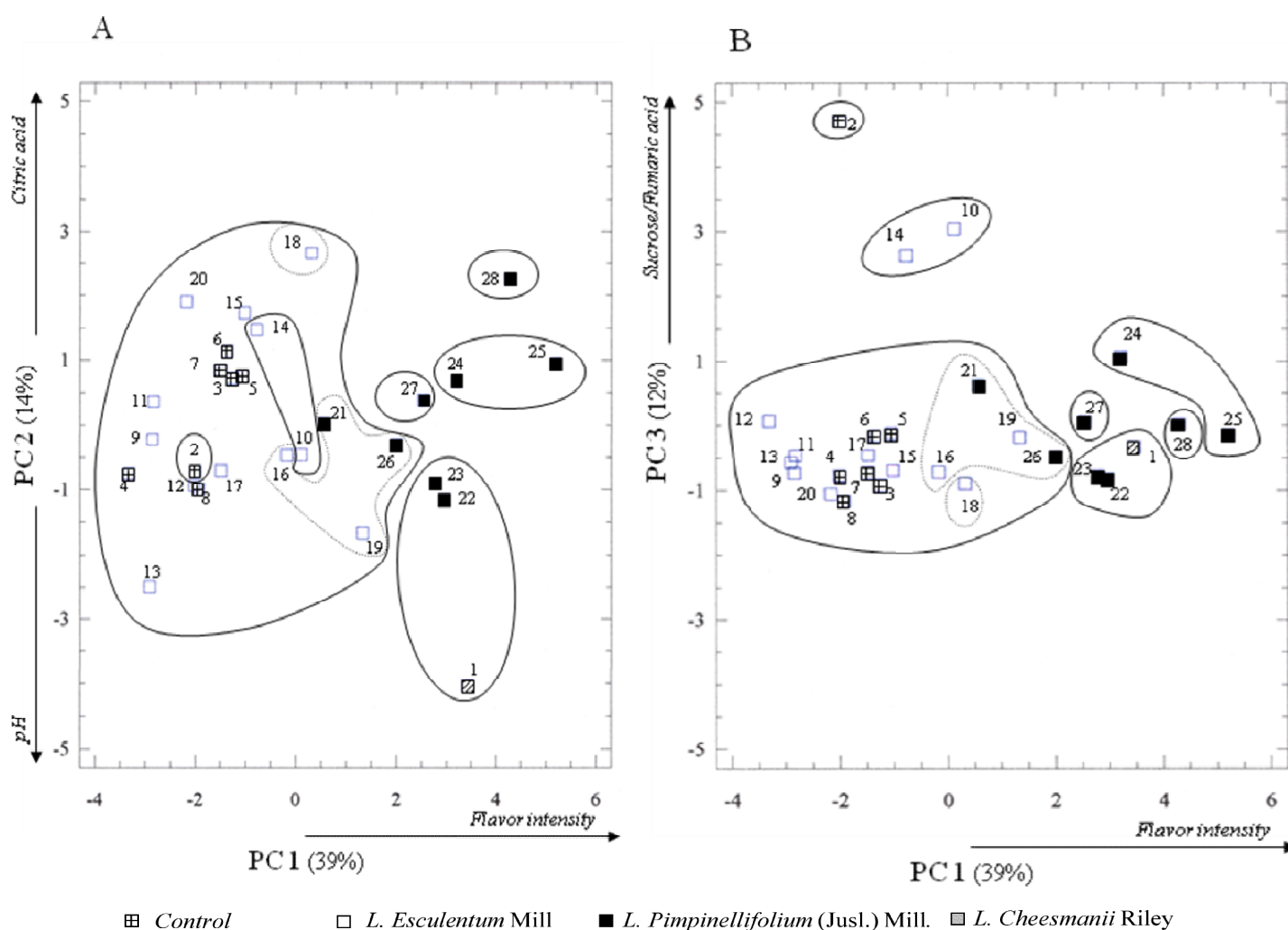


Fig 1. Plot of the tomato varieties projected on the reduced spaces of the first and second principal components and of the first and third principal components. Groups are derived from a separate cluster analysis.

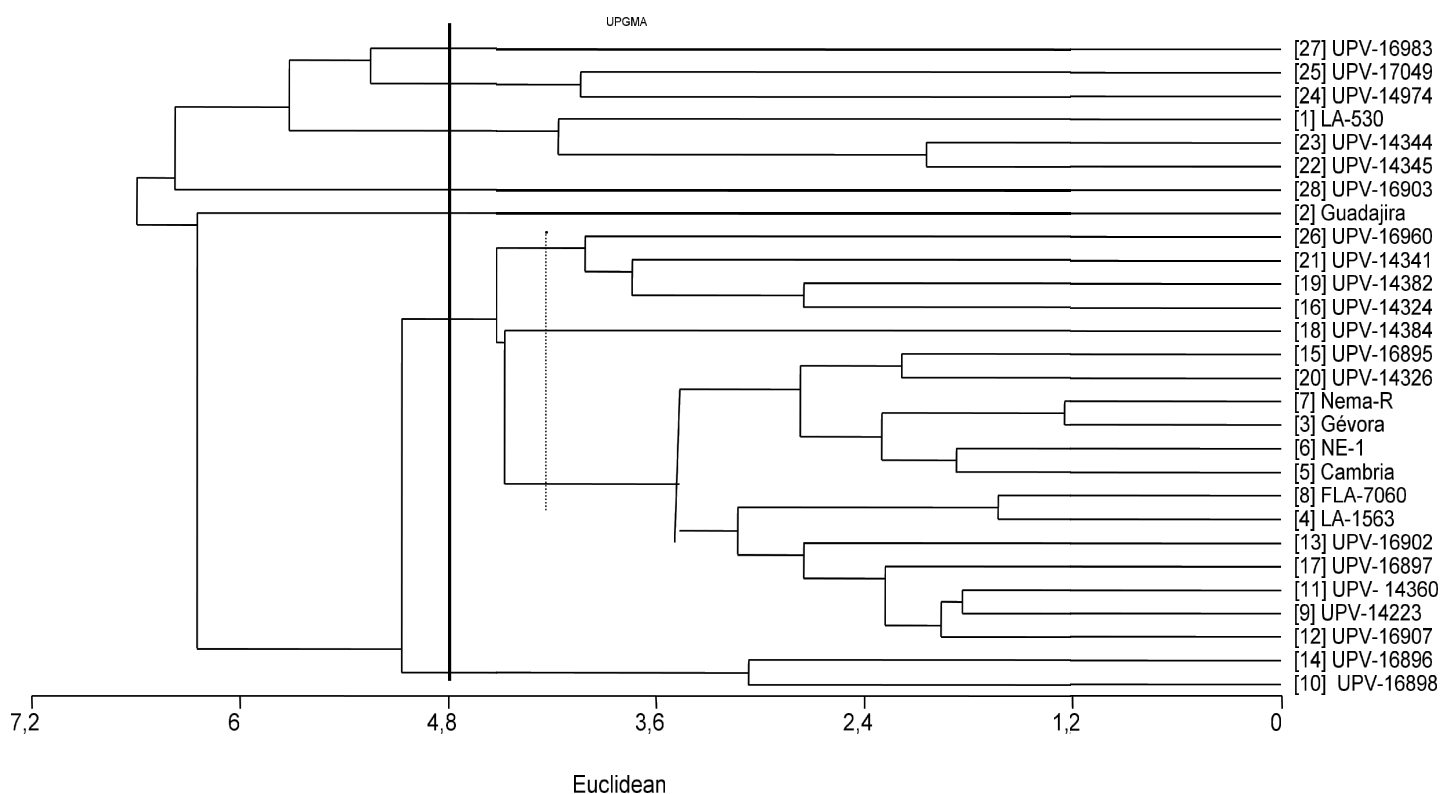


Fig 2. Dendrogram of the *Eulycopersicon* accessions using the UPGMA criterion method.

In order to make a more detailed analysis on the accessions of the specie *L. esculentum* Mill. (Table 2), the data corresponding to the species *L. pimpinellifolium* (Jusl.) Mill. and *L. cheesmanii* Riley were excluded and new PCA and CIA were performed. Correlation coefficients between the variables on the twelve accessions and seven controls of *L. esculentum* Mill. have been calculated (upper part of the diagonal of Table 3).

As in previous correlation analysis, DM/SSC and G/F are very closely correlated. The correlation coefficients between DM/VITC and SSC/VITC on the varieties of *L. esculentum* Mill. increase compared to those obtained by considering the three species together. TS are only correlated to DM, and both DM and SSC are correlated to F and G. In contrast to the previous analysis performed with the three tomato species, now TA appears closely associated to pH (correlation coefficient of -0.70) in *L. esculentum* Mill. accessions. The increase of this correlation coefficient is accompanied by a reduction of the variability on the MA/CA ratio, suggesting a relationship between a wide variation on the MA/CA ratio and the poor correlation between TA and pH.

In the PCA performed on *L. esculentum*, the three first principal components explain 71% of the total variance (Table 5). The first principal component (35% of the variance) is associated to variables responsible for sweet taste (sugar content) together with a high participation of the micronutrient VITC. In addition to CA, variables such as MA and OA and TA are now correlated to the second principal component (which accounts

for 21% of the total variance). This axis is an indicator of sourness. The third principal component (15% of the total variance), as in the previous PCA, is strongly correlated to FA and S.

The hierarchic classification performed with twelve accessions and seven controls of *L. esculentum* Mill. (cophenetic value = 0.93) shows a very good fit between the Euclidean distances of the data and the dendrogram distances. The more stable cut of this dendrogram (Fig. 3) allowed a classification of tomato fruits into five groups (outlined in Fig. 4) according firstly to sweetness and VITC content, secondly to acid composition and thirdly to minor compounds (FA and S). Two of these groups (the one formed by control Guadajira (2) and the one formed by UPV-16898 (10) and UPV-16896 (14) accessions) became evident during the former general classification. Two other groups agree with the former sub-groups made up of UPV-14384 (18) and UPV-14382 (19) *L. esculentum* Mill. accessions. The last group is formed by six controls and seven accessions showing similar or poorer characteristics than controls.

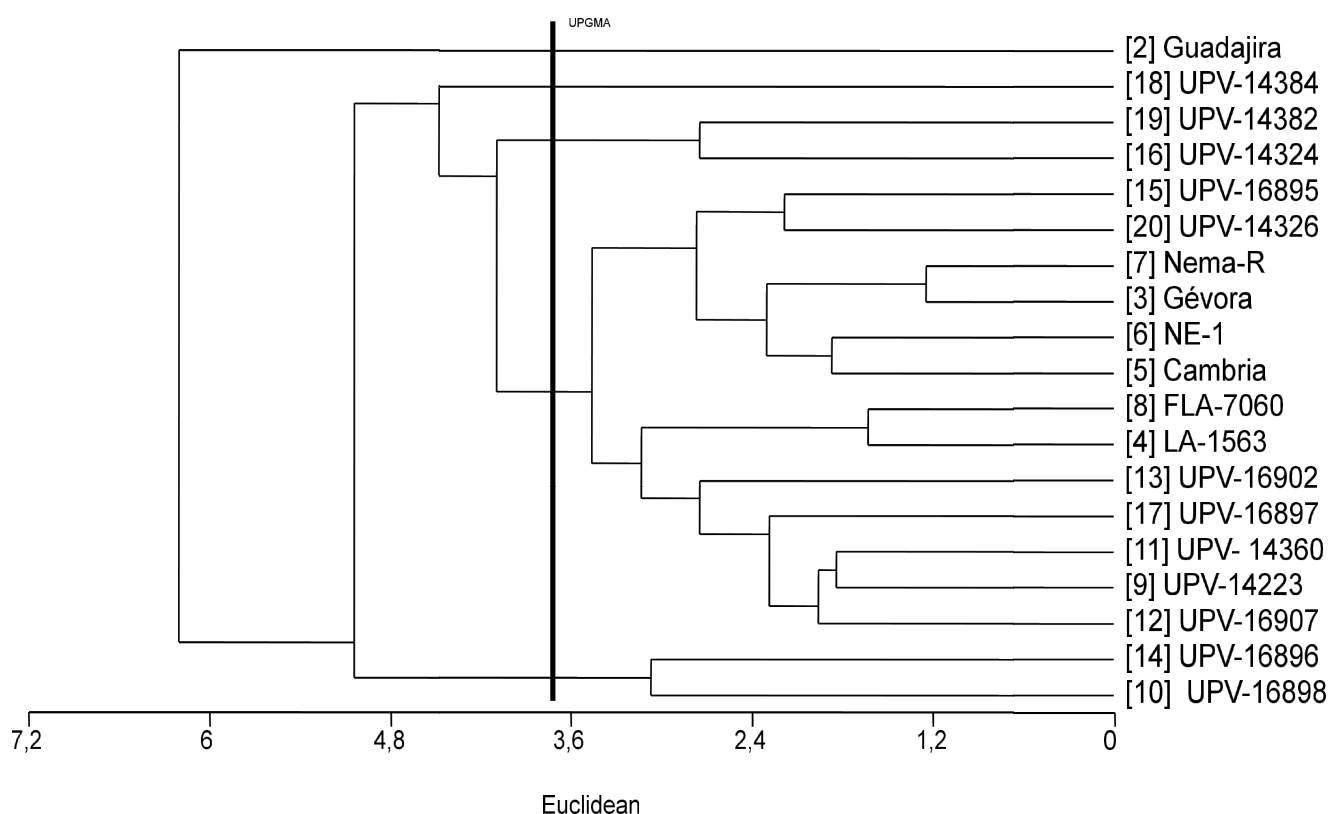


Fig 3. Dendrogram of the *L. esculentum* Mill. varieties using the UPGMA criterion method.

Table 5: Correlation coefficients between the variables and the three first principal components on the analysis performed on only the accessions of *L. esculentum* Mill.

Variables	PC1	PC2	PC3
DM	0,97	0,06	0,06
SSC	0,89	-0,05	0,28
TS	0,71	0,27	0,41
F	0,82	-0,41	-0,08
G	0,87	-0,35	-0,01
S	0,26	-0,23	-0,71
pH	-0,12	-0,59	0,49
TA	0,50	0,64	0,02
CA	-0,04	0,91	-0,07
MA	0,14	0,69	0,42
OA	0,03	0,67	-0,03
FA	0,33	-0,09	-0,80
VITC	0,83	0,09	-0,15
PS	0,39	0,36	-0,45
TP	0,50	-0,32	0,40
Variance explained (%)	35	21	15

Discussion

In this work we present similar variable correlations between general determinations and quantitations of individual compounds to those observed in previous studies (Stevens et al., 1977), but complementary conclusions can be added. Our results suggest that some accessions accumulate important quantities of acids other than CA, MA, OA and FA or sugars other than G, F and S because the TA value or TS content show higher values than individual acid or sugar additions. Further work is needed in order to identify and quantify the other acids and sugars present in the tomato in order to complete the characterization of *Lycopersicon* sugar and acid profiles.

The results shown suggest that all the variables taken into account on this work, except the PS, are good keys to characterize internal quality properties in red fruited accessions of subgenus *Eulycopersicon*. The multivariate statistical techniques used are suitable tools for examining affinities and differences on the accessions studied and for grouping them based on variables responsible for either sweetness, sourness, flavor intensity or nutritional value (VITC).

Nevertheless, the environment greatly influences the content of some compounds involved in flavor intensity (Davies and Hobson, 1981, Paterson et al., 1991). Consequently, for a finer interpretation of the characterization results, comparison between accession and control behavior are needed. The results of these comparisons show that five of the *L. pimpinellifolium* (Jusl.) Mill. accessions tested can be very interesting for use in breeding for internal quality characteristics. UPV-17049 (25) is the most interesting accession because it shows the highest flavor intensity characteristics

(around 625% higher flavor intensity than Cambria (5), the best *L. esculentum* Mill. control, and about a 175% higher flavor intensity than LA-530 (1), the *L. cheesmanii* Riley control). UPV-14974 (24) accession has similar characteristics but it has slightly lower flavor intensity (425% higher than Cambria (5) and 27% lower than LA-530(1)) and no MA content. These two accessions are good sources of high flavor intensity and well-balanced taste. Moreover, they are interesting because of their relatively high VITC content (53% higher than LA-1563 (4), the best control). The accession UPV-16903 (28) also has a high flavor intensity value (535% higher than Cambria (5) and 84% higher than LA-530 (1)) and medium-to-high VITC content (38% higher than the best control). This accession is a good source of high flavor intensity and acid taste. UPV-14345 (22) and UPV-14344 (23) accessions have similar flavor intensity characteristics to UPV-14974 (24) but its VITC content is comparable to the controls, however they show sweet taste.

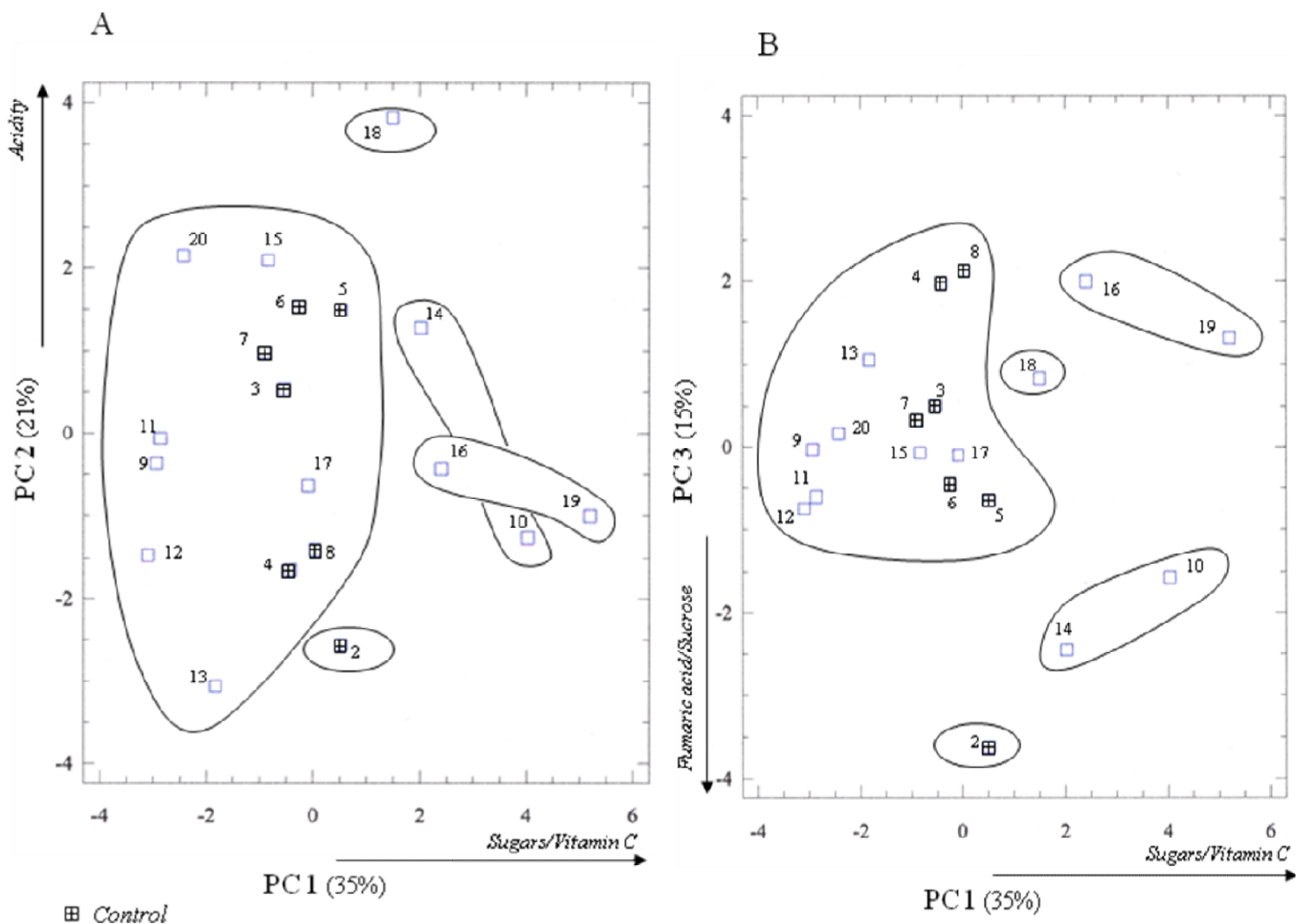


Fig 4. Plot of the *L. esculentum* Mill. accessions projected on the reduced spaces of the first and second principal components and of the first and third principal components. Groups are derived from a separate cluster analysis

It seems interesting to underline the usefulness of the methodology of the study that has shown the very good behavior of some of the *L. pimpinellifolium* (Jusl.) Mill. accessions selected in comparison to the *L. cheesmanii* Riley control. *L. cheesmanii* Riley accessions, specially those from the *minor* form, which have traditionally been considered very good variability sources for internal quality breeding programs because of their higher SSC (Hewitt and Garvey, 1987; Garvey and Hewitt, 1991, 1992). For this reason we chose a high SSC *L. cheesmanii* Riley accession (LA-530 (1)) as control. In our study, all the *L. pimpinellifolium* (Jusl.) Mill. accessions tested have lower SSC than *L. cheesmanii* Riley control, but the wide characterization carried out had shown that two of them have really higher flavor intensity characteristics. Moreover, these *L. pimpinellifolium* (Jusl.) Mill. accessions could be a better source to begin a breeding program because this is the species phylogenetically nearest to *L. esculentum* Mill. and it permits quicker recovering of agronomic traits.

Some of the *L. esculentum* Mill. accessions tested with higher flavor intensity than controls (higher than 120% than Cambria (5)) could be useful in advanced stages of breeding programs. UPV-14382 (19) accession show a medium-to-high flavor intensity value (238% higher than Cambria (5)) and, a slightly sweet taste. UPV-16898 (10) accessions have interesting VITC content (63% higher than LA-1563 (4), the best *L. esculentum* Mill. control) and relatively high S and FA contents. UPV-14384 (18) accessions have very high CA (24% higher than Cambria (5)) and MA content (54% higher than LA-1563 (4)).

Nevertheless, it is important to take into account that UPV-16903 (28), UPV-17049 (25), UPV-14384 (18), UPV-14974 (24) and UPV-14345 (22) accessions have an OA content higher than controls, specially UPV-16903 (28). From the nutritional point of view, the main problem which arises for high OA content is the bioavailability of calcium in the alimentary ration (Gül et al., 1996). Although OA content in tomato fruit should be considered together with calcium content in order to determine their bioavailability and, consequently, selecting the best accessions for their use in internal quality breeding programs.

In conclusion, the deep analytical characterization employed proved to be useful for selecting interesting donor parents according to their usefulness for internal quality breeding programs. Nevertheless, identification of other sugars and acids present in *Lycopersicon* germplasm could be interesting for additional research in order to obtain wider characterization of tomato flavor characteristics.

Literature Cited

- Ahmed, A.E.R., J.M. Labavitch. 1977. A simplified method for accurate determination of cell wall uronide content. *J. Food Biochem.* 1: 361-367.
- Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official methods of analysis. 15th ed. K. Herlich, (ed).; Arlington, Virginia.
- Baldwin, E.A., J.W. Scott, M.A. Einstein, T.M.M. Malundo, B.T. Carr, R.L. Shewfelt, K.S. Tandon. 1998. Relationship between sensory and instrumental analysis for tomato flavor. *J.Amer.Soc.Hort.Sci.* 123:906-915.
- Bisogni, C.A., G. Armsbruster, P.E. Brecht. 1976. Quality comparisons of room ripened and field ripened tomato fruits. *J. Food Sci.* 41: 333-338.
- Blumenkrantz, N., G. Asboe-Hansen. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54: 484-489.
- Davies, J.N., G.E. Hobson. 1981. The constituents of tomato fruit – the influence of environment, nutrition and genotype. *CRC Crit. Rev. Food Sci.Nutr.* pp. 205-280.
- Everitt, B. 1980. Cluster analysis. Halsted Press, New York.
- Garvey T.C., J.D. Hewitt. 1991. Starch and sugar accumulation in two accessions of *Lycopersicon cheesmanii*. *J.Amer.Soc.Hort.Sci.* 116: 77-79.
- Garvey T.C., J.D. Hewitt. 1992. Use of molecular markers to locate quantitative trait loci linked to high soluble solids content in a hybrid of *Lycopersicon cheesmanii*. *J.Amer.Soc.Hort.Sci.* 117: 497-499.
- Güil, J.L., M.E. Torija, J.J. Gimenez, I. Rodriguez-García, A. Giménez. 1996. Oxalic acid and calcium determination in wild edible plants. *J.Agric.Food.Chem.* 44: 1821-1823.
- Hewitt J.D., T.C. Garvey. 1987. Wild sources of high soluble solids, p. 45-54. In: D.J. Nevins and R.A. Jones (eds.). *Plant Biology*, vol. 4: Tomato biotechnology. Liss, New York.
- Hobson, G., D. Grierson, 1993. Tomato, p. 405-441. In: G. Seymour, J. Taylor, G. Tucker (eds.). *Biochemistry of fruit ripening*. Chapman and Hall, London.
- Mollá, E., M. M. Cámara, C. Díez, M.E. Torija. 1994. Estudio de la determinación de azúcares en frutas y derivados. *Alimentaria*. Jul-Agost, 87-93.
- Osborne, D.R., P. Voogt. 1986. Análisis de los nutrientes de los alimentos. Acribia, Zaragoza (Spain).
- Paterson A.H., S. Damon, J.D. Hewitt, D. Zamir, H.D. Rabinowitch, S.E. Lincoln, E.S. Lander, S.D. Tanksley. 1991. Mendelian factors underlying quantitative traits in

- tomato: comparison across species, generations and environments. *Genetics* 127: 181-197.
- Romesburg, H.C. 1984. *Cluster analysis for researchers*. Lifetime Learning, Belmont, CA,
- Sánchez-Mata M.C., M. Cámara Hurtado, S. Roselló Ripollés, L. Galiana-Balaguer, M.E. Torija Isasa, F. Nuez Viñals. 2000. Breeding for flavour of fresh market tomato: sources for increasing acid content. *Acta Physiologiae Plant.*, 22: 250-253.
- Sokal, R. R., F. J. Rohlf. 1995. *Biometry*. 3th ed. W.H. Freeman, New York.
- Stevens, M.A. 1972. Relationships between components contributing to quality variation among tomato lines. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 97: 70-73.
- Stevens M.A., M.A. Long 1971. Inheritance of malate in tomatoes. *J.Amer.Soc.Hort.Sci.* 96: 20-122.
- Stevens, M.A., A.A. Kader, M. Albright-Holton. 1979. Potential for increasing tomato flavor via increased sugar and acid content. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 104: 40-42.
- Stevens, M.A., A.A. Kader, M. Albright-Holton, M. Algazi. 1977. Genotypic variation for flavor and composition in fresh market tomatoes. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 102: 680-689.
- Triano S.R., D.A. St. Clair. 1995. Processing tomato germplasm with improved fruit soluble solids content. *HortScience* 30: 1477-1478.
- Vázquez Odériz, M.L., M.E. Vázquez Blanco, J. López Hernández, J. Simal Lozano, M.A. Romero Rodríguez. 1994. Simultaneous determination of organic acids and vitamin C in green beans by Liquid Chromatography. *J. AOAC Int.* 77: 1056-1059.
- Yelle S., R.T. Chetelat, M. Dorais, J.W. De Verna, A.B. Bennett. 1991. Sink metabolism in tomato fruit. *Plant Physiol.* 95: 1026-1035.

CAPÍTULO 4:

Characterization and selection of balanced sources of variability for breeding tomato (*Lycopersicon*) internal quality.

Galiana-Balaguer, L., Rosello, S., Nuez, F. (2006).

Genetic Resources and Crop Evolution, 53(5), 907-923.

Characterization and selection of balanced sources of variability for breeding tomato internal quality

L. Galiana-Balaguer¹, S. Roselló², F. Nuez^{1*}

Abstract. Tomato breeders have hitherto selected for yield, uniformity and disease resistance rather than for internal qualities such as taste that depend on appropriate amounts and proportions of many different constituents. In order to improve internal quality it is necessary to find balanced donor parents with high contents of these individual constituents in order to develop this strategy. A methodology to evaluate all constituents together is also necessary. This work characterizes and classifies accessions of *Lycopersicon* to assist the selection of parents for several internal qualities. Thirty-eight accessions of *L. esculentum*, *L. pimpinellifolium*, *L. hirsutum*, *L. pennellii* and *L. peruvianum* have been studied, and their taste and vitamin C content characteristics have been measured. Some of the variables studied are complex since many chemical constituents are involved (pH, °Brix (SSC), titratable acidity), whereas other variables are individual constituents (vitamin C, oxalic acid, malic acid, citric acid, fructose, glucose and sucrose). Therefore, individual taste components in *Lycopersicon* accessions have been analyzed by using precise analytical techniques (capillary zone electrophoresis) and statistical methods (principal component, cluster and GGE biplot analyses) for comparisons to be made not only among these, but also among controls (four breeding lines and one commercial hybrid). All analyses performed have allowed both for a good classification and for a selection of materials to be made. Two *L. pimpinellifolium* accessions are very interesting to use as donor parents in the first steps of tomato taste breeding programmes, since they are balanced and have shown three times the taste intensity of controls. Furthermore, characterization by individual constituents (citric, malic, oxalic and ascorbic acids, glucose, fructose, sucrose, etc) has been found to be a precise tool to classify and select *Lycopersicon* germplasm for internal quality attributes.

Key words. *Lycopersicon*, tomato germplasm, chemical composition, sugars, organic acids, vitamin C, multivariate analysis, capillary electrophoresis.

¹ Centro de Conservación y Mejora de la Agrobiodiversidad Valenciana (COMAV). Universitat Politècnica de València. Cno. Vera, 14. 46022 Valencia, Spain.

