

## Variabilidad del contenido en tocoferoles en la pepita del almendro para su consideración en un programa de mejora genética

O. Kodad\*, R. Socias i Company\*, M.S. Prats\*\*, M.C. López Ortiz\*\*

\*Unidad de Fruticultura, CITA de Aragón, Apartado 727, 50080 Zaragoza. Email: rsocias@aragon.es

\*\*Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Universidad de Alicante, Apartado 99, 03080 Alicante.

### Resumen

Debido a la importancia de los tocoferoles en la estabilidad de los aceites y por lo tanto en el mantenimiento de la calidad de la pepita de la almendra, se ha estudiado la composición en los homólogos  $\alpha$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -tocopherol en las pepitas de ocho parentales y 48 selecciones de almendro (*Prunus amygdalus* Batsch) procedentes de cinco familias obtenidas por los cruzamientos entre estos parentales. Se ha observado una gran variabilidad en el contenido de los tres homólogos, incluso entre los genotipos de la misma familia, con diferencias significativas entre las familias y los individuos. Así el contenido en  $\alpha$ -tocopherol osciló entre 187,3 y 490,3 mg/kg aceite, el de  $\gamma$ -tocopherol entre 12,9 y 27,6, y el de  $\delta$ -tocopherol entre 12,3 y 22,4, confirmando la mayor presencia en las almendras del  $\alpha$ -tocopherol, el homólogo de mayor actividad. Así mismo se encontró una correlación significativa y positiva entre los contenidos de  $\alpha$ - y  $\delta$ -tocopherol. Destacó el contenido en tocoferol de 'Marcona', una de las variedades españolas consideradas de mayor calidad, así como de algunas selecciones prometedoras por su floración extra tardía. La variación continua del contenido sugiere que estos caracteres podrían estar bajo control poligénico y la correlación positiva entre los contenidos en  $\alpha$ - y  $\delta$ -tocopherol podría permitir la selección para un elevado contenido en uno de los dos homólogos con el objetivo de aumentar el nivel del otro. Las diferencias significativas para el  $\alpha$ - y el  $\gamma$ -tocopherol sugieren la importancia de la elección de los parentales y que la selección para un elevado contenido en tocoferol es un objetivo plenamente posible en un plan de mejora del almendro.

**Palabras clave:** Almendro, *Prunus amygdalus*, Pepita, Composición, Almacenaje, Tocoferol, Mejora.

### Summary

#### Variability in tocopherol content in almond kernels as a selection criterion in almond breeding

Due to the importance of tocopherols in oil stability and, consequently, in maintaining almond (*Prunus amygdalus* Batsch) kernel quality, the content of the three homologues  $\alpha$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -tocopherol has been determined in the kernels of eight almond parents and 48 selections coming from five families obtained by crosses among these parents. A high variability in the content of the three homologues has been observed, even among genotypes of the same family, with significant differences among families and individuals. The content in  $\alpha$ -tocopherol ranged between 187,3 and 490,3 mg/kg of oil, that of  $\gamma$ -tocopherol between 12,9 and 27,6, and that of  $\delta$ -tocopherol between 12,3 and 22,4, confirming in almond the higher content of  $\alpha$ -tocopherol, the homologue with major activity. A significant and positive correlation was also found between the contents in  $\alpha$ - and  $\delta$ -tocopherol. The high tocopherol content in 'Marcona', a traditional Spanish cultivar considered of the highest quality, was specially relevant, as well as that in several promising selections of very late blooming time. The continuous variability in tocopherol contents suggests that these contents could be under poligenic control. The positive correlation between the contents in  $\alpha$ - and  $\delta$ -tocopherol could allow selection for

a high isomer content with the objective of increasing the content of the other isomer. The significant differences found for the  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol contents suggest the importance in parent election in almond breeding and that selection for a high tocopherol content is a clearly attainable objective in this breeding program.

**Key words:** Almond, *Prunus amygdalus*, Kernel, Composition, Storage, Tocopherol, Breeding.

### Introducción

La pepita, parte comestible del almendro, es un producto de un elevado valor nutritivo. Actualmente, en el comercio nacional e internacional del almendro, la definición de su calidad se basa fundamentalmente en las características físicas de la almendra y en la homogeneidad de la partida, sin prestar mucha atención a su composición química, aunque la mejor utilización industrial de cada variedad depende en gran medida de sus distintos componentes químicos (Berger, 1969). Su alto valor nutritivo deriva principalmente de su elevado contenido en lípidos, que constituyen una fuente importante de calorías que, sin embargo, no contribuyen a la formación de colesterol en el organismo, debido a su elevado nivel de ácidos grasos insaturados, especialmente de ácidos grasos mono-insaturados (Sabate y Hook, 1996).

La mayoría de los aceites vegetales contienen tocoferoles en distintas proporciones, y en particular los aceites insaturados en elevadas concentraciones. Los tocoferoles son componentes monofenólicos naturales con diferente actividad antioxidante (Reische et al., 1998), de los que existen varios homólogos según la posición y el número de radicales metilo. Su principal función bioquímica es probablemente la protección de los ácidos grasos poliinsaturados frente a la peroxidación (Kamal-Eldin y Appelqvist, 1996).

