

## Antioxidantes y calidad del fruto de variedades de manzana del Banco de Germoplasma de la Estación Experimental de Aula Dei-CSIC

Pierre Mignard<sup>1</sup>, Gemma Reig<sup>1</sup>, Carolina Font i Forcada<sup>1</sup> & María Ángeles Moreno<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Pomología, Estación Experimental de Aula Dei-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (EEAD-CSIC), Avda. Montañana 1005, E-50059 Zaragoza, España. pmignard@eead.csic.es, greig@eead.csic.es, cfont@eead.csic.es, mmoreno@eead.csic.es

### Resumen

La manzana (*Malus x domestica* Borkh) es una de las frutas más consumidas en el mundo. Los compuestos antioxidantes, conocidos por sus beneficios sobre la salud son cada vez más estudiados en los productos hortofrutícolas. En este trabajo se han estudiado 18 variedades con distintas características procedentes del Banco de Germoplasma de manzano de la Estación Experimental de Aula Dei-CSIC (Aragón, Zaragoza). Se clasificaron en grupos en función del color de su piel (6 rojas o bicolor, 6 verdes y 6 amarillas) y de su origen (autóctonas y extranjeras). Se cosecharon los frutos durante tres años consecutivos (2014, 2015 y 2016) y se determinaron tanto parámetros básicos de calidad de fruto: color, contenido de sólidos solubles (SS), acidez (AT), índice de madurez (IM), como de compuestos antioxidantes: fenoles totales, flavonoides, vitamina C y capacidad antioxidante (RAC). El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) mostró diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre variedades para todos los parámetros estudiados y según los grupos de variedades antes definidos. Se observó también la influencia del año de cosecha en los valores obtenidos. Además, se encontraron correlaciones significativas y positivas ( $p \leq 0,01$ ) entre RAC y fenoles totales ( $r=0,720$ ), RAC y flavonoides ( $r=0,605$ ), RAC y vitamina C ( $r=0,219$ ) y fenoles y flavonoides ( $r=0,464$ ). También se observaron correlaciones significativas positivas ( $p \leq 0,01$ ) entre la acidez (AT) y los compuestos antioxidantes: fenoles totales ( $r=0,583$ ), flavonoides ( $r=0,683$ ) y RAC ( $r=0,490$ ). Entre las variedades estudiadas destacó especialmente la variedad autóctona ‘Camuesa Fina de Aragón’, por mostrar los valores más altos en flavonoides, fenoles totales y RAC. Este trabajo demuestra la importancia de determinar el contenido en compuestos antioxidantes en las diferentes variedades, así como el interés de las variedades autóctonas para su uso en futuros programas de mejora.

**Palabras claves:** fenoles, flavonoides, *Malus sp.*, RAC, vitamina C.

### Abstract

Apple (*Malus x domestica* Borkh) is one of the most consumed fruit in the world. The antioxidant compounds, known for their health benefits, are increasingly being studied in the horticultural products. In this study, 18 accessions with different characteristics from the Apple Germplasm collection at the Experimental Station of Aula Dei-CSIC (Aragón, Zaragoza) were evaluated. They were classified in groups according to the skin color (6 red or bicolor, 6 green and 6 yellow) and the origin (local or foreign). They were harvested over three consecutive years (2014, 2015 and 2016) and fruit quality traits: color, soluble solids content (SSC), titratable acidity (TA), ripening index (RI), as well as antioxidant compounds: total phenols content, flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity (RAC), were evaluated. The statistical analysis (ANOVA) showed significant differences ( $p \leq 0,05$ ) among accessions for all traits evaluated and according to the different groups above mentioned. A year effect was also observed on the values

obtained. In addition, significant and positive correlations ( $p \leq 0,01$ ) between RAC and total phenols content ( $r=0,720$ ), RAC and flavonoids ( $r=0,605$ ), RAC and vitamin C ( $r=0,219$ ) and total phenol content and flavonoids ( $r=0,464$ ) were found. Also, significant positive correlations between titratable acidity (TA) and antioxidant compounds were found: total phenol content ( $r=0,583$ ), flavonoids ( $r=0,683$ ) and RAC ( $r=0,490$ ). Among the accessions studied, the local accession 'Camuesa Fina de Aragón' highlighted to have the highest flavonoid, total phenol content and RAC values. This work shows the importance of evaluating the antioxidant compounds in different accessions, as well as the interest of using local accessions in future breeding programs.