² Dpto. Ciencias Experimentales, Producción Vegetal, Universitat Jaume I, Campus de Riu Sec, 12071 Castellón de la Plana, Spain

* Corresponding author, e-mail: fnuez@btc.upv.es

High yield, disease resistance, uniform fruit size and colour have been priority objectives in tomato breeding programmes (Baldwin et al., 1998). Successful progress has been made in this way whereby productive and resistant cultivars and hybrids with uniform attractive tomatoes have been obtained. Nevertheless, focusing breeding programmes on such objectives has resulted in new varieties with diminished flavour quality. Flavour is a complex character as it depends on many constituents. However, unlike high yield, it does not have a single expression. In addition, internal quality is very subjective, because it depends on customers' preferences, which may change with nationality and it can only be assessed after eating the tomatoes once they have been bought, therefore it is a secondary purchase criterion, while external quality is the first primary criterion. The complexity and the multiplicity of expression of the "good internal quality" characters means that breeding programmes for high internal quality are assumed to be long, difficult and very laborious (Scott 2002). Additionally, the short life time of new cultivars in the seed market (which means that recovering these characteristics in short breeding programmes proves to be more difficult) and the priority of other breeding objectives, have delayed tomato internal improvement. However, nowadays flavour and nutritive characteristics are increasingly important for consumers who are constantly becoming more demanding. Studies on consumers' expectations have been carried out (Baldwin et al., 1998; Scandella et al., 2002; Vesseur 1990; Wolters and Gemert 1990), and more tasty and nutritive tomatoes have been found to be preferred. For this reason, internal quality is now a breeding objective that must be attained.

Tomato flavour is directly related to its chemical composition. It is determined by two main groups of constituents, soluble solids and aromas (Stevens et al., 1977). Tomato taste intensity is mainly conditioned by soluble solids (sugars, organic acids, minerals) (Bucheli et al., 1999; Krumbein and Auerswald 1998), while aroma substances (more than thirty compounds) clearly affect odour and flavour perception in tomatoes (Baldwin et al., 1998; Krumbein et al., 1999). The nutritional value in tomatoes is related to the high content of antioxidants (mainly vitamin C (vitC) and carotenoids), since they prevent certain cancers (Byers and Guerrero 1995; Girija et al., 1996; Jamison et al., 2001; Knekt 1993; O' Toole and Lombard 1996; Webb et al., 1997; You et al., 2000), cardiovascular disease (Gey 1993; Libby and Aikawa 2002; Marchioli et al., 2000) and neurological disorders (Behl et al., 1992; Fahn and Cohen 1992; Lee et al., 2001; Olanow 1990). The nutritional value is also related to low content of oxalic acid (OA), as that diminishes the bio-availability of calcium in the alimentary canal (Gül et al., 1996).

The large numbers of components involved in the flavour and nutritional value of tomatoes, their different relative contributions to these characters and the difficulties in quantifying some of them quickly and precisely for a great number of samples have led to pursuing the breeding for internal quality of tomato by a series of successive steps. Breeders started by increasing the flavour (soluble solids) or the nutritional compounds (vitC) that could be determined more easily in a large number of samples, and continued subsequently with other flavours and nutritive compounds which are more difficult to quantify.

The soluble solid content in tomatoes represents around 60 % of dry matter in ripe fruits and this is fundamentally due to reducing sugars (fructose (F) and glucose (G)), acids (citric (CA) and malic acid (MA) mainly) minerals and other components such as vitC (Baldwin et al., 1991; Baldwin et al., 1998; Bucheli et al., 1999; Yelle et al., 1991). The higher the amount of sugars and organic acids there are, the higher the tomato taste intensity will be perceived (Bucheli et al., 1999; Stevens et al., 1977). However, there is a level in the acid / sugar ratio which, once it is exceeded makes the taste perceived worse (Malundo et al., 1995). Hence, breeding programmes which have been looking for good tasting accessions have tried to increase those components by focusing on soluble solid content (SSC, i.e. °Brix), titratable acidity (TA) and pH (Hewitt and Garvey 1987; Triano and St Clair 1995). Nevertheless, these scientists have pointed out that selection by these characteristics is inefficient, as those characteristics are the result of many individual chemical constituents: sweetness is related to SSC and to reducing sugars, while sourness is related to soluble solid content, pH and TA (organic acids) (Baldwin et al., 1998; Stevens et al., 1977; Stevens et al., 1979). In fact, those general characteristics seem to have polygenic control which gives rise to great variation in descendants that do not show simply heritable traits (for example, the many QTLs involved) (Fulton et al., 2002; Saliba Colombani et al., 2001). On the contrary, contents of some individual constituents (MA, CA and sucrose (S)) seem to be controlled by single loci (Stevens and Long 1971; Stevens 1972; Stommel and Haynes 1993; Yelle et al., 1991). Obviously if the monogenic control was confirmed in further studies, a high-content selection in individual traits would be more efficient. This would allow different breeding lines to be developed with higher contents of individual constituents in order to obtain either the desirable taste profile or nutritive compounds in commercial hybrids, and furthermore to obtain lines with different taste nuances or nutritive contents.

According to what has been stated, it is apparently clear that breeding for individual compounds would be a more efficient way to improve taste quality and vitC content. Nowadays these tomato constituents can be measured relatively quickly and accurately by analytical methods (twenty-five minutes for simultaneous sugar and organic acid determinations, and three minutes for vitC determination) (Galiana-Balaguer et al., 2001; Roselló et al., 2002). This leads to quantifying individual components more easily and precisely. Nevertheless, we need to consider the content of individual internal quality components together in order to make a balanced selection which would cut down on breeding programme times. For this strategy, donor parents with high and balanced taste constituents are highly desirable, and more so if an appropriate ratio between constituents should be accomplished. However, little work has been done regarding this approach and there is not much information available about *Lycopersicon* germplasm characterization and classification according to taste constituents (Fernández-Ruiz et al., 2004).

Therefore the object of the present study is to:

- i) state a characterization method for *Lycopersicon* accessions as a preliminary step for taste intensity and high vitC content breeding programmes;

ii) provide tools to select interesting and balanced accessions of species of *Lycopersicon* for these traits, at a stage where panellist assessment is not possible (it would mean assessing too many samples and would involve too much money; in addition, some fruits are inedible); however, panellist assessments must be carried out to relate chemical composition to taste intensity properties;

iii) study whether characterization by individual compounds, which can be measured more precisely, will enable removal of the characteristics involved (SSC, pH and TA), then these characteristics may only be used to relate current results to previous works.

Materials and Methods

Plants.

Twelve accessions of *L. esculentum* Mill., two accessions of *L. esculentum* var. *cerasiforme* (Dun.) Gray, thirteen accessions of *L. pimpinellifolium* (Jusl.) Mill., seven accessions of *L. hirsutum* Humb.& Bonpl., two accessions of *L. pennellii* (Corr.) D'Arcy, and two accessions of *L. peruvianum* (L.) Mill. have been studied (Table 1). They were collected in Peru, Ecuador and Spain by the COMAV team (Centro de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana, Universitat Politècnica de València, Spain). Also five controls were used in order to make breeding and cultivated materials available for comparison: three of them are experimental lines ('FLA 7060', 'NE-1', and 'NEMA-R'), one is a processing tomato variety ('Gévora') and another is a commercial hybrid ('Cambria').

Table 1. *Lycopersicon* lines and accessions studied (the first half are subgenus *Eulycopersicon* species and the second half are subgenus *Eriopersicon* species).

Code	Species	Line or accession	Origin (Country)	Collection place altitude (a.s.l.')
1	<i>L. esculentum</i>	CAMBRIA	Seminis Vegetable Seeds (Spain)	---
2	<i>L. esculentum</i>	FLA7060	Seminis Vegetable Seeds (Spain)	---
3	<i>L. esculentum</i>	Gévora	Seminis Vegetable Seeds (Spain)	---
4	<i>L. esculentum</i>	NE-1	Universitat Politècnica de València (Spain)	---
5	<i>L. esculentum</i>	Nema-R	SIDT. Extremadura (Spain)	---
6	<i>L. esculentum</i>	UPV-3799	Alicante (Spain)	43
7	<i>L. esculentum</i>	UPV- 3810	Valencia (Spain)	---
8	<i>L. esculentum</i>	UPV- 3812	Valencia (Spain)	---
9	<i>L. esculentum</i>	UPV- 14223	Loja (Ecuador)	1.600
10	<i>L. esculentum</i>	UPV- 14324	El Oro (Ecuador)	1.325
11	<i>L. esculentum</i>	UPV- 14360	Azuay (Ecuador)	1.490
12	<i>L. esculentum</i>	UPV- 15032	Valencia (Spain)	---
13	<i>L. esculentum</i>	UPV- 16895	Loja (Ecuador)	950
14	<i>L. esculentum</i>	UPV- 16896	Loja (Ecuador)	950
15	<i>L. esculentum</i>	UPV- 16897	Loja (Ecuador)	950
16	<i>L. esculentum</i>	UPV- 18263	Azuay (Ecuador)	1.193
17	<i>L. esculentum</i>	UPV- 18278	Morona-Santiago (Ecuador)	---
18	<i>L. esculentum</i> var. <i>cerasiforme</i>	UPV- 14828	(Brazil)	---

Table 1 (cont.). *Lycopersicon* lines and accessions studied (the first half are subgenus *Eulycopersicon* species and the second half are subgenus *Eriopersicon* species).

Code	Species	Line or accession	Origin (Country)	Collection place altitude (a.s.l. ²)
19	<i>L. esculentum</i> var. <i>cersaiforme</i>	UPV- 14829	(Brazil)	---
20	<i>L. pimpinellifolium</i>	UPV- 14345	Cañar (Ecuador)	250
21	<i>L. pimpinellifolium</i>	UPV- 16948	Piura (Peru)	100
22	<i>L. pimpinellifolium</i>	UPV- 16950	Piura (Peru)	110
23	<i>L. pimpinellifolium</i>	UPV- 16952	Piura (Peru)	175
24	<i>L. pimpinellifolium</i>	UPV- 16956	Piura (Peru)	160
25	<i>L. pimpinellifolium</i>	UPV- 16959	Piura (Peru)	225
26	<i>L. pimpinellifolium</i>	UPV- 16967	Piura (Peru)	30
27	<i>L. pimpinellifolium</i>	UPV- 16970	Piura (Peru)	150
28	<i>L. pimpinellifolium</i>	UPV- 16974	Lambayeque (Peru)	325
29	<i>L. pimpinellifolium</i>	UPV- 16975	Lambayeque (Peru)	220
30	<i>L. pimpinellifolium</i>	UPV-17035	Lambayeque (Peru)	230
31	<i>L. pimpinellifolium</i>	UPV- 17037	Piura (Peru)	25
32	<i>L. pimpinellifolium</i>	UPV- 18242	Loja (Ecuador)	1.850
33	<i>L. hirsutum</i>	UPV- 16918	Loja (Ecuador)	1.600
34	<i>L. hirsutum</i>	UPV- 16921	Loja (Ecuador)	1.600
35	<i>L. hirsutum</i>	UPV- 16924	Loja (Ecuador)	2.250
36	<i>L. hirsutum</i>	UPV- 16933	Piura (Peru)	2.200
37	<i>L. hirsutum</i>	UPV- 17041	Piura (Peru)	800
38	<i>L. hirsutum</i>	UPV- 17042	Loja (Ecuador)	2.250
39	<i>L. hirsutum</i>	UPV- 18258	Azuay (Ecuador)	1.690
40	<i>L. pennellii</i>	UPV- 16942	Piura (Peru)	80-100
41	<i>L. pennellii</i>	UPV- 16946	Piura (Peru)	80-100
42	<i>L. peruvianum</i>	UPV-18264	Azuay (Ecuador)	2.355
43	<i>L. peruvianum</i>	UPV- 18265	Azuay (Ecuador)	2.400

² a.s.l.: m above sea level

Experimental design and growing conditions. Twelve plants of each accession were grown at the appropriate temperatures (25-35 °C / 15-20 °C, day / night) under greenhouse conditions, and were watered and fertilized for suitable production in the Spring-Summer cycle in Valencia, Spain. Environmental variability was reduced by means of a completely randomized block design (three blocks of four plants for each accession).

Sampling.

Several fruits were harvested for each sample: a minimum of five tomatoes for the large-fruited accessions (approximately 100 g each); around one hundred and twenty fruits for the small-fruited accessions (approximately 0.5 g each). The fruits were collected from the first to third floral trusses at the completely ripe stage. Fresh fruits from each accession were pooled together.

Analytical Determinations.

Fruits were homogenized in a laboratory blender. The content of soluble solids was determined with an optical refractometer (ATAGO-N1 Tokyo, Japan), and the results were reported as °Brix at 20 °C. Aliquots were taken to analyze TA and to measure pH. TA was measured by titration with NaOH and phenolphthalein, and the results were expressed as NaOH 0.1 M ml · kg⁻¹ (AOAC 1990). The pH was determined by a pH meter. Another portion of homogenized fruits was frozen for sugar and organic acid determinations. A last aliquot was frozen in 2 % of metaphosphoric acid for vitC analysis. Sugars (F, G and S), organic acids (OA, MA and CA) and vitC were quantified by Capillary Zone Electrophoresis (Galiana-Balaguer et al., 2001; Roselló et al., 2002). Each value is the average of three determinations (Table 2).

Instrumentation.

A P/ACE System MDQ (Beckman Instruments, Fullerton, CA) was used for Capillary Electrophoresis analysis, controlled by a Beckman P/ACE System MDQ Version 2.3 with an IBM computer.

Statistical methods.

Correlations have been calculated in order to evaluate relations between variables and how these may affect subsequent analyses. The correlation coefficients were then transformed using $z_{ij} = \frac{1}{2} \log_e \left\{ \frac{(1+r_{ij})}{(1-r_{ij})} \right\}$, and a probability plot was drawn with those transformed values in order to discover if any significant correlations existed (Krzanowski 2000). If significant correlations had occurred, variables could have been transformed to avoid these.

Principal Component (PC) analyses with standardized data were performed to reduce the number of variables and to identify underlying relations between variables that could be associated with internal quality characteristics. The number of PCs which can explain enough variation can be decided by simultaneously using two criteria: on the one hand, the subjective commonly accepted criterion to consider the minimum number of PCs, which explains at least 75 % of the available variation; and on the other hand, to consider those components whose eigenvalues l_i of the covariance matrix are greater than one (Krzanowski 2000).

Cluster analysis was performed to study the grouping between accessions and to classify them. An agglomerative hierarchical cluster analysis by the unweighted pair-group method, based on arithmetic averages (UPGMA) and on euclidean distances, was used. The maximization of the resemblance coefficient range was used as a classification criterion, as a wide range indicates that the clusters are well separated in the attribute space. If however the maximization occurs in either the first or last clustering step, they are excluded in this classification as they are uninformative (Romesburg 1984). The goodness-of-fit of the cluster analysis to the data was tested by the cophenetic correlation coefficient (Sokal and Rohlf 1995).

Table 2 Determinations for *Lycopersicon* accessions or lines analyzed (mean ± standard error)

Code	Accession or line	° Brix	pH	TA ^a (mL·kg ⁻¹ FW)	vitC ^b (mg·kg ⁻¹ FW)	OA (g·kg ⁻¹ FW)	MA (g·kg ⁻¹ FW)	CA (g·kg ⁻¹ FW)	F (g·kg ⁻¹ FW)	G (g·kg ⁻¹ FW)	S (g·kg ⁻¹ FW)	TS ^c (g·kg ⁻¹ FW)
1	CAMBRIA	5.8 ± 0.1	4.7 ± 0.1	811.4 ± 10.1	219.6 ± 0.1	0.24 ± 0.0	0.50 ± 0.1	2.79 ± 0.1	12.17 ± 1.8	13.82 ± 0.7	1.57 ± 0.0	30.57 ± 3.3
2	FLA7060	5.4 ± 0.1	4.8 ± 0.1	600.1 ± 11.8	207.0 ± 12.6	0.39 ± 0.0	3.36 ± 0.2	1.81 ± 0.1	18.79 ± 0.2	19.87 ± 0.3	ND	43.65 ± 0.5
3	Gevora	5.2 ± 0.1	4.7 ± 0.1	871.4 ± 90.9	171.5 ± 4.6	0.27 ± 0.1	0.95 ± 0.1	4.34 ± 0.1	14.17 ± 0.5	13.74 ± 0.2	4.35 ± 0.1	36.34 ± 0.4
4	NE-1	5.3 ± 0.1	4.4 ± 0.4	1122.9 ± 51.8	162.4 ± 9.7	0.39 ± 0.1	0.79 ± 0.0	5.03 ± 0.1	13.55 ± 0.1	12.76 ± 0.2	3.74 ± 0.2	34.03 ± 0.3
5	Nema-R	5.5 ± 0.1	4.5 ± 0.2	952.9 ± 66.2	154.0 ± 0.6	0.48 ± 0.1	1.10 ± 0.0	3.90 ± 0.5	13.53 ± 0.3	13.50 ± 1.6	ND	30.82 ± 1.6
6	UPV-3799	8.6 ± 0.3	4.3 ± 0.2	1310.3 ± 150.1	232.6 ± 74.1	0.44 ± 0.0	6.35 ± 0.2	0.68 ± 0.0	25.79 ± 0.7	24.60 ± 0.4	3.56 ± 0.2	61.45 ± 1.6
7	UPV-3810	4.8 ± 0.1	4.8 ± 0.1	454.3 ± 0.2	116.0 ± 2.0	0.43 ± 0.0	2.39 ± 0.1	1.61 ± 0.0	23.52 ± 1.3	24.31 ± 1.9	1.84 ± 0.0	56.07 ± 3.4
8	UPV-3812	5.1 ± 0.1	4.9 ± 0.1	539.7 ± 36.4	83.3 ± 1.7	0.86 ± 0.1	1.36 ± 0.1	4.56 ± 0.3	17.90 ± 1.5	17.97 ± 1.3	3.49 ± 0.0	44.36 ± 3.2
9	UPV-14223	4.4 ± 0.1	4.8 ± 0.1	443.6 ± 0.9	145.0 ± 0.8	0.34 ± 0.0	1.46 ± 0.1	8.73 ± 0.2	35.58 ± 0.2	22.65 ± 0.3	2.02 ± 0.0	73.32 ± 0.5
10	UPV-14324	4.5 ± 0.3	5.0 ± 0.2	396.8 ± 15.3	174.4 ± 39.9	0.79 ± 0.4	1.20 ± 0.6	7.40 ± 1.9	33.55 ± 9.7	27.01 ± 10.4	1.79 ± 0.1	73.32 ± 17.8
11	UPV-14360	5.8 ± 0.1	4.8 ± 0.1	418.4 ± 6.5	170.0 ± 0.0	0.27 ± 0.0	0.48 ± 0.1	1.40 ± 0.2	4.04 ± 0.5	4.96 ± 0.5	1.54 ± 0.0	11.45 ± 1.2
12	UPV-15032	6.1 ± 0.1	4.6 ± 0.1	651.9 ± 22.1	174.2 ± 5.5	0.73 ± 0.2	1.47 ± 0.0	5.16 ± 0.1	30.76 ± 0.3	35.90 ± 1.9	ND	74.04 ± 1.9
13	UPV-16895	5.4 ± 0.1	4.6 ± 0.1	612.3 ± 18.3	229.2 ± 2.5	0.36 ± 0.0	1.06 ± 0.0	6.17 ± 0.2	19.39 ± 0.5	22.11 ± 0.3	2.36 ± 0.1	48.64 ± 0.9
14	UPV-16896	5.5 ± 0.1	4.8 ± 0.1	463.3 ± 5.8	326.5 ± 3.1	0.32 ± 0.1	0.92 ± 0.1	3.87 ± 0.2	13.33 ± 3.1	14.38 ± 3.7	1.57 ± 0.1	32.77 ± 7.5
15	UPV-16897	5.0 ± 0.1	4.8 ± 0.1	442.2 ± 18.0	207.9 ± 1.3	0.54 ± 0.1	0.99 ± 0.0	3.52 ± 0.3	16.02 ± 1.2	18.84 ± 2.5	ND	38.67 ± 3.7
16	UPV-18263	6.2 ± 0.1	4.7 ± 0.1	519.8 ± 6.1	125.7 ± 1.3	0.40 ± 0.0	1.17 ± 0.1	10.70 ± 0.1	55.03 ± 7.4	33.28 ± 3.0	ND	108.94 ± 8.9
17	UPV-18278	3.7 ± 0.1	4.6 ± 0.1	517.7 ± 8.6	253.1 ± 11.5	0.40 ± 0.0	0.48 ± 0.0	4.03 ± 0.0	11.86 ± 0.7	10.60 ± 0.1	ND	26.08 ± 1.1
18	UPV-14828	5.3 ± 0.1	4.9 ± 0.1	465.4 ± 41.9	211.3 ± 12.4	0.52 ± 0.2	3.44 ± 0.0	2.01 ± 0.0	9.24 ± 0.0	6.61 ± 0.4	ND	19.06 ± 0.4
19	UPV-14829	6.4 ± 0.1	4.1 ± 0.1	1545.9 ± 48.2	295.8 ± 3.6	0.37 ± 0.0	0.95 ± 0.0	8.45 ± 0.2	17.39 ± 0.2	5.98 ± 0.2	4.01 ± 0.1	35.00 ± 0.2
20	UPV-14345	6.7 ± 0.1	4.7 ± 0.1	1273.3 ± 30.9	322.7 ± 14.9	0.28 ± 0.1	1.68 ± 0.4	7.21 ± 0.5	11.46 ± 4.0	10.09 ± 1.9	ND	25.09 ± 7.4
21	UPV-16948	8.3 ± 0.1	4.8 ± 0.1	1246.8 ± 41.2	91.9 ± 6.9	0.99 ± 0.0	7.38 ± 0.3	2.37 ± 0.0	9.86 ± 2.1	6.92 ± 0.3	ND	20.24 ± 2.9
22	UPV-16950	11.1 ± 0.1	4.7 ± 0.1	1290.4 ± 39.8	306.2 ± 16.4	1.10 ± 0.2	10.66 ± 2.5	1.54 ± 0.3	44.43 ± 9.2	44.82 ± 10.6	2.91 ± 0.0	104.51 ± 19.6
23	UPV-16952	7.0 ± 0.1	4.5 ± 0.1	1070.1 ± 14.7	200.8 ± 0.4	0.51 ± 0.0	7.17 ± 0.7	2.50 ± 0.0	9.46 ± 0.4	4.53 ± 0.5	ND	17.82 ± 1.0
24	UPV-16956	5.4 ± 0.1	4.6 ± 0.1	816.5 ± 30.8	148.1 ± 35.3	0.47 ± 0.0	4.25 ± 0.1	0.92 ± 0.1	10.67 ± 0.4	7.78 ± 0.1	14.85 ± 2.5	36.98 ± 3.1
25	UPV-16959	6.4 ± 0.1	4.5 ± 0.1	1015.7 ± 22.1	267.5 ± 10.2	0.18 ± 0.0	1.18 ± 0.0	3.64 ± 0.1	6.94 ± 0.5	4.90 ± 0.2	1.54 ± 0.1	15.80 ± 0.9
26	UPV-16967	11.4 ± 0.1	4.9 ± 0.1	949.2 ± 26.3	12.6 ± 7.5	0.56 ± 0.0	7.97 ± 0.5	6.64 ± 0.1	6.35 ± 0.4	1.62 ± 0.3	ND	10.89 ± 1.4
27	UPV-16970	6.6 ± 0.1	4.8 ± 0.1	1287.0 ± 15.9	242.0 ± 2.0	0.41 ± 0.0	9.29 ± 0.6	3.17 ± 0.1	5.76 ± 0.2	2.06 ± 0.1	ND	10.32 ± 0.3
28	UPV-16974	9.7 ± 0.1	4.9 ± 0.1	1247.7 ± 49.1	53.2 ± 16.2	0.48 ± 0.1	6.36 ± 0.2	4.59 ± 0.2	11.97 ± 0.1	4.31 ± 0.2	ND	21.48 ± 0.0
29	UPV-16975	8.4 ± 0.1	4.6 ± 0.1	1266.0 ± 36.6	505.5 ± 8.5	0.74 ± 0.0	4.94 ± 0.4	1.86 ± 0.0	16.73 ± 0.8	4.68 ± 0.6	2.86 ± 0.0	31.86 ± 1.7
30	UPV-17035	11.0 ± 0.1	5.0 ± 0.1	1001.6 ± 19.9	454.2 ± 12.1	0.58 ± 0.0	1.65 ± 0.0	2.05 ± 0.0	11.53 ± 0.5	7.49 ± 0.1	5.87 ± 0.2	29.08 ± 1.1
31	UPV-17037	4.7 ± 0.1	5.0 ± 0.1	375.6 ± 18.5	104.1 ± 6.4	0.59 ± 0.2	1.14 ± 0.0	3.58 ± 0.3	22.81 ± 5.6	20.63 ± 1.6	1.88 ± 0.4	52.23 ± 10.0
32	UPV-18242	11.6 ± 0.1	4.7 ± 0.1	1217.1 ± 9.5	570.6 ± 16.0	0.62 ± 0.1	7.17 ± 0.5	0.99 ± 0.1	52.25 ± 3.5	53.48 ± 7.1	3.76 ± 0.7	123.82 ± 10.0
33	UPV-16918	8.4 ± 0.1	4.5 ± 0.1	1742.2 ± 426.4	28.0 ± 8.4	0.34 ± 0.0	2.27 ± 0.0	30.36 ± 1.4	1.28 ± 0.8	3.26 ± 0.5	36.72 ± 8.3	41.15 ± 9.1
34	UPV-16921	12.1 ± 0.1	5.1 ± 0.1	710.2 ± 8.9	17.1 ± 0.3	0.33 ± 0.0	4.84 ± 0.1	6.62 ± 0.2	4.45 ± 0.6	4.35 ± 0.1	57.77 ± 10.9	67.84 ± 11.7
35	UPV-16924	9.2 ± 0.1	4.4 ± 0.1	1811.0 ± 54.0	10.9 ± 0.8	0.58 ± 0.1	24.35 ± 2.6	1.06 ± 0.1	7.23 ± 0.3	4.78 ± 0.1	93.56 ± 19.8	108.18 ± 18.3
36	UPV-16933	10.0 ± 1.2	5.2 ± 0.2	586.8 ± 47.1	45.9 ± 3.7	0.19 ± 0.0	0.99 ± 0.0	3.42 ± 0.1	2.57 ± 0.2	0.95 ± 0.1	32.95 ± 0.9	37.58 ± 1.2
37	UPV-17041	8.6 ± 0.7	5.1 ± 0.3	869.6 ± 99.9	11.0 ± 1.0	0.48 ± 0.0	1.44 ± 0.0	0.94 ± 0.0	7.19 ± 0.8	7.68 ± 0.5	10.10 ± 0.8	26.87 ± 0.8
38	UPV-17042	9.1 ± 0.1	4.6 ± 0.07	1264.3 ± 82.0	22.8 ± 2.3	0.42 ± 0.0	1.68 ± 0.0	45.21 ± 1.8	5.75 ± 0.4	2.83 ± 0.0	60.64 ± 5.3	71.53 ± 5.9
39	UPV-18258	7.3 ± 0.2	4.1 ± 0.01	1511.4 ± 13.1	5.9 ± 0.2	ND	1.17 ± 0.1	9.15 ± 0.0	26.70 ± 0.6	18.47 ± 0.1	3.32 ± 0.6	57.94 ± 0.2
40	UPV-16942	6.7 ± 0.4	4.8 ± 0.57	1648.6 ± 266.2	83.3 ± 3.9	1.32 ± 0.0	1.25 ± 0.0	14.69 ± 0.4	7.55 ± 0.1	0.26 ± 0.2	4.78 ± 0.3	16.46 ± 0.3
41	UPV-16946	8.8 ± 0.1	4.8 ± 0.2	1415.8 ± 24.1	205.2 ± 15.7	0.31 ± 0.0	6.67 ± 0.3	10.38 ± 0.3	24.24 ± 0.1	18.95 ± 0.4	ND	51.25 ± 0.5
42	UPV-18264	6.7 ± 0.1	4.4 ± 0.1	1369.1 ± 33.4	268.9 ± 9.2	0.67 ± 0.0	7.46 ± 0.0	14.98 ± 0.2	6.36 ± 0.2	4.53 ± 0.1	1.90 ± 0.0	15.01 ± 0.3
43	UPV-18265	7.6 ± 1.0	4.9 ± 0.1	1185.6 ± 255.4	184.1 ± 26.4	0.84 ± 0.17	4.86 ± 0.3	14.78 ± 0.1	5.09 ± 0.1	4.68 ± 0.0	ND	11.29 ± 0.2

FW = fresh weight. ND = not detectable. ^a mL 0.1 N NaOH; ^b aFW = fresh weight. ND = not detectable. ^a mL 0.1 N NaOH; ^b as ascorbic acid; ^c Sucrose equivalents. TS = 1 · S + 0.76 · G + 1.52 · F (Coultaite 1998)

Projections of PC values have been plotted to characterize grouped accessions, as far as the new PC variables are concerned. Furthermore, biplots have been used to discover the relations among accessions, original variables and the new PC variables (Yan 2001).

GGE biplot analyses extend PC analyses and graphically examine: -which accessions are balanced in internal quality characteristics, which are the best for each of the internal quality characteristics, and which accessions could best contribute to improve internal quality characteristics, by comparing each accession's behaviour with the controls. "Stability" GGE figures are constructed by rotating the biplot axes. In this stability biplot, the abscissa axis passes through the biplot origin, and through the marker of the original variables' average values, which is defined as the average PC1 and PC2 scores over all the variables. This line indicates the mean performance of accessions. The ordinate axis is the line that passes through the biplot origin and which is perpendicular to the abscissa axis. Balanced (stable) accessions are identified by their projection to the average variable coordinate-y axis. Balanced accessions (accessions whose variable values are within the same range), will have a smaller projection on the new coordinate-y axis (Yan 2001). Projections to the average variable coordinate-x axis are the approximate average values of the accessions for the PC being considered; the greater the projections are for an accession, the greater the accession's values are. In the "ideal entry" GGE figure, an ideal accession is drawn in the rotated axes biplot; its projection on the x-axis was designed to be equal to the longest vector of all accessions, and its projection on the y-axis is obviously zero, meaning that it is absolutely balanced. Therefore, the smaller the distance is from an accession to such a virtual accession, the more ideal the accession is. In "the best accession for each variable" GGE figure, a convex-hull is drawn on those accessions that are relatively remote from the biplot origin so that all other cultivars are contained within it. The plot is divided into sectors by lines which are perpendicular to each side of the convex hull. These perpendiculars divide the biplot into several sectors, and variables inevitably fall into the sectors. The accessions which are the corner or vertex of the convex hull are those that are best for the variables which are placed in the same sector. The GGE biplot also allows two accessions to be compared. The selected accessions are connected by a line in these figures; a perpendicular line to the previous line also occurs. Each accession is ranked according to the values of the variables placed at its side of the perpendicular (Yan 2001).