El contenido en tocoferoles se ha estudiado en distintas especies comestibles con un ele-

vado contenido en grasa: avellano, *Corylus avellana* L. (Özdemir et al., 2001), nogal, *Juglans regia* L., y olivo, *Olea europea* L. (Kamal-Eldin y Andersson, 1997), cacahuete, *Arachis hypogaea* L. (Chu y Hsu, 1999), y nuez de Camboya, *Irvingia malayana* Oliv. ex A. Benn. (Bandelier et al., 2002), y se ha correlacionado con su actividad antioxidante. En el almendro también se ha comprobado que el contenido en tocoferol tiene un papel importante en la protección de los lípidos de la almendra frente a la oxidación, con lo cual se puede alargar su almacenaje (Senesi et al., 1996; Zacheo et al., 2000; García-Pascual et al., 2003). Además, al estudiar Fourie y Basson (1989) los cambios en el contenido en tocoferol en varios frutos secos, encontraron que las pepitas de almendro, con un contenido en tocoferol más alto que en los otros frutos secos, presentaron la mayor duración de almacenaje.

La determinación de la composición de la almendra en tocoferol es un paso importante para especificar el destino comercial de la pepita y estimar la duración de su almacenaje. En efecto, varios estudios han concluido que la almendra entera se puede almacenar durante un periodo de 9 meses manteniendo su calidad (García-Pascual et al., 2003; Zacheo et al., 2000). Asimismo, Rizzolo et al. (1994) concluyeron que el almacenaje de la almendra durante un periodo superior a un año sin deterioro de su calidad sólo se puede conseguir en el caso de variedades con un elevado contenido en antioxidantes naturales como el  $\alpha$ -tofofe-

rol, lo que sugiere que este homólogo es el principal en la protección de la almendra (Kamal-Eldin y Appelqvist, 1996), por lo que éste puede ser un carácter deseable para el almacenaje de la almendra a largo plazo (Senesi et al., 1996). En efecto, parece que la oxidación de los ácidos grasos llega a ser significativa después de un periodo de inducción durante el cual se hayan destruido los antioxidantes de la pepita (Zacheo et al., 2000; Sun et al., 2001), ya que se ha observado que el contenido total en tocoferoles disminuye durante el almacenaje. Esta disminución es claramente debida a la intervención del tocoferol en el proceso de oxidación por su actividad antioxidante (Zacheo et al., 2000). Efectivamente, Rossell (1998) mencionó que las condiciones de almacenaje y de manipulación del aceite pueden causar una reducción importante en la cantidad de tocoferoles presente en el aceite.

También se ha mostrado que un elevado contenido en este homólogo es muy importante en la dieta humana debido a su efecto en la actividad de la vitamina E (Kamal-Eldin y Appelqvist, 1996). Por lo tanto, se puede mejorar la estabilidad de la almendra aumentando el nivel del  $\alpha$ -tocoferol y al mismo tiempo incrementar su valor nutritivo por ser una fuente importante de vitamina E, teniendo en cuenta la tendencia actual de los consumidores hacia los alimentos que no lleven aditivos sintéticos (Kriings y Berger, 2001).

El objetivo de este trabajo fue el de determinar el contenido en los distintos homólogos de tocoferol en un conjunto de selecciones de almendro y en sus parentales con el fin de conocer su rango de variabilidad, la posible correlación entre el contenido en tocoferol en los parentales y en las descendencias y la posibilidad de utilizar el contenido en tocoferol como un criterio de selección en un programa de mejora genética del almendro.

### Materiales y Métodos

#### Material vegetal

Se estudiaron los frutos de 48 selecciones procedentes de 5 cruzamientos entre 8 parentales que incluyen dos cultivares tradicionales españoles ('Marcona' y 'Desmayo Largueta'), una variedad francesa ('Ferragnès'), una selección local española ('Bertina'), tres obtenciones del programa de mejora genética del CITA ('Felisia', 'Guara' y 'Moncayo') y una selección de este mismo programa (A-10-6) (tabla 1). Estas selecciones están injertadas sobre el patrón 'Garnem' (Gómez-Aparisi et al., 2001) y plantadas en bloques de tres repeticiones cada una sobre un suelo franco de tipo aluvial. Estas selecciones han sido seleccionadas previamente por su autocompatibilidad, época de floración y características del fruto (Socias y Company et al., datos no publicados).

#### Métodos analíticos

Para el aislamiento y el análisis de los tocoferoles se pelaron las almendras y se molieron en un molinillo eléctrico. El aceite se obtuvo mediante un extractor tipo Soxhlet (Selecta, Barcelona) durante dos horas, con éter de petróleo como solvente, manteniendo la fuente térmica a 135 °C. El proceso de saponificación se realizó de acuerdo con una modificación realizada por los autores del método oficial (DOCE L174/39, 13.7.2000) con el fin de determinar simultáneamente los tocoferoles y los esteroides en aceites y productos grasos.