**Keywords:** phenols, flavonoids, *Malus sp.*, RAC, vitamin C.

### Introducción

El manzano (*Malus x domestica* Borkh) es uno de los frutales más cultivados en el mundo. Actualmente existen más de 7000 variedades conocidas. Entre ellas están las comerciales y mundialmente conocidas como las del grupo 'Fuji', 'Gala', 'Golden', 'Granny Smith', y 'Red Delicious', entre otras, así como las autóctonas de los países productores de manzano.

La manzana es una de las principales fuentes de sustancias biológicas activas beneficiosas para la salud de los consumidores, como pectinas, fibra, vitaminas, oligosacáridos y sobre todo compuestos fenólicos (Lee et al., 2003; Raudone et al., 2017), ya que es uno de los frutos más consumidos en el mundo y está disponible todo el año en el mercado. Una reducción del riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, microbianas y cancerígenas también ha sido atribuida al consumo de manzana, principalmente debido a la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos (Raudone et al., 2017).

En España, como en otros países productores, los agricultores basan la producción de manzano en variedades no autóctonas, principalmente las del grupo 'Golden', 'Gala', 'Red Delicious', y 'Fuji', debido a su alta y rápida entrada en producción. Como consecuencia, las variedades autóctonas, mejor adaptadas a las zonas de origen, en cuanto a resistencia a plagas y enfermedades y calidad de fruto, han ido desapareciendo o han sido conservadas en bancos de germoplasma para evitar su extinción. Los bancos de germoplasma son una valiosa fuente de diversidad genética que hay que preservar para proveer de comida a la raza humana, ya que esta diversidad genética es necesaria para mejorar los cultivos actuales debido a factores relacionados con el cambio climático y/o plagas y enfermedades (Reig et al., 2015).

Diversos estudios han descrito y estudiado los compuestos fenólicos, tanto de la pulpa del fruto como de la piel, de algunas variedades de manzano cultivadas en distintas partes del mundo. El contenido de los compuestos fenólicos varía considerablemente en función de las condiciones ambientales, prácticas de cultivo, como también de la fecha de cosecha y las condiciones de conservación en frío. Sin embargo, según nuestro conocimiento, ningún estudio previo ha evaluado la capacidad antioxidante, compuestos fenólicos y Vitamina C, tanto de variedades extranjeras como de variedades autóctonas, en las condiciones edafo-climáticas de la zona del Valle del Ebro.

### Material y Métodos

Dieciocho variedades del Banco de Germoplasma de manzano de la Estación Experimental de Aula Dei-CSIC (Aragón, Zaragoza) fueron evaluadas durante 3 años consecutivos (2014-2016). Las variedades se clasificaron en función del color de su piel

(6 rojas o bicolor, 6 verdes y 6 amarillas) y de su origen (autóctonas y extranjeras). Su descripción se puede observar en la Tabla 1.

En el Banco de Germoplasma cada variedad consta de tres árboles. Durante tres años se cosecharon 15 frutos por variedad (5 frutos por árbol) a madurez comercial (alrededor de 70 N de firmeza) para determinar los parámetros básicos de la calidad de fruto: sólidos solubles (SS, °Brix), acidez total (AT, g ácido málico/L), e índice de madurez (IM) como la relación entre SS y AT, así como los compuestos antioxidantes: fenoles totales (mg ácido gálico/100 g peso fresco), flavonoides (mg catequina/100 g peso fresco), capacidad antioxidante relativa (RAC, mg Trolox/100 g peso fresco), y vitamina C (mg ácido ascórbico/100 g peso fresco).