PC analyses were performed with S.Plus 6.1 (Insightful Corp.) for Windows. Cluster analyses were performed with NTSYS PC 2.02 (Applied Biostatistics, Setauket, NY) for Windows. GGE biplot analyses were carried out with GGE biplot software (licensed by Dr. Weikai Yan, ON., Canada)

Results

Values for the species of subgenus *Eulycopersicon* are the lowest for acids (CA, MA and OA), S (zero in many accessions) and general constituents such as TA, °Brix and pH (Table 2); on the contrary, the highest are for vitC (UPV-18242 (32) and UPV-16975 (29), 570.6 and 505.5 mg · kg⁻¹, respectively) and reducing sugars, F (UPV-

18263 (16) and UPV-18242 (32), 55.03 and 52.25 g · kg⁻¹, respectively) and G (UPV-18242 (32) and UPV-16950 (22), 53.48 and 44.82 g · kg⁻¹, respectively). Values for the species of subgenus *Eriopersicon* are quite the opposite, where the highest are for acids, S and general variables, yet the lowest are for reducing sugars and vitC. UPV-16921 (34) has the highest value for °Brix (12.1) , UPV-16924 (35) for MA and TA (24.35 g · kg⁻¹ and 1811.0 mL · kg⁻¹, respectively), UPV-16933 (36) for pH (5.17), UPV-16942 (40) for OA (1.32 g · kg⁻¹), UPV-17042 (38) for CA (45.21 g · kg⁻¹) and UPV-16924 (35) for S (93.56 g · kg⁻¹). *L. hirsutum* had the highest concentration of S and accession UPV-18258 (39) also had the lowest value for pH, which means higher acidity.

Simple values of the chemical analysis hardly provide interpretable information; thus, more statistical analyses have been performed to obtain better and deeper conclusions to both characterize and group accessions.

Correlations were obtained (Table 3), transformed, and afterwards plotted in a half-normal plot. There is only one point which indicates a statistically significant correlation, between G-F. A new characteristic called total sweetness (TS), which includes all sugars, was then created: - TS = 1 · S + 0.76 · G + 1.52 · F (S, F and G are weights, and the result is the weight of the equivalent of S) (Coulter 1998). In this way, later analysis will not be interfered with by that correlation. According to this new characteristic, *L. pimpinellifolium* UPV-18242 (32) is the sweetest accession, due to the large amounts of F and G, and to the greater sweetness taste of F.

Table 3 Correlation coefficient for each possible variable relationship.

	°Brix	pH	TA	vitC	OA	MA	CA	F	G	S
°Brix	—	0.165	0.491	0.014	0.132	0.472	0.107	-0.039	-0.046	0.407
pH		—	-0.529	-0.132	0.206	-0.135	-0.162	-0.102	-0.054	-0.030
TA			—	0.017	0.169	0.507	0.332	-0.183	-0.251	0.303
vitC				—	0.090	-0.041	-0.307	0.320	0.343	-0.417
OA					—	0.271	-0.006	0.134	0.139	-0.096
MA						—	-0.152	-0.029	-0.035	0.481
CA							—	-0.176	-0.231	0.367
F								—	0.920	-0.306
G									—	-0.285
S										—

The results of the PC analysis show four main PCs to explain 75.3 % of the total variance. The first PC (PC1) provided information about taste intensity as it was mainly positively correlated to TA, MA and °Brix (Table 4) (Baldwin et al., 1998; Bucheli et al., 1999). The second one (PC2) was related to sourness (pH, CA) and additionally to calcium availability. This is because of the negative pH and positive CA coefficients; non-availability of calcium is related to the OA coefficient in PC2. The lower the OA content is, the higher the calcium availability becomes (Gül et al., 1996). PC3 is related to vitC, pH and CA. Finally, PC4 would be related to calcium availability

because of the negative OA coefficient, and to high sweetness because of the TS positive correlation.

Table 4. PC analysis variable loadings with all the variables considered (the most important values are shown in bold type).

	<i>PC1</i>	<i>PC2</i>	<i>PC3</i>	<i>PC4</i>
^o Brix	0.47	0.24	- 0.23	
pH	- 0.24	0.53	- 0.52	
TA	0.57	- 0.27		- 0.30
vitC		0.24	0.67	- 0.16
OA	0.21	0.40	- 0.15	- 0.46
MA	0.52	0.26		
CA	0.17	- 0.52	- 0.44	
TS	0.25	0.17		0.82

Cluster analyses were performed to group accessions by their variability and internal quality attributes. Eight clusters were obtained (Fig. 1). The analyses were robust enough since the cophenetic index ($r= 0.84$) was greater than 0.8.

Experienced breeders do not like to select a single accession to begin a breeding programme. They prefer to consider group behaviour, and we wondered therefore what the relation would be between cluster groups, the new internal quality variables obtained by PC analyses and the original variables. That is why plots of grouped accessions placed on biplots were obtained (Figs. 2 and 3). A *L. hirsutum* accession, UPV-16924 (35), and two accessions of *L. pimpinellifolium*, UPV-16950 (22) and UPV-18242 (32), were seen to form two separate groups because of taste intensity PC1 (Fig. 2A). UPV-16950 (22) and UPV- 18242 (32) have little acid taste (a low PC2 value) (Fig. 2A) and, UPV- 18242 (32), has an especially high vitC content (a high PC3 value) as well as high TS and calcium availability (a relatively high PC4) (Figs. 2B and 3A). Some other results can be noted; *L. hirsutum* species hardly join to *Eulycopersicon*, which emphasises taxonomic differences with nutritional and organoleptic properties. In fact UPV-16918 (33) and UPV-17042 (38) are separately grouped together; they had really high values for PC2 (high acidity) and relatively high values for PC1 and PC4, yet had a low vitC content (a low PC3 value) (Figs. 2 and 3A). UPV-16921 (34), UPV-16933 (36) and UPV-17041 (37) are grouped with a *L. pennellii* UPV-16946 (41), *L. peruvianum* UPV-18265 (43) and three accessions of *L. pimpinellifolium*; these offer no outstanding PC1 or PC2 values (Fig. 2A), but they have a low vitC content and a different behaviour for PC4 (Fig. 3A). Another group is formed by a single accession of *L. pennelli* UPV-16942 (40) which has very low values with regard to PC3 (vitC) and PC4 (low sweetness and low calcium availability) (Fig. 3A), and medium values for PC1 and PC2 (Fig. 2A). Three groups remain: the seventh group is formed by two *L. pimpinellifolium* accessions UPV-16975 (29) and UPV-17035 (30), which seem to prove interesting for creating breeding lines because of their high PC3 values (vitC content), but they offer low sourness and sweetness (PC2 and PC4) (Figs. 2A and 3A). The eighth group, as far as cluster analysis is concerned, has a high vitC content (a high PC3 value) (Fig. 2B) and irregular but high behaviour in sourness (Fig. 2A); it seems to be related to high sourness accessions *L. hirsutum* UPV-18258 (39) and *L.*

esculentum UPV-14829 (19) and UPV-3799 (6). The controls are all grouped in the same last cluster with almost all the other *L. esculentum* ones and with UPV-18264 (42) *L. peruvianum*. They are always around the origin of the axes.

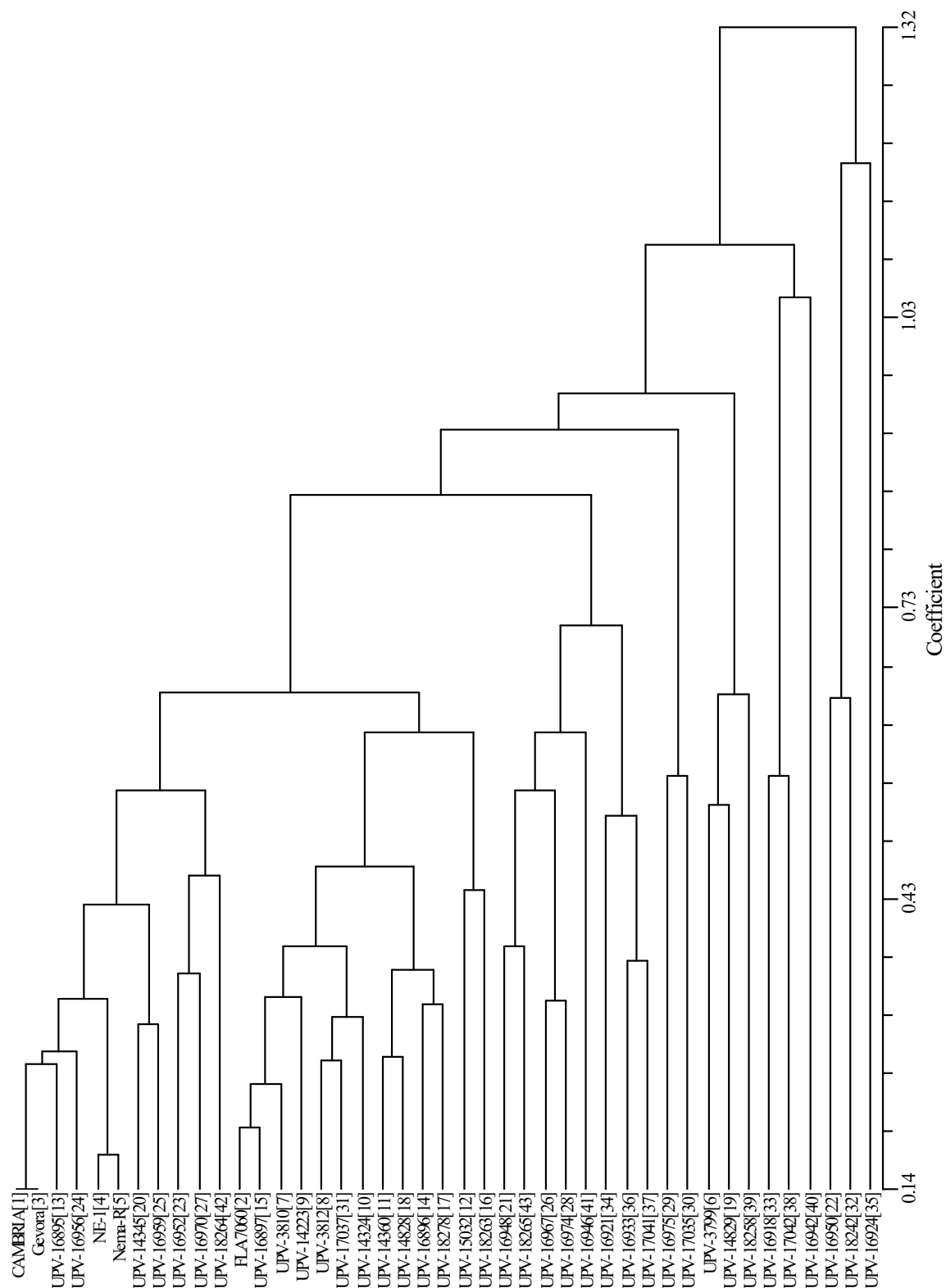


Figure 1. Dendrogram for *Lycopersicon* accessions and lines studied with all the variables considered.

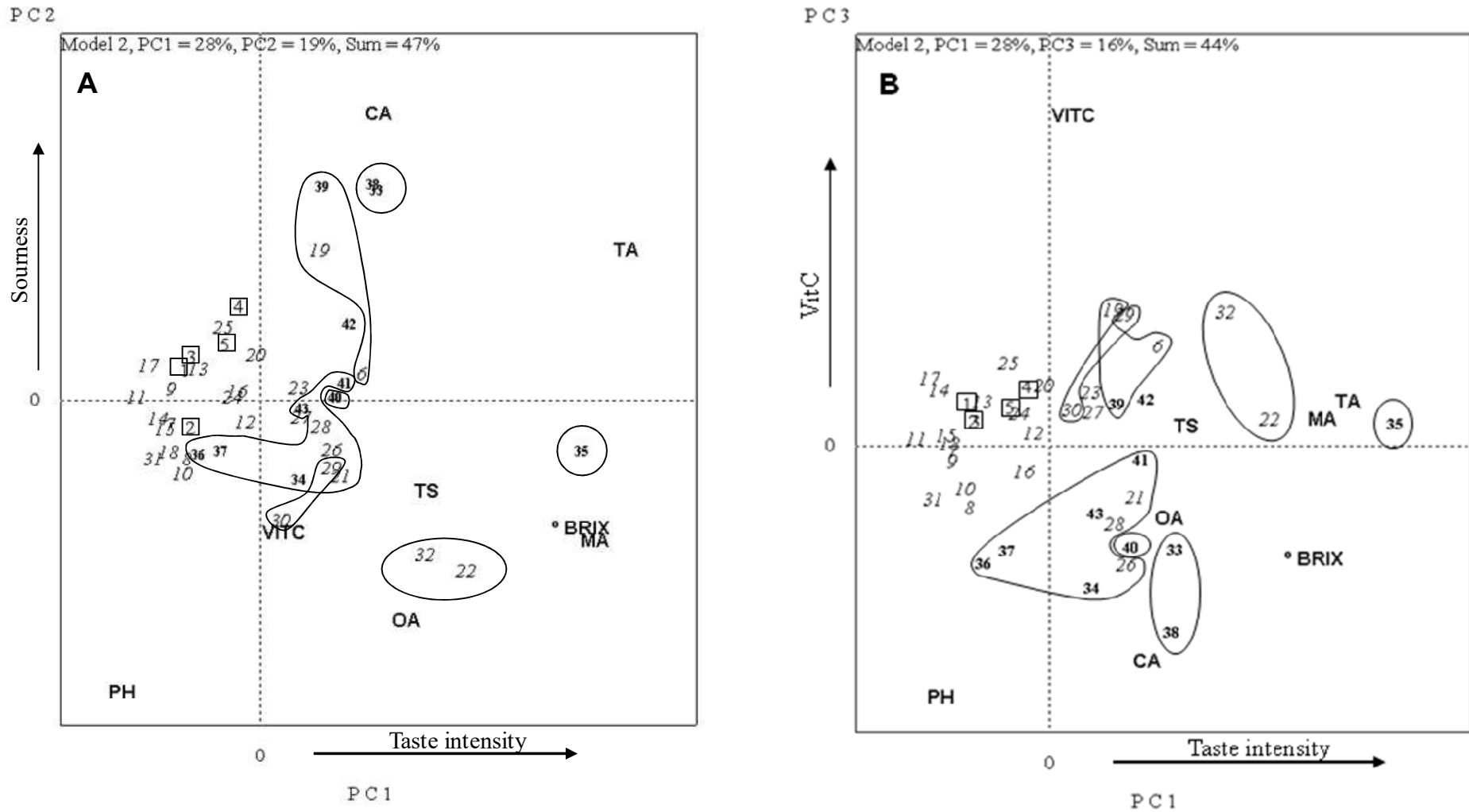


Figure 2. GGEbiplot figures with all the variables considered (controls are boxed and *Eriopersicon* accessions are shown in bold type) (A) Biplot for PC1 and PC2 with clusters. (B) Biplot for PC1 and PC3 with clusters.

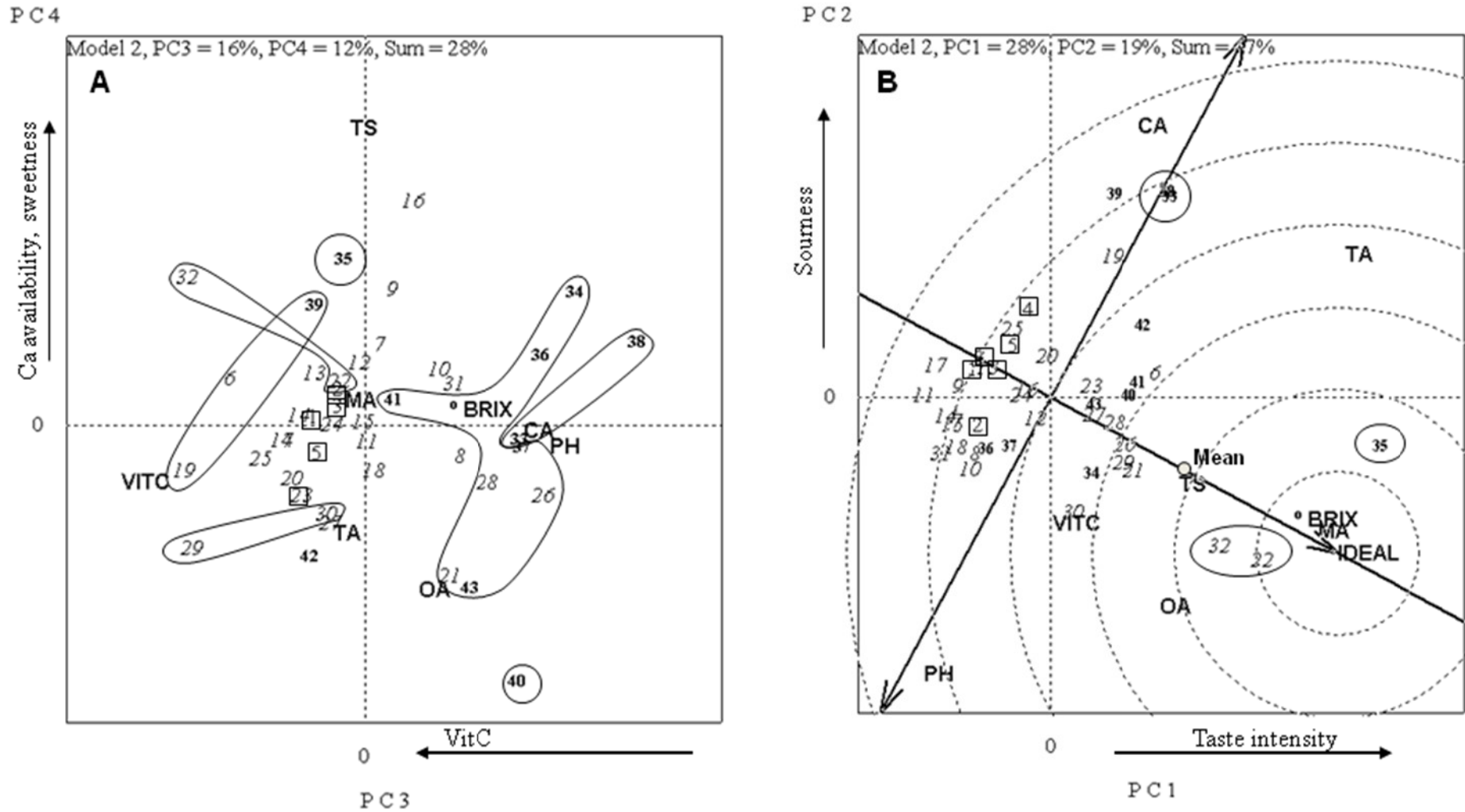


Figure 3. GGEbiplot figures with all variables considered (controls are boxed and *Eriopersicon* accessions are shown in bold type) (A) Biplot for PC3 and PC4 with clusters. (B) Stability and position in relation to an ideal accession for PC1 and PC2.

Some *L. hirsutum* accessions (UPV-16918 (33), UPV-17042 (38) and UPV-18258 (39)), have shown high values in PC2, although they would not have high taste properties because of not having very high PC1 values. These results are very useful if we consider that they are inedible. The same occurs with UPV-14829 (19), an edible *L. esculentum* var. *cerasiforme* accession, which would be interesting for increasing sourness in breeding lines, since this accession has a high acidity and is genetically nearer to cultivated tomato than is *L. hirsutum*. UPV-16950 (22) and UPV-18242 (32) seem better with regard to taste intensity, as they have greater PC1 values, and they have a better genetic background than has UPV-16924 (35), which is *L. hirsutum*, although it has a greater PC1 value. The remaining accessions are near the PC origin, so neither PC1 nor PC2 values are noteworthy.

As for PC3, the subgenus *Eulycopersicon* accessions UPV-14829 (19), UPV-16975 (29) and UPV-18242 (32) stand out for their high values (Fig. 2B). With regard to PC4, UPV-16924 (35), UPV-16921 (34), UPV-16933 (36), UPV-18258 (39), which are *L. hirsutum* accessions, and UPV-18263 (16), UPV-18242 (32), which are subgenus *Eulycopersicon*, offer values that stand out (Fig. 3A).

In addition, an ideal accession is drawn (Fig. 3B). The ideal accession would be that which is the most balanced (placed on coordinate-x axis), and that with the greatest projection value on the abscissa axis. It is the centre of equidistant concentric circles, to provide a better observation of the best accessions; it would allow the accessions to be compared and selected by their closeness to the ideal accession. According to Fig. 3B, the best accessions within the ones mentioned before, are UPV-16950 (22) and UPV- 18242 (32), which are in the same cluster, because of their average and balance. They have approximately three times more taste intensity than the controls have. In addition, they are *L. pimpinellifolium* species, and are better for introgression breeding programmes. UPV- 16924 (35), a *L. hirsutum* accession, also seems to be interesting, but it is genetically further removed from cultivated tomato, and would complicate and extend breeding programmes. UPV-16918 (33) and UPV-17042 (38) stood out for their PC2 values (approximately twice more than controls) but they are subgenus *Eriopersicon* and are very unbalanced, so they do not appear to be good selections.

As expected, control lines are quite stable (near the x-axis) and are grouped around the origin of coordinated axes; their values are lower than averages values.

Once the taste variables (PC) have assisted selection, the original variables may be seen in which the accessions tested have high values (where they “win”). GGE biplot also provides the possibility of visualizing the “winner” accessions for the variables, which are located in sectors (Fig. 4A). The best accessions are UPV-16924 (35) for MA, °Brix, TS and total TA (which alone formed a cluster), UPV-16950 (22) and UPV-18242 (32) (which formed another cluster). UPV-17042 (38), UPV-16918 (33) (both in the same cluster) and UPV-18258 (39), “win” for CA. UPV-17035 (30) “wins” for vitC and OA.

All projection plots of PC combinations show the same pattern, with centred *Eulycopersicon* accessions and *Eriopersicon* species, and some *L. pimpinellifolium* far removed from the PC origin.

To predict the contribution of selected accessions in breeding programmes crosses, these must be compared with breeding lines. This will allow the properties of resulting hybrids to be guessed. By way of example, when comparing one control, 'NE-1' (1), to one of the best and most balanced accessions, UPV-16950 (22), (Fig. 4B) all traits except CA are observed to be on the same side of the perpendicular line of UPV-16950 (22). This means that UPV-16950 (22) was better (had higher values) than 'NE-1' (1) for all traits except CA. Furthermore, this means there are good characteristics for breeding programmes seeing that the resulting hybrids would be better for all those traits and with a new taste nuance. UPV-16924 (35) is considerably different than 'NE-1' (1) whereas *Eulycopersicon* accessions are more similar to it, simply because of their position, far from or around the line which joined them. If comparisons were made with the rest of controls, the conclusions would be similar.

Traditional breeding for flavour has focused on complex characteristics such as °Brix, pH and total TA. We therefore wondered whether individual constituents would indeed be a strong enough to distinguish between accessions. It was precisely for this reason that all statistical analyses were performed again, but only with the individual internal quality constituents (vitC, OA, MA, CA, TS). In this case, three PCs are needed to explain enough variance, with nearly the same meaning as the previous PC analyses (Table 5). The most different accessions of *L. hirsutum* remained apart from the main group of subgenus *Eulycopersicon* (Fig. 5A), and moreover the same *L. pimpinellifolium* accessions remained as the best possible parentals because of their differences. Once more, the cluster (Figs. 5A and 6) supports the same point, and the control lines are once again next to the origin of axes and they show typical, similar values. When an ideal genotype (Fig. 5B) was considered, the same accessions came nearer, and would allow selections to be made in the same way.

Table 5. PC analysis variable loadings with individual variables considered (the most important values are shown in bold type).

	<i>PC1</i>	<i>PC2</i>	<i>PC3</i>
vitC	0.30	-0.63	
OA	0.47	-0.15	-0.75
MA	0.62	-0.28	
CA	-0.34	-0.62	-0.10
TS	0.44	-0.36	0.65

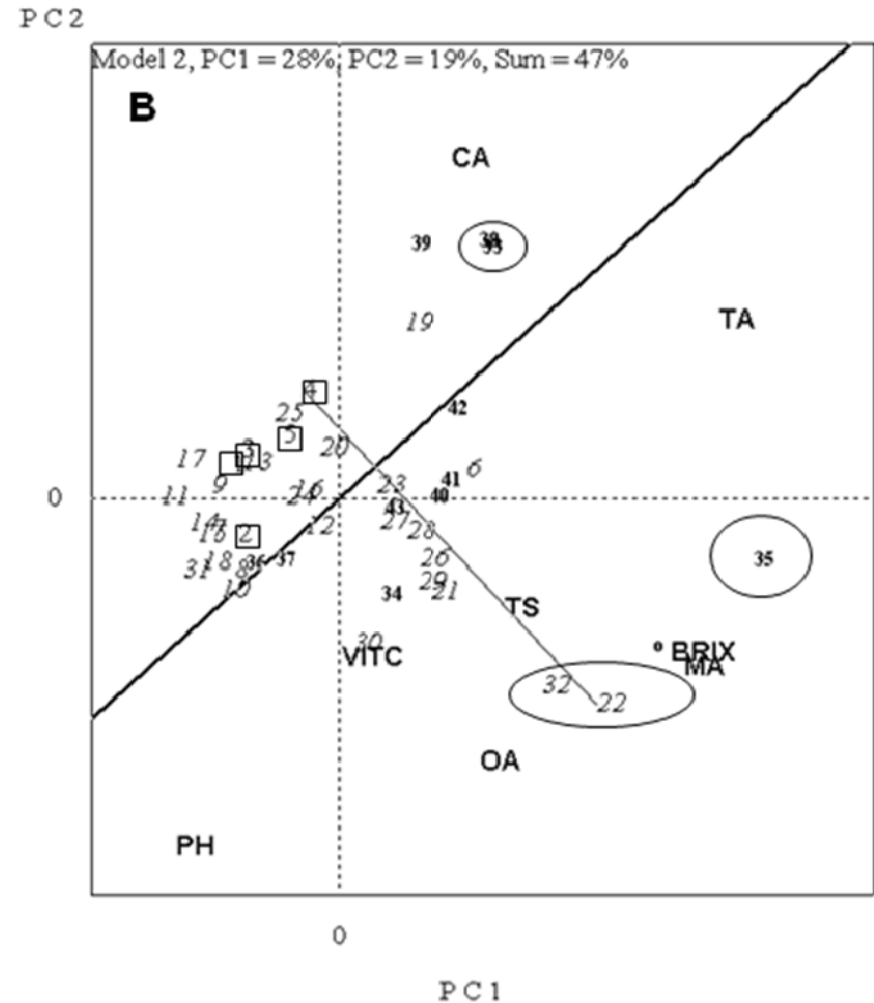
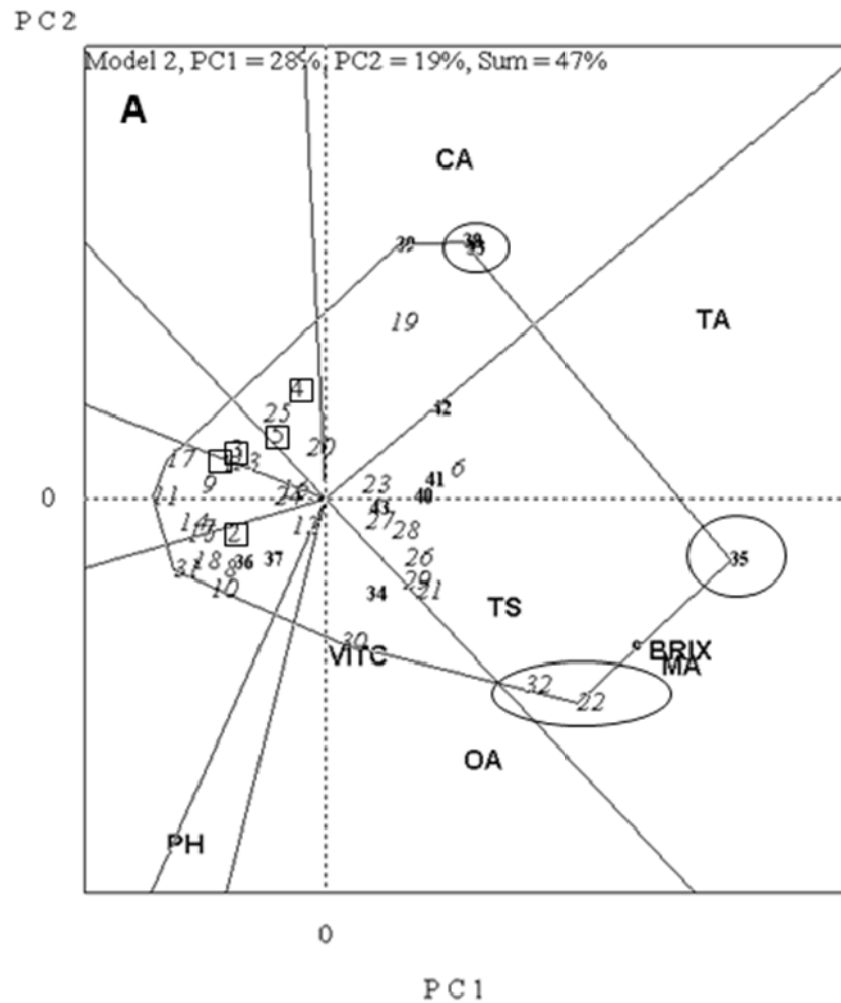
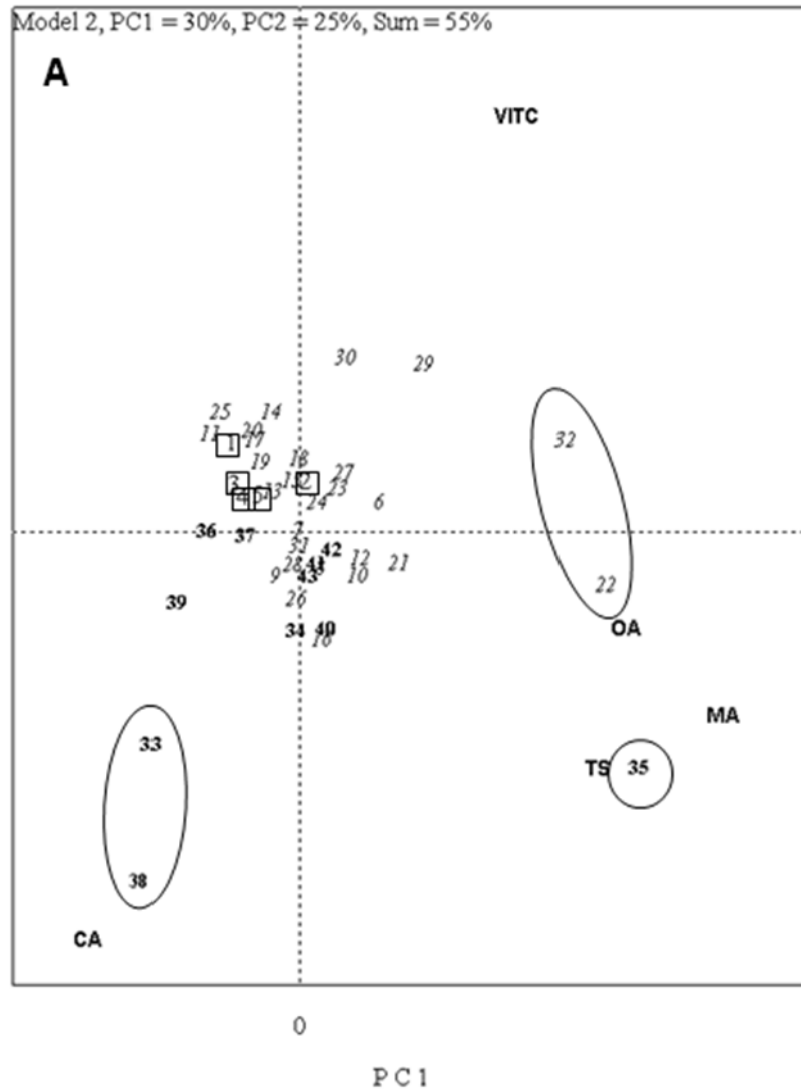


Figure 4. GGEbiplot figures with all the variables considered (controls are boxed and *Eriopersicon* accessions are shown in bold type). (A) Which are the best accessions for each variable. (B) Comparison between line NE-1 and UPV-16950.

