

ESTIMACIÓN DE LA RELACIÓN GENÉTICA DE CULTIVARES DE AGUACATE DE TAIWÁN POR LOS COMPONENTES VOLÁTILES DE LAS HOJAS

H. Wu¹, C. Chou^{1,2}, T-L. Chang¹ y I-Z. Chen¹

¹ Department of Horticulture, National Taiwan University. Taipei, Taiwan, R.O.C.

email: chenyo@ntu.edu.tw, fax: 886-2-23620760

² Sinetics International Co., Ltd. Taipei, Taiwan, R.O.C.

Los componentes volátiles de las muestras de hojas fueron analizados para distinguir la relación genética entre 46 cultivares (28 de Taiwán y 18 de El Salvador) de aguacate (*Persea americana* Mill.). Un dispositivo de microextracción en fase sólida (MEFS o SPME en inglés) fue utilizado para extraer los componentes volátiles de las hojas de aguacate en viales con headspace calentados y directamente inyectado en el GC-MS. La intensidad del aroma volátil de hojas del aguacate fue más alto en las razas mexicanas que en las razas guatemaltecas y antillanas. Estragol y β -cariofileno son los componentes más abundantes en las razas mexicanas y guatemaltecas respectivamente, y pueden ser indicadores en la clasificación de raza. Los resultados cualitativos y cuantitativos del análisis de GC-MS fueron analizados mediante el Análisis del Componente Principal (ACP o PCA en inglés) y análisis de conglomerados para estimar la variación de las razas de cultivares individuales de aguacate.

Palabras claves: Headspace micro extracción en fase sólida (MEFS o SPME en inglés), GC-MS, Quimitaxonomía

GENETIC RELATIONSHIP ESTIMATION OF TAIWAN AVOCADO CULTIVARS BY VOLATILE CONSTITUENTS OF LEAVES

H. Wu¹, C. Chou^{1,2}, T-L. Chang¹ and I-Z. Chen¹

¹ Department of Horticulture, National Taiwan University. Taipei, Taiwan, R.O.C.

email: chenyo@ntu.edu.tw, fax: 886-2-23620760

² Sinetics International Co., Ltd. Taipei, Taiwan, R.O.C.

Volatile constituents of leaf samples were analyzed to distinguish the genetic relationship among 46 Avocado (*Persea americana* Mill.) cultivars (28 from Taiwan and 18 from El Salvador). A solid phase microextraction (SPME) device was used to extract the volatile constituents from avocado leaves in heated headspace vial, and injected into GC-MS directly. The intensity of volatile aroma of avocado leaf in Mexican races was higher than Guatemalan and West-Indian races. Estragole and β -caryophyllene are the most abundant compounds in Mexican and Guatemalan races respectively, and can be used as indicators in races classification. The qualitative and quantitative results of GC-MS analysis were analyzed by principle component analysis (PCA) and cluster analysis to estimate the variation of individual cultivar races of avocado.

Key words: Headspace solid phase microextraction (HS-SPME), GC-MS, Chemotaxonomy

1. Introducción

Aguacate (*Persea americana* Mill.) es en el género *Persea* de Lauraceae. Tres razas horticulturas o ecológicas de aguacates han identificado convencionalmente, que son razas de México, Guatemala y las Antillas. El origen de aguacate fue América latina. Tres razas han buscado en elevaciones diferentes. La raza de las Antillas prosperaba de la elevación del mar hasta mas o menos 1000 metro, la Guatemala de 1000 hasta 2000 metro, y la mexicana de 1500 hasta 3000 metro (Popenoe, 1952). Las adaptaciones para climas diferentes y condiciones ecológicas resultaban que pueden distinguir las tres razas por rasgos morfológicos, fisiológicos y horticulturas (Bergh, 1992). Sin embargo, parecen que no hay barrera de esterilidad entre razas, y probablemente hay superposición de la distribución natural de las razas (Bergh, 1969).

Rhodes *et al.* (1971) utilizaron 67 caracteres morfológicos como el indicador de una taxonomía numérica de aguacate, cómo piel y textura de fruta, integumento de pepita y perfume de hoja. Caracteres de raíz fueron diferentes entre las razas de Guatemala y las Antillas (Borys *et al.*, 1985). Las hojas de la raza Mexicana tenían perfume que similar de anís, y fue aparente comparar a las razas otras (Bergh, 1969).

Varios ADN marcadores diferentes han aplicado a estimar relaciones genéticas. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) fue utilizado para evaluar relaciones genéticas entre subgéneros *Persea* (Furnier *et al.*, 1990). ADN polimórficas amplificado al azar (RAPD en inglés) fue usado para estimar la tasa de outcrossing y diversidad de plasma germinal (Fiedler *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 2000). Minisatélite (Lavi *et al.*, 1991), y microsátelites (Ashworth y Clegg, 2003; Ashworth *et al.*, 2004; Mhameed *et al.*, 1996; Schnell *et al.*, 2003) también fueron usado para las intenciones mismos.

