



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Caracterización de una colección de entradas de
Phaseolus lunatus para composición nutritiva.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: López Serna, Raúl

Tutor/a: Soler Aleixandre, Salvador

Cotutor/a: Raigón Jiménez, M^a Dolores

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ETSIAMN

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO FIN DE GRADO



Instituto de Conservación y Mejora
de la Agrodiversidad Valenciana

Caracterización de una colección de entradas de *Phaseolus lunatus* para composición nutritiva.

Autor: Raúl López Serna

Tutor: Salvador Soler Aleixandre

Cotutor: María Dolores Raigón Jiménez

2021/2022

VALÈNCIA, SEPTIEMBRE DE 2022

Caracterización de una colección de entradas de *Phaseolus lunatus* para composición nutritiva.

Resumen:

El “Garrofó Valencià” o “Garrofó” (*Phaseolus lunatus* L.) es uno de los productos agrarios genuinamente valencianos más conocidos. Recientemente, se está produciendo un incremento de la demanda de este judión valenciano, caracterizado por su calidad, pero también por su diversidad morfológica. En este trabajo se realiza una caracterización para componentes de calidad nutricional de una colección de 31 entradas valencianas de “Garrofó”. Esta colección incluye diversidad de tipos en cuanto a su hábito de crecimiento, así como de pigmentación del grano (tipo ‘Cella’, ‘Cella amb punts’, ‘Cella reduïda’, ‘Pintat’ y ‘Ull de Perdiu’). El objetivo es obtener información en estas entradas sobre su contenido en humedad, grasa, proteína, fibra, hidratos de carbono, polifenoles, antioxidantes y contenido en minerales evaluado a partir del porcentaje en cenizas. Por otra parte, se calculó también el valor energético o calórico de dichas entradas de “Garrofó”. Los datos generados permitirán obtener los perfiles de calidad asociados a cada uno de los tipos varietales del “Garrofó” existentes. Además, se obtendrá información sobre las diferencias de este respecto a otros judiones de procedencia foránea que muchas veces se venden como “Garrofó”. Esto contribuirá de forma crucial al establecimiento de este como un producto agrario valenciano de calidad diferenciada. Por último, paralelamente a este ensayo, se caracterizaron fenotípicamente estas entradas valencianas de “Garrofó” haciendo uso de diversos descriptores con el objetivo de establecer relaciones entre sus características fenotípicas y nutricionales.

Abstract:

The "Garrofó Valencià" or "Garrofó" (*Phaseolus lunatus* L.) is one of the best-known Valencian agricultural products. Recently, there has been an increase in the demand for this Valencian bean, characterized by its quality, but also by its morphological diversity. In this work, a characterization for nutritional quality components of a collection of 31 Valencian entries of "Garrofó" is carried out. This collection includes a diversity of types in terms of growth habit, as well as grain pigmentation ('Cella' type, 'Cella amb punts', 'Cella reduïda', 'Pintat' and 'Ull de Perdiu'). The objective is to obtain information in these entries about their content in humidity, fat, protein, fiber, carbohydrates, polyphenols, antioxidants and mineral content evaluated from the percentage of ashes. On the other hand, the energy value of these entries of "Garrofó" was also calculated. The data generated will make it possible to obtain the quality profiles associated with each of the existing "Garrofó" varietal types. In addition, information will be obtained on the differences between this bean and other foreign beans that are often sold as "Garrofó". This will crucially contribute to the establishment of this as a Valencian agricultural product of differentiated quality. Finally, parallel to this essay, these Valencian entries of "Garrofó" were phenotypically characterized using some descriptors to establish relationships between their phenotypic and nutritional characteristics.

Palabras clave: *Phaseolus lunatus* L., componentes nutricionales, perfiles de calidad, caracterización fenotípica.

Key words: *Phaseolus lunatus* L., nutritional components, quality profiles, phenotypic characterization.

Autor: Raúl López Serna

Tutor académico: Salvador Soler Aleixandre

Valencia, septiembre de 2022

Cotutor: María Dolores Raigón Jiménez

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Isabel y Basilio, mi hermana Irene y el resto de familiares y amigos por su apoyo y respaldo constante e incondicional durante esta experiencia.

A Salvador Soler y Lola Raigón por brindarme la oportunidad de formar parte de este proyecto.

A Loles García por toda la ayuda brindada en el laboratorio y motivación desde el principio del proyecto.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	ORIGEN Y DOMESTICACION DEL CULTIVO DE <i>P. LUNATUS</i>	1
1.2.	INTRODUCCIÓN DEL CULTIVO DE <i>P. LUNATUS</i> EN EUROPA Y ESPAÑA	3
1.3.	TAXONOMÍA DEL CULTIVO DE <i>P. LUNATUS</i>	3
1.4.	DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL CULTIVO DE <i>P. LUNATUS</i>	4
1.5.	IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL CULTIVO DE <i>P. LUNATUS</i>	5
1.5.1.	Importancia económica a nivel mundial	5
1.5.2.	Importancia económica en la Comunidad Valenciana	7
1.6.	IMPORTANCIA DE LAS VARIEDADES TRADICIONALES EN LA AGRICULTURA ACTUAL.....	7
1.6.1.	Variedades tradicionales de “Garrofó”	8
1.7.	CALIDAD EN LAS VARIEDADES TRADICIONALES.....	9
2.	OBJETIVOS	11
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1.	MATERIAL VEGETAL.....	12
3.2.	CONDICIONES DE CULTIVO	14
3.3.	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	14
3.4.	CARACTERIZACIÓN DE COMPOSICIÓN	16
3.4.1.	Procesado de muestras para caracterización de composición.....	16
3.4.2.	Análisis para caracterización de composición	16
3.4.2.1.	Análisis de humedad y materia seca.....	16
3.4.2.2.	Análisis de grasa	16
3.4.2.3.	Análisis de proteínas	17
3.4.2.4.	Análisis de minerales.....	18
3.4.2.5.	Análisis de fibra	18
3.4.2.6.	Análisis de hidratos de carbono	19
3.4.2.7.	Análisis del valor energético.....	20
3.4.2.8.	Análisis de polifenoles	20
3.4.2.9.	Análisis de antioxidantes	20
3.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	22
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
4.1.	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	23

4.2.	CARACTERIZACIÓN DE COMPOSICIÓN	26
4.3.	CONSIDERACIÓN CONJUNTA	29
4.4.	ESTUDIO DE LAS CORRELACIONES ENTRE CARACTERES.....	31
5.	CONCLUSIONES	32
6.	BIBLIOGRAFÍA	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de restos arqueológicos y accesiones silvestres y domesticadas de acervos genéticos de *P. lunatus* en América según el estudio de Gutiérrez Salgado et al. (1995). Los círculos blancos se refieren a los tipos cultivados mesoamericanos; los círculos negros, a los tipos silvestres mesoamericanos; las estrellas blancas, a los tipos cultivados andinos; las estrellas negras, a los tipos silvestres andinos.

Figura 2. Ilustración de planta de *P. lunatus* mostrando hojas alternas, trifoliadas; inflorescencias y vainas oblongas deshicientes.

Figura 3. Semillas de *P. lunatus* moteadas verdes y moradas con líneas transversales que irradian desde el hilio.

Figura 4. Mapa de distribución geográfica del cultivo de *P. lunatus* a nivel mundial.

Figura 5. Superficie (acres), rendimiento (libras/acres) y precio (\$/quintales) de la variedad americana de *P. lunatus* “large lima” en California, 2004-2013.

Figura 6. Características morfológicas y pigmentación de las semillas de un cultivar comercial de *P. lunatus* importado de Perú y de las variedades tradicionales de “Garrofo”: ‘Pintat’, ‘De la Cella’ y ‘Ull de Perdiu’.

Figura 7. Foto de una semilla representativa de cada una de las entradas evaluadas en el ensayo (excepto la entrada cultivada en Perú).

Figura 8. Descriptor de forma de la semilla de *P. lunatus*.

Figura 9. Sistema de extracción de grasa y materia extraíble ST 243 Soxtec.

Figura 10. Espectrofotómetro UviLine 9100/9400.

Figura 11. Horno de cámara/mufla Carbolite™ CWF 1100.