Las muestras de aceite de almendra de 0,25-0,30 g se saponificaron mediante la agitación de la muestra a 60 °C durante 45 min con 20 ml de una solución 2M de KOH en etanol y 5 ml de una solución 0,1M de ácido ascórbico, en un incubador 1000/Promasx 1200, Heidolph. La solución obtenida se filtró y se le añadieron 10 ml de NaCl saturado,

Tabla 1. Origen de las selecciones estudiadas  
Table 1. Origin of the selections studied

Cruzamiento	Selección
1. Felisia x Bertina	G-1-1, G-1-23, G-1-27, G-1-38, G-1-41, G-1-44, G-1-58, G-1-61, G-1-64, G-1-67, G-2-1, G-2-2, G-2-7, G-2-11, G-2-22, G-2-23, G-2-25, G-2-26, G-2-27, G-3-3, G-3-4, G-3-5, G-3-8, G-3-12, G-3-24, G-3-28, G-3-65, G-4-3, G-4-10, G-5-18, G-5-25, G-6-14, G-6-24, G-6-39, I-3-10, I-3-11, I-3-27
2. Moncayo x Desmayo Largueta	H-1-81, H-1-108
3. A-10-6 x Marcona	H-2-22, H-2-111, H-3-37, H-3-39
4. Guara x Ferragnès	I-1-95, I-2-12
5. Felisia x Moncayo	G-5-2, I-3-65, I-3-67

y posteriormente se agitó vigorosamente durante 1 min para emulsionar con 10 ml de n-hexano con BHT (5 mg/l) y 100 µl del acetato de tocoferol (100 ppm), utilizado como patrón interno. Una vez separadas perfectamente las dos fases, la fase orgánica, que contiene los tocoferoles, se recogió y filtró con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Mientras la fase acuosa se reextrajo con 5 ml de n-hexano, y este nuevo extracto se combinó con el primero. Toda la solución resultante se evaporó en un rotovapor a 50 °C para eliminar el n-hexano por completo, mientras se pasaba un flujo de nitrógeno para evitar la oxidación de los tocoferoles. El residuo se disolvió en 1 ml de metanol y se filtró en una membrana de nylon de 0,45 µm. Este extracto final se guardó en un frigorífico en oscuridad hasta el análisis.

La determinación de los homólogos de tocoferol se realizó con un sistema Waters HPLC-PDA. Para el análisis se inyectaron 10 µl de muestra en el cromatógrafo. Se utilizó una columna Luna 3µ C8 (2) de 150 x 2 mm (Phenomenex) mantenida a 40 °C mientras que la fase móvil consistía de una mezcla de acetonitrilo:agua (95:5) a 40 °C y un flujo de 0,4 ml/min. Las medidas de fluorescencia de

los tocoferoles se realizaron a una longitud de onda de excitación de 295 nm y de 208 nm para el acetato de tocoferol (patrón interno). Los resultados se han expresado en mg/kg de aceite.

### Resultados

#### Variabilidad en el contenido en tocoferoles

Después de la cuantificación de los tres homólogos de tocoferol, α, γ y δ, en las selecciones y variedades estudiadas, se encontró que el contenido en α-tocoferol es el más importante, seguido por los otros dos homólogos (tabla 2). La variabilidad observada fue muy grande y el análisis de varianza de los datos obtenidos mostró que hay diferencias significativas entre los genotipos estudiados en cuanto a los tres homólogos (tabla 3). Sin embargo, aunque se obtuvieron diferencias significativas entre las familias en cuanto al contenido en α- y γ-tocoferol, no las hubo para el δ-tocoferol (tabla 4). Por otro lado se encontró una correlación positiva y significativa entre el contenido en α- y δ-tocoferol (0,51, P < 0,0001; fig. 1), aunque

Tabla 2. Composición en los distintos homólogos de tocoferol de cada genotipo (mg/kg de aceite de almendra)

Table 2. Composition in the different tocopherol homologues of each genotype (mg/kg of almond oil)

Selección	Familia	α-tocoferol	γ-tocoferol	δ-tocoferol
G-1-1	1	221,1	18,1	16,6
G-1-23	1	270,1	20,3	17,2
G-1-27	1	342,7	16,8	17,6
G-1-38	1	276,9	26,3	16,6
G-1-41	1	187,3	18,7	18,4
G-1-44	1	242,9	17,2	17,1
G-1-58	1	425,5	20,3	17,3
G-1-61	1	249,1	23,6	16,7
G-1-64	1	457,5	18,1	19,1
G-1-67	1	302,6	16,2	14,6
G-2-1	1	284,7	16,3	18,8
G-2-2	1	278,4	12,9	14,1
G-2-7	1	350,4	15,8	18,5
G-2-11	1	322,8	18,0	16,5
G-2-22	1	346,6	18,7	17,4
G-2-23	1	345,8	21,0	17,1
G-2-25	1	201,9	17,4	15,1
G-2-26	1	347,7	24,7	16,7
G-2-27	1	314,3	18,9	19,4
G-3-3	1	284,9	19,1	16,2
G-3-4	1	463,9	17,0	21,3
G-3-5	1	261,8	17,8	16,6
G-3-8	1	336,5	20,7	18,7
G-3-12	1	348,5	24,3	17,6
G-3-24	1	427,8	27,6	18,7
G-3-28	1	355,8	20,9	18,0
G-3-65	1	308,1	18,1	16,2
G-4-3	1	347,5	15,9	18,5
G-4-10	1	457,1	17,2	18,0
G-5-18	1	278,6	16,5	15,2
G-5-25	1	245,1	18,3	19,6
G-6-14	1	318,7	19,2	17,4
G-6-24	1	337,0	18,5	18,5
G-6-39	1	235,3	20,1	16,0
I-3-10	1	343,2	20,6	19,1
I-3-11	1	380,6	21,9	22,4
I-3-27	1	297,8	16,9	17,5
H-1-81	2	326,0	21,0	18,9
H-1-108	2	248,5	21,6	15,3
H-2-22	3	258,6	12,8	12,3
H-2-111	3	344,2	22,6	17,1
H-3-37	3	324,2	16,8	16,9
H-3-39	3	317,6	16,4	21,4
I-1-95	4	303,3	18,6	17,3