En headsapce micro extracción en fase sólida (MEFS o SPME en inglés), GC-MS se han usado para análisis de aroma y fragancia (Li *et al.*, 2003). La falta de disponibilidad de estándares comerciales de fragancia y la naturaleza de equilibrio que es fundado en absorción resultaban la reproducibilidad y la cuantificación de GC-MS de HS-SPME difícil. El método GC-MS de disolución de isótopo estable con usar de estándar interna de deuterio se ha usado en el método de EPA de Estados Unidos para compuestos orgánicos semi-volátiles (SVOC en inglés) cuantitación (método 8270C de EPA de EE. UU.). Estos compuestos etiquetados con isótopos estables pueden utilizarlos como los estándar interna para análisis de fragancia de cuantitación calibrado en las hojas de los cultivares de aguacate (Wu, 2007).

Los cultivares de aguacate fueron introducido en Taiwán desde 1981. La clima de Taiwán no fue apropiado por los cultivares introducidos, pero hay sólo un poco de documento sobre la historia de la cultura de los cultivares de Taiwán. Las hojas de aguacate fueron famosas por la fragancia fuerte como el perfume que similar de anís. En esta investigación, el componente volátil de las hojas de aguacate fue analizado para headspace micro extracción en fase sólida (HS-SPME en inglés) que fue fundado en un estándar interno de isótopo estable unido con GC-MS. Los datos analíticos de GC-MS fueron usado para taxonomía numérica de los catares de aguacate.

2. Materias y Métodos

Regente y estándares: Metanol del grado del HPLC fue comprado de Merck (Alemania). El estándar interno, 1,4-dichlorobenzene-d4 y naphthalene-d8 en la mezcla de los estándares internos del método 8270 de EPA (AccuStandard, los E.E.U.U.), fueron utilizados para la cuantificación relativa. Estragole

(Riedel-riedel-de Haën, Alemania), trans-anethole (Fluka, Alemania), β -pinene, eugenol metílico, β -caryophyllene, y phenylacetaldehyde (Sigma-Aldrich, Alemania) fueron utilizados como estándares para la identificación del compuesto.

Muestras: Las hojas maduras del aguacate fueron recogidas de El Salvador y de Taiwán. Veintiséis muestras de la hoja del aguacate de Taiwán, congelado en -20°C antes del análisis, fue recogido de la huerta de señor Shen y de la Estación Chiayi del Experimento Agrícola (CAES o Chiayi Agricultural Experimental Station en inglés). Catorce muestras de las hojas que eran deshidratadas con silicona-gel fueron provistas por Germplasm Reserves del Instituto de Experimentos Agrícolas de El Salvador. El resumen del nombre cultivar y de la fuente de las hojas del aguacate para el análisis de los componentes volátiles en este estudio se enumera en Tabla 1.

Equipo: Agilent 5890 GC-5972 MSD (Agilent, los E.E.U.U.) fue funcionado en modo de la ionización del electrón-impacto en 70 eV. La columna era HP-5-MS (30 m \times 0.25 mm en diámetro interno, 1 μm de espesor del film, Agilent, los E.E.U.U.). La fibra de micro extracción en fase sólida (MEFS o SPME en inglés) era 50/30 μm DVB/PDMS (Supelco, los E.E.U.U.).

Preparación de la muestra: Los discos de la hoja del aguacate fueron colocados en el frasco del espacio libre (25 ml) con la inyección de la solución de estándar interna 1 μL (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El frasco fue calentado en 75°C por 20 minutos, y los compuestos volátiles de hojas fueron atrapados en la fibra de SPME por 5 minutos. La fibra de SPME era entonces directado en la desorción termal en puerto de inyección de la GC.

Condición cromatográfica: El programa de la temperatura del horno fue comenzado en 35°C por 5 minutos, $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a 160°C , mantiene 2 minutos, $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a 280°C , mantiene 1 minuto. El modo de la inyección de Splitless fue seleccionado. La temperatura del puerto de inyección fue fijada en 280°C , y la línea de transferencia fue fijada en 280°C . Helio (99.9995 %) era el gas portador con un caudal de 1 mL/min.