PC 2



PC 2

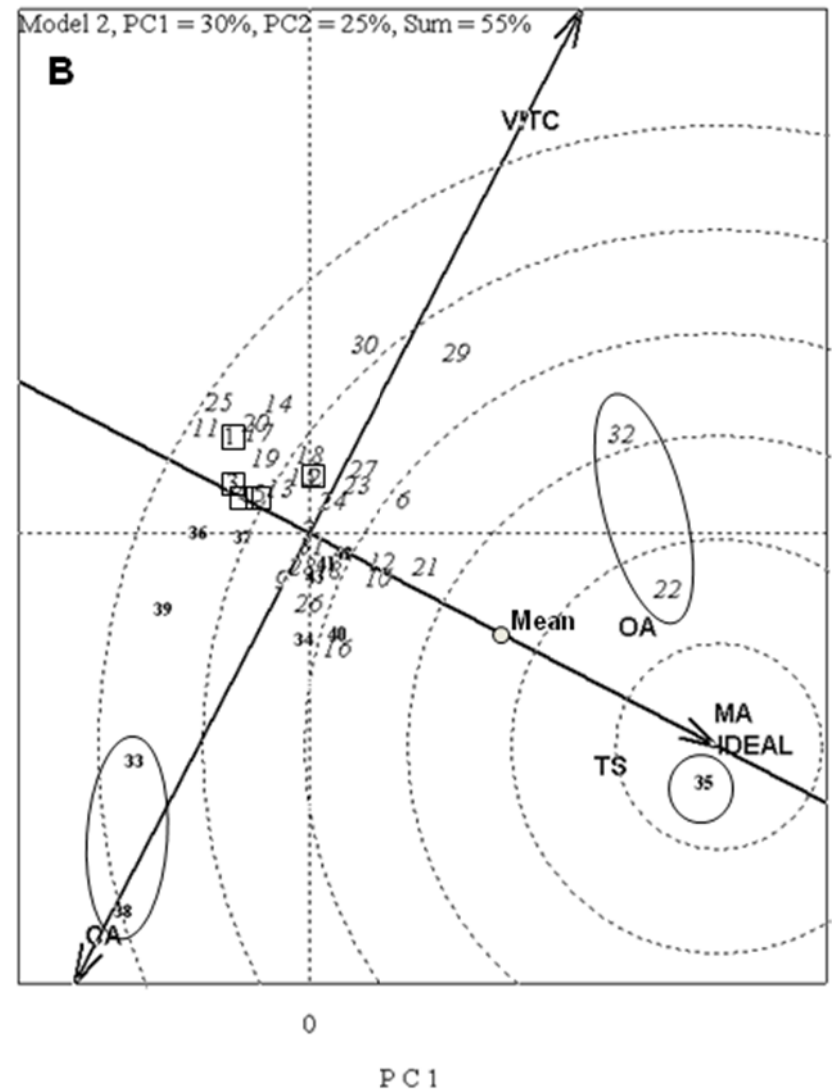


Figure 5. GGEbiplot figures considering with individual variables considered (controls are boxed and Eriopersicon accessions are shown in bold type). (A) Biplot for PC1 and PC2 with clusters. (B) Stability and position in relation to an ideal accession.

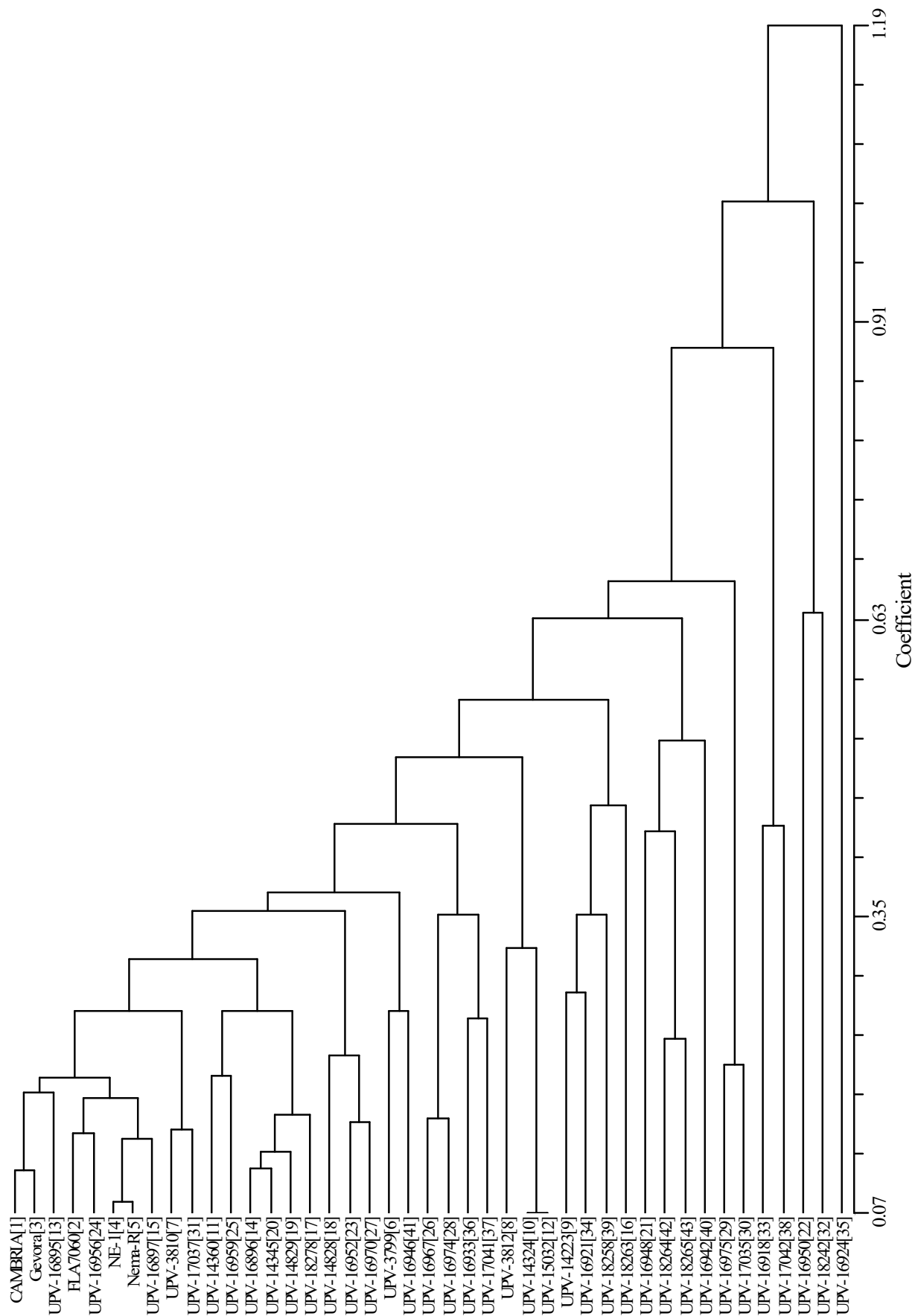


Figure 6. Dendrogram for *Lycopersicon* accessions and lines studied with individual variables considered.

Discussion

Some of the accessions analyzed have shown high contents in individual constituents. Examples of such are: the *L. pimpinellifolium* accessions UPV- 18242 (32) and UPV-16950 (22) for Vit. C, F and G; and the *L. hirsutum* accessions UPV-16924 (35) for S, TA and MA, and UPV-17042 (38) for CA. We have observed differences between species of the subgenus *Eriopersicon* and subgenus *Eulycopersicon*, as reported previously (Mochizuki et al., 1996). The S accumulation was only observed in *L. hirsutum*, although other authors (Mochizuki et al., 1996) also found S in another *Eriopersicon* species. Therefore, it would appear that the *Eriopersicon* species would be potential donors for increasing acidity, and would be the only way to increase the S accumulation. Work has begun by taking this into account (Chetelat et al., 1993; Harada et al., 1995; Imanishi et al., 1996; Klann et al., 1993; Mochizuki et al., 1996; Stommel and Haynes 1993). Nevertheless, it would be better to use the accessions of subgenus *Eulycopersicon*, such as the aforementioned *L. pimpinellifolium* accessions, to increase sugars and vitC content, as the amount of undesirable background genes introgressed in the developing breeding lines is lower than the *Eriopersicon* accessions used.

A great deal of interesting germplasm available is small-fruited, such as *L. pimpinellifolium* and the aforementioned *L. hirsutum* accessions. It should be borne in mind that although small-fruited accessions could prove interesting due to their high content in quality constituents, a significant amount of such constituents could be lost if individual fruit weight were to be increased. Some studies have revealed there is a negative relation between fruit weight and sugar content (Lee and Iwase 1998; Markovic et al., 1997). However, the content can be high enough to enable the low parental content which receives the interesting loci to increase, and more so if we make selections by considering the content in individual constituents.

Having an assessment of taste characteristics of tomato-related accessions is very interesting, especially in inedible *Eriopersicon* accessions in which the sensory assessment cannot be made. In this work, that both improves and enlarges upon a previous one (Fernández-Ruiz et al., 2004), we have determined underlying characteristics by PC analyses that can be related to taste sensory perception, as other researchers have done (Bucheli et al., 1999; Fulton et al., 2002; Saliba Colombani et al., 1999; Stevens et al., 1977). This allows us to relate chemical composition variables to new underlying taste and nutritional characteristics. By grouping similar accessions (by Cluster analyses) and assessing the balance in taste and nutritional components (by GGE biplot analyses) we can achieve evaluation and selection of donor *Lycopersicon* germplasm that is both broad and useful. Nevertheless, later, in the interesting accessions this initial evaluation will be fully completed by subsequent determinations of other important flavour components (aroma constituents and texture characteristics) and nutritional substances (carotenoids) complex to quantify in order to complete the flavour and nutritional assessment of *Lycopersicon* germplasm.

Trained panels are also needed to relate individual variables to PC taste variables in cultivated materials and to establish perception thresholds for analytical variables, which would enable PC values to be extrapolated to inedible accessions. Relations

between composition and panellist opinions will also assist in discovering consumer preferences in tomato taste (Causse et al., 2001; Causse et al., 2002; Pretel et al., 1993). The panellist assessment will obviously be essential in the final steps of breeding programmes, but with the methodology which has been developed, we obtain a useful initial idea of taste and nutritional characteristics of each accession.

All these analyses have assisted in the classification and selection of the *Lycopersicon* germplasm for further studies, and also for the start of breeding programmes for tomato internal quality improvement. In fact, two *L. pimpinellifolium* accessions are very interesting to be used as donor parents in the first steps of tomato taste and vitC breeding programmes, since they are balanced and have shown three times the taste intensity of controls. Therefore, a useful and robust method to characterize and select balanced germplasm has been developed. Moreover, this study reveals that individual determinations are strong enough to assist that selection, by reducing determination analyses, and by making characterization more precise. So involving variables (such as SSC, pH and TA) will only be necessary to relate current results to previous results which have only used these.

Acknowledgment

We wish to thank the financial support provided by the MCyT (project AGL2002-04224-C02-02) and Bancaja Foundation (project P1.1A2001-19).

References

- AOAC Association of Official Analytical Chemists, 1990: Official methods of analysis., 15th Ed. Arlington, Virginia.
- Baldwin, E. A., Nisperos, M. O., Moshonas, M.G., 1991: Quantitative analysis of flavor parameters in six Florida tomato varieties (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Journal of the american society for horticultural science. 39, 1135-1140. 1991.
- Baldwin, E. A., Scott, J. W., Einstein, M. A., Malundo, T. M. M., Carr, B. T., Shewfelt, R. L., Tandon, K.S., 1998: Relationship between sensory and instrumental analysis for tomato flavor. Journal of the American Society for Horticultural Science **123**, 906-915.
- Behl, C., Davies, J., Cole, G. M., Schubert, D., 1992: Vitamin E protects nerve cells form amyloid beta-protein toxicity. Biochem. Biophys. Res. Comm. **186**, 944-950.
- Bucheli, P., Voirol, E., Torre, R. R., Lopez, J., Rytz, A., Tanksley, S. D., Petiard, V., de la Torre, R., 1999: Definition of nonvolatile markers for flavor of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as tools in selection and breeding. Journal of Agricultural and Food Chemistry **47**, 659-664.
- Byers, T., Guerrero, N., 1995: Epidemiologic evidence for vitamin C and vitamin E in cancer prevention. American Journal of Clinical Nutrition **62**, 1385-1392.

Causse, M., Saliba Colombani, V., Lesschaeve, I., Buret, M., 2001: Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 2. Mapping QTLs for sensory attributes. *Theor appl genet* **102**, 273-283.

Causse, M., Saliba Colombani, V., Lecomte, L., Duffe, P., Rousselle, P., Buret, M., Seymour, G. B., Napier, R. M., White, P. J., 2002: QTL analysis of fruit quality in fresh market tomato: a few chromosome regions control the variation of sensory and instrumental traits. Fruit development and ripening, Swansea, UK, 11-12 April 2002. *Journal of Experimental Botany*. 2002, **53**, 2089-2098.

Chetelat, R. T., Klann, E., DeVerna, J. W., Yelle, S., Bennett, A. B., 1993: Inheritance and genetic mapping of fruit sucrose accumulation in *Lycopersicon chmielewskii*. *Plant Journal* **4**, 643-650.

Coultate, T. P., 1998: Manual de química y bioquímica de los alimentos. Acribia, S.A., Zaragoza (Spain).

Fahn, S., Cohen, G., 1992: The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Annals of Neurology* **32**, 804-812.

Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M. C., Cámara, M., Torija, M^a. E., Chaya, C., Galiana-Balaguer, L., Roselló, S., Nuez, F. 2004: Internal quality characterization of fresh tomato fruits. *HortScience* **39**, 339-345

Fulton, T. M., Bucheli, P., Voirol, E., Lopez, J., Petiard, V., Tanksley, S. D., 2002: Quantitative trait loci (QTL) affecting sugars, organic acids and other biochemical properties possibly contributing to flavor, identified in four advanced backcross populations of tomato. *Euphytica* **127**, 163-177.

Galiana-Balaguer, L., Roselló, S., Herrero-Martínez, J. M., Maquieira, A., Nuez, F., 2001: Determination of L-ascorbic acid in *Lycopersicon* fruits by capillary zone electrophoresis. *Analytical Biochemistry* **296**, 218-224.

Gey, K. F., 1993: Vitamin E and other essential antioxidants regarding coronary heart disease: Risk assessment studies. In: L. Packer, J. Fuchs, J. Marcel-Dekker (eds.), *Vitamin E in Health and Disease*., New York.

Girija, R., Lakshmi, K., Ramaswamy, G., Krishnamoorthy, L., 1996: Serum carotene, vitamin A, and vitamin C levels in breast cancer and cancer of the uterine cervix. *Nutrition and Cancer* **25**, 173-177.

Gül, J. L., Torija, M. E., Gimenez, J. J., Rodríguez-García, I., Giménez, A., 1996: Oxalic acid and calcium determination in wild edible plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 1821-1823.

Harada, S., Fukuta, S., Tanaka, H., Ishiguro, Y., Sato, T., 1995: Genetic analysis of the trait of sucrose accumulation in tomato fruit using molecular markers. *Breeding Science* **45**, 429-434.

Hewitt, J. D., Garvey, T. C. 1987: Wild sources of high soluble solids in tomato. In: D. J. Nevins and R. A. Jones (eds.), *Tomato biotechnology*, 45-54. Liss, New York.

- Imanishi, S., Egashira, H., Tanaka, H., Harada, S., Nishimura, R., Takahashi, S., Takashina, T., Oumura, S., 1996: Development of interspecific hybrids between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* var. *humifusum* and introgression of *L. peruvianum* invertase gene into *L. esculentum*. *Breeding Science* **46**, 355-359.
- Jamison, J. M., Gilloteaux, J., Taper, H. S., Summers, J. L., Butrum, R. R., Dickson, J., 2001: Evaluation of the in vitro and in vivo antitumor activities of vitamin C and K-3 combinations against human prostate cancer. The role of nutrition in preventing and treating breast and prostate cancer Washington, DC, USA, 31 August-1 September 2000. *Journal of Nutrition*. 2001, 131, 158-160.
- Klann, E. M., Chetelat, R. T., Bennett, A. B., 1993: Expression of acid invertase gene controls sugar composition in tomato (*Lycopersicon*) fruit. *Plant Physiology* **103**, 863-870.
- Knekt, P., 1993: Epidemiology of vitamin E: evidence for anticancer effects in humans. In: L. Packer, J. Fuchs, J. Marcel-Dekker (eds.), *Vitamin E in Health and Disease.*, New York.
- Krumbein, A., Auerswald, H., 1998: UK tomato growers target taste. *Nahrung* **42**, 395-399.
- Krumbein, A., Auerswald, H., Hagg, M., Ahvenainen, R., Evers, A. M., Tiilikkala, K., 1999: Important aroma compounds in tomato determined by instrumental and sensory analysis. *Agri Food Quality II: quality management of fruits and vegetables from field to table*, Turku, Finland, 22-25 April, 1998 303-305.
- Krzanowski, W. J., 2000: *Principles of Multivariate Analysis. A User's Perspective.* Oxford University Press Inc., New York.
- Lee, L., Kang, S. A., Lee, H. O., Lee, B. H., Jung, I. K., Lee, J. E., Heo, Y. S., 2001: Effect of supplementation of vitamin E and vitamin C on brain acetylcholinesterase activity and neurotransmitter levels in rats treated with scopolamine, an inducer of dementia. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **47**, 323-328.
- Lee, S. W., Iwase, T., 1998: Multiple linear regression analysis of factors determining sugar content of tomatoes. *RDA Journal of Horticulture Science* **40**, 48-54.
- Libby, P., Aikawa, M., 2002: Vitamin C, collagen, and cracks in the plaque. *Circulation* **105**, 1396-1398.
- Malundo, T. M. M., Shewfelt, R. L., Scott, J. W., 1995: Flavor quality of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as affected by sugar and acid levels. *Postharvest biol. technol.* **6**, 103-110.
- Marchioli, R., Schweiger, C., Levantesi, G., Tavazzi, L., Valagussa, F., 2000: Antioxidant vitamins and prevention of cardiovascular disease: epidemiological and clinical trial data. *Prevention and treatment of vascular disease: a nutrition based approach*, Aarhus, Denmark, 18-20 May, 2000, **36**, 53-63.

- Markovic, Z., Zdravkovic, J., Damjanovic, M., Jevtic, S. ed., Lazic, B., 1997: Correlation between the morphological characteristics and the biochemical components of tomato fruit quality. Proceedings of the first Balkan symposium on vegetables and potatoes, Belgrade, Yugoslavia, 4-7 June 1996: **462**, 151-156.
- Mochizuki, T., Ishiuchi, D., Ito, K., 1996: Genetic variation in sugar components and its inheritance in early generations derived from interspecific hybridization in the genus *Lycopersicon*. Bulletin of the National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea **11**, 109-118.
- O' Toole, P., Lombard, M., 1996: Vitamin C and gastric cancer: supplements for some or fruit for all? Gut **39**, 345-347.
- Olanow, C., 1990: Oxidative reactions in Parkinson's disease. Neurology **40**, 32-37.
- Pretel, M. T., Serrano, M., Riquelme, F., Romojaro, F., 1993: La calidad de la producción hortícola. In: M. A. Albi, F. Gutiérrez, M. Roca (eds.), Maduración y post-recolección '93. La calidad en frutos y hortalizas.
- Romesburg, H.C., 1984: Cluster analysis for researchers. Lifetime Learning, Belmont, CA.
- Roselló, S., Galiana-Balaguer, L., Herrero-Martínez, J. M., Maquieira, A., Nuez, F., 2002: Simultaneous quantification of the main organic acids and carbohydrates involved in tomato flavour using capillary zone electrophoresis. Journal of the Science of Food and Agriculture **82**, 1101-1106.
- Saliba Colombani, V., Causse, M., Langlois, D., Philouze, J., Buret, M., 2001: Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 1. Mapping QTLs for physical and chemical traits. Theor. appl. genet. **102**, 259-272.
- Saliba, C., V, Causse, M., Philouze, J., Buret, M., Issanchou, S., Lesschaeve, I., Scarascia-Mugnozza, G. T., Porceddu, E. (eds.), Pagnotta, M. A., 1999: QTLs for organoleptic quality in fresh market tomato. Genetics and breeding for crop quality and resistance Viterbo, Italy, September 20-25, 1998. 1999, 291-299; Italy, September-25, 1998.
- Scandella, D., Navez, B., Lespinasse, N., Venien, S., Jost, M., Schlich, P., 2002: La segmentation gustative: cibler les envies du consommateur. Infos. Ctifl. **185**, 9-13.
- Scott, J. W., 2002: A breeder's perspective on the use of molecular techniques for improving fruit quality. HortScience **37**, 464-467.
- Sokal, R. R., Rohlf, F. J., 1995: Biometry, 3th Ed. W.H. Freeman, New York.
- Stevens, M. A., 1972: Citrate and malate concentrations in tomato fruits: Genetic control and maturational effects. Journal of the American Society for Horticultural Science **97**, 655-658.
- Stevens, M. A., Kader, A. A., Albright-Holton, M., 1979: Potential for increasing tomato flavour via increased sugar and acid content. Journal of the American Society for Horticultural Science **104**, 40-42.

Stevens, M. A., Kader, A. A., Albright-Holton, M., Algazi, M., 1977: Genotypic variation for flavor and composition in fresh market tomatoes. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **102**, 680-689.

Stevens, M. A., Long, M. A., 1971: Inheritance of malate in tomatoes. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **96**, 120-122.

Stommel, J. R., Haynes, K. G., 1993: Genetic control of fruit sugar accumulation in a *Lycopersicon esculentum* x *L. hirsutum* cross. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **118**, 859-863.

Triano, S. R., St Clair, D. A., 1995: Processing tomato germplasm with improved fruit soluble solids content. *HortScience* **30**, 1477-1478.

Vessey, I. W. P., 1990: Tomato tasting and consumer attitude. *Acta Hortic.* **259**, 83-89.

Webb, P. M., Bates, C. J., Palli, D., Forman, D., 1997: Gastric cancer, gastritis and plasma vitamin C: Results from an international correlation and cross-sectional study. *International Journal of Cancer* **73**, 684-689.

Wolters, C. J., Gemert, L. J., 1990: Towards an integrated model of sensory attributes, instrumental data and consumer perception of tomatoes. I. Relation between consumer perception and sensory attributes. *Acta Hortic.* **259**, 91-106.

Yan, W., 2001: SOFTWARE. GGE biplot – A windows Application for Graphical Analysis of Multienvironment Trial Data and Other Types of Two-Way Data. *Agron.J.* **93**, 1111-1118.

Yelle, S., Chetelat, R. T., Dorais, M., DeVerna, J. W., Bennett, A. B., 1991: Sink metabolism in tomato fruit. IV. Genetic and biochemical analysis of sucrose accumulation. *Plant Physiology* **95**, 1026-1035.

You, W. C., Zhang, L., Chang, Y. S., Liu, W. D., Ma, J. L., Li, J. Y., Jin, M. L., Hu, Y. R., Yang, C. S., Xu, G. W., 2000: Gastric dysplasia and gastric cancer: Helicobacter pylori, serum vitamin C, and other risk factors. *Journal of the National Cancer Institute* **92**, 1607-1612.

CAPÍTULO 5:

**Potential of germplasm in *Solanum* section
Lycopersicon for breeding tomato taste.**

Galiana, L., Ibañez, G., Cebolla-Cornejo, J., Roselló, S. (2017).

Scientia horticultrae, (ENVIADO).

Potential of germplasm in *Solanum* section *Lycopersicon* for breeding tomato taste

L. Galiana-Balaguer², G. Ibáñez¹, J. Cebolla-Cornejo²⁺, S. Roselló^{1+*}

¹Unidad Mixta de Investigación Mejora de la Calidad Agroalimentaria UJI-UPV. Department de Ciències Agràries i del Medi Natural, Universitat Jaume I, Avda. Sos Baynat s/n, 12071 Castelló de la Plana, Spain

²Unidad Mixta de Investigación Mejora de la Calidad Agroalimentaria UJI-UPV. COMAV. Universitat Politècnica de València, Cno. De Vera s/n, 46022 València, Spain

*Corresponding author: rosello@uji.es; Tel.: +34-96-472-80-98

+Equal contribution

RUNNING TITLE

Breeding tomato taste: sources of variation in *Solanum* section *Lycopersicon*

Abstract

The potential of accessions from *Solanum* section *Lycopersicon* for breeding tomato taste has been studied in multi-environmental trials with clonal replicates. The environment clearly affects the accumulation, and level of variation, of sugars and acids and derived variables through a direct effect in which the photosynthetically active radiation mainly determines sugar accumulation and the temperature the accumulation of organic acids. Even more, important genotype x environment interactions can considerably modify the real value of germplasm. An important intra-population variability in wild germplasm has been discovered, emphasizing the need to conveniently analyse a high number of plants per accession in order to identify sources of variation. Accessions with a significant genotypic contribution to the accumulation of sucrose within the *Lycopersicon* group may be interesting to analyse the regulation of vacuolar invertase. Accessions with different profile of citric, malic and glutamic acid have been identified. These accessions will be valuable for the development of breeding programs considering the acid shade of taste. Additionally, they will be interesting to study the regulation of the tricarboxylic acid (TCA) cycle and the gamma-aminobutyric acid (GABA) shunt.

Keywords

Environment, Genotype x environment, fructose, glucose, citric, malic, glutamic, organoleptic quality.

1. Introduction

Concerns regarding the loss of tomato taste resulted evident in the nineties (Bruhn et al., 1991), but it seems that these complains are still concerning researchers (Bennett, 2012). The special emphasis placed in high yield during selection may have negative side effects on fruit quality, as well as the introgressions from wild species and the use of genes such as *uniform ripening (u)*, or those related with delayed ripening (*nor, rin*), or even the replacement of alleles associated with the biosynthesis of key flavour volatiles, have contributed to this loss of organoleptic quality (Bertin et al., 2000; Causse et al., 2003; Powell et al., 2012; Tieman et al., 2017). Other common practices by farmers or consumers, such as the harvest of mature green fruits (Kader et al., 1977) or the refrigeration after purchase, have also contributed to this degeneration.

In this context, a great interest has been placed in increasing organoleptic quality in tomato. Considering the difficulty existing in the improvement of aroma (with more than 20 important compounds and their relationships and background notes contributing to this trait), most efforts have been placed in improving tomato taste. Stevens et al. in 1977 already revealed that tomato taste is significantly determined by the concentration of sugars, acids, and the relation between them.

Among sugars, at the red ripe stage, the concentrations of sucrose are negligible and the most important are fructose and glucose. Fructose has a higher sweetening power. Consequently, it is usual that concentrations of sugars are expressed as sucrose equivalents multiplying the concentrations of each sugar by the relative sweetness compared to sucrose (Koehler and Kays, 1991). In fact, this derived variable is more correlated with sweetness perception in sensory panels (Baldwin et al., 1998).