Tabla 2. Composición en los distintos homólogos de tocoferol de cada genotipo (mg/kg de aceite de almendra)

Table 2. Composition in the different tocopherol homologues of each genotype (mg/kg of almond oil)

Selección	Familia	$\alpha$ -tocoferol	$\gamma$ -tocoferol	$\delta$ -tocoferol
I-2-12	4	419,6	17,8	18,8
G-5-2	5	490,3	19,5	21,2
I-3-65	5	332,3	17,6	15,9
I-3-67	5	368,4	20,3	18,3
Marcona	Parental	463,6	18,5	18,7
Moncayo	"	412,5	18,8	21,2
A-10-6	"	328,1	14,2	14,2
Bertina	"	241,6	15,0	16,6
Desmayo Largueta	"	304,3	15,3	16,6
Felisía	"	250,6	18,2	17,3
Ferragnès	"	377,5	18,7	18,4
Guara	"	385,4	15,7	17,6

Tabla 3. Análisis de varianza global para el contenido en los distintos homólogos de tocoferol en las selecciones y los parentales

Table 3. Global analysis of variance for the content in the different tocopherol homologues in the selections and the parents

Homólogo	Grados de libertad		Suma de Cuadrados		Media de Cuadrados		Valor de F <sup>z</sup>
	Variable	Error	Variable	Error	Variable	Error	
$\alpha$	55	56	5375,71	991,16	97,74	17,69	5,52***
$\gamma$	55	56	9,65	1,85	0,18	0,03	5,29***
$\delta$	55	56	3,96	1,62	0,07	0,04	2,49***

z.- Significación de la probabilidad al 0,001 (\*\*\*)

Tabla 4. Análisis de varianza para el contenido en los distintos homólogos de tocoferol entre las familias

Table 4. Analysis of variance for the content of the different tocopherol homologues among the families

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados			Media de cuadrados			Valor de F <sup>z</sup>		
		$\alpha$	$\gamma$	$\delta$	$\alpha$	$\gamma$	$\delta$	$\alpha$	$\gamma$	$\delta$
Familia	4	483,98	0,53	0,10	120,99	0,13	0,02	5,59**	3,73**	0,83 ns
Individuo (Familia)	43	4534,01	7,89	3,29	105,44	0,18	0,07	4,88***	5,11***	2,51***
Error	48	1038,10	1,72	1,46	21,62	0,04	0,03			

z.- Significación de la probabilidad al 0,01 (\*\*), 0,001 (\*\*\*) o no significativo (ns)

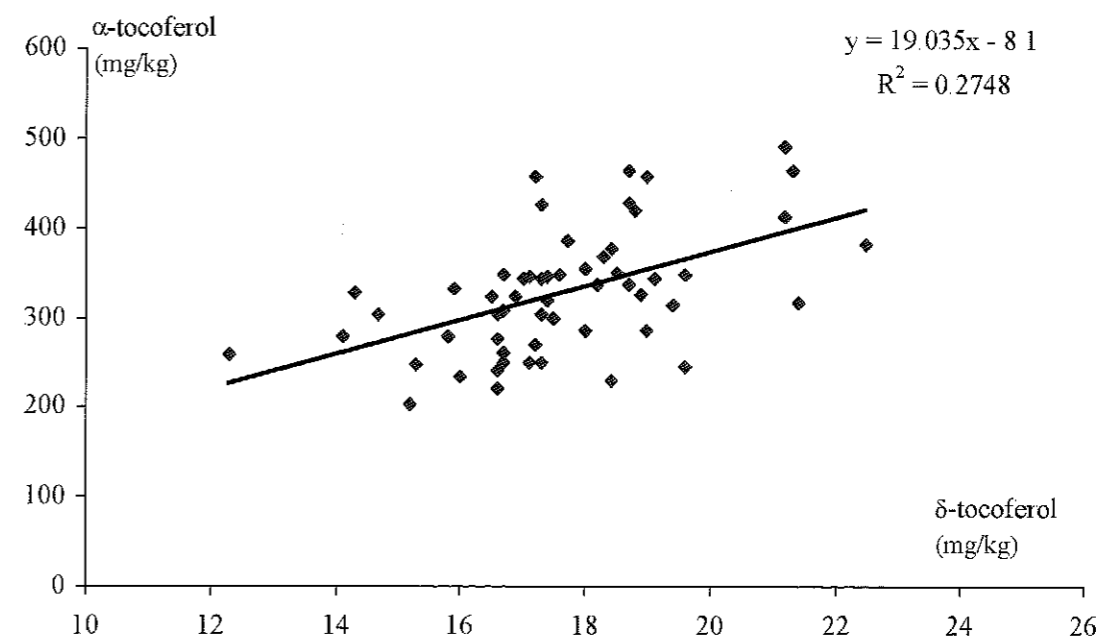


Figura 1. Regresión lineal entre los contenidos en  $\alpha$ - y  $\delta$ -tocoferol  
Figure 1. Linear regression between the contents in  $\alpha$ - and  $\delta$ -tocopherol

no entre los contenidos en  $\alpha$ - y  $\delta$ -tocoferol (0,15) ni de  $\gamma$ - y  $\delta$ -tocoferol (0,27).