Análisis de datos: El espectro de los datos fue identificado por Wiley275 (Wiley, los E.E.U.U.) y NIST05 (NIST, los E.E.U.U.) las bibliotecas totales estándares del

espectro. La abundancia calibrada era calculada de la abundancia dividida por la abundancia del 'Duke 7'. La matriz de la semejanza era calculada por la distancia Euclidean con los valores convertidos del logaritmo base-10 de la abundancia calibrada, y calculada por usar R 2.4.1 (Departamento de la Estadística de U. Auckland), y arracimado por el método con par- grupo que no pesado usando la media aritmética (UPGMA en ingles).

3. Resultados y Discusiones

'Duke7' es la rizoma usado comúnmente con fragancia fuerte como anís. Calculan la abundancia calibrado de la abundancia sobre la abundancia de 'Duke7'.

$$\text{Abundancia calibrado} = \text{abundancia} \times \frac{A_{IS}}{A_{IS'Duke7'}} \times \frac{S}{S_{Duke7'}}$$

A_{IS} – la abundancia de estándar interno

$A_{IS'Duke7'}$ – la abundancia de estándar interno de 'Duke7'

S – el área del disco de hoja en headspace vial

$S_{Duke7'}$ –el área del disco de hoja de 'Duke7'

No puede reconocer claramente todos los compuestos objetivos por las resultados de la búsqueda biblioteca. Sesquiterpene I (tiempo de retención = 23.55), sesquiterpene II (R.T. = 24.97), sesquiterpene III (R.T. = 26.26), sesquiterpene IV (R.T. = 27.44) y sesquiterpene V (R.T. = 28.18) les solamente puede reconocer como sesquiterpenes ($C_{15}H_{24}$, MW = 204) con su ion molecular. Las formas posible de los sesquiterpenoids son α -cubebene, tetradecane, δ -cadinene and ledene. El estándar de los compuestos no son disponible comercialmente. En esta investigación, respectivamente estos compuestos se llama sesquiterpene I, II, III, IV y V.

Los modelos de componente volátil del cultivar entre las razas de ecología misma eran parecidos (Figura 1, 2, y 3). Los dos mayor características de fragancia entre las tres razas podrían reconocerlas, que son compuestos raza-específicos y compuestos abundancia-variados de la característica. Doce compuestos raza-específicos y diez compuestos característicos (Tabla 2) fue encontrada entre todos los datos de prueba de las muestras puras de la raza. Los compuestos raza-específicos se podían encontrar solamente en una o dos razas ecológicas.

Por ejemplo, hexanal y phenylacetaldehyde podrían encontrarlos solamente en la raza de las Antillas, chavicol y eugenol metílico podrían encontrarlos solamente en la raza de México, y sesquiterpene I y caryophyllene podrían encontrarlos solamente en raza guatemalteca.

Los compuestos característicos abundancia-variados se pueden encontrar en las tres razas ecológicas, pero su abundancia calibrada variada. La abundancia de estragole en muestras mexicanas de la raza era 103 a 104 veces más que otras muestras de dos razas. El resto de característica abundancia-variada compone tenía comportamiento similar como estragole en las muestras mexicanas. Sin la conversión apropiada de la abundancia calibrada, la diferencia entre las muestras de Guatemala y las de las Antilla se podía descuidar en comparación con las de México. El logaritmo base-10 fue elegido como el método numérico de la conversión de abundancia calibrada para análisis adicional. La matriz de la semejanza era calculada por la distancia Euclidean con los valores convertidos del logaritmo base-10 de la abundancia calibrada, y arracimada por UPGMA y el dendrogram generado por el software de R 2.4.1. El dendrogram de todos los datos de prueba de la muestra generados por UPGMA demostró en Figura 4.

Las muestras del aguacate fueron separadas en tres grupos importantes en acordar con tres razas ecológicas en el dendrogram de los resultados de la prueba de los componentes volátiles. La mayoría de los cultivares de Taiwán y de las muestras de la raza de las Antillas de Taiwán fueron arracimadas en grupo A. Las muestras de El Salvador y las de la raza pura de Guatemala de Taiwán fueron arracimadas en grupo B, y las de la raza pura de México de Taiwán fue arracimada en grupo C.

Con las ventajas de la operación fácil, del análisis rápido, de la buena capacidad de repetición y de la reproductibilidad, el análisis del componente volátil de hojas se podía utilizar como método morfológico de la taxonomía para aguacate. La abundancia calibrada por estándares internos de los datos de GC-MS se podía combinar en base de datos, y generó un nuevo dendrogram con todos los datos en la base de datos. Los resultados experimentales probaron que esto es un método factible para la identificación de la relación genética.

Agradecimientos

Los autores quisieran apreciar la ayuda en el muestreo de Sr. T-M. Jong, Sr. C-D. Shan en Taiwán, y Sr. K-L. Huang en El Salvador.