Figura 12. Sistema de extracción de fibra FT 221 FiberCap™ incluyendo la placa calefactora Foss Tecator 2022 Hot Plate, las jarras de extracción, el carrusel y las cápsulas FiberCap™.

Figura 13. Recta de calibrado de ácido gálico para la determinación del contenido en polifenoles.

Figura 14. Recta de calibrado de TROLOX para la determinación de antioxidantes totales.

Figura 15. Representación gráfica de la distribución obtenida tras el análisis ACP, con los descriptores cuantitativos y pseudo-cuantitativos de *P. lunatus*, para las 33 entradas cultivadas.

Figura 16. Histograma para el descriptor de *P. lunatus* “Patrón de color de la semilla” para todas las entradas de la colección evaluada.

Figura 17. Histograma para el descriptor de *P. lunatus* “Patrón de cubierta de la semilla” para todas las entradas de la colección evaluada.

Figura 18. Representación gráfica de la distribución obtenida tras el análisis ACP, con los componentes de calidad nutricional, para las 34 entradas evaluadas.

Figura 19. Representación gráfica de la distribución obtenida tras el análisis ACP, con los descriptores cuantitativos y pseudo-cuantitativos de *P. lunatus* y caracteres de calidad evaluados para las 33 entradas cultivadas en el ensayo.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición proximal de las variedades americanas de *P. lunatus* “large lima” y “baby lima” crudas y cocidas.

Tabla 2. Listado de las variedades locales y controles empleados en la caracterización de composición descritos por su procedencia.

Tabla 3. Descriptores de *Phaseolus lunatus* empleados para la caracterización fenotípica.

Tabla 4. Media, rango, coeficiente de variación y significancia estadística de cada uno de los descriptores de *P. lunatus* evaluados para las 33 entradas cultivadas en el ensayo.

Tabla 5. Valores principales para las dos primeras componentes principales (PCs) con los descriptores cuantitativos y pseudo-cuantitativos de *P. lunatus* para las 33 entradas cultivadas en el ensayo.

Tabla 6. Media, rango, coeficiente de variación y significancia estadística de cada uno de los caracteres de calidad evaluados para las 34 entradas estudiadas en el ensayo.

Tabla 7. Valores principales para las dos primeras componentes principales (PCs) con los caracteres de calidad evaluados para las 34 entradas estudiadas en el ensayo.

Tabla 8. Valores principales para las dos primeras componentes principales (PCs) con los descriptores cuantitativos y pseudo-cuantitativos de *P. lunatus* y caracteres de calidad evaluados para las 33 entradas cultivadas en el ensayo.

Tabla 9. Coeficientes de correlación de Pearson correspondientes a los caracteres de calidad y composición evaluados para las 33 entradas cultivadas en el ensayo.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ORIGEN Y DOMESTICACION DEL CULTIVO DE *P. LUNATUS*

La domesticación de plantas es un proceso evolutivo que opera bajo la influencia del hombre (Harlan, 1992; Gepts, 2004; Zeder et al., 2006). Gracias a la domesticación, las variedades locales surgen de sus progenitores silvestres y durante este proceso, las plantas adquieren un conjunto de rasgos morfológicos y fisiológicos que las hacen diferentes de sus ancestros silvestres. Esto se conoce como síndrome de domesticación (Harlan, 1992; Doebley et al., 2006).

El estudio de los procesos de domesticación de las plantas ha permitido demostrar que algunos cultivos derivan de una sola domesticación. Sin embargo, también se han podido observar múltiples eventos de domesticación en diferentes poblaciones de la misma especie. Ejemplo de ello son *Phaseolus vulgaris* L. (el frijol común o judía) (Gepts y Debouck, 1991; Chacón et al., 2005) y *Phaseolus lunatus* L: frijol lima o “Garrofó” (denominación utilizada en València) (Gutiérrez-Salgado et al., 1995; Motta-Aldana et al., 2010).

Phaseolus lunatus se trata de una de las cinco especies domesticadas de *Phaseolus* (Fabaceae) y es la segunda especie alimenticia más importante de este género, después de la judía (Baudoin et al. 2004). Así, actualmente se encuentra ampliamente distribuido en zonas tropicales y templadas alrededor de todo el mundo. Sin embargo, tiene su origen en América y ha evolucionado en el Neotrópico durante más de 10.000 años (Kaplan y Lynch, 1999; Martínez-Castillo et al., 2014).

Atendiendo a las características de las semillas (Debouck et al., 1987), los patrones bioquímicos de las proteínas de estas semillas (Gutiérrez Salgado et al., 1995; Maquet et al., 1999) y estudios sobre polimorfismos del ADN nuclear y del cloroplasto (Caicedo et al., 1999; Fofana et al., 1999), se ha evidenciado dentro de la especie (*P. lunatus*) la presencia de dos acervos genéticos en la naturaleza: el mesoamericano (M) y el andino (A). El acervo genético M consiste en semillas de *P. lunatus* de pequeño tamaño mientras que el acervo genético A contiene semillas de *P. lunatus* de gran tamaño (Baudoin et al., 2004).

Sin embargo, se ha demostrado mediante estudios recientes que utilizan regiones no codificantes del ADN del cloroplasto (ADNcp) y polimorfismos del espaciador transcrito interno (ITS) del ADN ribosómico (ADNr) (Motta-Aldana et al., 2010; Serrano-Serrano et al., 2010; Andueza - Noh et al., 2013) que la organización de la diversidad genética de *P. lunatus* podría ser más compleja en el caso del acervo genético mesoamericano. En términos generales, el acervo genético A se extiende principalmente entre Ecuador y Perú (donde se ha ubicado el centro de domesticación) (Gutiérrez-Salgado et al. 1995; Caicedo et al. 1999; Maquet et al. 1999; Motta-Aldana et al. 2010) mientras el acervo genético M se distribuye desde el sureste de Estados Unidos y México hasta América Central y América del Sur (figura 1). Sin embargo, estos estudios recientes manifiestan que este acervo genético no es ni genética ni geográficamente un grupo compacto; sino que, este grupo se divide en dos subgrupos principales: Mesoamericano I y Mesoamericano II (MI y MII, respectivamente, siguiendo la nomenclatura propuesta por Serrano-Serrano et al., 2010) (Martínez-Castillo et al., 2014). Particularmente para la variedad silvestre, MI se encuentra distribuido principalmente en la parte occidental y noroeste del Istmo de Tehuantepec en México. Por otra parte, el grupo MII se extiende en la zona este y sureste de México, el Istmo de Tehuantepec, América Central (Guatemala, El Salvador, Honduras y Costa Rica), el Caribe (Cuba) y América del Sur (Colombia, sur de Perú y Argentina) hasta el norte de Argentina (Serrano-Serrano et al. 2010; Motta-Aldana et al. 2010).



Figura 1. Distribución geográfica de restos arqueológicos y accesiones silvestres y domesticadas de acervos genéticos de *P. lunatus* en América según el estudio de Gutiérrez Salgado et al. (1995). Los círculos blancos se refieren a los tipos cultivados mesoamericanos; los círculos negros, a los tipos silvestres mesoamericanos; las estrellas blancas, a los tipos cultivados andinos; las estrellas negras, a los tipos silvestres andinos.

Esta gran distribución y la escasez de muestras silvestres han complicado el descubrimiento del centro de domesticación del acervo genético mesoamericano. Sobre la base de la evidencia reportada por Andueza-Noh, et al. (2013) se propone que MI fue domesticado en el centro occidente de México donde existen pruebas de domesticación de al menos otras dos especies de *Phaseolus* (*Pasheolus vulgaris* y *Phaseolus acutifolius*). Además, estos autores también proporcionan muestras de un posible evento de domesticación de MII, que habría tenido lugar en la zona ubicada entre Guatemala, Honduras y Costa Rica.

Por otra parte, debido a la estrecha relación filogenética de *P. lunatus* silvestre con las especies andinas, Caicedo et al. (1999), Fofana et al. (1999) y Sparvoli et al. (2001) propusieron un origen andino para *P. lunatus*. Esto sugiere un origen andino para esta especie.