Citric and malic acids are the most prominent organic acids in tomato. The concentration of citric acid is usually higher and the balance between both of them is variety-dependent. It is quite more difficult to determine the relative contribution of each acid to sourness, as it depends on pH, concentrations and other variables. Nevertheless, at pH close to 4.5 (quite standard for tomato), malic acid maybe perceived as sourer (de Bruyn et al., 1971). The amino acid glutamic acid does not seem to play an important role in the perception of sourness, but some researchers have pointed out that a high ratio between sucrose equivalents and glutamic acid may be convenient to improve tomato taste (Bucheli et al., 1999; Fulton et al., 2002). Nevertheless, more insight is required regarding the role of glutamic acid in tomato taste.

Wild species of tomato have been used to improve different traits in tomato ever since the 30s (Rick, 1986). In the case of organoleptic quality, several wild species have been used in the improvement of fruit quality (reviewed by Fernie et al., 2006). In fact, important genes altering the carbohydrate metabolism have been identified in wild germplasm. For example, *Solanum chmielewskii* ((C.M. Rick, Kesicki, Fobes y M. Holle) D.M. Spooner, G.J. Anderson y R.K. Jansen) accumulates sucrose instead of hexoses in the fruit. This trait, controlled by the gene *sucrose accumulator (sucr)* has been introgressed in tomato. In this case, the *S. chmielewskii* vacuolar invertase is transcriptionally silent in tomato fruits, enabling sucrose accumulation (Klann et al.,

1993; Chetelat et al., 1995a). Nevertheless, side effects are found, including a reduction in fruit weight and yield of ripe fruits (Chetelat et al., 1995b).

Solanum habrochaites also accumulates low levels of hexoses, but with a high ratio fructose to glucose (>1.5:1). This trait is interesting considering the higher sweetening power of the former. Initially a polygenic control was proposed, but a major locus termed *Fgr* in chromosome 4 with an allelic dosage effect was later described (Levin et al., 2000). In later studies, an additional locus interacting with *Fgr* was identified. This locus, mapping to chromosome 6, encodes the enzyme Fructokinase2. Both genes show epistatic behaviour. With the higher ratios being obtained with the combinations *Fgr^{HH}* and *Fk2^{HH}*. In the presence of *Fgr habrochaites* alleles the *Fk2 habrochaites* alleles further increase the ratio. With the *Fgr esculentum* alleles, a small inconsistent additive effect is observed for *Fk2 habrochaites* alleles (Levin et al., 2004). Again, the use of these genes does not increase total sugar content (Schaffer et al., 1999).

Solanum pennellii has offered better results in increasing total sugar content in tomato. The analysis of introgression lines between this wild species and the cultivated one led to the identification of the introgression Brix-9-2-5 with high total soluble contents in chromosome 9. This introgression in fact mapped to a 484 bp ranging from exon 3 to exon 4 of the apoplastic invertase LIN5 (Fridman et al., 2000). One of the detected mutations in the catalytic site facilitates the enzyme kinetics and the resulting increased invertase activity in the fruit leads to a higher capacity to take up sucrose from the phloem and increased levels of hexoses in the ripe fruit (reviewed by Matsukura, 2016).

Despite these advances, today, the search for sources for variation targeted to the improvement of tomato taste still represents a continuous necessity. The objective of the present study is to evaluate the potential of different accessions from tomato and wild relatives as donor of traits related to tomato taste perception. At the same time, the specific contribution of genotype and environment is determined in order to analyse the difficulties that arise in this kind of screening programs.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Thirteen accessions from different species were evaluated, including materials from *Solanum lycopersicum* L., *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, *Solanum pimpinellifolium* L. and *Solanum habrochaites* Knaap & Spooner (Table 1). Most accessions were provided by the Germplasm Bank of Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV, Valencia, Spain), though two of them were provided by Tomato Genetics Resource Center (Davis, California, USA). Three modern tomato cultivars with normal levels of sugars and acids were included as controls: CDP8779 (experimental line developed by COMAV), 'Cambria' (a hybrid commercialized by Seminis Vegetables Seeds, Almería, Spain) and 'Gevora' (a processing tomato variety developed by el Centro de Investigación "La Orden-Valdesequera", Badajoz, Spain).

Table 1: Characteristics of the accessions evaluated.

Code	Accession	Species	Fruit characteristics	Origin
1	CDP8779	1	Large, light red	Valencia, Spain, X
2	CAMBRIA	1	Medium-sized, red	Almería, Spain, X
3	GEVORA	1	Medium-sized, red	Badajoz, Spain, X
4	LA3538	1	Medium sized, intense red, high lycopene	University of California, Z
5	LA1563	1	Large, red, high SSC	University of California, Z
6	CDP2178	1	Medium-size, red	Piura, Perú, X
7	CDP7632	1	Medium-size, red	Loja, Ecuador, X
8	CDP2087	1	Large, red	Gran Canaria, Spain, X
9	CDP6957/A	1	Small, yellow	Alicante, Spain, X
10	CDP6957/R	1	Small, red	Alicante, Spain, X
11	CDP4777	2	Small, orange-brownish	Ipala, Guatemala, X
12	CDP7090	3	Very small, dark red	Piura, Perú, X
13	CDP1568	3	Very small, dark red	Piura, Perú, X
14	CDP9822	3	Very small, dark red	Piura, Perú, X
15	CDP9999	3	Very small, yellow	Lambayeque, Perú, X
16	CDP4941	4	Very small, green	Loja, Ecuador, X

1, *Solanum lycopersicum*; 2, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*; 3, *S. pimpinellifolium*; 4, *S. habrochaites*. X, Supplied by COMAV, Spain; Z, Supplied by Tomato Genetics Resource Center, USA

2.2. Cultivation

The accessions were evaluated in three different environments at two sites: Valencia and Turís. Cultivation at Valencia was carried out in autumn-winter and spring-summer cycles in a glasshouse with automated climate control. Cultivation at Turis took place in the spring-summer cycle in the open air.

In protected cultivation, heating systems were used in autumn-winter cycle when required, while progressive shadowing and cooling was used in the spring-summer cycle. In all cases, fertigation was scheduled daily and plants were staked and pruned. Air temperature and photosynthetically active radiation (PAR) were recorded every 10 minutes using WatchDog wheatear stations (Spectrum Technologies Inc., Illinois, USA) equipped with temperature, quantum light PAR sensors and data logger.

As wild accessions were evaluated, and they may be composed by different genotypes, clones of all the plants studied were used, and consequently, each group of genotypes used in each environment and block was an exact replicate. Thus, a precise evaluation of the contribution of genotypes and environment could be achieved. A randomized complete block design was used with 4 blocks per environment, 16 plots per block (one per accession) and 8 plants per plot. All the blocks of each accession had clones of the same 8 plants in order to have a better estimate of block and environment effects.

2.3. Sampling

Uniformly ripe, healthy fruits at the final-ripe stage (maximum colour intensity) were harvested. The number of representative fruits harvested (5-20) were determined by the species and according to fruit weight. Fruits were collected only from the first three

trusses to minimize intra-plant variability. Samples were ground and blended with homogenizer (Diox 900, Heidolph, Germany) and stored at -80°C until analysis.

2.4. Analysis of sugars and acids

The sugars (fructose, glucose, and sucrose) and the organic acids (malic, citric and glutamic) were quantified following the method described by Cebolla-Cornejo et al. (2012). Reagents and standards were purchased from Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, Spain). Capillary electrophoresis was performed with an Agilent 7100 capillary electrophoresis system (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania. Fused silica capillaries (Polymicro Technologies, Valley Drive, Ilkey, UK) were used, with a 50 µm internal diameter, 363 µm external diameter, 67 cm total length and 60 cm effective length. Capillaries were initially conditioned with consecutive rinses at 95000 Pa and 50°C: NaOH 1 M (5 min), NaOH 0.1 M (5 min), and deionized water (Elix 3, Millipore, Billerica, MA)(10 min). Following initial conditioning, the capillary was rinsed for 20 min at 20°C with the separation buffer.

Samples were thawed and then centrifuged at 3500 rpm for 5 min. The upper phase was diluted (1:20) in deionized water. The solution was filtered using 0.2 µm membranes and analyzed. The analysis conditions were as follows: hydrodynamic injection for 10 s at 03400 Pa; separation at -25 kV fixed voltage and 20°C. The separation buffer was: 20 mM 2,6-piridin dicarboxylic acid (PDC) and 0.1% w/v hexadimethrine bromide, pH=12.1. The capillary was flushed with 58 mM SDS (2 min) and separation buffer (5 min) between analyses.

2.5. Statistical analysis

Several derived variables were calculated using the contents determined of sugars and acids. Sucrose equivalents, a variable highly correlated with sweetness perception (Baldwin et al., 1998) were calculated adding up glucose and fructose contents multiplied by 0.74 and 1.73 respectively. Following the same approximation, acid equivalents were calculated considering the relative sourness of each compound, summing up the contents of citric acid and malic acid multiplied by 1 and 1.14 respectively (Stevens et al., 1977). Several authors point the importance of the ratios sugar to acid (Stevens et al., 1977, Baldwin et al., 1998). Consequently, the ratios sucrose equivalents to citric acid, glutamic acid and acid equivalents were also calculated.

A graphical analysis to display the genotype and genotype x environment contribution was performed using GGE biplots to provide a general insight on the genetic contribution to sugar and acid accumulation. A model with standard deviation scaling, tester-centering (G+GE) and HJ singular value partitioning (dual metric preserving) were used for the analysis (Frutos et al., 2014). GGEbiplotGUI package in R was used for this purpose.

In order to obtain a deeper insight to the contribution of the growing environment, genotype and their interaction to the phenotypic expression of taste components we calculated an specific estimate of these contributions using the following mixed linear model considering the *i* genotype, *j* environment and *k* block inside each environment:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + E_j + GE_{ij} + B_{k(j)} + e_{ijk}$$

where Y= phenotypic value with population mean μ and variance V_P ; G= genotype effect with mean 0 and variance V_G ; E= environment effect with mean 0 and variance V_E ; GE= genotype x environment interaction effect with mean 0 and variance $V_{G \times E}$; B= the block effect with mean 0 and variance V_B ; e = residual effect with mean 0 and variance V_e . All the factors were considered as random. The random effects were predicted using the adjusted unbiased prediction (AUP) method. Standard errors of the statistics were obtained by jackknife procedures and two-tailed t-tests were performed for testing the significance of parameters obtained. All the data analyses were performed with QGASStation (v. 2) software (Bioinformatics Institute, Zhejiang University, China).

In order to provide information on the level of variation within accessions, the data obtained in the environment Turis spring/summer was analysed with MANOVA biplots. Univariate Bonferroni confidence circles are added to the group markers. Significance of the difference between two accessions-environments can be inferred if the projections on a variable vector do not overlap. MultiBiplot, a software free-licensed by Prof. Vicente Villardón (2015) was used for these calculations. Coefficients of variation for each analyte and environment were also calculated in order to assess the effect of genotype and environment in the level of variation. Correlations between acid contents were calculated to analyse the acidic profile of the accessions tested.

3. Results

Sugars and acid concentrations and derived variables were obtained for all accessions and environments (Supp. Table 1). Only accessions with small fruits including CDP6957/A, CDP6957/R from cultivated tomato, CDP4777 from the former var. *cerasiforme*, CDP7090, CDP1568, CDP9822 and CDP9999 from *S. pimpinellifolium* and CDP4941 from *S. habrochaites* presented quantifiable amounts of sucrose. The cultivation in three environments of clones of the same plants enabled a precise decomposition of the effects of the environment (E), genotype (G) and GxE interactions.

Environmental effects:

Only the ratio malic to citric acid showed null general environmental contributions to the phenotypic values, as in this case, the environment affected the phenotypic value mainly via genotype x environment interactions (Fig.1). Of the three environments, Valencia with an autumn-winter growing cycle in a glasshouse had a clearly negative contribution to the accumulation of both fructose and glucose. In this environment, the environmental contribution to the accumulation of citric acid was positive, resulting in a positive contribution to acid equivalents. As result, the contributions to the ratios between sucrose equivalents and the different acids were negative, as well as the environmental contributions to the ratios glutamic to citric acid and fructose to glucose.

Supp. Table 1: Phenotypic content (mean ± standard deviation, g·kg⁻¹ fresh weight) of sugars and organic acids.

Accession	Location	Citric acid (Cit)	Malic acid (Mal)	Glutamic acid (Glut)	Fructose (Fru)	Glucose (Glu)	Sucrose (S)	Mal/Cit ratio	Glut/Cit ratio	Glut/Mal ratio	Fru/Glu ratio
CDP8779	V a/w	6.65 ± 1.18	1.780 ± 0.46	1.86 ± 0.88	11.71 ± 1.68	10.91 ± 2.53	n.d.	0.27 ± 0.06	0.29 ± 0.13	1.09 ± 0.53	1.12 ± 0.22
CAMBRIA	V a/w	8.27 ± 0.95	1.69 ± 0.77	2.32 ± 0.69	15.42 ± 2.05	15.40 ± 2.18	n.d.	0.20 ± 0.07	0.29 ± 0.11	1.47 ± 0.93	1.01 ± 0.06
GEVORA	V a/w	4.83 ± 1.65	2.01 ± 0.51	3.38 ± 1.53	10.43 ± 2.68	9.00 ± 2.87	n.d.	0.48 ± 0.30	0.77 ± 0.43	1.76 ± 0.92	1.23 ± 0.28
LA3538	V a/w	7.59 ± 1.24	2.19 ± 0.44	1.15 ± 0.55	12.10 ± 2.29	11.52 ± 2.04	n.d.	0.29 ± 0.06	0.15 ± 0.05	0.54 ± 0.23	1.05 ± 0.04
LA1563	V a/w	7.03 ± 1.85	1.55 ± 0.50	2.93 ± 1.66	15.61 ± 3.75	15.82 ± 3.30	n.d.	0.22 ± 0.05	0.43 ± 0.22	1.87 ± 0.56	0.99 ± 0.11
CDP2178	V a/w	4.96 ± 1.31	1.83 ± 0.63	3.77 ± 1.16	14.07 ± 2.14	12.84 ± 1.38	n.d.	0.37 ± 0.07	0.79 ± 0.26	2.16 ± 0.66	1.10 ± 0.13
CDP7632	V a/w	7.74 ± 1.54	1.67 ± 0.34	1.86 ± 0.79	12.62 ± 1.54	13.04 ± 2.89	n.d.	0.22 ± 0.06	0.24 ± 0.09	1.12 ± 0.40	0.99 ± 0.12
CDP2087	V a/w	6.77 ± 1.48	1.75 ± 0.51	1.75 ± 0.60	12.55 ± 2.02	12.77 ± 2.00	n.d.	0.26 ± 0.05	0.26 ± 0.06	1.02 ± 0.22	0.99 ± 0.08
CDP6957/A	V a/w	10.34 ± 2.23	2.56 ± 1.15	3.28 ± 0.82	16.21 ± 2.62	13.71 ± 2.50	1.25 ± 0.79	0.26 ± 0.12	0.33 ± 0.10	1.60 ± 1.00	1.19 ± 0.15
CDP6957/R	V a/w	7.41 ± 1.07	3.13 ± 0.77	4.63 ± 1.63	15.40 ± 3.09	14.81 ± 2.77	1.11 ± 1.75	0.43 ± 0.13	0.66 ± 0.41	1.54 ± 0.58	1.04 ± 0.12
CDP4777	V a/w	14.64 ± 4.28	1.97 ± 0.65	1.71 ± 0.68	11.07 ± 2.77	9.68 ± 2.75	2.31 ± 0.82	0.13 ± 0.08	0.14 ± 0.09	1.22 ± 0.79	1.17 ± 0.17
CDP7090	V a/w	24.81 ± 1.84	2.16 ± 0.83	4.93 ± 1.87	5.17 ± 1.87	3.52 ± 1.29	0.71 ± 0.26	0.09 ± 0.13	0.20 ± 0.21	2.29 ± 1.05	1.47 ± 0.16
CDP1568	V a/w	14.19 ± 2.24	2.43 ± 0.46	5.46 ± 1.79	4.70 ± 2.36	4.48 ± 1.39	2.06 ± 1.51	0.17 ± 0.02	0.39 ± 0.14	2.23 ± 0.63	1.00 ± 0.27
CDP9822	V a/w	9.71 ± 1.77	2.49 ± 0.79	4.94 ± 1.25	10.64 ± 3.24	13.08 ± 1.43	1.02 ± 0.53	0.26 ± 0.24	0.51 ± 0.65	1.98 ± 2.84	0.81 ± 0.21
CDP9999	V a/w	12.95 ± 3.36	5.14 ± 2.90	0.77 ± 0.25	13.66 ± 5.43	9.76 ± 4.14	1.43 ± 1.57	0.53 ± 0.39	0.08 ± 0.05	0.17 ± 0.07	1.42 ± 0.09
CDP4941	V a/w	19.34 ± 4.73	7.80 ± 2.06	2.21 ± 1.73	6.23 ± 2.17	3.60 ± 1.67	20.23 ± 12.44	0.41 ± 0.17	0.11 ± 0.07	0.30 ± 0.22	1.88 ± 0.62
CDP8779	V s/s	5.37 ± 2.64	1.41 ± 0.38	2.67 ± 1.82	15.45 ± 4.96	14.52 ± 6.55	n.d.	0.32 ± 0.18	0.55 ± 0.33	2.00 ± 1.38	1.12 ± 0.16
CAMBRIA	V s/s	8.06 ± 5.02	1.46 ± 1.09	3.21 ± 2.91	19.25 ± 6.16	18.16 ± 6.89	n.d.	0.20 ± 0.11	0.56 ± 0.67	2.84 ± 2.56	1.08 ± 0.10
GEVORA	V s/s	7.81 ± 1.03	1.58 ± 0.73	3.28 ± 2.21	15.95 ± 5.06	14.55 ± 5.61	n.d.	0.30 ± 0.14	0.60 ± 0.37	2.26 ± 1.46	1.13 ± 0.16
LA3538	V s/s	6.40 ± 2.52	1.79 ± 0.63	2.04 ± 1.31	17.53 ± 4.98	17.06 ± 5.70	n.d.	0.32 ± 0.15	0.33 ± 0.18	1.38 ± 1.20	1.06 ± 0.16
LA1563	V s/s	4.83 ± 3.83	1.23 ± 0.45	3.81 ± 2.36	20.04 ± 4.58	18.79 ± 5.58	n.d.	0.36 ± 0.20	1.05 ± 1.01	3.52 ± 3.14	1.09 ± 0.12
CDP2178	V s/s	4.94 ± 2.14	1.39 ± 0.56	2.90 ± 1.86	18.88 ± 5.29	17.05 ± 5.16	n.d.	0.32 ± 0.20	0.71 ± 0.56	2.76 ± 3.18	1.12 ± 0.11
CDP7632	V s/s	7.16 ± 3.30	1.31 ± 0.56	2.71 ± 1.96	17.08 ± 5.08	15.70 ± 5.40	n.d.	0.22 ± 0.11	0.45 ± 0.36	2.33 ± 1.68	1.11 ± 0.11
CDP2087	V s/s	7.45 ± 3.25	1.59 ± 0.74	2.20 ± 1.05	19.79 ± 5.75	18.63 ± 5.66	n.d.	0.24 ± 0.13	0.35 ± 0.28	1.82 ± 1.64	1.08 ± 0.13
CDP6957/A	V s/s	8.07 ± 4.20	1.92 ± 0.98	5.63 ± 4.39	20.29 ± 5.03	17.70 ± 5.13	1.80 ± 1.47	0.28 ± 0.17	0.85 ± 0.79	3.80 ± 3.07	1.16 ± 0.09
CDP6957/R	V s/s	9.57 ± 5.96	3.51 ± 1.78	7.65 ± 4.86	22.24 ± 8.09	20.77 ± 8.39	1.66 ± 1.29	0.45 ± 0.21	1.27 ± 0.84	3.53 ± 2.49	1.09 ± 0.09
CDP4777	V s/s	11.67 ± 4.60	1.25 ± 1.03	3.10 ± 2.40	16.17 ± 4.03	13.53 ± 3.88	3.45 ± 1.53	0.14 ± 0.12	0.35 ± 0.33	4.64 ± 6.47	1.21 ± 0.11
CDP7090	V s/s	14.24 ± 3.95	5.75 ± 2.22	7.13 ± 2.40	15.75 ± 5.78	12.81 ± 4.80	4.77 ± 2.75	0.37 ± 0.13	0.56 ± 0.24	1.90 ± 1.51	1.24 ± 0.14
CDP1568	V s/s	13.95 ± 5.52	2.76 ± 1.85	5.90 ± 2.72	8.15 ± 4.83	6.11 ± 3.92	2.70 ± 1.31	0.22 ± 0.11	0.51 ± 0.33	2.61 ± 1.41	1.38 ± 0.29
CDP9822	V s/s	11.58 ± 4.04	6.05 ± 2.85	10.48 ± 5.07	12.16 ± 4.68	11.63 ± 5.05	2.67 ± 2.69	1.06 ± 0.27	1.08 ± 0.31	1.75 ± 0.76	1.08 ± 0.30
CDP9999	V s/s	14.68 ± 3.60	4.44 ± 2.47	1.19 ± 0.42	16.52 ± 4.57	14.50 ± 4.74	1.87 ± 1.58	0.33 ± 0.16	0.09 ± 0.03	0.32 ± 0.14	1.18 ± 0.19
CDP4941	V s/s	16.97 ± 3.68	6.48 ± 2.68	3.90 ± 2.20	6.73 ± 3.60	5.56 ± 3.21	24.51 ± 14.19	0.36 ± 0.20	0.26 ± 0.19	1.07 ± 1.03	1.29 ± 0.28

n.d.: not detected; Va/w: Valencia Autumn/Winter; Vs/s: Valencia Spring/summer; Ts/s: Turis Spring/summer.

Supp. Table 1 (continuation) Phenotypic content (mean \pm standard deviation, g·kg⁻¹ fresh weight) of sugars and organic acids.
Phenotypic content (mean \pm standard deviation, g·kg⁻¹ fresh weight) of sugars and organic acids.

Accession	Location	Citric acid (Cit)	Malic acid (Mal)	Glutamic acid (Glu)	Fructose (Fru)	Glucose (Glu)	Sucrose (S)	Mal/Cit ratio	Glut/Cit ratio	Glut/Mal ratio	Fru/Glu ratio
CDP8779	T s/s	4.48 \pm 1.07	1.43 \pm 0.43	0.92 \pm 0.48	13.82 \pm 2.06	12.43 \pm 2.57	n.d.	0.33 \pm 0.11	0.21 \pm 0.11	0.70 \pm 0.49	1.14 \pm 0.24
CAMBRIA	T s/s	4.78 \pm 1.38	1.65 \pm 1.18	1.74 \pm 0.34	15.99 \pm 2.34	14.19 \pm 2.13	n.d.	0.34 \pm 0.12	0.30 \pm 0.33	0.85 \pm 0.47	1.14 \pm 0.15
GEVORA	T s/s	4.00 \pm 1.46	1.81 \pm 0.81	1.88 \pm 0.81	14.57 \pm 4.16	12.89 \pm 3.77	n.d.	0.64 \pm 0.94	0.55 \pm 0.41	1.09 \pm 0.38	1.17 \pm 0.31
LA3538	T s/s	4.82 \pm 3.00	2.57 \pm 0.86	1.02 \pm 0.52	17.44 \pm 8.99	13.09 \pm 5.47	n.d.	0.40 \pm 0.16	0.23 \pm 0.10	0.64 \pm 0.40	1.13 \pm 0.17
LA1563	T s/s	3.16 \pm 1.08	1.52 \pm 0.72	2.11 \pm 0.62	17.39 \pm 3.91	14.39 \pm 4.30	n.d.	0.52 \pm 0.66	0.75 \pm 0.52	1.70 \pm 0.56	1.31 \pm 0.80
CDP2178	T s/s	3.10 \pm 1.28	1.59 \pm 0.76	1.50 \pm 0.48	13.23 \pm 2.36	12.00 \pm 2.90	n.d.	0.67 \pm 1.09	0.57 \pm 0.44	1.09 \pm 0.35	1.09 \pm 0.22
CDP7632	T s/s	4.30 \pm 1.11	1.37 \pm 0.35	1.05 \pm 0.39	14.65 \pm 2.60	13.09 \pm 3.20	n.d.	0.33 \pm 0.09	0.24 \pm 0.07	0.80 \pm 0.35	1.16 \pm 0.24
CDP2087	T s/s	4.86 \pm 4.03	1.55 \pm 1.13	1.16 \pm 0.73	17.46 \pm 8.14	15.90 \pm 7.61	n.d.	0.37 \pm 0.19	0.30 \pm 0.29	0.89 \pm 0.56	1.13 \pm 0.38
CDP6957/A	T s/s	5.36 \pm 1.43	2.14 \pm 1.23	2.21 \pm 1.17	19.89 \pm 5.00	15.17 \pm 4.98	0.27 \pm 0.48	0.44 \pm 0.36	0.43 \pm 0.21	1.32 \pm 0.75	1.46 \pm 0.65
CDP6957/R	T s/s	3.79 \pm 1.00	1.87 \pm 0.75	2.18 \pm 0.84	15.67 \pm 3.44	14.94 \pm 6.76	0.14 \pm 0.28	0.50 \pm 0.16	0.59 \pm 0.19	1.28 \pm 0.54	1.28 \pm 0.36
CDP4777	T s/s	8.19 \pm 2.00	1.14 \pm 0.88	1.36 \pm 0.77	16.23 \pm 4.56	13.49 \pm 2.69	1.06 \pm 0.73	0.13 \pm 0.05	0.16 \pm 0.05	1.31 \pm 0.48	1.21 \pm 0.26
CDP7090	T s/s	15.52 \pm 3.83	2.04 \pm 0.72	3.58 \pm 1.88	18.47 \pm 6.61	15.25 \pm 5.55	2.50 \pm 0.86	0.14 \pm 0.07	0.24 \pm 0.14	1.84 \pm 0.91	1.23 \pm 0.17
CDP1568	T s/s	13.48 \pm 2.09	1.32 \pm 0.44	2.51 \pm 1.25	13.63 \pm 3.13	10.84 \pm 2.37	2.58 \pm 0.89	0.10 \pm 0.03	0.19 \pm 0.12	2.05 \pm 1.18	1.26 \pm 0.11
CDP9822	T s/s	11.39 \pm 1.94	1.73 \pm 0.44	3.63 \pm 0.49	21.93 \pm 5.12	19.15 \pm 5.04	2.38 \pm 0.94	0.15 \pm 0.04	0.34 \pm 0.51	2.21 \pm 3.37	1.16 \pm 0.15
CDP9999	T s/s	12.65 \pm 4.07	3.01 \pm 2.25	1.04 \pm 0.34	26.71 \pm 6.23	23.20 \pm 5.53	1.54 \pm 0.47	0.28 \pm 0.30	0.09 \pm 0.03	0.44 \pm 0.20	1.17 \pm 0.17
CDP4941	T s/s	22.00 \pm 5.03	4.57 \pm 1.03	1.54 \pm 1.14	7.69 \pm 3.45	5.73 \pm 3.53	34.45 \pm 14.11	0.20 \pm 0.10	0.08 \pm 0.10	0.41 \pm 0.36	1.45 \pm 0.25

n.d.: not detected; Va/w: Valencia Autumn/Winter; Vs/s: Valencia Spring/summer; Ts/s: Turis Spring/summer.

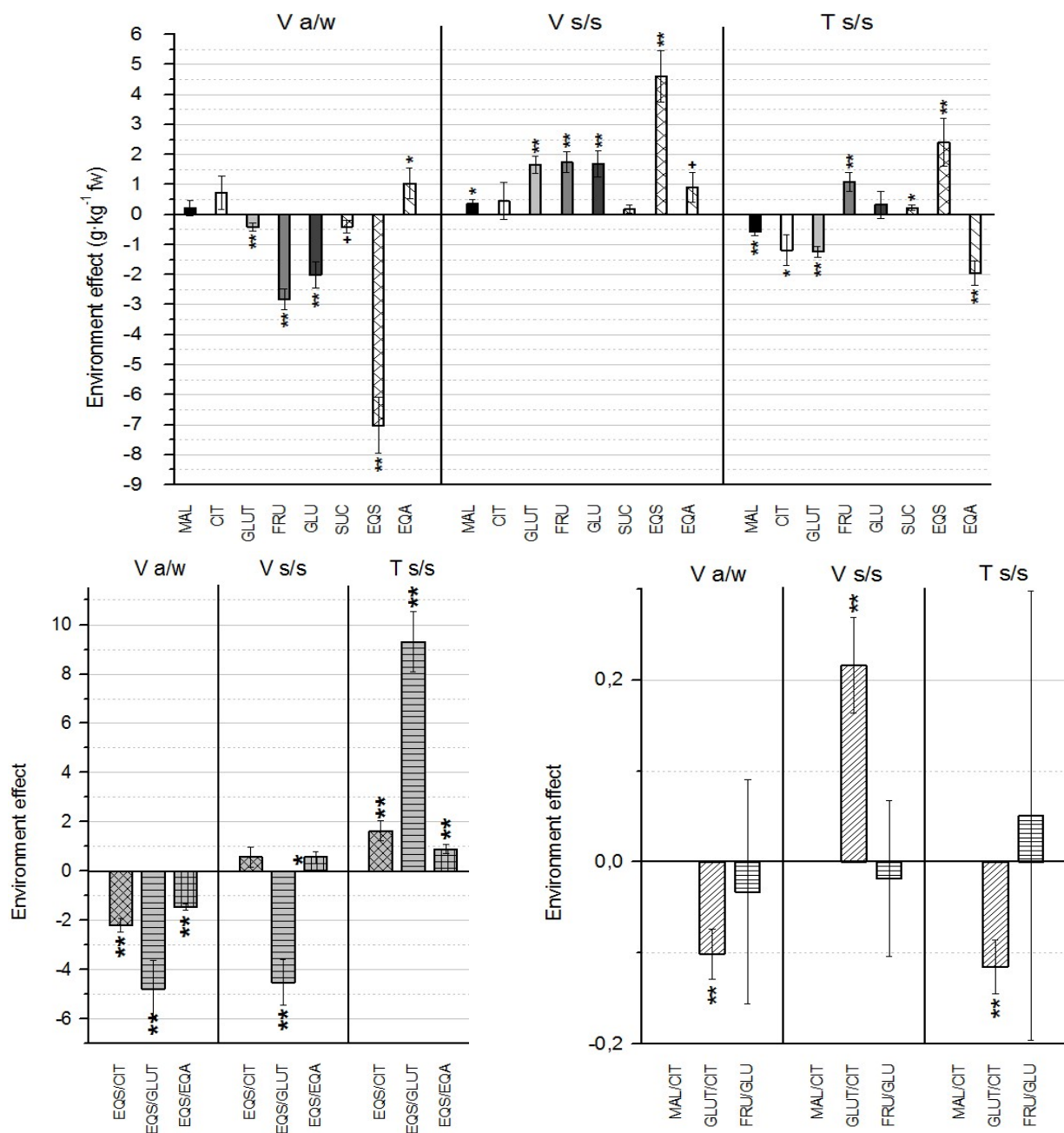


Fig. 1. Estimated contribution of the environment to the phenotypic accumulation of sugars and acids and to derived variables. Va/w: Valencia Autumn/Winter; Vs/s: Valencia Spring/summer; Ts/s: Turis Spring/summer.