Cada fruto cosechado se dividió en dos partes. Una mitad se destinó a la calidad básica de fruto, y la otra a la determinación de los compuestos antioxidantes. Con el zumo extraído de los frutos destinados a los parámetros de SS y AT, se determinaron los SS con un refractómetro digital y la AT mediante valoración con 0,1 N NaOH. Los trozos pelados de los 5 frutos por árbol se juntaron y mezclaron, se pesaron y congelaron unos 5 gramos aproximadamente, anotando el peso exacto. Se mantuvieron las muestras en congelador a -20°C para su posterior análisis. Las determinaciones de los fenoles totales, flavonoides, RAC y vitamina C se realizaron por espectrofotometría según Font i Forcada et al. (2014), con algunas modificaciones.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa estadístico IBM SPSS, versión 24 (USA) realizándose un ANOVA de un sólo factor. La separación de medias se realizó mediante la prueba t de Student a un nivel de significación de  $p \leq 0,05$ . Los análisis de correlación de Pearson y de Componentes Principales (PCA) se llevaron a cabo para estudiar la relación entre las distintas variables estudiadas. Para el análisis de PCA se utilizó el programa Unscrambler X 10.3 (CamoAsa, 2001).

## Resultados y Discusión

Las 18 variedades evaluadas en este estudio mostraron una amplia variabilidad fenotípica para todas las variables estudiadas. El análisis estadístico de los resultados mostró diferencias significativas entre variedades para todos los parámetros estudiados, y también según la tipología y el origen de la variedad. Se observó también la influencia del año de cosecha en los valores obtenidos. No obstante, estos valores estuvieron dentro del rango de los previamente publicados en otros estudios de manzano (Kalinowska et al., 2014; Ozturk et al., 2015; Raudone et al., 2017).

Para cada tipología de fruto (amarilla, bicolor, verde) en función de su origen (autóctona, extranjera) se observó que las variedades amarillas extranjeras presentaron valores más elevados de RAC comparado con las autóctonas (Tabla 2). Sin embargo, en las variedades bicolor se observó lo contrario. Éstas también presentaron valores más elevados de fenoles totales, flavonoides y vitamina C. En las variedades verdes no se observaron diferencias entre los compuestos antioxidantes en función de su origen. En cuanto a la calidad básica de fruto, sólo se observaron diferencias en función de su origen en las variedades verdes. Las autóctonas tendieron a ser más dulces y menos ácidas que las extranjeras.

Para cada origen en función de la tipología de fruto, se observó que las variedades autóctonas bicolor presentaban valores más elevados de RAC y flavonoides comparado con el resto de tipologías, al igual que las variedades extranjeras amarillas y verdes (Tabla 2). Éstas últimas presentaron también valores más elevados de AT, mientras que las extranjeras amarillas y bicolor presentaron valores más elevados de SS.

Dentro que cada tipología y origen, también las variedades entre sí mostraron diferencias entre ellas. La Figura 1 representa una distribución bidimensional de las 18

variedades en función de las variables estudiadas. Este gráfico bidimensional nos explica el 80% de la variabilidad total del estudio, aportando el eje principal 1 (PC1) un 62% y el eje principal 2 (PC2) un 18%. En el eje PC1 las variables que más contribuyeron a esta variabilidad fueron los fenoles totales, flavonoides, RAC y AT. Se encontraron varias correlaciones significativas y positivas ( $p \leq 0,01$ ), entre RAC y fenoles totales ( $r=0,720$ ), RAC y flavonoides ( $r=0,605$ ), flavonoides y AT ( $r=0,683$ ). La variedad autóctona ‘Camuesa Fina de Aragón’ destacó mostrando los valores más altos de fenoles totales, flavonoides y RAC. En cambio, las variedades ‘Bost Kantoia’, ‘Golden Smoothee’ y ‘Verde Doncella’ mostraron lo contrario. En el eje PC2 las variables que más contribuyeron a la variabilidad fueron SS y Vitamina C, siendo la variedad autóctona ‘Aciprés’ y la extranjera ‘Starkrimson’ las que mostraron valores más elevados de SS, y la variedad autóctona ‘Reineta Encarnada’ la que mostró mayor contenido de Vitamina C.