4. Literatura Citada

Ashworth, V. E. T. M., Clegg, M. T. 2003. Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): genealogical relationships among cultivated avocado genotypes. *J. Hered.* 94: 407-415.

Ashworth, V. E. T. M., Kobayashi, M. C., de la Cruz, M., Clegg, M. T. 2004. Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): development of dinucleotide and trinucleotide markers. *Sci. Hortic.* 101: 255-267.

Bergh, B. 1992. The Origin, nature, and genetic improvement of the avocado. *California Avocado Society Yearbook* 76: 61-75.

Bergh, B. O. 1969. Avocado (*Persea americana* Miller). pp. 23-51 in F. P. Ferwerda and F. Wit [ed.], *Outlines of perennial crop breeding in the tropics*. Landbouwhogeschool, Wageningen, Netherlands, Misc. Paper 4.

Borys, M. W., Barrera, Guerra, J. L., Luna-Lopez, J. 1985. Some root characteristics of avocado (*Persea americana* Mill.) seedlings of the West Indian and Guatemalan races. *California Avocado Society Yearbook* 69: 111-122.

Fiedler, J., Bufler, G., Bangerth, F. 1998. Genetic relationships of avocado (*Persea americana* Mill.) using RAPD markers. *Euphytica* 101: 249-255.

Furnier, G. R., Cummings, M. P., Clegg, M. T. 1990. Evolution of the avocados as revealed by DNA restriction fragment variation. *J. Hered.* 81: 183-188.

Lavi, U., Hillel, J., Vainstein, A., Lahav, E., Sharon, D. 1991. Application of DNA fingerprints for identification and genetic analysis of avocado. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116(6): 1078-1081.

Li, H. P., Li, G. C. and Jen, J. F. 2003. Determination of organochlorine pesticides

in water using microwave-assisted headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. J. Chroma. A. 1012: 129–137.

Mhameed, S., Sharon, D., Hillel, J., Lahav, E., Kaufman, D., Lavi, U. 1996. Level of heterozygosity and mode of inheritance of variable number of tandem repeat loci in avocado. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 121(5): 778-782.

Popenoe, W. 1952. Central American fruit culture. Ceiba 1: 225-227.

Rhodes, A. M., Malo, S. E., Campbell, C. W., Carmer, S. G. 1971. A numerical taxonomic study of the avocado (*Persea americana* Mill.). J. Amer. Soc. Hort. Sci. 96: 391-395.

Schnell, R. J., Brown, J. S., Olano, C. T., Power, E. J., Krol, C. A., Kuhn, D. N. , Motamayor, J. C. 2003. Evaluation of avocado germplasm using microsatellite markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 128: 881-889.

USEPA, 1995. SW-846, Method 8270C, Semi-volatile organic compounds (SVOC) by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS): capillary column technique.

Wu, H., Chou, C., Chen, K., Chang, T-L., Chen, I-Z. 2007. Avocado (*Persea americana* Mill.) genetic relationship identification by using leaf volatile constituents as indicators. J. Taiwan Soc. Hort. Sci. (in press)

Tabla 1. El nombre del cultivar y la fuente del aguacate se va para el análisis de los componentes volátiles en este estudio.

Fuente	El nombre del cultivar
CAES, Taiwan (17 samples)	'76-s-6', '79-6-5-3', 'Bacon', 'CAES1', 'CAES2', 'CAES3', 'CAES4', 'Duke 7', 'Esther', 'Hong-ci-chao'(C), 'Hong-sin-yuan'(C), 'Horshim', 'Jhang-an'(C), 'Stewart', 'Toro Canyon', 'WS1Q5', 'Zutano'
Shen's, Taiwan (8 samples)	'Chang-jhong', 'Hong-ci-chao'(S), 'Hong-sin-yuan'(S), 'Jhang-an'(S), 'O24D', 'Pollock'-1, 'Pollock'-2, 'Pollock'-3
El Salvador (14 samples)	'Ahuachapán', 'Béneke', 'Cordero 2', 'Ereguayquín 1', 'Ereguayquín 3', 'Guirola', 'Juguete', 'Letona Morado', 'Lima', 'Lorenzana', 'Mercedes', 'Nejapa', 'San Benito', 'Sitio del Niño 3'

Tabla 2. Desviación media y de estándar de la abundancia calibrada de compuestos raza-específicos en las tres razas del aguacate.