Comparatively, this environment was characterized by a much lower irradiance and lower temperatures during the second half of the growing cycle (Fig. 2). Between both variables, the effect of irradiance was more accentuated, as when accumulated PAR_{max} and temperatures were considered the difference between irradiance is much higher than in terms of temperature (e.g. differences in accumulated temperature during the last part of the cultivation period with open air cultivation in Turis were limited).

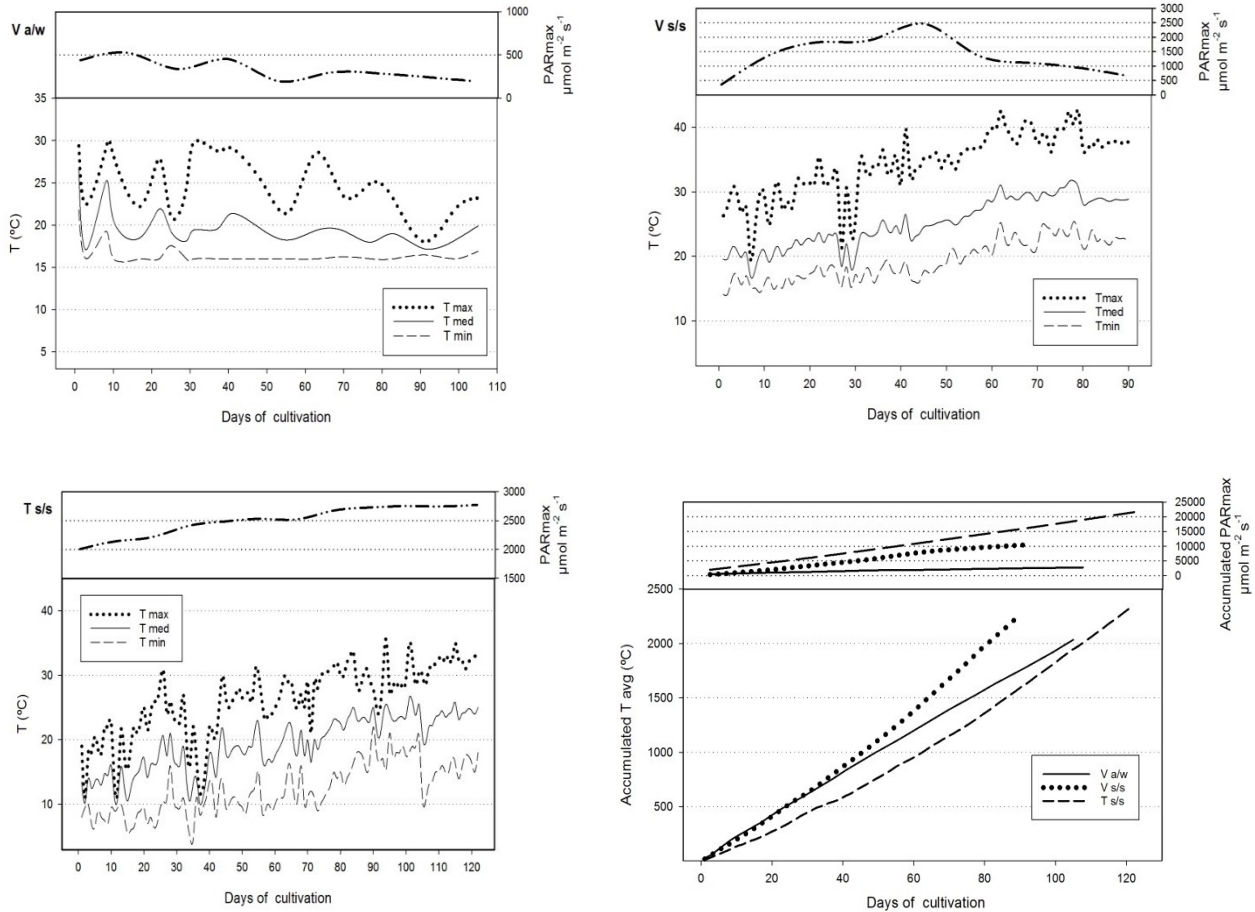


Fig.2. Climatic data recorded during the study. Va/w: Valencia Autumn/Winter; Vs/s: Valencia Spring/summer; Ts/s: Turis Spring/summer.

The environment of Valencia with cultivation in glasshouse during the spring-summer cycle had a positive contribution to the accumulation of both acids and sugars, especially of the latter (Fig. 1). In the case of organic acids, the contribution to the accumulation of glutamic acid was much higher than to citric or malic acid, and a positive contribution to the ratio glutamic to citric acid was detected. Consequently, there was a positive contribution to the ratios sucrose equivalents to citric acid and a negative one to the ratio sucrose equivalents to glutamic acid. On the contrary, a small negative contribution to the ratio fructose to glucose was observed. This environment was characterized by a higher irradiance compared to the autumn-winter cycle, much higher temperatures and higher temperature ranges (Fig.2).

The environment of Turis, with higher irradiance levels, lower temperatures and intermediate temperature ranges (Fig. 2), had a negative contribution to the accumulation of acids and positive on the accumulation of sugars. In this last case, the contribution to glucose contents was lower than the corresponding to fructose and lower than the one detected in Valencia in the same growing cycle. This led to a positive contribution to the fructose to glucose ratio. The imbalance between the contributions to the accumulation of sugars and acids resulted in positive contributions to the ratio between sugars and acids. This environment had a negative contribution to

the glutamic to citric acid, similar to the one detected in Valencia during the autumn-winter cycle.

The analysis of coefficients of variation revealed that the environment presented a significant effect on the level of variation in the accumulation of all the compounds. The lowest coefficients of variation were detected in Valencia autumn/winter followed at a distance by Turis spring/summer (Supp. Table 2).

General genotypic and GxE interaction effects

GGE biplots used offer a general picture of the genetic potential (genotype and the GxE interaction) of all accessions studied for all taste variables considered, allowing an easy and direct comparison between them and additional information about character correlations very useful for genotype selection. This analysis represented a 75% of the observed variability. This time accession CDP9999 outstood for the GGE contribution to the accumulation of fructose and glucose, and consequently to sucrose equivalents (Fig. 3).

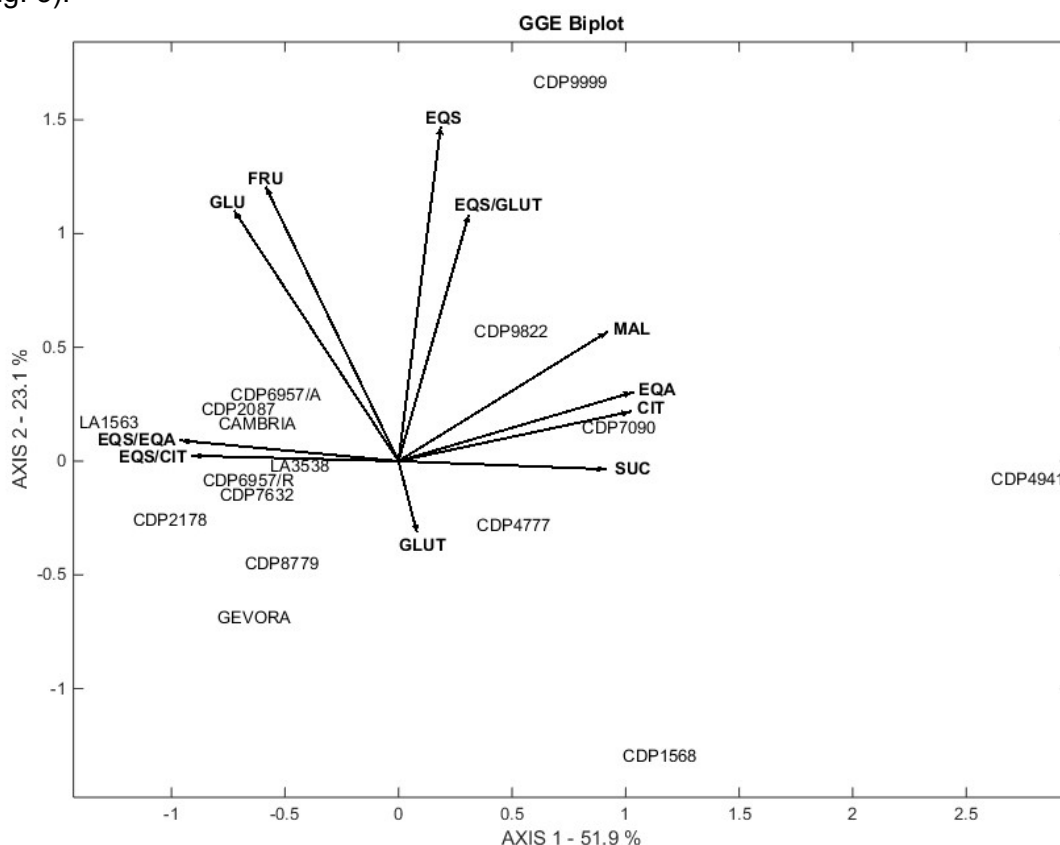


Fig. 3. GGE biplot analysis (JK tester centered) of the accessions evaluated.

Accessions CDP4941 and in a lesser extent CDP7090 outstood for their genotypic contribution to an acid nuance, with higher GGE contributions to both citric and malic acids, leading to rank high in acid equivalents. In the accessions tested, the contributions to malic and citric were somehow correlated, as the angle between the vectors for citric and malic acids was relatively small. The contribution to the accumulation of glutamic acid was independent. In this case, the accession CDP1568 outstood for the genetic contribution to the contents of glutamic acid.

Supp. Table 2: Mean coefficients of variation per accession and environment for sugar and acid content. Va/w: Valencia Autumn/Winter; Vs/s: Valencia Spring/summer; Ts/s: Turis Spring/summer.

Accessions	Citric acid (%CV)			Malic acid (%CV)			Glutamic acid (%CV)			Fructose (%CV)			Glucose (%CV)			Sucrose (%CV)		
	Va/w	Vs/s	Ts/s	Va/w	Vs/s	Ts/s	Va/w	Vs/s	Ts/s	Va/w	Vs/s	Ts/s	Va/w	Vs/s	Ts/s	Va/w	Vs/s	Ts/s
CDP8779	17,8	49,2	23,8	25,8	27,2	30,5	47,1	68,0	52,4	14,4	32,1	14,9	23,1	45,1	20,7			
Cambria	11,4	62,3	28,9	45,4	74,8	71,7	29,9	90,7	19,7	13,3	32,0	14,6	14,2	37,9	15,0			
Gevora	34,0	13,1	36,5	25,3	46,0	45,0	45,4	67,3	43,3	25,7	31,7	28,5	31,8	38,5	29,3			
LA3538	16,3	39,4	62,2	19,9	34,9	33,5	47,7	64,1	51,2	18,9	28,4	51,6	17,7	33,4	41,8			
LA1563	26,3	79,3	34,2	32,5	36,6	47,6	56,6	62,1	29,2	24,0	22,8	22,5	20,9	29,7	29,8			
CDP2178	26,3	43,3	41,4	34,1	40,3	47,9	30,8	64,1	32,0	15,2	28,0	17,8	10,7	30,3	24,1			
CDP7632	19,9	46,1	25,9	20,3	42,7	25,5	42,3	72,5	37,3	12,2	29,7	17,7	22,2	34,4	24,4			
CDP2087	21,9	43,7	82,9	29,4	46,6	72,9	34,4	47,6	62,6	16,1	29,1	46,6	15,7	30,4	47,9			
CDP6957/A	21,6	52,0	26,6	44,9	51,0	57,6	25,1	78,0	53,1	16,2	24,8	25,1	18,2	29,0	32,8	63,0	81,4	175,9
CDP6957/R	14,4	62,3	26,3	24,6	50,6	40,4	35,2	63,5	38,7	20,1	36,4	21,9	18,7	40,4	45,3	157,7	77,4	197,9
CDP4777	29,3	39,4	24,4	32,9	82,4	77,0	39,7	77,5	56,8	25,0	24,9	28,1	28,4	28,7	19,9	35,5	44,3	68,3
CDP7090	7,4	27,7	24,7	38,7	38,5	35,2	38,0	33,6	52,6	36,2	36,7	35,8	36,7	37,4	36,4	36,0	57,6	34,2
CDP1568	15,8	39,6	15,5	18,8	66,9	33,2	32,9	46,1	49,7	50,2	59,2	23,0	31,0	64,2	21,8	73,3	48,6	34,7
CDP9822	18,3	34,9	17,0	31,5	47,1	25,3	25,4	48,4	13,5	30,5	38,5	23,3	11,0	43,4	26,3	51,8	100,6	39,7
CDP9999	26,0	24,5	32,2	56,5	55,8	74,5	32,5	35,4	32,7	39,7	27,7	23,3	42,4	32,7	23,8	109,2	84,5	30,5
CDP4941	24,5	21,7	22,8	26,4	41,4	22,4	78,1	56,3	74,4	34,8	53,4	44,8	46,3	57,8	61,7	61,5	57,9	41,0
Environment	19,8	41,9	32,7	31,7	48,7	45,7	39,8	59,7	41,4	23,8	33,2	27,7	23,8	38,1	31,3	69,2	64,5	73,0

The GGE contributions to the ratio between sucrose equivalents and citric acid and acid equivalents were highly correlated. This result was somehow expected, as citric acid, despite being less sour presented in general quantities much higher (2-fold on average). Accession LA1563 outstood for the highest contributions in these ratios. As the accumulation of glutamic acid was inversely related to the accumulation of sugars in this group of accessions, the highest ratios between both variables were obtained with CDP9999.

Specific genotypic and GxE interaction effects

The specific contributions of genotype and genotype x environment interaction were analysed to identify the accessions with higher genotypic contributions and stability (Figs. 4 and 5). Accessions CDP4941 and CDP7090 showed the highest genotypic contribution to the accumulation of citric acid. For CDP7090 the contribution in Valencia autumn/winter would be higher, while for CDP4941 Turis spring/summer would have a higher effect. This last accession also outstood for malic acid accumulation, showing positive interactions with the environments of Valencia. In general, the correlations between phenotypic contents of malic and citric acid were moderate ($R=0.47$) and lower between malic and glutamic ($R=0.28$) and citric and glutamic ($R=0.22$). But within accessions these correlations varied (Supp. Table 3). In the case of citric and malic, ten accessions showed significant moderate correlations (mean $R=0.44$). In the case of citric and glutamic acids, seven accessions showed significant moderate correlations (mean $R=0.45$), two accessions significant low correlations (mean $R=0.22$) and one accession (CDP4941) showed a significant negative correlation ($R=-0.36$). Between malic and glutamic, six accessions showed significant moderate correlations (mean $R=0.49$) and one accession significant low correlation ($R=0.24$). No common pattern could be identified. But it was noticeable that CDP2087 (with mean $R=0.34$) presented relatively high values for the correlations between the three acids.

The two accessions with the highest contribution to citric acid accumulation showed a distinct acid accumulation profile. CDP4941 showed a significant positive correlation between citric and malic acids ($R=0.41$), while the relationship between citric and glutamic and malic and glutamic was negative or null ($R=-0.36$ and $R=0.03$ respectively). In the case of CDP7090 only malic and glutamic acids were significantly correlated (0.54).

Regarding the malic to citric acid ratio, two different profiles were identified. One formed by accessions with smaller genotypic contributions, similar to the controls Cambria and CDP87779, and another formed by CDP9822, CDP9999, CDP6957/R, CDP2178 and CDP4941, with a profile similar to Gevora. It was noticeable that the interaction contribution was especially in the accessions with high genotypic contribution. Among them, the performance was different, as CDP9822 and CDP9999 showed a considerably negative contribution in Turis while CDP2178 and Gevora showed a considerable positive interaction in the same environment.

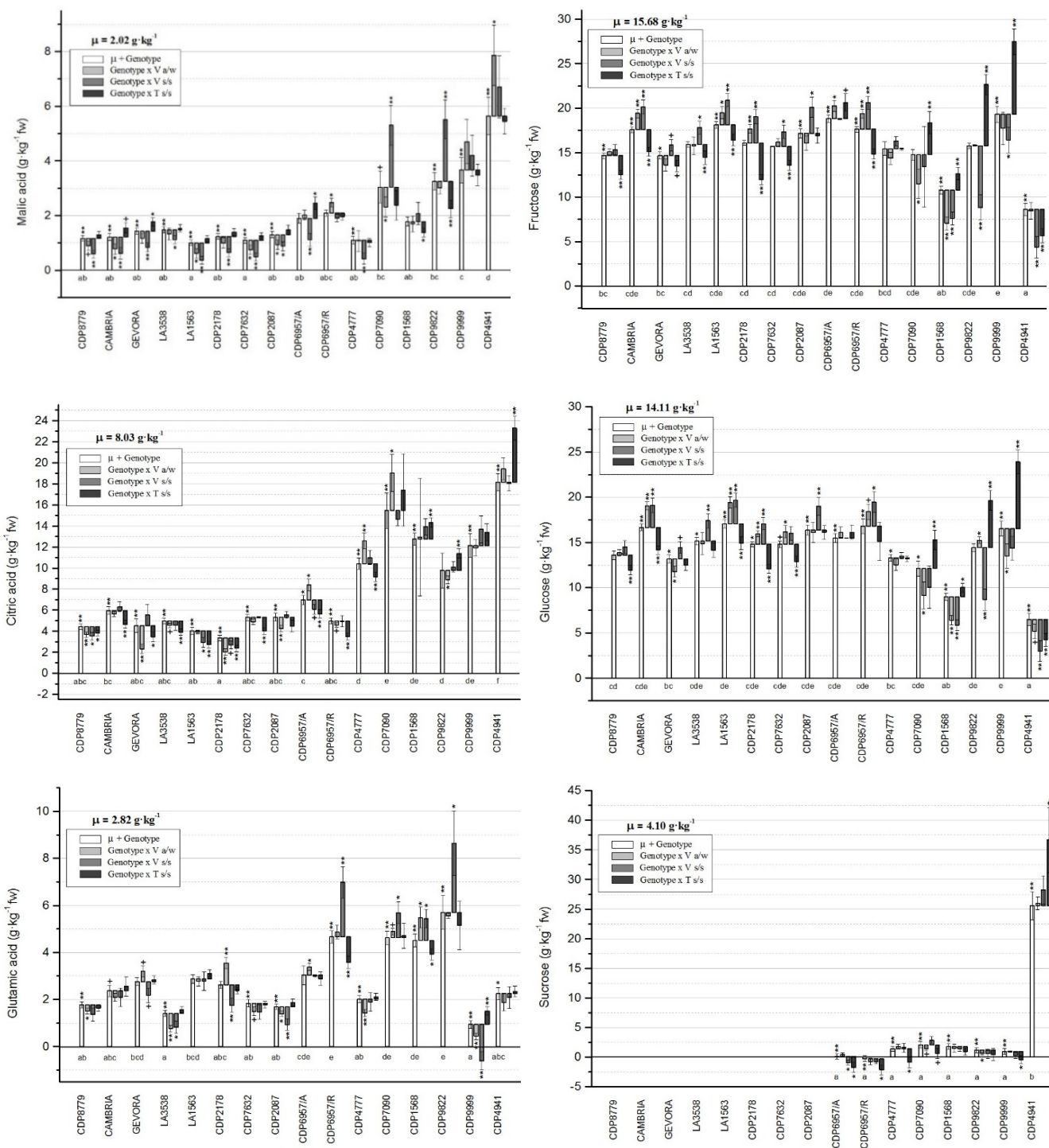


Fig. 4. Predicted total genotypic ($\mu + G$) and interaction ($G \times E$) effects for sugar and acid accumulation in three environments: Va/w: Valencia autumn/winter Vs/s: Valencia Spring/summer Ts/s: Turis Spring/summer. Significant departures from zero (t-test) are indicated with + ($p < 0.1$), * ($p < 0.05$) and ** ($p < 0.01$).

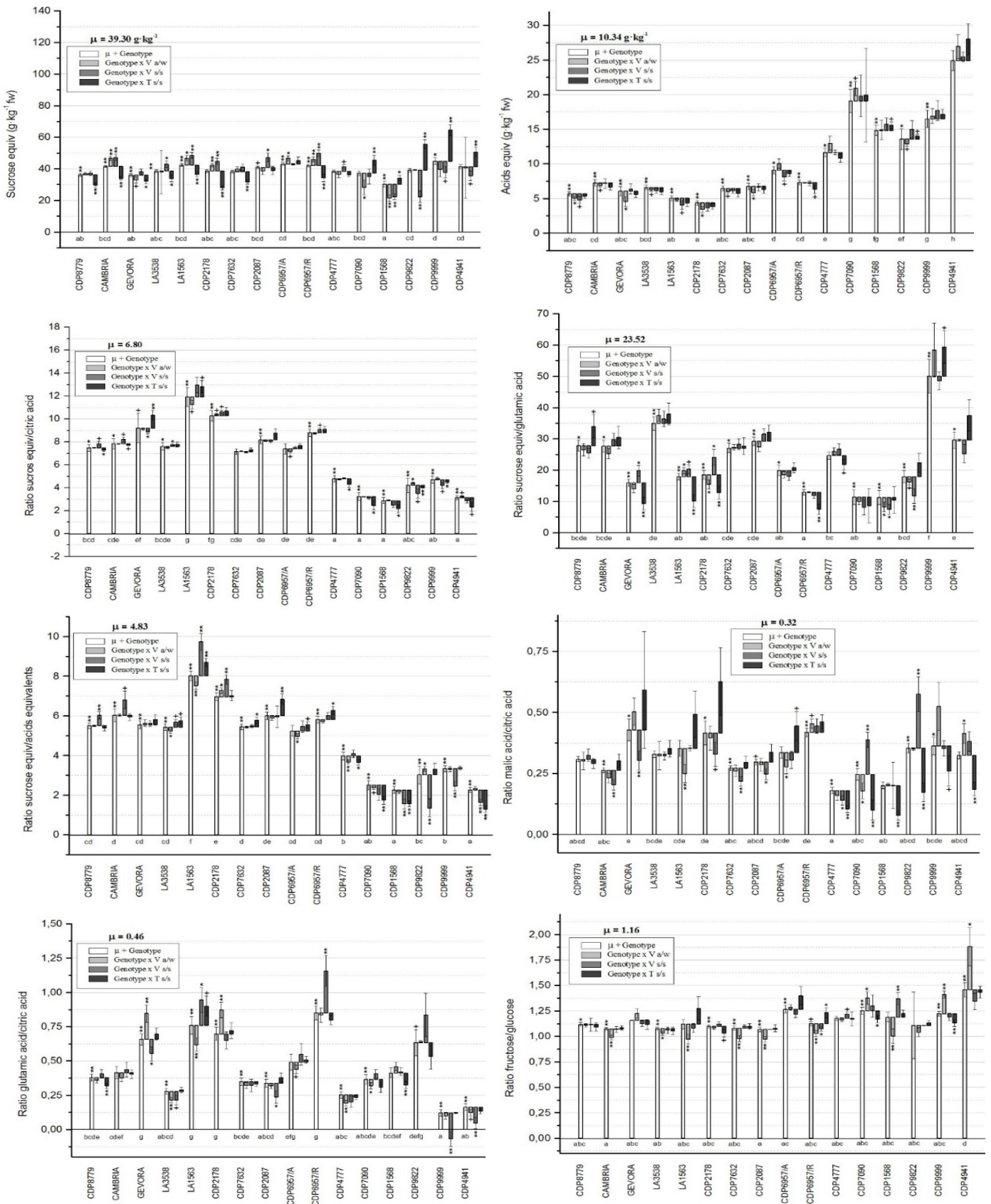


Fig. 5. Predicted total genotypic ($\mu + G$) and interaction ($G \times E$) effects for derived variables in three environments: Va/w: Valencia autumn/winter Vs/s: Valencia Spring/summer Ts/s: Turis Spring/summer. First three accessions are controls. Significant departures from zero (t-test) are indicated with + ($p < 0.1$), * ($p < 0.05$) and ** ($p < 0.01$).

Supp. Table 3: Correlations among accumulation of organic acids (R values)

Accession	Malic and citric acid	Citric and glutamic	Malic and glutamic
CDP8779	0,41*	0,38*	0
CAMBRIA	0,51*	0,11	0,39*
GEVORA	0,07	0,06	0,09
LA3538	0,57*	0,38*	0,13
LA1563	0	0,44*	10
CDP2178	0,20	0,19*	0
CDP7632	0,06	0,25*	0,17
CDP2087	0,36*	0,41*	0,24*
CDP6957/A	0,17	0,19	0,07
CDP6957/R	0,37*	0,51*	0,17
CDP4777	0,38*	0,1	0,05
CDP7090	0,27	0,06	0,54*
CDP1568	0,57*	0,26	0,56*
CDP9822	0,34*	0,11	0,61*
CDP9999	0,15	0,46*	0,42*
CDP4941	0,41*	-0,36*	0,03
<i>Global</i>	0,47*	0,22*	0,28*

*Significant *P*-value<0.05

Something similar happened with the glutamic to citric acid ratio. This time LA1563, CDP2078, CDP6957/R and, CDP9822 showed high and similar genotypic contributions, like the control Gevora, generally doubling those of the rest of accessions. Interestingly those were not exactly the same accessions as in the case of malic to citric acid.

The genotypic contribution of the studied accessions to glucose and fructose accumulation was not remarkable, being only important the sucrose accumulation observed in CDP4941, at the expense of hexoses accumulation. But, the genotypic contribution to sucrose equivalents was rather standard.

Much lower variation was found regarding the genotypic contribution to the fructose to glucose ratio, were only CDP4941 (*S. habrochaites*) showed higher values. CDP4941 in certain environments showed a sum of genotypic and GxE interaction leading to ratios close to 1.75.

The intra-accession variation was analysed in order to evaluate the genotypic differences between plants of one accession, using a MANOVA biplot to summarize the results. For this purpose, only the data for Turis is presented, though similar conclusions can be extracted from the rest of environments. The F1 hybrid Cambria showed a considerable level of variation, suggesting an important level of variation due to micro-environmental differences. In general, higher level of variation was detected in wild accessions, especially in those with the highest accumulation of certain compounds such as CDP4941 (Fig. 6, figure code 16) or CDP7090 (Fig. 6, figure code 12).

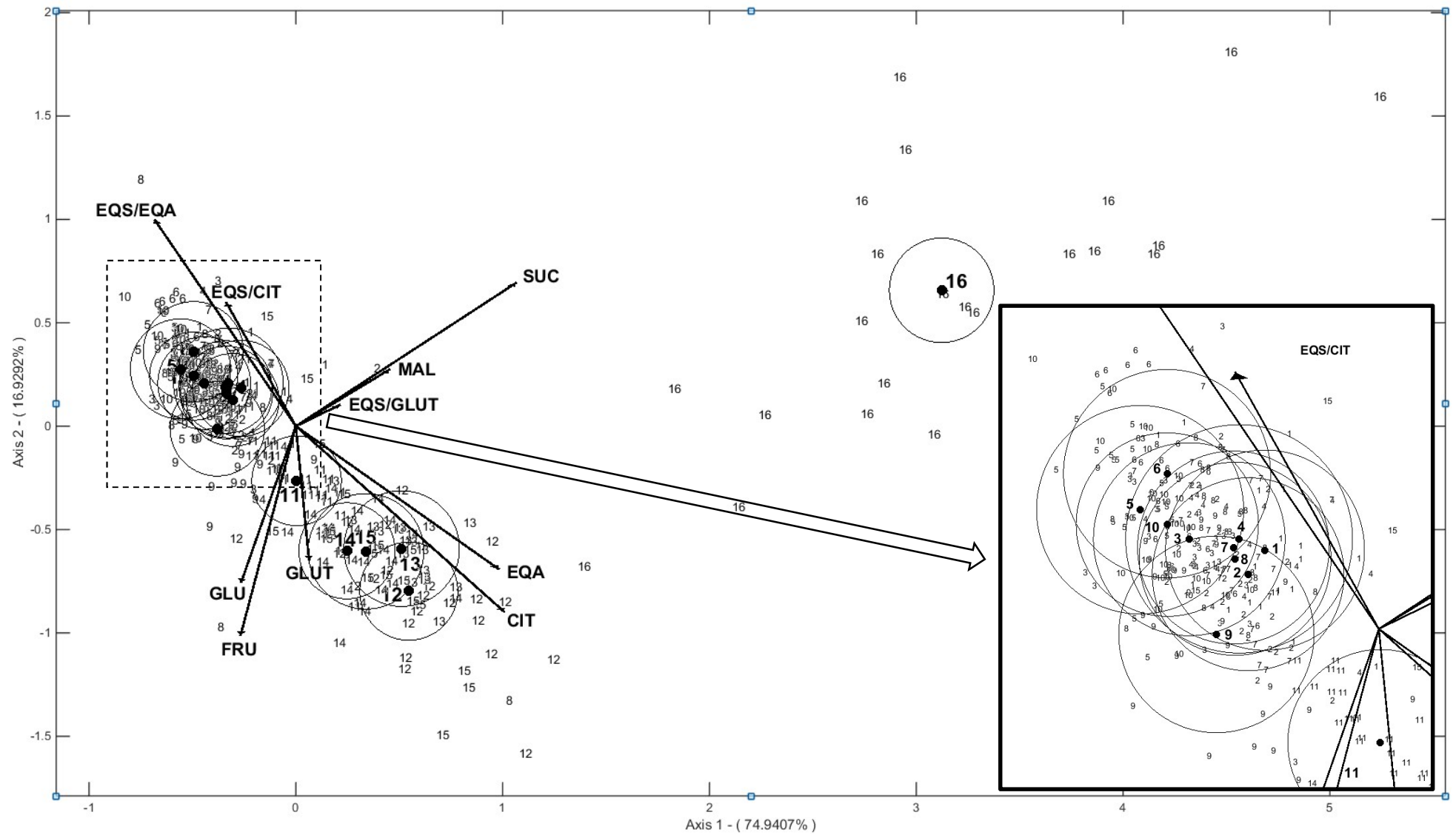


Fig. 6. MANOVA biplot of the data from Turis with open air cultivation (figure codes in Tble 1).