### Conclusión

Este trabajo demuestra la importancia de determinar los distintos parámetros de calidad del fruto y el contenido en compuestos antioxidantes en las diferentes variedades, así como el interés de las variedades autóctonas para su uso en futuros programas de mejora.

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos PIE 201640E070, RFP 2012-00020 y RFP 2015-00019, cofinanciados por FEDER y el Gobierno Regional de Aragón (A44). Se agradece al Dr. J. Abadía por la utilización del equipo de espectrofotometría, a la Dra. M.P. Vallés por el equipo de centrifugación, y a M.P. Soteras y B. Montero por la caracterización morfológica del material vegetal.

### Referencias

- Font i Forcada, C., Gogorcena, Y. & Moreno, M.A. 2014. Agronomical parameters, sugar profile and antioxidant compounds of “Catherine” peach cultivar influenced by different plum rootstocks. *International Journal of Molecular Sciences* 57:2237-2254.
- Kalinowska, M., Bielawska, A., Lewandowska-Siwkiewicz, H., Priebe, W. & Lewandowski, W. 2014. Apples: content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. *Plant Physiology and Biochemistry* 84:169-188.
- Lee, K.W., Kim, Y.J., Kim, D.O., Lee, H.J. & Lee, C.Y. 2003. Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51:6516-6520.
- Ozturk, B., Yildiz, K. & Ozkan, Y. 2015. Effects of pre-harvest methyl jasmonate treatments on bioactive compounds and peel color development of ‘Fuji’ apples. *International Journal Food Properties* 18:954-962.
- Raudone, L., Raudonis, R., Liaudanskas, M., Janulis, V. & Viskelis, P. 2017. Phenolic antioxidants profiles in the whole fruit, flesh and peel of apple cultivars grown in Lithuania. *Scientia Horticulturae* 216:186-192.
- Reig, G., Blanco, A., Castillo, A.M., Gogorcena, Y. & Moreno, M.A. 2015. Phenotypic diversity of Spanish Apple (*Malus × domestica* Borkh) accessions grown at the vulnerable climatic conditions of the Ebro Valley, Spain. *Scientia Horticulturae* 185:200-210.

## Tablas y Figuras

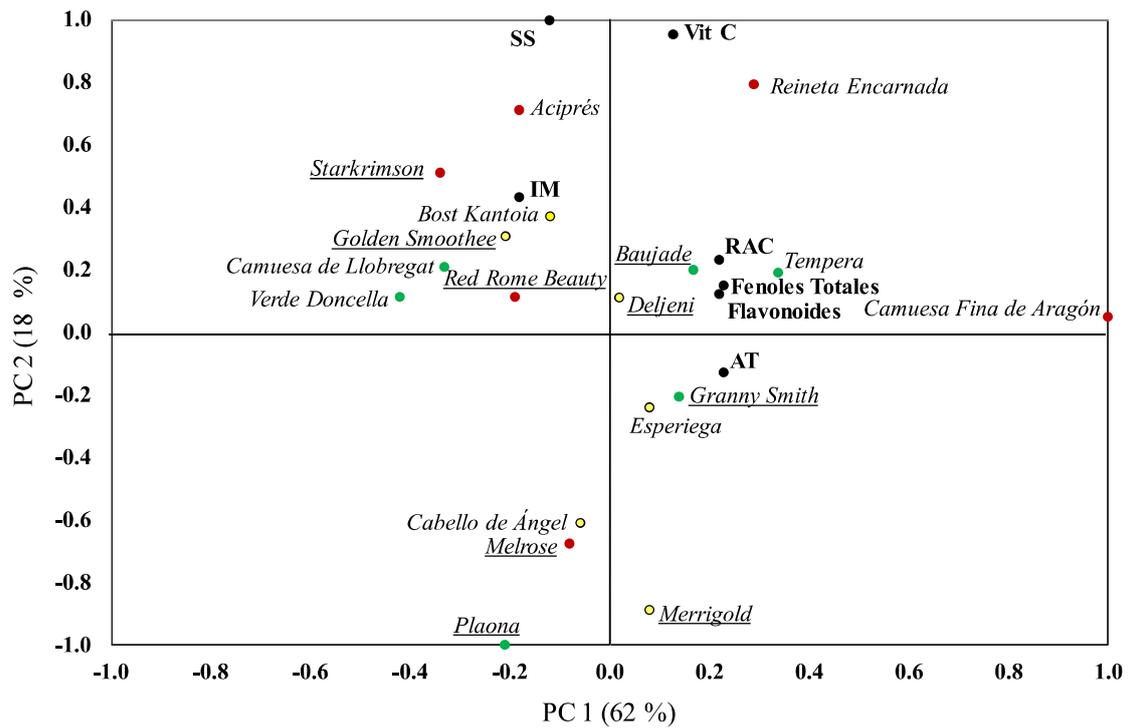
**Tabla 1-** Características de las 18 variedades de manzano estudiadas procedentes del Banco de Germoplasma de la Estación Experimental de Aula Dei (EEAD) – CSIC.