Compuesto raza-específicos	Raza de México	Raza de Guatemala	Raza de las Antillas
hexanal	ND	ND	34424 ± 15470
β-myrcene	ND	11504 ± 9574	12199 ± 7494
phenylacetaldehyde	ND	ND	5434 ± 2397
γ-terpinene	ND	6973 ± 7489	4343 ± 3283
nonyl aldehyde	ND	8444 ± 5708	4304 ± 1018
chavicol	324875*	ND	ND
trans-anethole	1092508 ± 551347	ND	1288*
sesquiterpene I	ND	4198 ± 3049	3303*
methyl eugenol	4812841*	ND	ND
caryophyllene isomer	ND	ND	7113 ± 5200
sesquiterpene III	ND	5209 ± 6001	3171*
sesquiterpene IV	191043 ± 15453	14796 ± 23858	ND

ND = no detectado

* el compuesto encontró solamente en una o dos muestras

Tabla 3. Desviación media y de estándar de la abundancia calibrada de compuestos de la característica en las tres razas del aguacate.

Compueto de la característica	Raza de México		Raza de Guatemala		Raza de las Antillas	
trans-2-hexenal	788772	± 665659	27446*		98962	± 28551
α-pinene	259050	± 182858	21191	± 16465	12912	± 6341
β-pinene	593495	± 322313	46360	± 55905	63490	± 37232
limonene + eucalyptol	2415054	± 1361622	72576	± 32246	253615	± 98102
estragole	30420012	± 27968424	18428	± 25136	4426	± 3876
α-copaene	489744	± 343566	13553	± 26790	17970	± 16470
sesquiterpene II	280289	± 130629	9081	± 4744	5339	± 3539
caryophyllene	3402598	± 2976023	116097	± 165022	77369	± 74865
α-humulene	359975	± 281218	15317	± 18766	9451	± 11934
sesquiterpene V	399511	± 273064	22672	± 26049	14453	± 14796