En conclusión, *P. lunatus* posee un origen andino experimentando una separación temprana en tres acervos genéticos, que evolucionaron principalmente de forma aislada. La distribución geográfica actual de *P. lunatus* silvestre probablemente se vio afectada por un evento de fragmentación en los Andes del Norte y por la migración hacia América Central, después de la formación del Istmo de Panamá (Serrano-Serrano et al., 2010). Sin embargo, este cultivo no se introdujo en Europa y España hasta años más tarde con el descubrimiento de América.

1.2. INTRODUCCIÓN DEL CULTIVO DE *P. LUNATUS* EN EUROPA Y ESPAÑA

Durante el siglo XIV, el cultivo de *P. lunatus* llegó a Norteamérica, y tras el descubrimiento de América, a finales del siglo XV y durante el siglo XVI, esta planta se había expandido a Europa donde empezó a ser cultivada. Se piensa que durante esta época, los exploradores europeos tomaron *P. lunatus* de América y lo esparcieron por todo el mundo. De hecho, Mackie (1943) destaca a los exploradores españoles por haber propagado este cultivo por Europa y Asia y jugaron un papel imprescindible en llevarlo a África a través de barcos de esclavos (Nwokolo, 1996). Así, durante la época del Virreinato del Perú, se exportaba el cultivo de *P. lunatus* al resto de América y a Europa. El nombre inglés de “lima bean” (frijol lima) proviene de las cajas de mercancía con origen en Lima en las cuales se exportaba este cultivo.

Después de la introducción a estas diversas zonas ecológicas, los cultivares de *P. lunatus* experimentaron una adaptación notable produciéndose las diversas variedades locales que existen en estas diferentes áreas. En el caso de España, tras siglos de cultivo en la Península Ibérica después de su introducción en el siglo XVI, los cultivos se adaptaron a nuevos entornos, evolucionando numerosas variedades locales (Castillo, 2021). Estas variedades locales se establecieron en los huertos valencianos y el cultivo de *P. lunatus* pasó a llamarse “Garrofó” o “Garrofó Valencià” debido a su parecido al fruto del algarrobo. Sin embargo, la botánica y taxonomía de *P. lunatus* dista bastante del cultivo del algarrobo (*Ceratonia siliqua*).

1.3. TAXONOMÍA DEL CULTIVO DE *P. LUNATUS*

P. lunatus está actualmente clasificado como una planta de la clase *Magnoliopsida* (es decir, dicotiledónea), orden *Fabales*, familia *Leguminosae* (o *Fabaceae*), género *Phaseolus* y especie *lunatus*.

El género *Phaseolus* y, en especial, la especie *P. lunatus* presenta una taxonomía y nomenclatura bastante complejas (Maquet, 1995). Las investigaciones filogenéticas recientes respaldan firmemente un género monofilético, aunque el número exacto de especies dentro del género aún se está debatiendo (Debouck 1999). Sin embargo, probablemente haya alrededor de 50 especies en el género, de las cuales 5 son domesticadas: *P. vulgaris* L. (judía), *P. lunatus* L. (frijol lima o “Garrofó”), *P. coccineus* L. (judía escarlata), *P. acutifolius* A. Gray (frijol tépari) y *P. polyanthus* Greenm. (Baudoin et al. 2004).

El género *Phaseolus* puede dividirse en 9 clados que engloban las diferentes especies del género (Delgado- Salinas et al., 1999). Por lo tanto, a pesar de que las 5 especies domesticadas de leguminosas pertenecen al género *Phaseolus*, se ha demostrado mediante estudios de cruzabilidad que no pertenecen al mismo clado o grupo. *P. acutifolius*, *P. coccineus*, *P. polyanthus* y *P. vulgaris* están incluidas dentro del grupo *Phaseolus vulgaris* (aunque *P. coccineus*, *P. polyanthus* y *P. vulgaris* están mucho más estrechamente relacionadas entre sí) y *P. lunatus* está incluida en el grupo *Phaseolus lunatus* (Debouck, 1991; Delgado- Salinas et al., 1999). Así, todos los intentos de cruzar *P. vulgaris* con *P. lunatus* han fracasado hasta ahora en producir un híbrido viable y fértil (Al-Yasiri y Coyne 1966; Mok et al. 1978; Leonard et al. 1987; Kuboyama et al. 1991). El cruce recíproco *P. lunatus* × *P. vulgaris* es aun más difícil de obtener (Rabakoarihanta et al. 1979). Esta dificultad para obtener híbridos fértiles viables entre *P. vulgaris* y *P. lunatus* confirma su distinta posición taxonómica en el género y tiene un gran impacto ya que la hibridación es una fuente de diversidad genética y adaptación de especies.

Además, debido a la amplia heterogeneidad de sus formas silvestres y cultivadas, Baudet (1977a) propuso dos variedades botánicas: *P. lunatus* var. *silvester* y *P. lunatus* var. *lunatus*.

Phaseolus lunatus var *silvester* incluye las formas silvestres. Por su parte, *Phaseolus lunatus* var. *lunatus* contiene las formas cultivadas. Dentro de esta variedad botánica son conocidos tres cultigrupos, definidos por el tamaño y forma de la semilla: cultigrupo Gran Lima, consiste en semillas grandes y planas; cultigrupo Sieva, con semillas de tamaño medio y de forma arriñonada; y cultigrupo tipo Papa, con semillas pequeñas de forma globular (Baudet, 1977b).

1.4. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL CULTIVO DE *P. LUNATUS*

En cuanto a su botánica, *P. lunatus* es una especie herbácea que incluye tipos arbustivos determinados anuales y tipos trepadores indeterminados perennes. Los tipos arbustivos son cortos, de unos 0,6 m de altura, mientras que los tipos trepadores miden entre 2 y 5 m. (Nwokolo, 1996). Por otra parte, presenta un sistema radicular muy ramificado alcanzando profundidades de más de 1 m y donde forman nódulos simbióticos con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico (FAO, 2018). Además, como se observa en la figura 2, posee hojas alternas, trifoliadas; el ápice agudo o acuminado corto; los márgenes sinuosos; haz verde oscuro, opaco, glabro, con nervadura ligeramente prominente; envés verde pálido, glabro, con la nervadura primaria y secundaria prominentes; folíolo terminal de 5.5-11 × 3.5-7.5 cm; estípulas triangulares y pecíolos de 6,5-9 cm de largo. Desarrollan inflorescencias en racimos axilares, largas (3-30 cm) con las flores en grupos de 2 por nudo de la inflorescencia; pedicelos de 6-9 mm de largo, pilosos; cáliz de 2-2.5 mm de largo, verde, campanulado; corola blanca, amarillenta, rojiza o lila; el estandarte, de 7-10 mm de largo; 9 estambres fusionados y 1 libre; ovario pubescente. (Acevedo-Rodríguez, 2005).



Figura 2. Ilustración de planta de *P. lunatus* mostrando hojas alternas, trifoliadas; inflorescencias y vainas oblongas deshiciertas (Laureano y Avellaneda, 2018).

P. lunatus se caracteriza por ser una especie bisexual en la que la autogamia se ve favorecida por la madurez sincronizada de los granos de polen y el estigma en sus flores, así como por la proximidad dentro del botón floral (Martínez-Castillo et al., 2007). Sin embargo, se han observado tasas de entrecruzamiento de 0,02% hasta 48%, según el genotipo, la distancia entre las plantas, las condiciones de crecimiento, las poblaciones locales de insectos polinizadores y la dirección del viento (Baudoin et al., 1998; Zoro Bi et al., 2005).

Cada planta de *P. lunatus* produce en la madurez una gran cantidad de frutos. Este fruto se trata de una vaina oblonga deshicente (figura 2), de 5–10,5 cm de largo y 1,2–2,5 cm de ancho conteniendo de 2 a 4 semillas. Las semillas son reniformes y aplanadas, con un tamaño de 12–13 × 8,5–9,5 mm y con color variable pudiendo ser blanca, amarilla, verde, marrón, rosada, morada, roja, negra o moteada de diversas formas, frecuentemente con líneas transversales que irradian desde el hilio (figura 3). (Lim, T.K., 2012).