Accesión	Origen	Tipo fruto
Aciprés	España	Bicolor
Baujade	Francia	Verde
Bost Kantoia	España	Amarilla
Cabello de Ángel	España	Amarilla
Camuesa de Llobregat	España	Verde
Camuesa Fina de Aragón	España	Bicolor
Deljeni	Francia	Amarilla
Esperiega	España	Amarilla
Golden Smoothee	USA	Amarilla
Granny Smith	Australia	Verde
Melrose	USA	Bicolor
Merrigold	USA	Amarilla
Plaona	-	Verde
Red Rome Beauty	USA	Bicolor
Reineta Encarnada	España	Bicolor
Starkrimson	USA	Bicolor
Tempera	España	Verde
Verde Doncella	España	Verde

**Tabla 2-** Compuestos antioxidantes y parámetros de calidad de fruto evaluados durante 3 años seguidos (2014-2016) en función de la tipología de fruto y origen.

Tipo fruto	Origen	RAC	Fenoles totales	Flavonoides	Vit. C	SS	AT	IM
Amarilla	Autócton <sup>a</sup>	11,7 aA	39,8 aA	17,3 aA	2,9 aA	12,9 aA	5,1 aA	2,8 aA
	Extranjer <sup>a</sup>	14,1 bB	38,2 aA	19,8 aB	2,2 aA	13,3 aB	5,8 aAB	2,7 aA
Bicolor	Autócton <sup>a</sup>	19,8 bB	43,1 bA	42,7 bB	3,1 bA	13,9 aA	6,1 aA	4,3 aAB
	Extranjer <sup>a</sup>	10,6 aA	32,7 aA	12,7 aA	2,1 aA	13,8 aB	4,1 aA	3,9 aB
Verde	Autócton <sup>a</sup>	12,5 aA	32,0 aA	14,9 aA	2,6 aA	13,7 bA	4,4 aA	5,4 bB
	Extranjer <sup>a</sup>	13,5 aB	34,3 aA	17,5 aAB	2,8 aA	12,2 aA	6,7 bB	2,2 aA

Prueba t Student ( $p \leq 0,05$ ) utilizada. Para cada tipología de frutos, los valores de una misma columna con la misma letra minúscula no son significativamente diferentes. Por cada origen, los valores de una misma columna con la misma letra mayúscula no son significativamente diferentes.



**Figura 1-** Segregación de las 18 variedades de manzano estudiadas en función de los parámetros básicos de calidad del fruto y compuestos antioxidantes. Las variedades subrayadas representan las variedades extranjeras.