* el compuesto encontró solamente en una o dos muestras

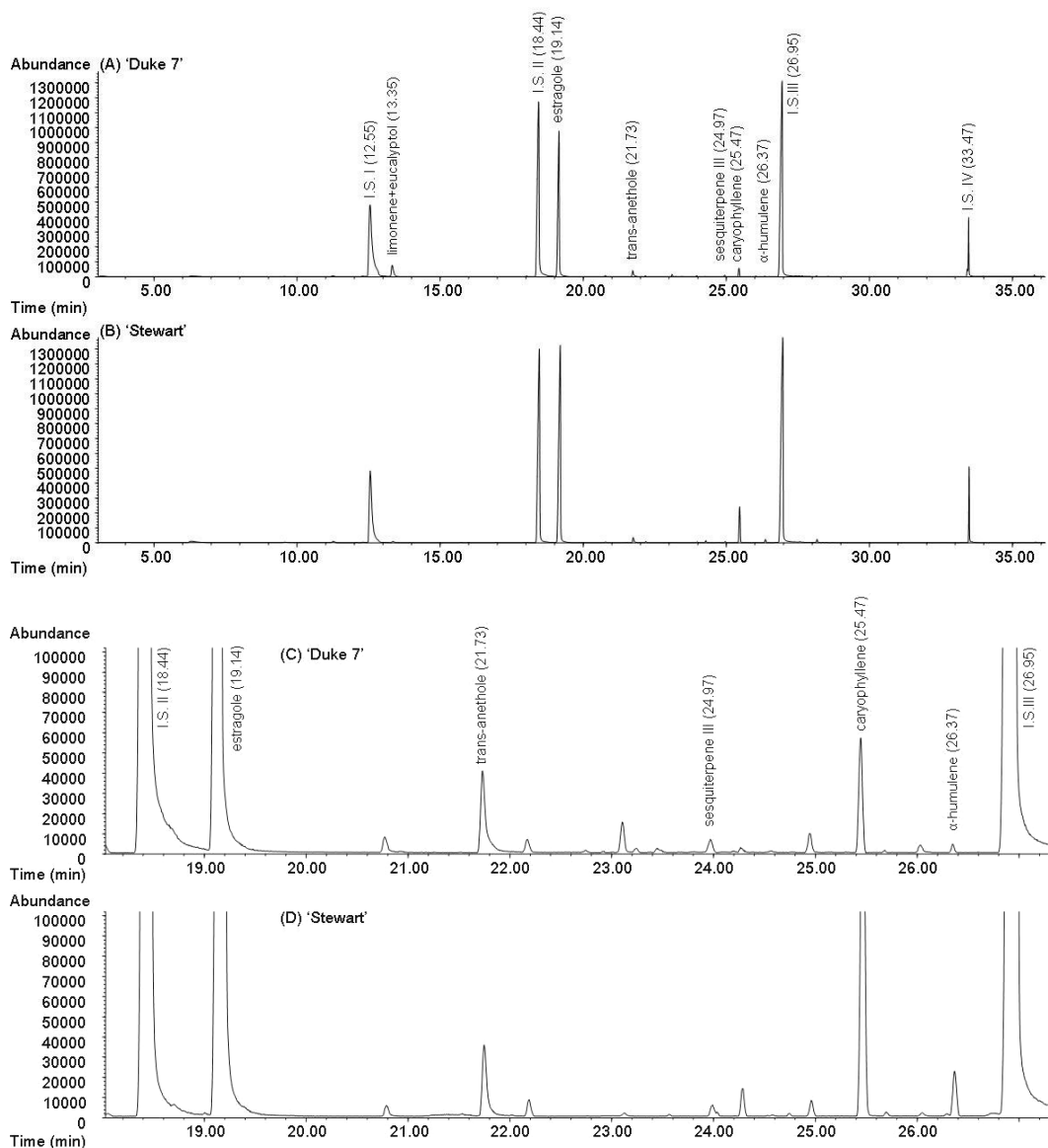


Figura 1. Compuestos totales del cromatógrafo y del indicador del ion de las muestras de la raza México. (A) 'Duke 7', (B) 'Stewart'; cromatogramas agrandados (a partir 18 minutos a 27 minutos) de (A) y (B) demostrado en (C) y (D).

I.S. = estándar interno, solamente I e II fue utilizado como estándar interno. I - 1,4-dichlorobenzene-d₄, II - naphthalene-d₈, III - acenaphthene-d₁₀, IV - phenanthrene-d₁₀