Figura 3. Semillas de *P. lunatus* moteadas verdes y moradas con líneas transversales que irradian desde el hilio (Lim, T.K., 2012).

1.5. IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL CULTIVO DE *P. LUNATUS*

1.5.1. Importancia económica a nivel mundial

Como ya se ha mencionado, *P. lunatus* se trata de la segunda especie alimenticia más importante de este género, solo después de la judía (Baudoin et al. 2004). Así, *P. lunatus* es cultivado en muchos países y; aunque prefiere climas de selva tropical, tropical monzónico y sabana tropical, tolera climas templados cálidos; por lo que, se encuentra en áreas tropicales y en algunas regiones templadas de la Tierra (figura 4) (Temagne et al., 2021).

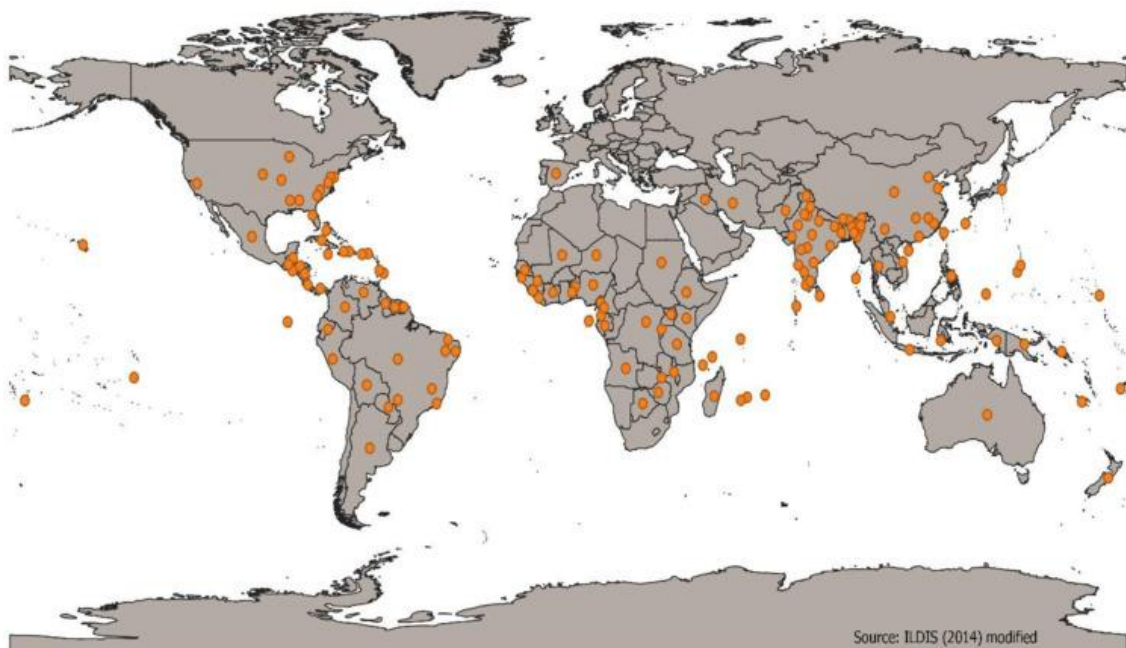


Figura 4. Mapa de distribución geográfica del cultivo de *P. lunatus* a nivel mundial (Temegne et al., 2021).

Se agrupa con otras leguminosas de grano en FAOSTAT, lo que justifica la ausencia de datos de producción específicos de la especie. A pesar de la ausencia de estadísticas de producción mundial, la producción de *P. lunatus* es de aproximadamente 200.000 toneladas/año (Temegne et al., 2021). Estados Unidos fue el principal productor en 1995 cultivando aproximadamente 21.000 hectáreas con una producción de 70.000 t/año, seguido por Madagascar (8.000 t/año y con un área cultivada que varía de 3.000 a 19.000 ha) y Perú (5.000–5.500 t/año y 5.000–6.000 ha cultivadas). Se estimó que, en África, el área sembrada con *P. lunatus* en los trópicos húmedos y subhúmedos (especialmente Sierra Leona, Costa de Marfil, Liberia, Nigeria, Ghana y la República Democrática del Congo) fue de 120.000–200.000 ha en la década de 1980, con un total de producción anual de 50.000 a 100.000 t. En Asia, Birmania es el mayor productor (Baudoin, 2006).

En Estados Unidos, anualmente, se plantaban 40.000 acres (aproximadamente 16.000 ha) de *P. lunatus* en la década de los 2000. Aquí, la producción estaba concentrada en California, el noroeste del Pacífico, ciertas áreas de Wisconsin, Illinois y Minnesota, Delaware (con una superficie cultivada mayor que cualquier otro cultivo vegetal) y otras regiones del Atlántico Medio (E. Kee et al., 2004). Sin embargo, en el transcurso de los últimos años se ha observado una ligera disminución de la superficie cultivada de *P. lunatus* en Estados Unidos debido a la sustitución por otros cultivos de mayor valor. Prueba de ello son los datos observados en California; donde, sin embargo, el precio mostró una tendencia ascendente bastante significativa superando los 600\$/t (figura 5), basándose su comercio en la industria conservera o exportaciones al extranjero (principalmente a Japón) (Long et al., 2014).

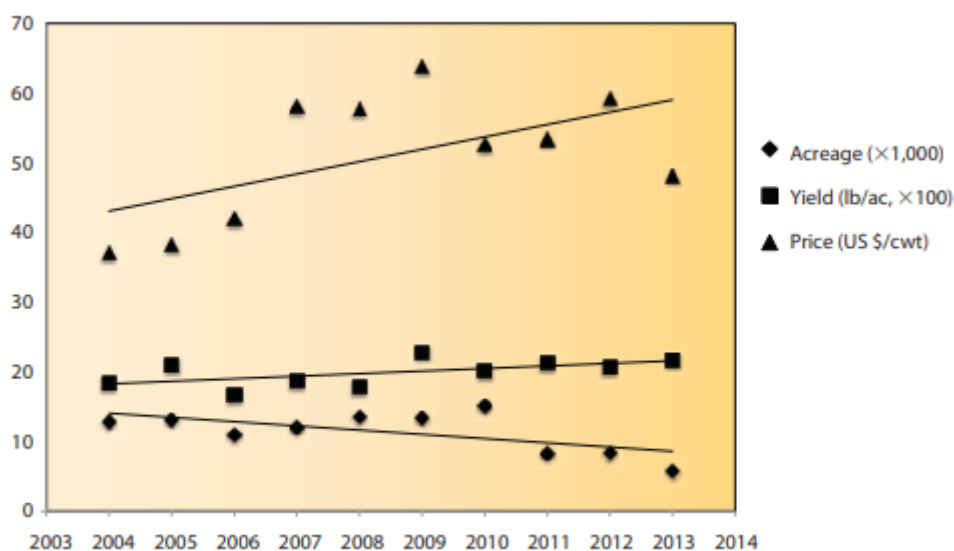


Figura 5. Superficie (acres), rendimiento (libras/acres) y precio (\$/quintales) de la variedad americana de *P. lunatus* “large lima” en California, 2004-2013. (Long et al., 2014).

lb: libra; ac: acre; cwt: quintal

Sin embargo, a nivel del estado español, esta leguminosa es poco cultivada y su importancia está limitada a la Comunidad Valenciana.

1.5.2. Importancia económica en la Comunidad Valenciana

Entre todas las leguminosas que se cultivan en Valencia, hay una que por su singularidad merece un puesto de honor en la gastronomía local: el “Garrofó” o “Garrofó Valencià”, como lo denominan los productores para diferenciarlo de otros productos que llegan de Sudamérica. Aunque el “Garrofó” es una leguminosa bastante desconocida fuera de la Comunitat Valenciana, es muy apreciada por los valencianos porque es un elemento imprescindible de uno de los platos valencianos con más proyección internacional, la paella.

El cultivo está limitado en las comarcas litorales de la franja mediterránea por el clima y la tradición. Por otra parte, la productividad suele ir asociada a la complejidad de su cultivo, ya que es un producto muy sensible a la climatología, especialmente a las olas de calor que se dan durante el verano y que afecta directamente a la flor, evitando que prospere el fruto (Arufe, 2021). Además, hace años que se importa “Garrofó” foráneo parecido y a bajo precio, lo que ha causado que en los campos valencianos sea poco cultivado, reduciéndose a extensiones pequeñas, menores de una hectárea.