De acuerdo con la significación del análisis de varianza se establecieron los diferentes grupos de LSD ( $P \leq 0,05$ ) para los diferentes homólogos, con 22 grupos para el  $\alpha$ , 21 para el  $\gamma$ , y 13 para el  $\delta$  (tabla 3), aunque no se muestran en detalle por su elevado número. Sin embargo, destacan los valores de algunos genotipos. Así, para el  $\alpha$ -tocoferol, su contenido osciló entre 187,3 (G-1-41) y 490,3 mg/kg (G-5-2) para las selecciones, mientras que para los parentales los valores oscilaron entre 241,6 ('Bertina') y 463,3 mg/kg ('Marcona'). En cuanto al  $\gamma$ -tocoferol, los valores oscilaron entre 12,8 (H-2-22) y 27,6 mg/kg (G-3-24) para las selecciones y entre 14,2 (A-10-6) y 18,8 mg/kg ('Moncayo') para los parentales. El rango de varia-

ción para el  $\delta$ -tocoferol fue entre 12,3 (H-2-22) y 22,4 mg/kg (I-3-11) para las selecciones y entre 14,2 (A-10-6) y 21,2 ('Moncayo') para los parentales.

#### Análisis de la familia 'Bertina' x 'Felisia'

Debido al elevado número de selecciones de esta familia se realizó un análisis restringido de los resultados obtenidos para estos individuos, que mostraron una gran variabilidad en cuanto a los contenidos en los tres homólogos de tocoferol. Los valores oscilaron entre 187,3 (G-1-41) y 463,9 (G-3-4) mg/kg de aceite para  $\alpha$ -tocoferol; entre 12,9 (G-2-2) y 27,6 (G-3-24) para  $\gamma$ -tocoferol; y entre 14,1 (G-2-2) y 22,45 (I-3-11) para  $\delta$ -tocoferol. El análisis de varianza mostró que existían diferencias significativas en el

contenido de los tres homólogos de tocoferol entre las selecciones de esta familia (tabla 5).

Por otra parte, se encontró que las medias de los contenidos de los tres homólogos en esta descendencia, 315,9 mg/kg de aceite para el  $\alpha$ , 19,3 para el  $\gamma$ , y 17,6 para el  $\delta$  han sido superiores a las medias de los parentales, 246,1, 16,6 y 16,9 respectivamente. Ade-

más, el 83,78% de la descendencia mostró valores superiores a la media de los dos parentales para los homólogos  $\alpha$  y  $\gamma$ , y un 64,86% para el  $\delta$ , diferencias que fueron significativas para siete de las selecciones de esta familia para el  $\alpha$ -tocoferol, para seis selecciones para el  $\gamma$  y para dos selecciones para el  $\delta$ .

Tabla 5. Análisis de varianza para el contenido en los distintos homólogo de tocoferol en los individuos de la familia 'Felisia' x 'Bertina'

Table 5. Analysis of variance for the content in the different tocopherol homologues in the individuals of the family 'Felisia' x 'Bertina'

Homólogo	Grados de libertad		Suma de Cuadrados		Media de Cuadrados		Valor de F <sup>z</sup>
	Variable	Error	Variable	Error	Variable	Error	
$\alpha$	38	39	3642,68	575,13	95,86	14,74	6,50***
$\gamma$	38	39	7,17	1,54	0,18	0,04	4,76***
$\delta$	38	39	2,05	1,26	0,05	0,03	1,67*

z.- Significación de la probabilidad al 0,05 (\*) o 0,001 (\*\*\*)

## Discusión

### Variabilidad en el contenido en tocoferoles

Los resultados obtenidos han mostrado que hay una variabilidad genética en los valores de los homólogos del tocoferol entre los genotipos de almendro estudiados, como ya habían indicado otros autores (Senesi et al., 1996 y 1991; Zacheo et al., 1998 y 2000), especialmente al considerar la familia 'Felisia' x 'Bertina', cuyo elevado número de individuos ha permitido observar que la concentración en los tres homólogos de tocoferol seguía una variación continua con una gran variabilidad. Estos valores son comparables a los indicados para otras variedades de almendro (Rizzolo et al., 1994; García-

Pascual et al., 2003), calculados en función de la cantidad total de grasa, pero no con los de Zacheo et al. (2000), calculados en función del peso seco, por lo que no se tiene en cuenta la variabilidad en la composición de grasas entre las distintas variedades (Abdallah et al., 1998; Schirra y Nieddu, 1992). En algunas especies se ha mencionado que el contenido en tocoferoles podría depender de las condiciones climáticas, especialmente de las altas temperaturas (Kamal-Eldin y Andersson, 1997; von Marquard, 1990), aunque en algodón, *Gossypium hirsutum* L., se encontró una gran constancia en el contenido en  $\alpha$ -tocoferol, sin diferencias significativas entre los cultivos estudiados a través de los años ni de las localidades (Smith y Creelman, 2001). En

el aceite de oliva se ha encontrado que el estrés hídrico aumenta la concentración del  $\alpha$ -tocoferol en el aceite del cultivar 'Les Garrigues' (Romero et al., 2003). En esta especie también se ha demostrado que existen diferencias significativas en la concentración de los tocoferoles en función de las condiciones climáticas de las zonas de cultivo (Aguilar et al., 2005; Mousa et al., 1996), siendo más altos en zonas cálidas.