4. Discussion

The environment had an important effect in the accumulation of sugars and acids and derived ratios and variables, both via its main effect and the genotype x environment interaction. Regarding the main effect, the accumulation of sugars considerably depended on the photosynthetically active radiation (PAR) rather than on the temperature, whereas in the case of the acids, the temperature exerted a major effect. The major effect of PAR on sugar accumulation was expected, considering that it may limit the photosynthetic activity of the plant. Consequently, during the autumn-winter cycle, the lower PAR radiation had a major impact on sugar accumulation.

Several studies have analysed the effect of shading or season on the accumulation of taste-related compounds. Regarding shading studies, Gautier et al. (2008) comparing fruits grown under light or shaded conditions at different temperatures also observed lower reducing sugars content in shaded fruits and higher titratable acidity. Comparing mesh protected cultivation vs. open air (26.7% lower PAR) we had previously found a decrease in fructose a glucose contents and similar levels of organic acids (Cebolla-Cornejo et al., 2011). On the other hand, in greenhouse conditions comparing 100% radiation with 50% and 75% shading Riga et al. (2008) found a higher correlation between cumulative mean temperature and soluble solids, suggesting that the effects of temperature on fruit quality were higher than PAR. In this case, a moderate correlation between titratable acidity and cumulative temperature ($r=0.38$) was found.

Regarding seasonal fluctuations, Toor et al. (2006) evaluating soluble solids content and titratable acidity throughout the year, found that irradiance and temperature did not have a significant effect on titratable acidity, while soluble solids were higher in samples collected during summer than during spring. Hernandez-Suarez et al.(2008) found for several cultivars that in the autumn-winter cycle less malic and higher citric acid contents were found compared to the spring-summer cycle, whereas higher soluble solids were found in the latter.

In our case, the environmental effect of the winter campaign was negative, reducing the accumulation of sugars, suggesting a prominent effect of PAR. On the other hand, the environmental contribution to acid accumulation was negative in Turis open air cultivation, with higher PAR but lower cumulative temperature. In this case, the differences between spring-summer and autumn-winter cultivation in Valencia were limited, while differences in PAR are considerable. It should be pointed out though that the high positive effect on the accumulation of glutamic acid found in Valencia suggests that for this amino-acid, the impact of PAR would be important. Nevertheless an increase of temperature would be required to increase the levels of glutamic acid, as increasing only irradiance (Turis spring-summer) would limit this effect. The differential behaviour of glutamic acid, would explain the high environmental effects on the ratio between other acids and this one and between sucrose equivalents and glutamic acid.

Interestingly, the environment not only affects the accumulation of taste-related compounds, but also the level of variation. It seems that the diffuse irradiance typical of autumn-winter conditions would limit shading effects within the greenhouse. On the other hand, during the spring-summer season the lower variation found in the open

field would probably be related to the lack of shading effects of the structure and cover of the greenhouse.

But the environment not only exerts an influence via the main effect, but also through environment x genotype interactions. This can be considerably high in the accumulation of both sugars and acids. The importance of the interactions has been emphasized in tomato regarding the accumulation of functional compounds, especially in vitamin C (Leiva-Brondo et al., 2012) and in a lower extent in carotenoids (Leiva-Brondo et al., 2016). This differential behaviour may lead to over-estimate or sub-estimate the value of an accession, and consequently emphasises the need to perform screening studies in multi-environmental designs. Regarding these designs, the number of plants per accession should also be reconsidered, as an important intra-accession variation has been found. Consequently, we should not refer to promising accessions, but to promising plants within accessions. It also reinforces the need to carefully control reproduction in the case of wild species with a higher tendency to cross-pollination than tomato, and to collect seeds in a per plant basis.

These screening programs are still necessary. It is true that huge advances have been obtained through the evaluation of several introgression lines that have been developed from accessions of wild species related to tomato, including red-fruited species belonging to the *Lycopersicon* group *S. pimpinellifolium* or green fruited species belonging to the *Neolycopersicon*, *Eriopersicon* or *Arcanum* groups (mainly *S. pennellii* and *S. habrochaites*). However, the production of this ILs is expensive and time-consuming, and therefore only one or few accessions have been used in each case as parents in the program, limiting the full exploitation of the potential of the section *Lycopersicon* of the *Solanum* genus. In fact, the considerable drop in the costs of the development of ILs makes it easier and cheaper to continue to exploit the information provided by this material (Barrantes et al., 2016).

Regarding sugar accumulation none of the accession tested offers an important genotypic contribution. It is true that CDP4941 from *S. habrochaites* has an important genotypic contribution to the accumulation of sucrose. This behaviour has already been described in *S. habrochaites*, and also in *S. chmieleweskii* from which the gene *sucr* has been identified and introgressed in tomato, although as stated in the introduction negative side effects were detected. Anyway, when the genotypic contribution to the level of sucrose equivalents is considered, the interest of this accession decreases compared to other accessions from the *Lycopersicon* group that do accumulate sucrose, such as CDP9999. Kortsee et al. (2007) concluded that sucrose synthase and soluble invertase enzyme activities were higher in the domesticated crop and distributed throughout the whole fruit, explaining partially the lack of sucrose accumulation in *S. lycopersicum*. Thus, these accessions from the *Lycopersicon* group accumulating sucrose may be useful to study the regulation of vacuolar invertase.

Accession CDP4941 also offered an important genotypic contribution to the ratio fructose to glucose. This ratio is important, considering that fructose has a considerably higher sweetening power (Baldwin et al., 1998) and its increase is interesting for example for the development of lines targeted to ketchup production. In this case, this effect is probably due to the presence of the *Fgr* gene, encoding fruktokinase2, which has been described in this species. But more interestingly, accessions CDP6957/A and

CDP7090 also offer high genotypic contributions and they belong to the *Lycopersicon* group. These materials are more readily usable, as the complications derived from linkage drag, which is quite important in tomato (Haggard et al., 2013), due to the low recombination rate in wide areas of the genome (Tomato Genome Consortium 2012) are less important.

Regarding the potential use for increasing acid accumulation, Kortsee et al. (2007) concluded that fruits of wild tomato plants with the exception of *S. pimpinellifolium* had higher contents of citric and malic acid. Our results confirm the higher contents in *S. habrochaites*, although we have found high contents of citric acid also in several *S. pimpinellifolium* accessions. This result emphasizes the need to continue screening new sources of variation, as the metabolic profile of a species is not generalizable. Thus, it is still possible to find interesting sources of variation.

Apart from differences in the accumulation potential of acids, different accumulation of citric, malic and glutamic acids were identified in the accessions evaluated. These different profiles will be useful to deepen the knowledge of the regulation of the TCA cycle and the GABA shunt in tomato. As an example, CDP6957/R showed low ratios between the phenotypic values of citric and malic acid and citric and glutamic acid that were consistent among the three environments tested. This behaviour would be compatible with an increased accumulation of glutamic acid at the expense of citric acid, maybe due to an upregulation of the GABA shunt (Etienne, et al., 2013).

On the other hand, CDP9999 and CDP4941 showed clearly higher ratios between the phenotypic values of malic and glutamic acid. This behaviour was not species dependent, as CDP9999 is the only accession of *S. pimpinellifolium* showing a ratio so high (around 5-fold the ratio of the other accessions). In the case of CDP4941, this was the only accession from *S. habrochaites* evaluated. In both accessions, especially in the case of CDP9999, this high ratio derives of a low accumulation of glutamic acid and an increased accumulation of malic acid. In fact, these accessions also showed a clearly higher ratio citric to glutamic acid in the three environments. This result may suggest a downregulation of the GABA shunt resulting in a decrease of the accumulation of glutamic acid and an accumulation of citrate (Etienne et al., 2013).

Accession CDP4777 from the former var. *cerasiforme* of the cultivated species also high citric to glutamic and citric to malic ratios, but the malic to glutamic ratios were not so high. In this case, a relatively high accumulation of citric acid is observed, accompanied by a relatively low accumulation of malic acid and this profile is consistent in the three environments. But in this case, it seems that the cause is an increased accumulation of citric acid at the expense of malic acid, although as the contents of glutamic acid are not so high, a small contribution via a downregulation of the GABA shunt might be collaborating.

On the other hand, accession CDP7090 from *S. pimpinellifolium* could be upregulating the whole accumulation of the three acids. It seems that in this case, the GABA shunt is not downregulated, and the TCA cycle could be upregulated resulting in an increased accumulation of organic acids and derived aminoacids. This behaviour was consistent in the three environments, resulting in high genetic contributions to accumulation of these compounds.

5. Conclusions

Screening studies are still necessary to identify potentially useful genetic resources for the development of breeding programs. In the case of taste-related compounds, important environmental and interaction effects have been detected, suggesting the need to perform multi-environmental studies before placing the focus in a certain accession. A high level of intra-accession variation also reinforces the need to perform individual selection rather than directly working with an accession. By doing so, different accessions with potential to accumulate certain levels of sucrose, to change the ratio fructose to glucose or to improve the contents and profile of acids have been identified. These materials will also be valuable to study the regulation of the TCA cycle and the GABA shunt.

Acknowledgements

This research was partially financed by The Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN) (project AGL2005-08083-C03-01). The authors thank the development and kindly cessions of the packages used to perform calculations in this paper: Professor Jun Zhu, director of the Bioinformatics Institute (Zhejiang University, China) for the cession of the software QGA Station, Dr. Vicente-Villardón (Salamanca University) for the development MultBiplot and Dra.Frutos and Dra Galindo for the development of Interactive GGEBiplotsGUI in R.

References

- Baldwin, E.A., Scott, J.W., Einstein, M.A., Malundo, T.M.M., Carr, B.T., Shewfelt, R.L., Tandon, K.S., 1998. Relationship between sensory and instrumental analysis for tomato flavor. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123(5), pp.906-915.
- Barrantes, W., López-Casado, G., García-Martínez, S., Alonso, A., Rubio, F., Ruiz, J. J., Fernández-Muñoz, R., Granell, A., Monforte, A. J. (2016). Exploring new alleles involved in tomato fruit quality in an introgression line library of *Solanum pimpinellifolium*. *Frontiers in Plant Science*, 7.
- Bennett, A.B., 2012. Taste: unraveling tomato flavor. *Current Biology*, 22(11), pp.R443-R444
- Bertin, N., Guichard, S., Leonardi, C., Longuenesse, J.J., Langlois, D., Navez, B., 2000. Seasonal evolution of the quality of fresh glasshouse tomatoes under Mediterranean conditions, as affected by air vapour pressure deficit and plant fruit load. *Annals of Botany*, 85(6), pp.741-750.
- Bruhn, C.M., Feldman, N., Garlitz, C., Harwood, J., Ivans, E., Marshall, M., Riley, A., Thurber, D., Williamson, E., 1991. Consumer perceptions of quality: apricots, cantaloupes, peaches, pears, strawberries, and tomatoes. *Journal of Food Quality*, 14(3), pp.187-195.

- Bucheli, P., Voirol, E., de la Torre, R., López, J., Rytz, A., Tanksley, S.D., Pétiard, V., 1999. Definition of nonvolatile markers for flavor of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as tools in selection and breeding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), pp.659-664.
- Causse, M., Buret, M., Robini, K., Verschave, P., 2003. Inheritance of nutritional and sensory quality traits in fresh market tomato and relation to consumer preferences. *Journal of Food Science*, 68(7), pp.2342-2350.
- Cebolla-Cornejo, J., Roselló, S., Valcárcel, M., Serrano, E., Beltrán, J., Nuez, F., 2011. Evaluation of genotype and environment effects on taste and aroma flavor components of Spanish fresh tomato varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), pp.2440-2450.
- Cebolla-Cornejo, J., Valcárcel, M., Herrero-Martínez, J.M., Roselló, S., Nuez, F., 2012. High efficiency joint CZE determination of sugars and acids in vegetables and fruits. *Electrophoresis*, 33(15), pp.2416-2423.
- Chetelat, R.T., De Verna, J.W., Bennett, A.B. 1995a. Introgression into tomato (*Lycopersicon esculentum*) of the *L.chmielewskii* sucrose accumulator gene (*sucr*) controlling fruit sugar composition. *Theoretical Applied Genetics*. 91: 327-333
- Chetelat, R.T., DeVerna, J.W., Bennett, A.B., 1995b. Effects of the *Lycopersicon chmielewskii* sucrose accumulator gene (*sucr*) on fruit yield and quality parameters following introgression into tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 91(2), pp.334-339.
- de Bruyn, J.D., Garretsen, F., Kooistra, E., 1971. Variation in taste and chemical composition of the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Euphytica*, 20(2), pp.214-227.
- Etienne, A., Génard, M., Lobit, P., Mbeguié-A-Mbéguié, D., Bugaud, C., 2013. What controls fleshy fruit acidity? A review of malate and citrate accumulation in fruit cells. *Journal of Experimental Botany*, 64(6), pp.1451-1469.
- Fernie, A.R., Tadmor, Y., Zamir, D., 2006. Natural genetic variation for improving crop quality. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(2), pp.196-202.
- Fridman, E., Pleban, T., Zamir, D., 2000. A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), pp.4718-4723.
- Frutos, E. Galindo, M.P., Leiva, V. 2014. An interactive biplot implementation in R for modeling genotype-by-environment interaction. *Stoch. Environ Res Risk Assess*, 28:1629-1641.
- Fulton, T.M., Bucheli, P., Voirol, E., Lopez, J., Petiard, V., Tanksley, S.D., 2002. Quantitative trait loci (QTL) affecting sugars, organic acids and other biochemical properties possibly contributing to flavor, identified in four advanced backcross populations of tomato. *Euphytica*, 127(2), pp.163-177.

- Gautier, H., Diakou-Verdin, V., Bénard, C., Reich, M., Buret, M., Bourgaud, F., Poëssel, J.L., Caris-Veyrat, C., Génard, M., 2008. How does tomato quality (sugar, acid, and nutritional quality) vary with ripening stage, temperature, and irradiance?. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), pp.1241-1250.
- Haggard, J.E., Johnson, E.B., Clair, D.A.S., 2013. Linkage relationships among multiple QTL for horticultural traits and late blight (*P. infestans*) resistance on chromosome 5 introgressed from wild tomato *Solanum habrochaites*. *G3: Genes| Genomes| Genetics*, 3(12), pp.2131-2146.
- Kader, A.A., Stevens, M.A., Albright-Holton, M., Morris, L.L., Algazi, M., 1977. Effect of fruit ripeness when picked on flavor and composition in fresh market tomatoes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 102(6), pp.724-731.
- Klann, E.M., Chetelat, R.T., Bennett, A.B., 1993. Expression of acid invertase gene controls sugar composition in tomato (*Lycopersicon*) fruit. *Plant Physiology*, 103(3), pp.863-870.
- Koehler, P.E., Kays, S.J., 1991. Sweet potato flavor: quantitative and qualitative assessment of optimum sweetness. *Journal of food quality*, 14(3), pp.241-249.
- Kortstee, A.J., Appeldoorn, N.J.G., Oortwijn, M.E.P., Visser, R.G.F., 2007. Differences in regulation of carbohydrate metabolism during early fruit development between domesticated tomato and two wild relatives. *Planta*, 226(4), pp.929-939.
- Leiva-Brondo, M., Valcárcel, M., Cortés-Olmos, C., Roselló, S., Cebolla-Cornejo, J., Nuez, F., 2012. Exploring alternative germplasm for the development of stable high vitamin C content in tomato varieties. *Scientia horticulturae*, 133, pp.84-88.
- Leiva-Brondo, M., Valcarcel, M., Martí, R., Roselló, S., Cebolla-Cornejo, J., 2016. New opportunities for developing tomato varieties with enhanced carotenoid content. *Scientia Agricola*, 73(6), pp.512-519.
- Levin, I., Gilboa, N., Yeselson, E., Shen, S., Schaffer, A.A., 2000. Fgr, a major locus that modulates the fructose to glucose ratio in mature tomato fruits. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(2), pp.256-262.
- Levin, I., Lalazar, A., Bar, M., Schaffer, A.A., 2004. Non GMO fruit factories: Strategies for modulating metabolic pathways in the tomato fruit. *Industrial Crops and Products*, 20(1), pp.29-36.
- Matsukura, C., 2016. Sugar Accumulation in Tomato Fruit and Its Modification Using Molecular Breeding Techniques. In *Functional Genomics and Biotechnology in Solanaceae and Cucurbitaceae Crops* (pp. 141-154). Springer Berlin Heidelberg.
- Powell, A.L.T., Nguyen, C.V., Hill, T., Cheng, K.L., Figueroa-Balderas, R., Aktas, H., Ashrafi, H., Pons, C., Fernández-Muñoz, R., Vicente, A., Lopez-Baltazar, J., Barry, C.S., Liu, Y., Chetelat, R., Granell, A., Van Deynze, A., Giovannoni J.J., Bennett, A.B. 2012. Uniform ripening Encodes a Golden 2-like Transcription Factor Regulating Tomato Fruit Chloroplast Development. *Science*. 336:1711-1715.

- Rick, C.M. 1986. Germplasm resources in the wild tomato species. *Acta Horticulturae*. ISHS. 190: 39-48.
- Riga, P., Anza, M., Garbisu, C., 2008. Tomato quality is more dependent on temperature than on photosynthetically active radiation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(1), pp.158-166.
- Schaffer, A.A., Miron, D., Petreikov, M., Fogelman, M., Spiegelman, M., Bnei-Moshe, Z., Shen, S., Granot, D., Hadas, R., Dai, N., Bar, M., 1999. Modification of carbohydrate content in developing tomato fruit. *HortScience*, 34(6), pp.1024-1027.
- Stevens, M.A., Kader, A.A., Albright-Holton, M., Algazi, M., 1977. Genotypic variation for flavor and composition in fresh market tomatoes. *Journal American Society for Horticultural Science*, 102: 680-689.
- Suárez, M.H., Rodríguez, E.R., Romero, C.D., 2008. Analysis of organic acid content in cultivars of tomato harvested in Tenerife. *European Food Research and Technology*, 226(3), pp.423-435.
- Tieman, D., Zhu, G., Resende, M.F., Lin, T., Nguyen, C., Bies, D., Rambla, J.L., Beltran, K.S.O., Taylor, M., Zhang, B., Ikeda, H., 2017. A chemical genetic roadmap to improved tomato flavor. *Science*, 355(6323), pp.391-394.
- Tomato Genome Consortium, 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485(7400), pp.635-641.
- Toor, R.K., Savage, G.P., Lister, C.E., 2006. Seasonal variations in the antioxidant composition of greenhouse grown tomatoes. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(1), pp.1-10.
- Vicente-Villardón, J.L. 2015. *MULTBILOT: A package for Multivariate Analysis using Biplots*. Departamento de Estadística. Universidad de Salamanca. (<http://biplot.usal.es/ClassicalBiplot/index.html>)

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

Es cierto que en la actualidad las demandas de los agentes de la cadena producción consumo siguen requiriendo el desarrollo de variedades que mantengan el nivel de producción, resistencias a plagas y enfermedades y resistencia al manipulado, así como la larga vida en el almacenamiento, ya sea para reducir pérdidas en el stock del distribuidor o para alargar la conservación por parte del consumidor. Aun así, la voz de un consumidor cada vez más exigente hace que la inclusión de objetivos de mejora de la calidad organoléptica se haya hecho necesaria, al menos en líneas específicas destinadas a mercados exigentes con este aspecto.

La reincorporación de la mejora de la calidad como objetivo de mejora, ya se había iniciado previamente en los años 60 y 70 del siglo pasado por exigencias de la industria que requería optimizar el procesado. En aquel momento herramientas básicas como la determinación del CSS ($^{\circ}$ Brix), el pH y la acidez valorable, como forma de estimar la calidad del tomate se hicieron comunes (Galiana-Balaguer et al., 2004). Pero el arrastre de efectos negativos como la pérdida de producción o la reducción de tamaño de fruto hizo reconsiderar la estrategia y, a partir de los años noventa, las variables que se han considerado más idóneas para el desarrollo de planes de mejora de la calidad más eficientes en este sentido han sido los componentes individuales del sabor.

En aquel momento, muchos autores relacionaron los contenidos en ácidos orgánicos (cítrico y málico), azúcares (fructosa, glucosa y sacarosa) y la relación entre estos compuestos (ratio fructosa/glucosa, ratio azúcares/ácidos) con respuestas sensoriales de sabor obtenidas a través de paneles de catadores (Malundo et al., 1995; Saliba et al., 1999; Baldwin et al., 1998; Bucheli et al., 1999; Causse et al., 2001, Fulton et al., 2002), ampliando los resultados de estudios clásicos como los de Stevens et al. (1977).

Una vez establecidas estas relaciones, se trató de abordar como objetivos de mejora el incremento en el contenido de estos compuestos individuales implicados en la percepción del sabor del tomate. En aquel momento, se empieza, por otro lado, a ser consciente del papel que tienen los aromas no solo a la hora de determinar el aroma de tomate, sino también en su influencia en la modulación de la percepción del dulzor o la acidez en el gusto (Baldwin et al., 2000). Esta relación también se da a la inversa, ya que también ácidos y azúcares parecen influir sobre la percepción de algunas características del aroma (Tandon et al., 2003; Baldwin et al., 2008).

Sin embargo, la complejidad del aroma en tomate (Petro-Turza, 1986), así como del coste y requerimientos en tiempo de análisis de compuestos volátiles hacía casi imposible abordar su cuantificación en programas reales de mejora. Por otro lado, se parte de la premisa de que, manteniendo los niveles de aromas, una mayor acumulación de azúcares y ácidos tendría un efecto positivo sobre el sabor. De hecho, esta limitación se seguía aplicando a la determinación individualizada de azúcares y ácidos. Así, el primer paso considerado a la hora de abordar la tesis consistió en

desarrollar una metodología para obtener estas determinaciones de forma precisa, rápida, barata y sencilla.

En este contexto, la electroforesis capilar pareció entonces una herramienta ideal, al ser potente, precisa, versátil, con alto grado de automatización y bajos costes de funcionamiento. Habiéndose desarrollado ya un método para la cuantificación de la vitamina C en muestras de tomate y especies silvestres relacionadas con tiempo de análisis inferior a cinco minutos (Galiana-Balaguer et al., 2001), se tomó con determinación el objetivo de desarrollar un método que utilizara dicha técnica analítica para la cuantificación de ácidos y azúcares, partiendo de los resultados de otros investigadores como los de Soga et al. (1999). Se consiguió así desarrollar un método de electroforesis capilar zonal que consiguió analizar simultáneamente en la misma carrera ácidos (oxálico, málico, cítrico) y azúcares (fructosa, glucosa y sacarosa) en menos de 20 minutos (Roselló et al., 2002). Aunque la adquisición de los equipos es cara, una vez adquiridos el funcionamiento resulta muy económico puesto que el capilar no es costoso, el acondicionamiento es rápido y automatizado, los volúmenes de reactivos requeridos son irrisorios y la muestra es inyectada en el capilar sin otro tratamiento previo que la homogenización, el filtrado y la dilución que adecúe el contenido en los componentes al rango de las rectas de calibrado. Su utilización en el grupo de trabajo se generalizó y cientos de muestras se han analizado siguiendo el protocolo establecido.

Además, el método resultó válido tanto para especies de fruto rojo como de fruto verde, pese a la gran diferencia en la composición de la matriz de los zumos, no teniendo que desarrollar nuevas modificaciones del método para especies de frutos verdes, como ocurrió en el caso de la vitamina C (Galiana-Balaguer et al., 2001).

La comparación del método obtenido con el análisis de muestras mediante HPLC también resultó positiva. Dicha técnica emplea 15 minutos para ácidos y 15 para azúcares, en análisis separados, lo que supone doble preparación de la muestra y acondicionado previo de cada una de las columnas, lo que, desde el punto de vista operativo en un contexto de trabajo en el que se han de evaluar grandes cantidades de muestras, significa una elevada demanda de tiempo ya que requieren más del doble de tiempo de análisis que con electroforesis capilar. Además, las columnas de HPLC son mucho más caras que un simple capilar que es preparado en cinco minutos.

Se obtuvo, por tanto, un método que permite el análisis simultáneo y rápido de los compuestos fundamentales de los atributos del sabor del tomate que no requiere derivatización de los azúcares, de preparación mínima de la muestra, de bajo coste de funcionamiento y funcionamiento autónomo.

Al disponer de un método de análisis tan preciso, rápido y automatizado como el de electroforesis capilar desarrollado, y conociendo la relación entre el contenido en compuestos individuales y los componentes del sabor, se abrió un campo muy interesante para el cribado y valoración de parentales de planes de mejora para la calidad organoléptica del tomate.

La experiencia otorgada por el uso del método, llevó a una mejora posterior. Cebolla-Cornejo et al. (2012) lo emplearon como punto de partida para optimizar el análisis de

azúcares y ácidos en frutas y hortalizas. Esta revisión fue necesaria puesto que la inyección de gran cantidad de muestras en un día producía un retraso en el tiempo de migración de los compuestos a analizar debido a la gran cantidad de metabolitos que circulaban a través del capilar a lo largo de la jornada y a la acidificación del tampón de carrera, que tiene un pH muy elevado. Por ello, se intercaló un lavado con SDS entre cada muestra que llevó a una mayor durabilidad del capilar, así como a mayor reproducibilidad de los tiempos de migración y un acortamiento del tiempo de análisis.

Si bien el método ofrece muchas ventajas, es cierto que cuando el número de muestras a analizar es muy elevado, por ejemplo varios centenares o miles de muestras para evaluar y descartar plantas en campo durante un programa de mejora, los tiempos de análisis pueden comprometer estas tareas de cribado preliminar si se requiere un tiempo de respuesta corto. También, el coste de análisis puede seguir siendo elevado cuando la selección por calidad no es objetivo prioritario del programa en cuestión. En estos casos puede ser recomendable recurrir a técnicas de análisis indirecto como las basadas en espectroscopia de infrarrojos para realizar cribados iniciales. Así se han realizado experiencias en tomate que estiman el contenido en los compuestos analizados a partir de espectros del infrarrojo próximo o medio medidos en fruto intacto o zumo con espectrómetros NIR o FT-IR, (García-Martínez et al., 2012; Wilkerson et al., 2013). Estas técnicas pueden ofrecer coeficientes de regresión superiores al 0,9 en variables como el contenido en determinados minerales o CSS, aunque en azúcares y ácidos individuales los valores son muy dependientes del estudio, pudiendo llegar a valores de $R^2=0,8$ con errores de validación cruzada razonables. En cualquier caso, hay que tener en cuenta que estas modelizaciones son muy dependientes del material evaluado y requieren complejas calibraciones. Aun así pueden ser útiles para descartar materiales y centrar los esfuerzos económicos en el análisis preciso de un menor número de muestras.

En nuestro caso, una vez se dispuso del método adecuado, que permitía el análisis de gran cantidad de muestras por componentes individuales, se pudo poner en marcha cribados que permitieran la identificación de parentales para el inicio de planes de mejora de la calidad organoléptica. Así, se continuaron los esfuerzos realizados, mientras se desarrollaba el método, que contaron con la colaboración con otros grupos de investigación. En estos estudios preliminares se inició la identificación de materiales interesantes antes de poder contar con el uso rutinario de la electroforesis capilar.

En este contexto, en cribados para acidez, (Sanchez-Mata et al., 2000) se encontró una entrada de tomate que presentaba casi un 25 y 60% más de ácido cítrico y málico respectivamente que el mejor de los controles y otra de *S. pimpinellifolium* que presentó un contenido un 65% mayor en ácido málico que el mejor de los controles. Además en dicho cribado preliminar se observaron valores de CSS, valorados como °Brix, muy elevados: hasta 7,27 y 11,35 en *S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium* respectivamente, lo que indicaba contenidos en compuestos individuales elevados y existencia de material vegetal muy interesante de cara al desarrollo de planes de mejora para la calidad organoléptica una vez cribados convenientemente.

El estudio además reveló diferentes patrones en el contenido de ácidos, lo que pudiera significar un control genético diferente para cada ácido. Incluso en algunos casos la

acidez total fue menor que la suma de los ácidos individuales, razón de más para contemplar el análisis individual de los ácidos. En otros casos el contenido en ácidos valorado como acidez total reveló contenidos superiores que la suma de los ácidos individuales analizados, abriendo la posibilidad de encontrar otros ácidos en concentraciones superiores a las habituales.