Por estas razones, en el “Garrofó” se ha reducido en más de un 75% la superficie cultivada en los últimos tiempos a causa de las dificultades para competir por costes con las importaciones foráneas y de las elevadas exigencias que requiere el cultivo. Como consecuencia, agricultores, cocineros y personas preocupadas por la pérdida de esta legumbre han decidido impulsar una iniciativa de carácter promocional y divulgativo para buscar la denominación de origen como es la creación de l’Associació de Productors de Garrofó Valencià en 2018 (i Oltra, 2014).

En este contexto de progresiva pérdida del “Garrofó” surge la cuestión sobre la importancia que tienen las variedades tradicionales de los cultivos, la necesidad de conocerlas y, a través de este conocimiento, asegurar su preservación.

1.6. IMPORTANCIA DE LAS VARIEDADES TRADICIONALES EN LA AGRICULTURA ACTUAL

Varias definiciones de variedad tradicional han surgido desde finales del siglo XIX. Estas fueron descritas por Harlan (1975) como “poblaciones que han evolucionado en sociedades agrícolas como resultado de presiones de selección humana artificiales de milenios de duración, mediadas por la migración humana, el intercambio de semillas y la selección natural”. Debido a su naturaleza compleja, Zeven (1998) concluyó que no se puede dar una definición global. Sin embargo, más recientemente, Camacho Villa et al. (2005), propusieron la siguiente definición de variedad tradicional: “es una población dinámica de una planta cultivada que tiene un origen histórico, una identidad distintiva y carece de mejoramiento formal del cultivo, además de ser a menudo genéticamente diversa, adaptada localmente y asociada con los sistemas agrícolas tradicionales” (Newton et al., 2011).

La mejora genética (en un sentido diferente en que se entiende hoy en día) ha sido llevada a cabo por agricultores durante miles de años. Estos agricultores contribuían a la expansión de la agricultura y a la adaptación de sus cultivos a nuevos climas cuando migraban de un lugar a otro llevando consigo las semillas de sus cultivos. Este proceso, a lo largo de miles de años, condujo a la formación de las variedades tradicionales.

Las variedades tradicionales fueron el centro de interés de la producción agrícola hasta finales del siglo XIX con el redescubrimiento de las leyes de Mendel y el remplazo de la mejora genética

realizada por agricultores por la mejora genética mediante investigación científica en laboratorios. A mediados del siglo XX ocurrió la Revolución Verde, la cual provocó grandes cambios en la agricultura. Este término fue acuñado en 1968 por William S. Gaud, el director de USAID (Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional) para indicar el resultado del desarrollo de una estrategia basada en nuevos cultivares, fertilizantes, riego, pesticidas y mecanización. Esta estrategia se basó en el desarrollo de cultivos de alto rendimiento y tuvo entre otras consecuencias, un declive dramático de la agrobiodiversidad ya que las nuevas variedades (muy similares genéticamente al proceder de un germoplasma estrecho) sustituyeron a las variedades tradicionales amenazando su extinción (Ceccarelli, 2012).

Por tanto, se distingue entre variedades tradicionales y cultivares modernos (cultivares de élite), siendo estos últimos el resultado de programas formales de mejoramiento de cultivos (Newton et al., 2011). Estos cultivos modernos han sido mejorados para presentar un elevado rendimiento. Por su parte, las variedades tradicionales se caracterizan por la tolerancia a enfermedades debido a que, según Frankel et al. (1995), los componentes de una población genéticamente diversa (como una variedad tradicional) tienen un efecto amortiguador del efecto de las enfermedades al reducir la propagación de patógenos. Además, presentan resistencia o tolerancia a plagas y diversos estreses abióticos (como el aumento de la aridez y las sequías), constituyendo un reservorio de diversidad genética que es interesante para futuros trabajos de mejoramiento, así como para el desarrollo de nuevos sistemas agrícolas y nuevos productos (Marone et al., 2021).

Por esta razón, tiene cada vez más importancia la labor de los bancos de germoplasma y las prácticas de conservación “*in situ*” para preservar la diversidad genética de las variedades tradicionales y para satisfacer las necesidades futuras de la agricultura sostenible en el contexto del cambio climático (Newton et al., 2011).

1.6.1. Variedades tradicionales de “Garrofó”

Las variedades tradicionales de esta especie no son una excepción a lo ocurrido en la agricultura actual. Así, están siendo reemplazadas por variedades comerciales y representan un cultivo testimonial en pequeñas áreas del continente europeo. Son pocos los agricultores que las cultivan actualmente debido a la competencia que supone la importación a bajo precio de variedades de *P. lunatus* provenientes de Sudamérica u otras judías semejantes. De esta forma, a diferencia de *P. vulgaris*, no se han realizado casi estudios de caracterización de las variedades cultivadas y mucho menos estudios de los factores que limitan su rentabilidad o programas de mejora para su solución.

En València, las variedades tradicionales autóctonas cultivadas son las conocidas como ‘Pintat’, ‘Ull de Perdiu’ y ‘De la Cella’. El uso de esta especie en el este de la Península Ibérica en la cocina tradicional es muy antiguo y, a día de hoy, solo existen referencias del uso de estas variedades en los últimos 100 años en la Comunidad Valenciana (Tardío et al., 2018).

Estas variedades tradicionales valencianas se caracterizan sobre todo por presentar antocianos en el tegumento de la semilla, a diferencia de las semillas importadas de Perú, que son completamente blancas y no muestran ningún tipo de pigmentación. En principio, los agricultores, atendiendo al patrón de distribución de estos antocianos en la superficie de las semillas, han clasificado sus variedades en las citadas ‘Pintat’, ‘Ull de Perdiu’ y ‘De la Cella’. Así, el “Garrofó De la Cella” (de la ceja) se identifica por tener uno de sus extremos de color marrón oscuro a negro, cerca del lóbulo de la radícula del embrión; el “Garrofó Ull de Perdiu” (ojo de perdiz) presenta un característico ojo morado que rodea la zona hilioseminal; y el “Garrofó Pintat”

(pintado) con manchas de color marrón oscuro distribuidas de forma irregular en toda la cubierta externa de la semilla (Martínez-Nieto et al., 2020).

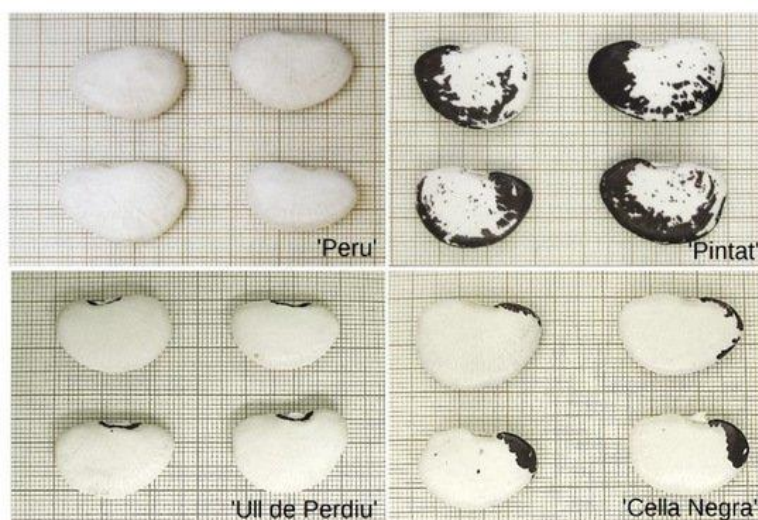


Figura 6. Características morfológicas y pigmentación de las semillas de un cultivar comercial de *P. lunatus* importado de Perú y de las variedades tradicionales de “Garrofó”: ‘Pintat’, ‘De la Cella’ y ‘Ull de Perdiu’. (Martínez-Nieto et al., 2020).