Los valores obtenidos en este estudio son comparables a los indicados para otras variedades de almendro (Rizzolo et al., 1994; García-Pascual et al., 2003), calculados en función de la cantidad total de grasa, pero no con los de Zacheo et al. (2000), calculados en función del peso seco y que no tienen en cuenta la variabilidad en la composición de grasas entre las distintas variedades (Abdallah et al., 1998; Schirra y Nieddu, 1992). También los valores del  $\alpha$ -tocoferol son superiores a los encontrados en el aceite de oliva, con un rango de variabilidad de 90-300 mg/kg (Aguilar et al., 2005; Cunha et al., 2006; Mousa et al., 1996; Romero et al., 2003).

Las diferencias significativas para los tres homólogos de tocoferol entre los genotipos estudiados significa que su composición puede depender del genotipo y se puede considerar como una característica varietal, como ya se determinó para la composición en ácidos grasos en estas mismas selecciones (Kodad et al., 2005). El elevado contenido de  $\alpha$ -tocoferol en 'Marcona' y los contenidos medios-altos en los otros homólogos pueden haber sido un factor decisivo, aunque ignorado hasta ahora, de su valoración en el mercado español para la fabricación de muchos derivados de la almendra, especialmente el turrón. Igualmente los elevados contenidos de algunas selecciones, como G-5-2, G-3-4 y G-1-64, que son igualmente de floración extremadamente tardía (Socias i Company et al., 2003), pueden ser un motivo de su apreciación como futuras variedades.

### Influencia de la familia

La existencia de diferencias significativas entre las familias estudiadas en cuanto al  $\alpha$ - y  $\delta$ -tocoferol (tabla 4) sugieren que la composición en estos homólogos puede depender de su origen genealógico, mientras que el contenido en  $\gamma$ -tocoferol no dependería de su contenido en los parentales. Por ello, los distintos homólogos del tocoferol podrían estar bajo diferente control genético.

El bajo número de individuos en la mayoría de las familias y el hecho que los individuos hayan sido sometidos a una selección previa impiden que se pueda analizar la heredabilidad de la composición en tocoferol en almendro, aunque el estudio de la familia más numerosa, formada por la descendencia del cruzamiento 'Bertina' x 'Felisia', mostró una gran variabilidad asegurada por las diferencias significativas observadas entre sus selecciones. Por lo tanto, la variabilidad observada en el conjunto de las selecciones no es debida solamente a las diferencias presentes entre los parentales, sino también a las características genéticas de cada genotipo. Por otro lado, los valores del  $\alpha$ -  $\delta$ - y  $\gamma$ -tocoferol en la mayoría de las selecciones han sido claramente superiores a la media de los parentales para cada componente, lo que sugiere que se ha podido ejercer una selección previa en este sentido y por ello la posibilidad de mejorar y seleccionar para valores altos en estos componentes químicos en las futuras nuevas variedades del almendro.

### Implicaciones para la mejora

La variación continua del contenido de los tres homólogos del tocoferol sugiere que estos caracteres podrían estar bajo control poligénico. Aunque en el almendro no se conoce el determinismo genético y el modo de transmisión de estos componentes, en

otras especies, como la colza, *Brassica napus* L. (Goffman y Becker, 2001), el maíz, *Zea mays* L. (Rocheford et al., 2002), *Arabidopsis thaliana* (Shintani y DellaPena, 1998) y el girasol, *Helianthus annuus* L. (Demurin, 1993), se ha encontrado que el contenido total de tocoferoles y su composición se encuentran bajo el control de unos pocos genes de efecto aditivo. Además, se ha comprobado que por la sobre-expresión de la  $\gamma$ -tocoferol metiltransferasa, un enzima que cataliza la metilación del  $\gamma$ -tocoferol en  $\alpha$ -tocoferol, la proporción del  $\alpha$ -tocoferol en semillas de selecciones de *Arabidopsis thaliana* ha sido nueve veces superior que en los tipos silvestres, sin ninguna modificación en el contenido total de tocoferoles (Shintani y DellaPena, 1998). También Koch et al. (2003) han comprobado el papel del enzima  $\gamma$ -tocoferol metiltransferasa en la regulación de la acumulación de los tocoferoles en las plantas superiores. Por ello, puede ser recomendable la caracterización de este enzima y realizar estudios sobre la transmisión de estos componentes en el almendro.