Puesta de manifiesto la gran variabilidad que parecía existir, se observó un gran potencial para la mejora del sabor, incluso dentro del grupo *Lycopersicon* (antiguo subgénero *Eulycopersicon*). Esas especies, de fondo genético mucho más próximo, facilitan la introducción de genes en las variedades cultivadas, aunque sin descartar definitivamente las especies de los grupos *Neolycopersicon*, *Eriopersicon* y *Arcanum* (antiguo subgénero *Eriopersicon*), con diferencias importantes por ejemplo en el metabolismo de los azúcares (Matsukura, 2016). Aun así, conocidos los inconvenientes de la utilización de especies de frutos verdes, ya que arrastran y llevan ligados muchos caracteres indeseables (recordemos que incluso son incomedibles), la existencia de material vegetal prometedor entre las entradas de frutos rojos supuso que se planteara continuar en el camino trazado.

Sin embargo, no hay que dejar de considerar que un inconveniente de las especies silvestres, aun siendo de fruto rojo, es su pequeño tamaño. Algunos estudios parecen ligar el mayor contenido en componentes del sabor al tamaño reducido de los frutos (Markovic et al., 1997; Lee y Iwase, 1998). Ante este hecho se planteó si la introgresión de genes interesantes de *S. pimpinellifolium* en el tomate cultivado no resultaría tan relevante como pudiera parecer en un principio, puesto que se daría el efecto dilución al introgresar en una entrada de mayor tamaño. Los valores tan elevados en el CSS y el hecho de poder introgresar en tomates del tipo varietal *cerasiforme*, muy valoradas comercialmente en la actualidad, donde la intensidad de sabor resulta tan importante, permitieron concluir que, en cualquier caso, podrían desarrollarse variedades a partir de los materiales encontrados. Además, si se consideraran los contenidos en compuestos individuales, que necesariamente deben estar regulados por un menor número de loci, podría estimarse mejor la influencia del tamaño y minimizar la pérdida del potencial del parental donante. Por otro lado, estudios como el de Barrantes et al. (2016) han puesto de manifiesto la posibilidad de identificar QTLs asociados al CSS en *S. pimpinellifolium* sin efectos colaterales en el tamaño de fruto.

Continuando con nuestros trabajos, en estudios posteriores se analizaron los contenidos individuales de azúcares y ácidos (Fernández-Ruiz et al., 2004). En este momento ya se preveía una importante influencia del ambiente, por lo que se optó por incluir en todos los estudios los mismos controles. Tanto de contenido estándar como elevado. En este estudio se identificaron entradas interesantes, así como agrupaciones de entradas que permitieron estudiar el comportamiento diferencial de grupos con perfiles similares. De nuevo el CSS y la acidez total resultaron superiores a la suma de los azúcares y ácidos analizados individualmente, por lo que nuevos análisis en busca de otros azúcares y ácidos pudieran ser interesantes para localizar nuevos compuestos responsables de sabor. Las técnicas estadísticas multivariantes se confirmaron como una forma interesante de valorar atributos de sabor como el dulzor, la acidez, la intensidad de sabor o el valor nutricional mediante componentes

principales. De este modo se encontraron cinco entradas de *S. pimpinellifolium* interesantes. Destacar una que mostró un 625% de intensidad de sabor del control comercial utilizado y un 175% mayor que el control de *S. galapagense* LA-530, una entrada seleccionada como control al haber sido citada como un parental interesante para mejorar el contenido en sólidos solubles (Hewitt y Garvey, 1987; Garvey y Hewitt, 1991, 1992). Otra de las entradas mostró un comportamiento en intensidad de sabor un 535 y 84% mayor que los controles comentados anteriormente, con un contenido un 38% mayor en vitamina C que el mejor de los controles. El hallazgo de las entradas promisorias de *S. pimpinellifolium* supone una ventaja adicional, no sólo por presentar en ocasiones un contenido mayor que el control citado, sino por facilitar el proceso en los planes de mejora para calidad organoléptica, ya que esta especie es filogenéticamente más próxima al tomate cultivado (Peralta et al., 2008), y por tanto permite la más rápida recuperación de caracteres de calidad y agronómicos.

De forma adicional, entre las entradas de *S. lycopersicum* aparecieron algunas con valores de intensidad de sabor 238% superiores al control híbrido comercial cultivado, otra con un contenido en ácido cítrico y málico un 24 y 54% mayor que el del mejor control para cada uno de los compuestos y una tercera con un 63% más de vitamina C que el mejor de los controles. Así pues, podría intentarse su utilización en etapas avanzadas de los programas de mejora para mejorar el contenido en caracteres de calidad.

En este cribado ya se identificaron además una entrada de *S. lycopersicum* y otra de *S. pimpinellifolium* que acumulaban un 2% de sacarosa, pudiendo indicar que son portadoras de algún gen existente en la sección *Lycopersicon* que regulara el metabolismo correspondiente. La comparación entre especies acumuladoras de sacarosa y el tomate, acumulador de hexosas, puso de manifiesto que la diferencia se debía fundamentalmente a distintos niveles de actividad de la invertasa vacuolar (Matsukura, 2016), de forma que las especies con actividad restringida de este enzima durante la maduración acumulan fundamentalmente sacarosa. Es cierto que se ha descrito que *S. pimpinellifolium* tiene una actividad invertasa vacuolar aumentada respecto a tomate, lo que confiere una mayor capacidad de acumulación de hexosas (Husain et al., 2001), por lo que el hecho de encontrar niveles apreciables de sacarosa en *S. pimpinellifolium* abriría la posibilidad de estudiar la regulación de este enzima.

En 2006 se publicó un tercer cribado más amplio con 38 entradas y 5 controles (Galiana-Balaguer et al., 2006), incluidas entradas de cinco especies diferentes: *S. esculentum*, *S. pimpinellifolium*, *S. habrochaites*, *S. pennellii* y *S. peruvianum*. Los resultados para los compuestos estudiados pusieron de manifiesto que en entradas de especies de frutos rojos (grupo *Lycopersicon*) se llegaron a encontrar mayores contenidos en fructosa, glucosa y vitamina C (192, 169 y 160% respectivamente) que el mejor de los controles para cada uno de los compuestos. Por el contrario, en entradas de frutos verdes (grupos *Neolycopersicon*, *Eriopersicon* y *Arcanum*) se observaron mayores contenidos en sacarosa (más de 21 veces), ácido cítrico (9 veces) y ácido málico (más de 7 veces) mayores que el contenido del mejor de los controles. En estas entradas también se observaron los mayores valores de CSS y acidez total.

Para poder comparar el potencial de mejora del dulzor de entradas con diferentes mecanismos metabólicos de acumulación de azúcares (glucosa y fructosa fundamentalmente en unos casos y sacarosa mayoritariamente en otros) se utilizó una nueva variable que midiera la contribución al dulzor de cada uno de estos azúcares, expresando el poder endulzante total como equivalentes de sacarosa (Coulter, 1998), por estar esta medida asociada a evaluaciones de dulzor en paneles de cata (Baldwin et al., 1998). Considerando esta nueva variable, se detectó una entrada de *S. pimpinellifolium* con un dulzor potencial casi tres veces mayor que el mejor de los controles (aunque apenas contenía sacarosa), quedando la mejor de frutos verdes 2,5 veces superior al mejor de los controles.

Por otro lado, el análisis de agrupaciones reflejó como el comportamiento en caracteres de sabor agrupaba a las especies filogenéticamente relacionadas. Tomando dichos estudios como referentes para la posible selección de entradas interesantes para planes de mejora del sabor se contemplaron dos entradas de *S. pimpinellifolium* y una de *S. habrochaites*. El estudio mediante GGE biplot permitió comparar las entradas susceptibles de ser consideradas como parentales en los programas de mejora con los controles. De este modo se puso de manifiesto como las entradas de frutos rojos, a las que se hacía referencia anteriormente, aparecían como las más equilibradas, mostrando mayor contenido que los controles en casi todos los caracteres de calidad analizados.

Así se concluyó que entre las entradas analizadas para introducir sacarosa en el tomate cultivado debiera utilizarse *S. habrochaites*, puesto que ninguna otra especie mostró un contenido tan elevado. Del mismo modo, para glucosa y fructosa y vitamina C se manifiesta como mejor opción las entradas de *S. pimpinellifolium* que presentan mayores contenidos, además de un mejor fondo genético.

Aunque la influencia ambiental sobre la acumulación de compuestos relacionados con el sabor ya se conocía, (Davies y Hobson, 1981), diversos estudios publicados durante el inicio del desarrollo de la tesis volvieron a enfatizar este aspecto (Adams et al., 2001; Mulholland et al., 2003; Saltveit, 2005; Yahia et al., 2005; Beckmann et al., 2006; Fleisher et al., 2006; Gautier et al., 2008; Caliman et al., 2010; Znidarcic et al., 2010; Ilic et al., 2012). En aquel momento ya se desarrollaban nuestros cribados con controles que permitirán valorar el efecto de distintas campañas. Sin embargo, se creyó necesario evaluar con más detalle el efecto ambiental en programas de cribado de germoplasma. Para ello, considerando que las poblaciones silvestres no están fijadas y cada planta representa un genotipo diferente se planteó un ensayo con réplicas clonales de las mismas plantas en tres ambientes diferentes (primavera-verano en dos localidades y otoño-invierno en una de ellas). En ellos se tomaron medidas de la radiación y de la temperatura y se estudió su efecto sobre la calidad de los frutos.

El efecto del ambiente sobre la composición de los frutos fue elevado. El contenido en azúcares se vio claramente condicionado por la radiación solar, siendo mayor el contenido en primavera-verano, con niveles mucho más elevados de radiación, mientras que las diferencias dentro del ciclo primavera-verano fueron muy reducidas. Estos resultados coinciden con los publicados por otros autores al analizar el efecto de sombreado (Gautier et al., 2008; Riga et al., 2008; Cebolla-Cornejo et al., 2011). Por otro

lado, el contenido en ácidos cítrico y málico no parece estar afectado tanto por la radiación, como por la temperatura, cuya disminución parece aumentar el contenido en ácido cítrico, siendo el efecto sobre el málico menor. Un efecto en la línea de lo sugerido por estudios como el de Suarez et al. (2008). La acumulación de ácido glutámico sigue una línea algo diferente, ya que tanto el aumento de la temperatura como de la radiación afectan positivamente a su contenido. Hay que añadir, que el ambiente también afecta a la variación fenotípica. La menor variación detectada en invernadero en otoño-invierno, seguida por aire-libre en primavera-verano y finalmente por invernadero en primavera-verano, parece sugerir que el efecto fundamental venía condicionado por diferencias en radiación, ya que en otoño-invierno la luz difusa genera menos sombras, algo similar ocurriría con la ausencia de estructuras en cultivo al aire libre.

La contribución del ambiente, no se limita sólo al efecto principal, sino que la interacción genotipo-ambiente puede llegar a ser importante. Esto es especialmente así en el caso de la sacarosa en la que el efecto ambiental es prácticamente nulo, pero la interacción es elevada, o en la acumulación de los ácidos cítrico y glutámico en las que determinadas interacciones pueden contribuir especialmente al valor fenotípico.

Este resultado condiciona la forma en la que se deben llevar a cabo los cribados de germoplasma, puesto que ensayos en ambiente único pueden sobreestimar o subestimar el valor de una entrada, condicionando que se ponga el foco en sucesivas investigaciones en germoplasma sub-óptimo.

Por otro lado, se ha podido comprobar la gran variación presente dentro de entrada. Este resultado era en parte de esperar, en tanto que las poblaciones silvestres no dejan de ser mezclas de genotipos. Sin embargo, la variación puede llegar a ser muy elevada. Este resultado es preocupante, porque normalmente se habla del valor de una entrada en concreto para la mejora de la calidad. Sin embargo, debería hablarse de una planta de una entrada concreta, ya que para una misma entrada hay plantas que no representan una diferencia importante mientras que otras destacan claramente. Este resultado condiciona la forma en la que se debe abordar el cribado de germoplasma, aumentando en el número de plantas evaluadas por entrada para estar seguros de aprovechar la variación intra-poblacional. Por otro lado, implica recoger la semilla por planta y tener especial cuidado en evitar polinizaciones cruzadas.

El hecho de haber llevado a cabo un ensayo multi-ambiente con réplicas clonales permitió llevar a cabo una descomposición fenotípica completa. Las entradas evaluadas no destacaron por su contribución genotípica a la acumulación de hexosas, aunque en materiales no solo de *S. habrochaites* sino también de *S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium* se encontró una contribución genotípica a la acumulación de sacarosa. Estas entradas del grupo *Lycopersicon* podrían emplearse para estudiar la regulación de la invertasa vacuolar, enzima clave en la regulación del balance entre hexosas y sacarosa (Matsuura et al., 2016). Por otro lado, la entrada CDP4041 de *S. habrochaites* también presenta una contribución elevada al ratio fructosa/glucosa. El interés de este ratio está condicionado por el mayor poder edulcorante de la fructosa y por tanto puede servir para aumentar los equivalentes de sacarosa, medida directamente relacionada con la percepción del dulzor (Baldwin et al., 1998). Es

posible, no obstante, que este balance esté condicionado por la presencia del gen *Fgr* que codifica la fructokinasa2 y que fue descrito en esta especie (Levin et al., 2000).

En cualquier caso, los últimos resultados tienen mayor valor en el contexto de la acumulación de ácidos. Así algunas de las entradas evaluadas para el contenido en ácidos han mostrado una gran contribución genotípica, por lo que serían las más interesantes para modificar la nota ácida del sabor o incrementar la intensidad de sabor. Pero además los resultados de estas entradas permiten poder evaluar la regulación del contenido en ácidos, ya que se han encontrado distintos perfiles de acumulación, interpretados a partir de las relaciones entre cada ácido, siendo el comportamiento consistente en los tres ambientes evaluados.

En algunos casos las bajas proporciones en ácido cítrico respecto al ácido málico y glutámico podrían indicar una mayor acumulación del ácido glutámico en detrimento del cítrico, por una regulación positiva del *GABA shunt* que conduce a la síntesis del ácido gamma amino butírico (GABA). En otras entradas de *S. pimpinellifolium* y *S. habrochaites* la relación entre málico y glutámico es alta, debido a una baja producción de ácido glutámico y mayor de málico, que podría deberse a una regulación negativa del *GABA shunt*, que conduciría a la acumulación de ácido cítrico (Etienne et al., 2013). En otra entrada de *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, los ratios del ácido cítrico respecto a málico y glutámico son también elevados, pero el de málico respecto al glutámico no es tan alto como en el caso anterior, en este caso parece que la causa es una acumulación de ácido cítrico a costa del ácido málico, aunque una pequeña contribución podría deberse a una regulación negativa del *GABA shunt*. Por otro lado en otras entradas de *S. pimpinellifolium* se da un aumento en los tres ácidos, por lo que el *GABA shunt* no parece estar regulado negativamente y el aumento puede deberse a una regulación positiva del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA), dando como resultado una acumulación de ácidos orgánicos y aminoácidos derivados.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, S.R., Cockshul, K.E., Cave, C.R.J., 2001. Effect of temperature on the growth and development of tomato fruits. *Annals of Botany* 88, 869-877.
- Baldwin, E.A., Scott, J.W., Einstein, M.A., Malundo, T.M.M., Carr, B.T., Shewfelt, R.L., Tandon, K.S., 1998. Relationship between sensory and instrumental analysis for tomato flavor. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123(5), pp.906-915.
- Baldwin, E.A., Scott, J.W., Shewmaker, C.K., Schuch, W., 2000. Flavor trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. *HortScience*, 35(6), pp.1013-1021.
- Baldwin, E.A., Goodner, K., Plotto, A., 2008. Interaction of volatiles, sugars, and acids on perception of tomato aroma and flavor descriptors. *Journal of food science*, 73(6), pp.S294-S307.
- Barrantes, W., López-Casado, G., García-Martínez, S., Alonso, A., Rubio, F., Ruiz, J. J., Fernández-Muñoz, R., Granell, A., Monforte, A. J., 2016. Exploring new alleles

- involved in tomato fruit quality in an introgression line library of *Solanum pimpinellifolium*. *Frontiers in plant science*, 7.
- Beckmann, M.Z., Duarte, G.R.B., De Paula, V.A., Gonzáles-Mendes, M.A., Piel, R.M.N., 2006. Radiação solar em ambiente protegido cultivado com tomateiro nas estações verão-outono do Rio Grande do Sul. *Ciência Rural*, Santa Maria 36 (1), 86-92.
- Bucheli, P., Voirol, E., de la Torre, R., López, J., Rytz, A., Tanksley, S.D., Pétiard, V., 1999. Definition of nonvolatile markers for flavor of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as tools in selection and breeding. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(2), pp.659-664.
- Caliman, F.R.B., Da Silva, D.J.H., Stringheta, P.C., Fontes, P.C.R., Moreira, G.R.E.C., 2010. Quality of tomatoes grown under a protected environment and field conditions. *Idesia (Chile)* 28, 75-82. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/idesia/v28n2/art09.pdf>
- Causse, M., Saliba-Colombani, V., Lesschaeve, I., Buret, M., 2001. Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 2. Mapping QTLs for sensory attributes. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 102(2), pp.273-283.
- Cebolla-Cornejo, J., Roselló, S., Valcárcel, M., Serrano, E., Beltrán, J., Nuez, F., 2011. Evaluation of genotype and environment effects on taste and aroma flavor components of Spanish fresh tomato varieties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(6), pp.2440-2450.
- Cebolla-Cornejo, J., Valcárcel, M., Herrero-Martínez, J.M., Roselló, S., Nuez, F., 2012. High efficiency joint CZE determination of sugars and acids in vegetables and fruits. *Electrophoresis*, 33(15), pp.2416-2423.
- Coulter, T.P., 1998. *Manual de Química y Bioquímica de los Alimentos*. Acribia S.A. , Zaragoza, Spain.
- Davies, J.N., Hobson, G.E., 1981. The constituents of tomato fruit. The influence of environment, nutrition and genotype. *CRC Critical Rev. Food Sci. Nutr.* 15 (3), 205-280.
- Etienne, A., Génard, M., Lobit, P., Mbéguié-A-Mbéguié, D., Bugaud, C., 2013. What controls fleshy fruit acidity? A review of malate and citrate accumulation in fruit cells. *Journal of experimental botany*, 64(6), pp. 1451-1469.
- Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M. C., Cámara, M., Torija, M. E., Chaya, C., Galiana-Balaguer, L., Roselló, S., Nuez, F., 2004. Internal quality characterization of fresh tomato fruits. *Hortscience*, 39(2), 339-345.
- Fleisher, D.H., Logendra, L.S., Moraru, C., Both, A.J., Cavazzoni, J., Gianfagna, T., Lee, T.C., Janes, H.W., 2006. Effect of temperature perturbations on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) quality and production scheduling. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 81, 1, 125-131.
- Fulton, T.M., Bucheli, P., Voirol, E., Lopez, J., Petiard, V., Tanksley, S.D., 2002. Quantitative trait loci (QTL) affecting sugars, organic acids and other biochemical properties possibly contributing to flavor, identified in four advanced backcross populations of tomato. *Euphytica*, 127(2), pp.163-177.

- Galiana-Balaguer, L., Roselló, S., Herrero-Martínez, J.M., Maquieira, A., Nuez, F., 2001. Determination of L-ascorbic acid in *Lycopersicon* fruits by capillary zone electrophoresis. *Analytical biochemistry*, 296(2), pp.218-224.
- Galiana-Balaguer, L., Roselló, S., Nuez, F., 2004. Flavour improvement in tomato. *Recent research developments in crop science*, pp.147-163.
- Galiana-Balaguer, L., Rosello, S., Nuez, F., 2006. Characterization and selection of balanced sources of variability for breeding tomato (*Lycopersicon*) internal quality. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(5), pp.907-923.
- García-Martínez, S., Gálvez-Sola, L.N., Alonso, A., Agulló, E., Rubio, F., Ruiz, J.J., Moral, R., 2012. Quality assessment of tomato landraces virus-resistant breeding lines: quick estimation by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(6), pp.1178-1185.
- Garvey, T.C., Hewitt, J.D., 1991. Starch and sugar accumulation in two accessions of *Lycopersicon cheesmanii*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116, pp.77-79.
- Garvey, T.C., Hewitt, J.D., 1992. Use of molecular markers to locate quantitative trait loci linked to high soluble solids content in a hybrid of *Lycopersicon cheesmanii*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117(3), pp.497-499.
- Gautier, H., Diakou-Verdin, V., Bénard, C., Reich, M., Buret, M., Bourgaud, F., Poëssel, J.L., Caris-Veyrat, C., Génard, M., 2008. How does tomato quality (sugar, acid, and nutritional quality) vary with ripening stage, temperature, and irradiance?. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), pp.1241-1250.
- Hewitt J.D., Garvey T.C. 1987. Wild sources of high soluble solids. In: "Nevins, D.J.; Jones, R.A. (Eds.) *Plant Biology*, vol. 4: *Tomato biotechnology*. Liss, New York": 45-54.
- Husain, S.E., Thomas, B.J., Kingston-Smith, A.H., Foyer, C.H., 2001. Invertase protein, but not activity, is present throughout development of *Lycopersicon esculentum* and *L. pimpinellifolium* fruit. *New Phytologist*, 150(1), pp.73-81.
- Ilić, Z.S., Milenković, L., Bodroža-Solarov, M., Marinković, D., Šunić, L. 2012. Tomato fruits quality as affected by light intensity using color shade nets. 47th Croatian and 7th International Symposium on Agriculture Proceedings, 414-418. Disponible en: http://scholar.google.es/scholar_url?url=http://www.researchgate.net/profile/Zoran_Ilic/publication/258847279_Tomato_fruits_quality_as_affected_by_light_intensity_using_color_shade_nets/links/00b49529398fd1d724000000.pdf&hl=es&sa=X&scisig=AGBfm0R_0VH35YOE_hlaIYId8xFIHZ6iA&nossl=1&oi=scholar&ei=nmYeVfvSHcjr aMPRgcgl&ved=0CB8QgAMoADAA
- Lee, S. W., T. Iwase, 1998: Multiple linear regression analysis of factors determining sugar content of tomatoes. *RDA Journal of Horticulture Science* 40, 48-54.
- Levin, I., Lalazar, A., Bar, M., Schaffer, A.A., 2004. Non GMO fruit factories: Strategies for modulating metabolic pathways in the tomato fruit. *Industrial Crops and Products*, 20(1), pp.29-36.
- Malundo, T.M.M., Shewfelt, R.L., Scott, J.W., 1995. Flavor quality of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as affected by sugar and acid levels. *Postharvest Biology and Technology*, 6(1-2), pp.103-110.

- Markovic, Z., Zdravkovic, J., Damjanovic, M., Jevtic, S. ed., B. Lazic, 1997: Correlation between the morphological characteristics and the biochemical components of tomato fruit quality. Proceedings of the first Balkan symposium on vegetables and potatoes, Belgrade, Yugoslavia, 4-7 June 1996: 462, 151-156.
- Mata, M. C. S., Hurtado, M. C., Ripollés, S. R., Galiana-Balaguer, L., Isasa, M. E. T., Viñals, F. N. (2000). Breeding for flavour of fresh market tomato: sources for increasing acid content. *Acta Physiologiae Plantarum*, 22(3), 250.
- Matsukura, C., 2016. Sugar Accumulation in Tomato Fruit and Its Modification Using Molecular Breeding Techniques. In *Functional Genomics and Biotechnology in Solanaceae and Cucurbitaceae Crops* (pp. 141-154). Springer Berlin Heidelberg.
- Mulholland, B.J., Edmondson, R.N., Fussel, M., Basham J., Ho L.C., 2003. Effects of high temperature on tomato summer fruit quality. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 78, 365-374.
- Peralta, I.E., Spooner, D.M., Knapp, S., 2008. Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; *Solanaceae*). *Systematic botany monographs*, 84.
- Petro-Turza, M., 1986. Flavor of tomato and tomato products. *Food Reviews International*, 2(3), pp.309-351.
- Riga, P., Anza, M., Garbisu, C., 2008. Tomato quality is more dependent on temperature than on photosynthetically active radiation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(1), pp.158-166.
- Rosello, S., Galiana-Balaguer, L., Herrero-Martínez, J.M., Maquieira, A., Nuez, F., 2002. Simultaneous quantification of the main organic acids and carbohydrates involved in tomato flavour using capillary zone electrophoresis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(10), pp.1101-1106.
- Saliba-Colombani, V., Causse, M., Philouze, J., Buret, M., Issanchou, S., Lesschaeve, I., 1999. QTLs for organoleptic quality in fresh market tomato. In *Genetics and Breeding for Crop Quality and Resistance* (pp. 291-299). Springer Netherlands.
- Salveit, M.E., 2005. Fruit ripening and fruit quality. *Crop Production Science in Horticulture*. 13, p.145
- Soga, T., Ross, G.A., 1999. Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids, amino acids and carbohydrates by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 837(1), pp.231-239.
- Stevens, M.A., Kader, A.A., Albright-Holton, M., 1977. Intercultivar variation in composition of locular and pericarp portions of fresh market tomatoes. *Journal-American Society for Horticultural Science (USA)*.
- Suárez, M.H., Rodríguez, E.R., Romero, C.D., 2008. Analysis of organic acid content in cultivars of tomato harvested in Tenerife. *European Food Research and Technology*, 226(3), pp.423-435.
- Tandon, K.S., Baldwin, E.A., Scott, J.W., Shewfelt, R.L., 2003. Linking sensory descriptors to volatile and nonvolatile components of fresh tomato flavor. *Journal of food science*, 68(7), pp.2366-2371.
- Wilkerson, E.D., Anthon, G.E., Barrett, D.M., Sayajon, G.F.G., Santos, A.M., Rodríguez-Saona, L.E., 2013. Rapid assessment of quality parameters in

processing tomatoes using hand-held and benchtop infrared spectrometers and multivariate analysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(9), pp.2088-2095.

Yahia, E.M., Hao, X., Papadopoulos, A.P., 2005. Influence of crop management decisions on postharvest quality of greenhouse tomatoes. Ramdane Dris PhD (Ed) "Crops: Quality, Growth and Biotechnology", pp. 379-405.

Žnidarčič, D., Ban, D., Oplanić, M., Karić, L., Požrl, T., 2010. Influence of postharvest temperatures on physicochemical quality of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *J.Food Agric. Environ.* 8(1), 21-25.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

Se ha desarrollado un método basado en la técnica de la electroforesis capilar zonal que permite la determinación simultánea de los ácidos orgánicos (oxálico, cítrico y málico) y azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa), que son los principales responsables del gusto del tomate, con límites de detección inferiores a 2 y 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ respectivamente. A diferencia de lo que ocurre con otros métodos de electroforesis capilar, este protocolo puede ser utilizado con muestras de frutos no solo de la especie cultivada sino también de otras especies relacionadas que muestran grandes diferencias en los componentes de la matriz de las muestras, sin que por ello su eficacia se vea comprometida. La rapidez del método (tiempo de carrera inferior a 20 minutos), escasa preparación de muestra, bajísimo consumo de reactivos, alta reproducibilidad, facilidad de automatización y bajo coste operativo que han hecho que se convierta en una herramienta de gran valor para su uso en programas de mejora genética

Se han identificado entradas del género *Solanum* sección *Lycopersicon* potencialmente útiles para aumentar el contenido en ácidos orgánicos y/o azúcares implicados en la percepción por el gusto. En conjunto se han evaluado 64 entradas, tanto de la especie cultivada, *S. lycopersicum* (29), como de las especies silvestres relacionadas, *S. pimpinellifolium* (23), *S. habrochaites* (8), *S. pennellii* (2) y *S. peruvianum* (2). El uso de diversas técnicas de análisis multivariante (PCA, cluster, GGEbiplot) ha permitido tener una visión global de las características de calidad de cada una de las entradas respecto a las del conjunto de cada ensayo, permitiendo seleccionar fuentes de variabilidad para el aumento en componentes específicos sin por ello descuidar el resto de variables.

Cabe destacar que en el grupo *Lycopersicon* (frutos rojos y filogenéticamente más próximas a la especie cultivada) las entradas UPV-16950, UPV-18242 y UPV-18263, casi triplican los contenidos en azúcares y ácido málico y duplican el de ácido cítrico de las variedades comerciales tomadas como control, lo que facilitará su uso en planes de mejora de la calidad organoléptica que busquen incrementos equilibrados de gusto. En las entradas del grupo *Eriopersicon* (frutos verdes y filogenéticamente menos próximas a la especie cultivada) se han identificado dos entradas de *S. habrochaites* (UPV-17924 y UPV-17042) con contenidos en ácido málico y cítrico siete y nueve veces mayores que el mejor de los controles que pueden ser útiles en la mejora del matiz ácido del sabor.

Finalmente se ha confirmado la importante influencia del ambiente en la expresión de caracteres de calidad organoléptica, lo que aconseja la realización de ensayos de cribado de fuentes de variabilidad en varios ambientes. Además, hay que tener la precaución de evaluar un número suficiente de plantas por entrada para poder detectar y aprovechar la variabilidad intra-entrada que en algunos casos es elevada.

La influencia del ambiente se manifiesta no solo de forma directa, aumentando los contenidos de azúcares en los frutos con los incrementos de radiación fotosintéticamente activa y disminuyendo los contenidos de ácidos en ambientes con

menor temperatura, sino también destapando efectos genéticos específicos debidos a la interacción del genotipo con el ambiente de cultivo. Por ello, para conocer el verdadero valor de una entrada es necesario descomponer su valor fenotípico, estimando la contribución genotípica y su estabilidad e identificando el potencial real para la mejora del carácter.

En concreto, al utilizar esta estrategia de evaluación y de estima de la contribución genotípica y de interacción se han identificado dos entradas, una de *S. habrochaites* (CDP4941) y otra de *S. pimpinellifolium* (CDP9999) que pueden ser interesantes como fuentes de variabilidad para incrementar el gusto con matiz ácido por su elevado contenido en ácidos málico y cítrico y por su estabilidad en la acumulación de estos compuestos. Por otro lado, la identificación de materiales con distinto perfil de acumulación de los ácidos cítrico, málico y glutámico que se ha realizado será también útil en el estudio de la regulación de los ciclos de los ácidos tricarboxílicos y del *GABA shunt*.