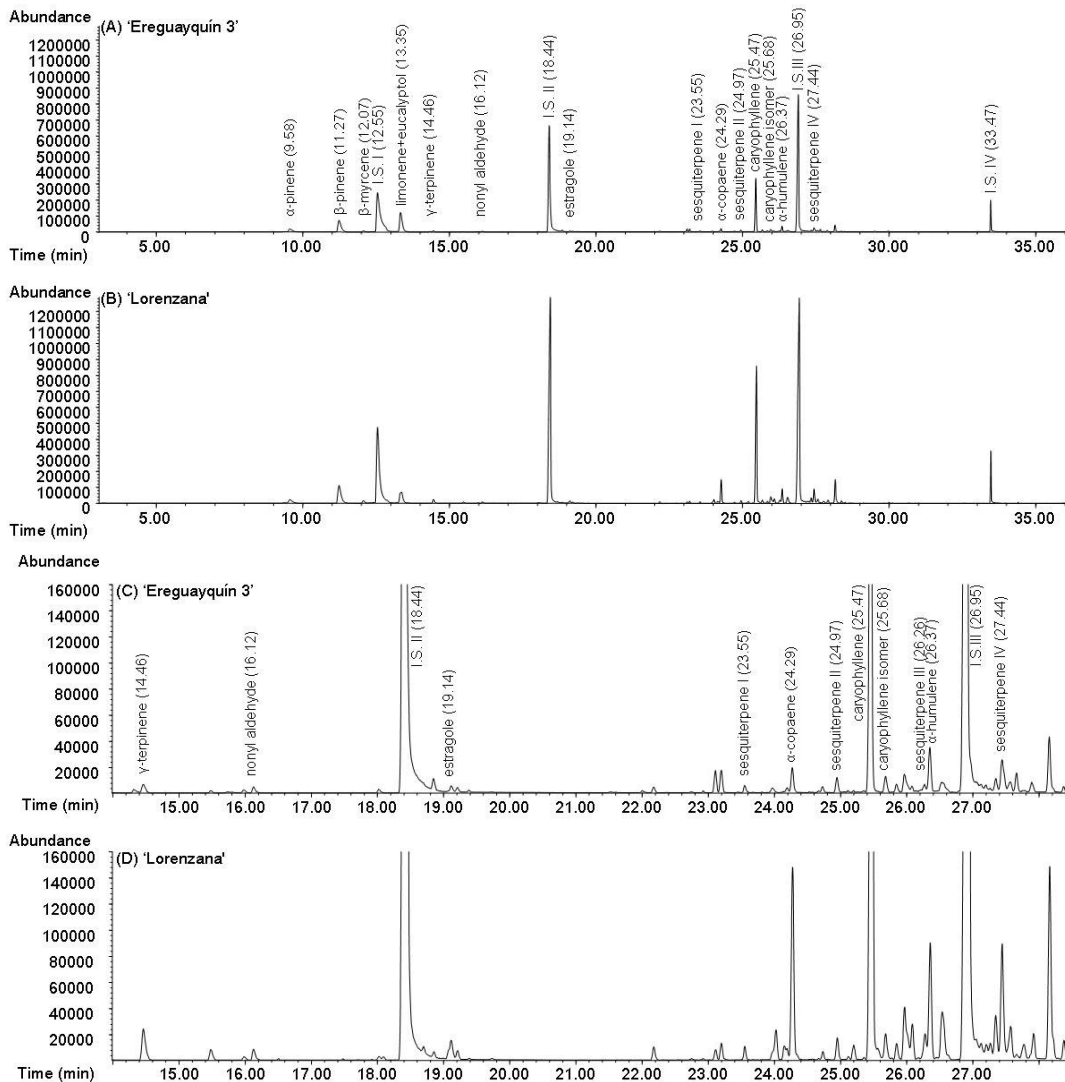


Figura 2. Compuestos totales del cromatograma y del indicador del ion de las muestras de la raza Guatemala. (A) 'Ereguayquín 3' ; (B) 'Lorenzana' cromatogramas agrandados (a partir 14 minutos a 28 minutos) de (A) y (B) demostrado en (C) y (D).

I.S. = estándar interno, solamente I e II fue utilizado como estándar interno. I - 1,4-dichlorobenzene-d₄, II - naphthalene-d₈, III - acenaphthene-d₁₀, IV - phenanthrene-d₁₀

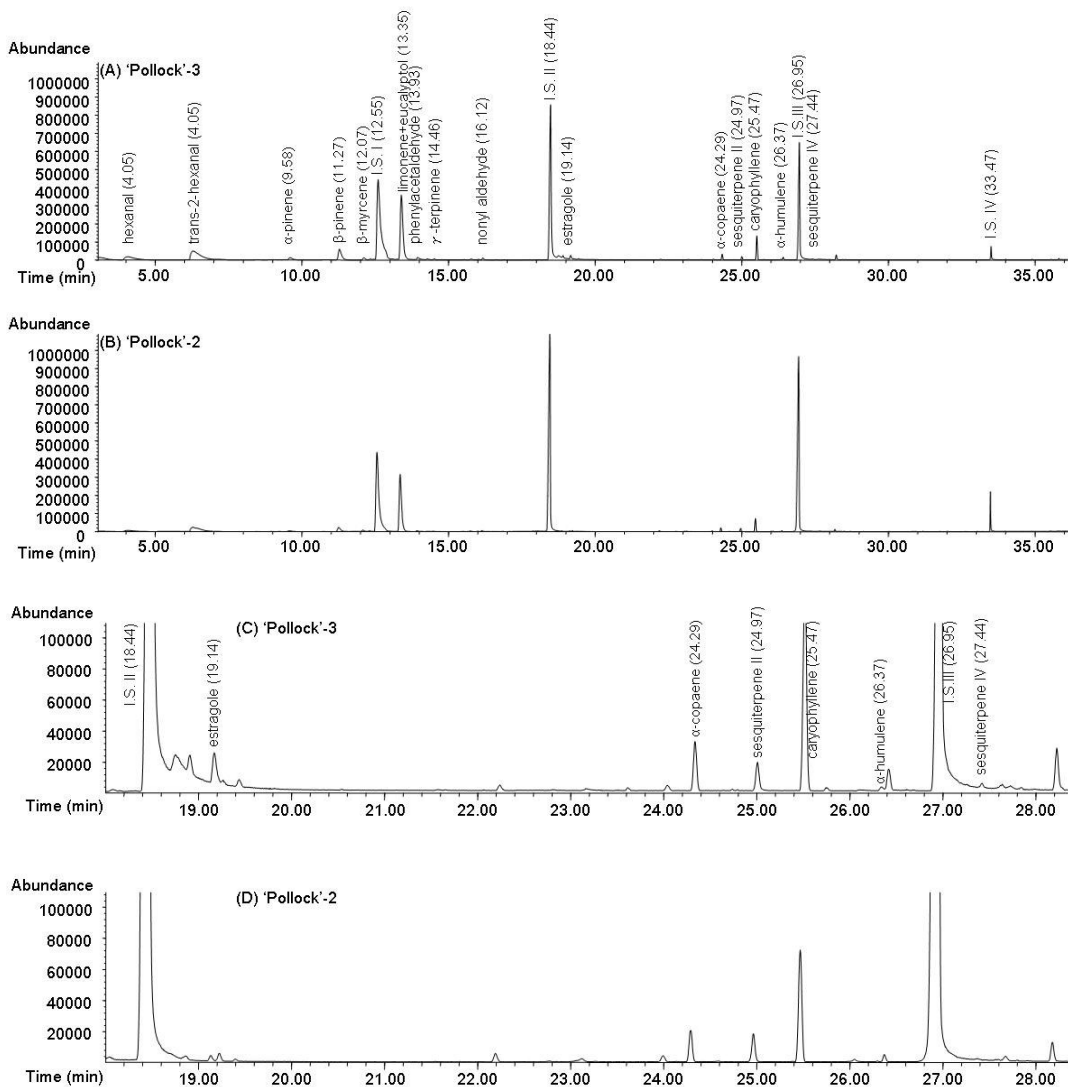


Figura 3. Compuestos totales del cromatograma y del indicador del ion de las muestras de la raza México. (A) 'Pollock'-3 ; (B) 'Pollock'-2; cromatogramas agrandados (a partir 18 minutos a 29 minutos) de (A) y (B) demostrado en (C) y (D).