1.7. CALIDAD EN LAS VARIETADES TRADICIONALES

Como ya se ha mencionado a lo largo del presente estudio, la importancia del “Garrofó” se debe a ser ingrediente de la paella valenciana. Las diferentes variedades tradicionales de este “Garrofó” son una parte primordial del patrimonio del pueblo valenciano. Durante años, los labradores han seleccionado variedades para adaptarlas a las condiciones de cultivo de la tierra, con las mejores propiedades organolépticas y características físicas (el sabor, el olor, la textura y el color). Así, a pesar de las ventajas de los cultivos modernos, muchos consumidores están reclamando la recuperación de las variedades tradicionales, que se asocian a la cultura local y se consideran organolépticamente mejores (Tardío et al, 2018).

En cuanto a datos sobre la composición del “Garrofó”, no constan estudios que los recojan. Sin embargo, debido a que *P. lunatus* es muy popular en los EE. UU., su química ha sido determinada como parte de una investigación de alimentos comúnmente consumidos (Haytowitz, 1986). El contenido de proteínas es de aproximadamente 20-25,9%, con una media de alrededor del 22%, aunque puede haber pequeñas variaciones en el valor debido a diferencias en el genotipo y la ecología. Por otra parte, *P. lunatus* tiene un bajo contenido en grasa (0.6-3.5%), teniendo la mayoría de las muestras un contenido de alrededor del 1,5% y, en consecuencia, los ácidos grasos no contribuyen de manera significativa a la energía dietética. Además, el contenido en cenizas es moderado (3.4-6,4%) con un valor medio de alrededor del 5% y el contenido en fibra también lo es (4.3-7.5%), con un valor medio de alrededor de 5.6% (Nwokolo, 1996).

Tabla 1. Composición proximal de las variedades americanas de *P. lunatus* “large lima” y “baby lima” crudas y cocidas (Nwokolo, 1996).

	Contenido (por 100g)			
	“Large lima” crudo	“Baby lima” crudo	“Large lima” cocido	“Baby lima” cocido
Humedad (g)	10,17	12,07	69,79	67,15
Proteína (g)	21,46	20,62	7,8	8,04
Grasa (g)	0,69	0,93	0,38	0,38
Carbohidratos (g)	63,38	62,83	20,89	23,31
Fibra (g)	6,34	5,71	3,09	3,59
Minerales (g)	4,3	3,55	1,15	1,12
Valor energético (kcal)	338	335	115	126

Por otra parte, las leguminosas están siendo ampliamente estudiadas porque sus frutos proporcionan grandes beneficios al ser consumidos. Estos proporcionan al cuerpo una gran cantidad de antioxidantes y compuestos bioactivos como polifenoles, isoflavones, etc., que son esenciales en la actualidad ya que, están implicados en la prevención de diversas enfermedades y, al ser antioxidantes de origen natural, no producen efectos colaterales al momento de su ingesta (Tello Fonseca, 2018). Así, *P. lunatus* se caracteriza por presentar también compuestos funcionales de gran interés alimentario.

Existen unos pocos estudios sobre el “Garrofó”, como los ensayos de Martínez-Nieto et al. (2020), Arteaga et al. (2018) o Castillo (2021); sin embargo, se trata de estudios parciales. En este contexto de ausencia de datos para las variedades valencianas se ha planteado la necesidad de hacer estudios más completos en el “Garrofó” y, por ello, se aborda este trabajo.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es obtener información sobre los caracteres de composición nutritiva en los distintos tipos varietales del “Garrofó” existentes. Así, se han estudiado diferentes parámetros de calidad de la semilla en 31 variedades locales de “Garrofó” procedentes del Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV) y dos controles. Esto contribuirá de forma crucial al establecimiento del “Garrofó” como un producto agrario valenciano de calidad diferenciada.

Para ello se plantean los siguientes subobjetivos:

- Determinar el contenido de humedad, grasa, proteína, fibra, hidratos de carbono, polifenoles, antioxidantes, contenido en minerales evaluado a partir del porcentaje en cenizas y valor energético o calórico de dichas entradas de *P. lunatus*.
- Evaluar estadísticamente las posibles diferencias de los parámetros de calidad entre las 31 variedades locales y los dos controles. Evaluar estadísticamente la posible correlación entre las características de fenotipado de las diferentes plantas de “Garrofó” y el contenido de los componentes de calidad nutricional de sus semillas. A partir de estos resultados se persigue determinar si se pueden establecer perfiles de composición o calidad asociados a los distintos tipos varietales que se establezcan.
- Obtener las diferencias del “Garrofó” respecto al “Garrofó” foráneo en cuanto a características de composición o calidad, y determinar, por tanto, si hay un efecto de las condiciones edafoclimáticas y las prácticas de cultivo sobre los parámetros de calidad de la semilla cultivada en la Comunidad Valenciana respecto al cultivado en Perú.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

Caracterización de composición.

Se emplearon 31 variedades locales de “Garrofó” procedentes del Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV). Además, se utilizaron dos controles comerciales. Uno de ellos fue una selección comercial “Garrofón Valenciano” de la casa Mascarell (entrada 35) y el otro fue semilla comercial “Garrofón Algitama” comprada en la cadena de supermercados “CONSUM” con origen Perú (entrada 34). Todas estas entradas fueron cultivadas durante el ensayo tal y como se expone en el siguiente apartado de “Condiciones de cultivo”. Por otra parte, se utilizó otro control consistente en semilla comercial del “Garrofón Algitama” con origen Perú (entrada 34) que fue analizada directamente (entrada “Perú”). Tanto las variedades locales como los controles se presentan en la tabla 2.

Caracterización fenotípica.

Se emplearon las mismas 31 variedades locales de “Garrofó” procedentes del Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV) y los controles comerciales entradas 34 y 35. Todas estas entradas fueron cultivadas durante el ensayo tal y como se expone en el siguiente apartado de “Condiciones de cultivo”.

Tabla 2. Listado de las variedades locales y controles empleados en la caracterización de composición descritos por su procedencia.

NÚMERO DE LA ENTRADA	CÓDIGO GCMVTV	PROCEDENCIA
1	PH-ALCALAXIVERT-1	Alcalà de Xivert, Castelló
2	PH-ALBORAIA-1	Alboraia, València
3	PH-GANDIA-1	Gandia, València
4	PH-BENAGUASIL-1	Benaguasil, València
5	PH-AGULLENT-1	Agullent, València
6	PH-VILAFAMES-1	Vilafamés, Castelló
7	PH-NULES-1	Nules, Castelló
8	PH-SOLLER-1	Sòller, Mallorca
9	PH-MELIANA-1	Meliana, València
10	PH-SAN ANTONIO DE BENAGEBER-1	San Antonio de Benagéber, València
11	PH-BENAVITES-1	Benavites, València
12	PH-MUTXAMEL-1	Mutxamel, Alacant
13	PH-FOIOS-1	Foios, València
14	PH-CATARROJA-1	Catarroja, València
15	PH-ALQUERIES-1	Alqueries, Castelló
16	PH-MASSAROJOS-1	Massarrojos, València
17	PH-BENAVITES-2	Benavites, València
18	PH-MONCADA-1	Moncada, València
19	PH-VERA(VALÈNCIA)-1	Vera, València
20	PH-MONCADA-2	Moncada, València
21	PH-CARCAIXENT-1	Carcaixent, València
23	PH-CARCAIXENT-3	Carcaixent, València
24	PH-(IVIA, 106-1)-1	(IVIA, 106-1), València

25	PH-(IVIA, 109-1)-2	(IVIA, 109-1), València
26	PH-ANNA-1	Anna, València
27	PH-CATARROJA-2	Catarroja, València
28	PH-VILAREAL-1	Vila-real, Castelló
29	PH-VILAREAL-2	Vila-real, Castelló
30	PH-VILAREAL-3	Vila-real, Castelló
31	PH-MELIANA-2	Meliana, València
32	PH-MELIANA-3	Meliana, València
34*	CONTROL COMERCIAL	GARROFÓN ALGITAMA CONSUM
35	CONTROL COMERCIAL	GARROFÓN VALENCIANO MASCARELL
PERÚ**	CONTROL COMERCIAL	GARROFÓN ALGITAMA CONSUM

**Muestra comercial con origen Perú.

*Muestra de *P. lunatus* obtenida a partir del cultivo en València de semilla comercial con origen Perú.