La ausencia de una correlación significativa entre los contenidos de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol en el aceite de almendro coincide con los resultados en otras especies como la colza (Goffman y Becker, 2001) y *Euphorbia* spp. (Bruni et al., 2004). En principio, se debería encontrar una correlación negativa entre los contenidos en  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol debido a que el  $\gamma$ -tocoferol es un precursor en la síntesis del  $\alpha$ -tocoferol (Soll y Shultz, 1980). Sin embargo, las investigaciones sobre las vías de la biosíntesis de los tocoferoles se realizaron en cloroplastos y no en semillas (Hofius y Sonnewald, 2003). Por lo tanto, la ausencia de correlación entre los contenidos en  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol sugiere la posibilidad de seleccionar para un elevado porcentaje de un componente sin disminuir el contenido en el otro. La misma conclusión

se puede aplicar a los contenidos en  $\delta$ - y  $\gamma$ -tocoferol, debido a que no existe una correlación significativa entre estos homólogos.

Por otro lado, la correlación positiva entre los contenidos en  $\alpha$ - y  $\delta$ -tocoferol sugiere que en un programa de mejora se puede seleccionar para un elevado contenido en uno de los dos homólogos con la esperanza de aumentar el nivel del otro. El aumento en el contenido en  $\alpha$ -tocoferol mediante los métodos clásicos de mejora, como los cruzamientos, han sido eficaces y han dado buenos resultados en especies como el girasol o el maíz (Goffman y Becker, 2001; Galliher et al., 1985). Ello sugiere que en un programa de mejora genética del almendro se puede igualmente mejorar el contenido en este homólogo.

En el almendro, es prioritaria la presencia de un elevado porcentaje en  $\alpha$ -tocoferol debido al hecho de que este homólogo ejerce una actividad biológica diez veces superior a la del  $\gamma$ -tocoferol (Pongracz et al., 1995). Además, en la almendra se ha observado que dos años después de la recolección el  $\gamma$ -tocoferol desaparece totalmente de la pepita mientras que el  $\alpha$ -tocoferol disminuye hasta un 90% (Zacheo et al., 2000). Por estas razones, las actuales investigaciones relativas al beneficio nutricional del  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol deben ser tenidas en cuenta en al momento de desarrollar nuevas estrategias de mejora del almendro para modificar el nivel de estos importantes componentes de la vitamina E, como ya se ha recomendado en otras especies como el maíz (Rocheford et al., 2002), ya que estos resultados muestran que la selección para un elevado contenido en tocoferol es un objetivo plenamente posible en un plan de mejora del almendro. Las diferencias significativas para el  $\alpha$ - y el  $\gamma$ -tocoferol sugieren la importancia de la elección de los parentales en el momento de planificar

los programas de mejora con el objetivo de seleccionar nuevos materiales que contengan elevadas proporciones en estos dos homólogos.

#### Agradecimientos

Investigación realizada en el marco del proyecto CICYT AGL2004-06674-C02-01. OK agradece el apoyo financiero del INIA para el desarrollo de este trabajo. El apoyo científico del Dr. V. Berenguer y la asistencia técnica de J.M. Ansón han sido de gran valor para la realización de este estudio.

#### Bibliografía

- Abdallah A, Ahumada MH, Gradziel TM, 1998. Oil content and fatty acid composition of almond kernels from different genotypes and California production regions. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123 (6): 1029-1033.
- Aguilar MP, Beltrán G, Ortega D, Fernández A, Jiménez A, Uced M, 2005. Characterisation of virgin olive oil of italian olive cultivars: 'Frantoio' and 'Leccino', grown in andalucía. *Food Chemistry.* 89: 387-391.
- Bandelier J, Chunhieng T, Olle M, Montet D, 2002. Original study of the biochemical and oil composition of Cambodia nut *Irvingia malayana*. *J. Agric. Food Chem.* 20: 1478-1482.
- Berger P, 1969. Aptitude à la transformation industrielle de quelques variétés d'amandier. *Bull. Techn. Inf.* 241: 577-580.
- Bruni R, Muzzoli M, Ballero M, Loi MC, Fantin G, Poli F, Sacchetti G, 2004. Tocopherols, fatty acids and sterols in seeds of four Sardinian wild *Euphorbia* species. *Fitoterapia.* 75 (1): 50-61.
- Chu YH, Hsu HF, 1999. Effect of antioxidants on the peanut oil stability. *Food Chem.* 66: 29-34.
- Cunha SC, Amaral JS, Fernández JO, Oliveira MBPP, 2006. Quantification of tocopherols and tocotrienols in Portuguese olive oils using HPLC with three different detection systems. *J. Agric. Food Chem.* 54: 3351-3356.
- Demurin Y, 1993. Genetic variability of tocopherol composition in sunflower seeds. *Helia* 16: 59-62.
- Fourie PC, Basson DS, 1989. Predicting occurrence of rancidity in stored nuts by means of chemical analyses. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 22: 251-253.
- Galliher HL, Alexander DE, Weber EJ, 1985. Genetic variability of alpha-tocopherol and gamma-tocopherol in corn embryos. *Crop Sci.* 25: 547-549.
- García-Pascual P, Mateos M, Carbonell V, Salazar DM, 2003. Influence of storage conditions on the quality of shelled and roasted almonds. *Biosystems Eng.* 84 (2): 201-209.
- Goffman FD, Becker HC, 2001. Diallel analysis for tocopherol contents in seeds of rapeseed. *Crop Sci.* 41: 1072-1079.
- Gómez Aparisi J, Carrera M, Felipe AJ, Socías i Company R, 2001. 'Garnem', 'Monegro' y 'Felinem': nuevos patrones híbridos almendro  $\times$  melocotonero resistentes a nematodos y de hoja para frutales de hueso. *Inf. Técn. Econ. Agrar.* 97V (3): 282-288.
- Hofius D, Sonnewald U, 2003. Vitamin E biosynthesis: biochemistry meets cell biology. *Trends Plant Sci.* 8 (1): 6-8.
- Kamal-Edin A, Andersson R, 1997. A multivariate study of the correlation between tocopherol content and fatty acid in vegetable oils. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 74: 375-376.
- Kamal-Edin A, Appelqvist LA, 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31: 671-701.
- Koch M, Lemke R, Heise KP, Mock HP, 2003. Characterization of  $\gamma$ -tocoferol methyltransferases from *Capsicum annuum* L and *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.* 270: 84-92.