I.S. = estándar interno, solamente I e II fue utilizado como estándar interno. I - 1,4-dichlorobenzene-d₄, II - naphthalene-d₈, III - acenaphthene-d₁₀, IV - phenanthrene-d₁₀

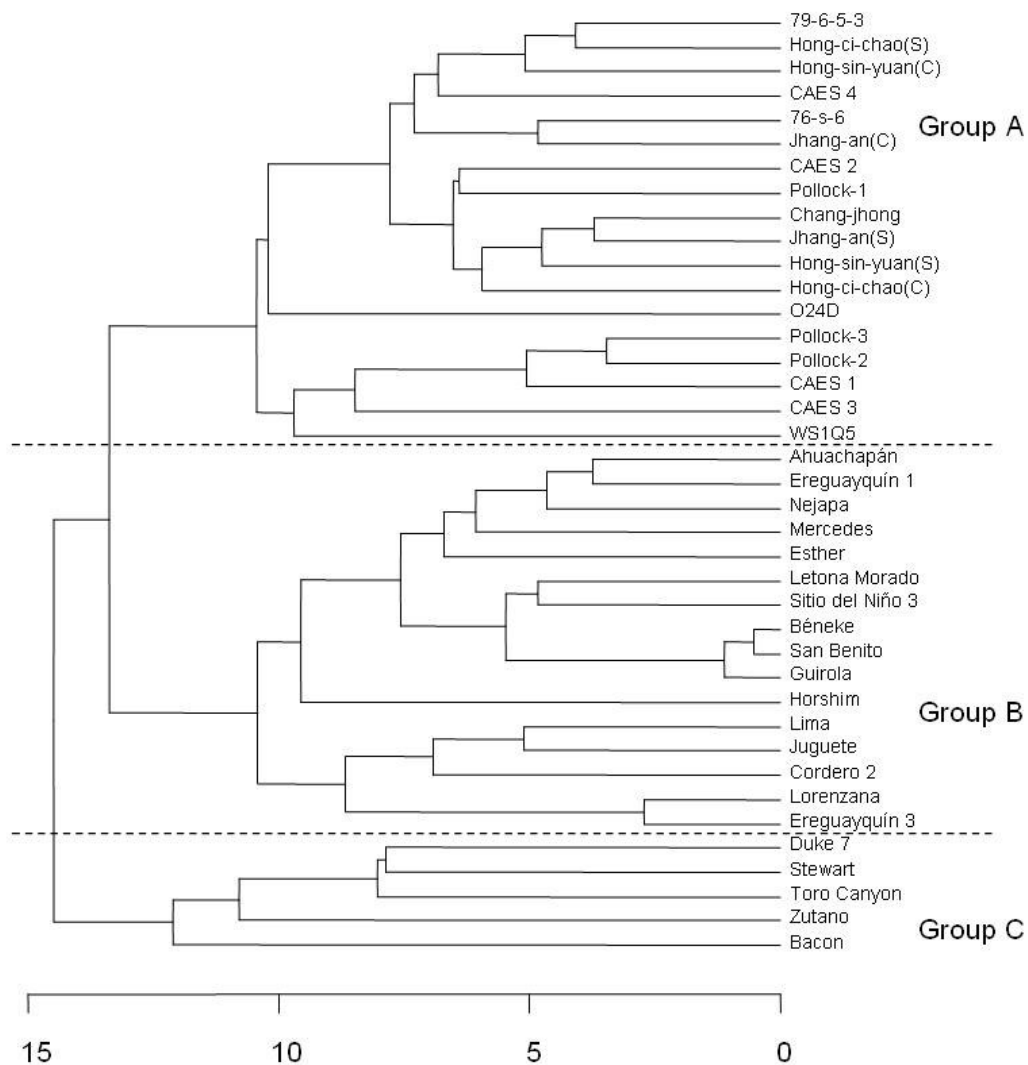


Figura 4. Dendrogram de 39 muestras del aguacate (24 muestras de las razas puras y 15 muestras del cultivar de Taiwán) derivadas de análisis usando los compuestos del indicador basados en las distancias obtenidas de la matriz de la semejanza (distancia euclidiana) de la abundancia calibrada en logaritmo y arracimadas cerca unweighted media aritmética del método del grupo del par.