A continuación, en la figura 7, se expone una fotografía representativa de cada una de las semillas cultivadas durante el ensayo.

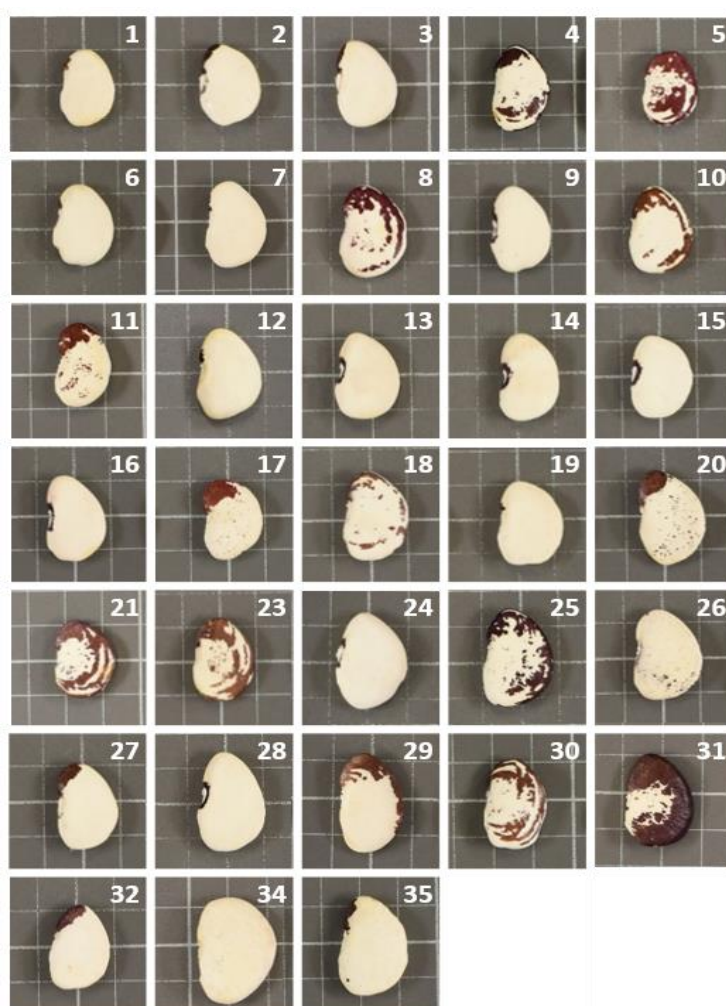


Figura 7. Foto de una semilla representativa de cada una de las entradas cultivadas en el ensayo.

3.2. CONDICIONES DE CULTIVO

El ensayo fue establecido al aire libre, en una parcela ubicada en el municipio de Alcàsser perteneciente a la provincia de València de la Comunitat Valenciana (coordenadas 39°23'42.0" N 0°27'00.4" O). La parcela presentaba un suelo de estructura franco-arcillosa.

Se estudiaron un total de 33 entradas (31 variedades locales de “Garrofó” y los controles comerciales “Garrofón Valenciano” de la casa Mascarell y “Garrofón Algitama” comprado en la cadena de supermercados “CONSUM” con origen Perú). Se cultivaron para cada entrada un total de 18 plantas, distribuidas en 3 bloques de 6. Los bloques de las 31 entradas y los 2 controles se distribuyeron al azar.

El trasplante se realizó el 15 de marzo de 2021. Las plantas se dispusieron protegidas en túnel de manta térmica con arcos de metal. La primera semana de mayo se retiró la manta térmica. A continuación, las plantas se cultivaron entutoradas empleando la estructura en barraca con cañas típicamente valenciana. Se utilizó un sistema de riego por goteo. La fertilización consistió en un aporte en vertedera consistente en abono ternario 8-8-22 a una dosis de 1.200 kg/ha.

3.3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

Para la caracterización fenotípica de las 33 entradas de *P. lunatus* cultivadas se emplearon un total de 12 descriptores, 5 cualitativos y 7 cuantitativos, (tabla 3) de *P. lunatus* (IBPGR,1982). Los caracteres de planta se evaluaron en 6 plantas en cada bloque y los de semilla en el número de semillas que se utilizó.

Tabla 3. Descriptores de *Phaseolus lunatus* empleados para la caracterización fenotípica.

CARACTERÍSTICA	UNIDAD O ESCALA DE MEDIDA
1. Patrón de crecimiento	1. Determinado 2. Indeterminado
2. Patrón de color	0. Sin patrón 1. Verde 2. Marrón claro 3. Marrón oscuro 4. Rojo 5. Rojo púrpura 6. Negro
3. Patrón de cubierta de la semilla	0. Sin patrón 1. Patrón alrededor del ojo solamente 2. Ojo distinto con pocas motas en el cuerpo 3. Ojo distinto con muchas motas en el cuerpo 4. Ojo distinto con manchas en < 50% del cuerpo 5. Ojo distinto con manchas en >50% del cuerpo 6. Ojo ligado a otras partes del patrón, manchas en la región del hilio (más desarrolladas hacia el micrópilo), algunas motas pueden estar presentes

7. Ojo ligado a otras partes del patrón, mancha que cubre la región del hilio y anverso, algunos pueden estar presentes motas
8. Ojo ligado a otras partes del patrón, mancha que cubre la región del hilio, zona posterior, frente y quilla, motas presentes en el resto del cuerpo
9. Ojo vinculado a otras partes del patrón, mancha en la región del hilio, el cuerpo tiene bandas que irradian de la región del hilio
10. Ojo vinculado a otras partes del patrón, mancha en región del hilio, el cuerpo tiene bandas orientadas radialmente y transversalmente
11. Cuerpo escasamente moteado
12. Cuerpo moderadamente moteado, algunas unidas para formar una mancha
13. Cuerpo intensamente moteado, el fondo de la semilla esta casi escondido

4. Forma de la semilla	Semilla tomada de la mitad de la vaina, consulte la figura 8 para conocer los estados del descriptor
5. Longitud de la semilla	mm
6. Anchura de la semilla	mm
7. Peso de la semilla	mg
8. Longitud del racimo floral	cm
9. Forma del pico de la vaina	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pico corto 2. Pico de media longitud 3. Pico largo 4. Pico grueso
10. Anchura de la vaina	cm
11. Longitud de la vaina	cm
12. Número de semillas por vaina	Promedio de 20 vainas maduras elegidas al azar

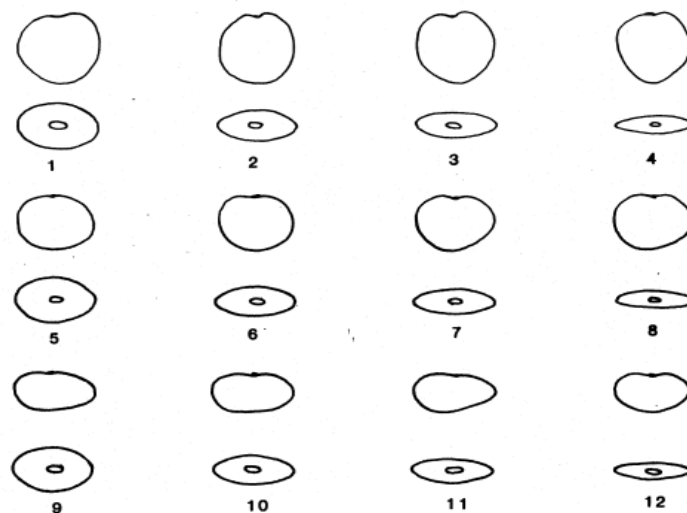


Figura 8. Descriptor de forma de la semilla de *P. lunatus*.

3.4. CARACTERIZACIÓN DE COMPOSICIÓN

3.4.1. Procesado de muestras para caracterización de composición

De cada bloque de estas entradas cultivadas se recogió una muestra de 125 g que fueron procesadas para su posterior caracterización de composición.

Se trituró cada bloque de cada entrada de *P. lunatus* usando un molinillo eléctrico (limpiándolo entre muestra y muestra con etanol al 70% para disminuir la contaminación).