- Kodad O, Gracia Gómez MS, Socias i Company R, 2005. Fatty acid composition as evaluation criterion for kernel quality in almond breeding. *Acta Hort* 663: 301-304.
- Krings U, Berger RG, 2001. Antioxidant activity of some roasted foods. *Food Chem* 72: 223-229.
- Marquard R von, 1990. Investigation on the influence of genotype and location on the tocopherol content of the oil from different oil crops. *Fat Sci. Technol.* 92: 452-455.
- Mousa YM, Gerasopoulos D, Metzidakis I, Kiritsakis A, 1996. Effect of altitude on fruit and oil quality characteristics of mastoids olives. *J. Agric. Food Chem.* 71: 345-349.
- Özdemir M, Açıkturk F, Kaplan M, Yıldız M, Löker M, Gürcan T, Biringen G, Okay A, Seyhan FG, 2001. Evaluation of new Turkish hybrid hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties: fatty acid composition,  $\alpha$ -tocopherol content, mineral composition and stability. *Food Chem.* 73: 411-415.
- Pongracz G, Weiser H, Matzinger D, 1995. Tocopherole- Antioxidantien der Natur. *Fat Sci. Technol.* 97: 90-104.
- Reische DW, Lillard DA, Eitenmiller RR, 1998. Antioxidants. En: C.C. Akoh y D.B. Min (Eds). *Food lipids. Chemistry, nutrition, and biotechnology.* Food Sci. Technol. Ser. 88, Marcel Dekker, New York, pp. 423-448.
- Rizzolo A, Senesi E, Colombo C, 1994. Studies on the storage of shelled and in-shelled almonds. *Acta Hort* 373: 259-261.
- Rochefford TR, Wong JC, Egesel CO, Lambert RJ, 2002. Enhancement of vitamin E levels in corn. *J. Amer. Coll. Nutr.* 21 (3): 191S-198S.
- Rossell JB, 1998. Vegetable oils and fats. En: J.B Rossell y J.L.R Pritchard (Eds.). *Analysis of oilseeds, fats and fatty foods.* Elsevier, London, pp. 261-327.
- Romero MP, Tovar MJ, Ramos T, Motilva MJ, 2003. Effect of crop season on the composition of virgin olive oil with protected designation of 'Les Garrigues'. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 80: 423-430.
- Sabate J, Hook DG, 1996. Almonds, walnuts, and serum lipids. En: G.A. Spiller (Ed.). *Lipids in human nutrition.* CRC Press, Boca Raton, Fla, pp. 137-144.
- Schirra M, Nieddu G, 1992. Compositional changes in developing almond kernels in relation to rootstock and water supply. *Ann. Fac. Agric. Univ. Sassari* 34: 169-175.
- Senesi E, Rizzolo A, Colombo C, Testoni A, 1996. Influence of pre-processing storage conditions on peeled almond quality. *Ital. J. Food Sci.* 8 (2): 115-125.
- Senesi E, Rizzolo A, Sarlo S, 1991. Effect of different packaging conditions on peeled almond stability. *Ital. J. Food Sci.* 3 (3): 209-218.
- Shintani D, DellaPenna D, 1998. Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science* 282: 2098-2100.
- Smith CW, Creelman RA, 2001. Vitamin E concentration in upland cotton seeds. *Crop Sci.* 41: 577-579.
- Socias i Company R, Felipe AJ, Gómez Aparisi J, 2003. Almond bloom in a changing climate. *J. Amer. Pomol. Soc.* 57 (2): 89-92.
- Soll J, Shultz G, 1980. 2-Methyl-6-phytylquinol and 2,3-dimethyl-5-phytylquinol as precursor of tocopherol synthesis in spinach chloroplasts. *Phytochemistry* 19: 215-218.
- Sun W, Kawano Y, Shiomori K, Yonekura M, Mitani H, Hatate Y, 2001. Auto-oxidation rate of linoleic acid and effect of antioxidants on the oxidation. *Kagaku Kogaku Ronbun-shu* 27 (1): 76-84.
- Zacheo G, Cappello AR, Perrone LM, Gnoni GV, 1998. Analysis of factors influencing lipid oxidation of almond seeds during accelerated ageing. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 31: 6-9.
- Zacheo G, Cappello MS, Gallo A, Santino A, Cappello AR, 2000. Changes associated with postharvest ageing in almond seeds. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 33: 415-423.

(Aceptado para publicación el 13 de diciembre de 2006)