Tras obtener las muestras trituradas en forma de polvo, por una parte, se pesó un crisol (haciendo uso de una balanza KERN 573-34), anotando el peso y tarando. A continuación, se pesaron sobre el crisol 5 g de la muestra triturada para el análisis de humedad.

Por otra parte, se pesaron aproximadamente 2 g de la muestra triturada y se guardaron en bolsas zip a -18°C (para el posterior análisis de polifenoles y antioxidantes).

El resto de cada bloque de muestra fue almacenado en Tubos Falcon de 50 ml y estos guardados en bolsas zip en oscuridad y con poco aire (para el análisis de proteínas, fibra, grasa y minerales totales). Estas bolsas zip contenían, además, gel de sílice para preservar y proteger de la humedad.

3.4.2. Análisis para caracterización de composición

Se comenzó con los análisis proximales de las diferentes entradas de *P. lunatus* (humedad, proteínas, fibras, grasas y cenizas). A partir de esos datos fue posible calcular los hidratos de carbono con una fórmula. Finalmente, se analizaron los componentes funcionales (antioxidantes totales y polifenoles).

3.4.2.1. Análisis de humedad y materia seca

Como se indica anteriormente, se pesaron 5 g de muestra de *P. lunatus* ya triturada. Estos se guardaron en estufa a alrededor de 80°C durante al menos 48 h hasta que el peso se mantuviese constante. Durante, estos días se realizaron varios pesajes observándose una disminución del peso por la pérdida de humedad. Finalmente, cuando el peso se mantuvo constante, la muestra había perdido toda su humedad y se pudo calcular el contenido de humedad y, por diferencia, de materia seca. Los resultados para el contenido en humedad y materia seca se expresaron en g/100 g (%) de materia fresca.

3.4.2.2. Análisis de grasa

Para la determinación de lípidos totales se hizo uso de un sistema de extracción ST 243 Soxtec (figura 9). En primer lugar, se colocaron 2'5 g de muestra dentro de un dedal. Se pesaron 6 vasos (evitando tocarlos para que la grasa de las manos no interfiriera en el análisis) habiendo añadido previamente 2 perlas de ebullición en cada vaso. Estas perlas sirvieron para controlar la ebullición porque cuando un líquido hierve, tiende a saltar por la cantidad de energía que se está proporcionando al mismo, y las perlas evitaron que las burbujas de aire que se forman en el fondo del recipiente explotasen. A continuación, para la extracción se añadieron 50 ml de éter de petróleo en cada vaso y se colocaron tanto los dedales con las muestras como los vasos en el sistema de extracción. Se siguió un programa consistente en 4 fases y alrededor de 3 horas a 85°C (primero con las muestras sumergidas en el éter de petróleo y más tarde con los dedales elevados). Tras la última fase de evaporación del solvente (éter de petróleo), la grasa resultante extraída de la muestra quedó retenida en su respectivo vaso y se pesó nuevamente el vaso para obtener, por diferencia, el contenido de grasas totales. Los resultados para el contenido en grasa se expresaron en g/100 g de materia fresca.



Figura 9. Sistema de extracción de grasa y materia extraíble ST 243 Soxtec. Fuente: DILACO.

3.4.2.3. Análisis de proteínas

Se empleó el protocolo de determinación de proteínas basado en la unión de Azul de Coomassie G-250 a las proteínas desarrollado por Bradford (1976) con algunas modificaciones.

El primer paso constó del pesaje de 0,1 g de muestra de *P. lunatus* (almacenado en tubos Falcon de 50 mL) en un tubo Falcon de 15 mL y la adición de 10 mL de tampón. Para preparar 100 mL de dicho tampón, se pesaron 0,541 g de KH_2PO_4 0,05M y 0,178 g de K_2HPO_4 0,05M y se diluyeron con agua destilada, se ajustó el pH de la disolución a 7,8 con NaOH (usando un pH & Ion-Meter GLP 22) y se aforó a 100 mL con agua destilada. Una vez se tenía en los tubos 0,1 g de muestra y el tampón, se agitó en Vortex unos segundos, se dejó en el agitador durante 10 min y se centrifugaron 5 min a 1500 rpm. A continuación, se pipetearon 5 μL del extracto y se vertieron en una cubeta desechable de poliestireno óptico. A dichas cubetas se añadieron, además, 795 μL de agua destilada. Por otra parte, se debió también preparar el “cero” o “blanco” (con 800 μL de agua destilada en lugar de añadir extracto) y los patrones que sirvieron para construir la curva de calibración o curva estándar. Para dicha construcción se usó una disolución de BSA 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ en agua destilada, se añadieron en las cubetas de poliestireno óptico diferentes volúmenes de dicha disolución de BSA: 10, 20, 30, 50, 70, 100, 120 y 140 μL y se completa con agua destilada hasta los 800 μL . Posteriormente, se añadieron 200 μL de Azul de Coomassie G-250 (reactivo Bradford) a todas las cubetas (las cubetas con los extractos, con la disolución BSA y la cubeta del “cero”), se dejó reaccionar en oscuridad durante al menos 2 minutos y se midió la absorbancia de cada muestra usando el espectrofotómetro UviLine 9100/9400 (figura 10) a 595 nm de longitud de onda. Previamente a la medida de las muestras de *P. lunatus* y aquellas para la curva de calibración, se debió poner “a cero” o “en blanco” el espectrofotómetro para la calibración de este, eliminando la absorbancia de todos los componentes diferentes de la sustancia de estudio con el objetivo de que no provocaran una interferencia. Finalmente, tras medir las respectivas absorbancias y haciendo uso de la ecuación de la recta de calibrado obtenida, fue posible obtener los valores de composición proteica (en g/100g de materia fresca) de cada entrada de *P. lunatus*.



Figura 10. Espectrofotómetro UviLine 9100/9400. Fuente: Avantor.

3.4.2.4. Análisis de minerales

Para dicho análisis se empleó el método descrito por Raigón et al. (2010). Se pesó un crisol, se taró y se pesó la muestra sobre dicho crisol. Se anotaron los pesos y se introdujeron los crisoles conteniendo cada muestra en un horno de cámara/mufla Carbolite™ CWF 1100 (figura 11) a 450 °C durante 2 h. Tras dejar enfriar, se pesaron los crisoles conteniendo las cenizas y obteniendo, así, el contenido de minerales totales (en g/100g) de materia fresca.



Figura 11. Horno de cámara/mufla Carbolite™ CWF 1100. Fuente: Fisher Scientific.

3.4.2.5. Análisis de fibra

En primer lugar, se debieron secar las cápsulas, tapas y crisoles en estufa a 105°C durante mínimo 30 min y se dejaron enfriar en el desecador. A continuación, se pesaron las cápsulas con sus respectivas tapas (W1) usando una balanza de precisión Mettler Toledo AB204-S, se taró y se pesaron 3 g de muestra (W2) en dichas cápsulas. Tras los pesajes, se cerraron las cápsulas con sus tapas y se colocaron en el carrusel en posiciones numeradas. Para llevar a cabo la determinación de fibra total, se hizo uso del sistema FT 221 FiberCap™ (figura 12) y fueron necesarias una primera extracción con H₂SO₄ y una posterior extracción con KOH. Para la primera extracción, se hizo uso de una jarra que se llenó con 300 mL de H₂SO₄ 0,13M. Esta jarra se colocó en una placa calefactora Foss Tecator 2022 Hot Plate y en dicha jarra se introdujo el carrusel con las cápsulas. A continuación, se tapó la jarra con el condensador, se conectó la refrigeración y cuando el ácido sulfúrico comenzó a hervir, se dejó en ebullición durante 30 min. Al terminar la extracción, se sacó el carrusel de la jarra, se dejó drenar el líquido y se vació la jarra. Esta se llenó con 300 ml de H₂O caliente y se introdujo de nuevo el carrusel para lavar las cápsulas (este lavado se repitió dos veces más). El procedimiento para la extracción con KOH fue muy similar: únicamente difirió en los lavados y en que, en este caso, se llenó la jarra con 300mL de KOH

0'23M (en lugar de H₂SO₄). Para la extracción con KOH, tras los 30 min en ebullición, se lavó 1 vez con agua caliente, una vez con HCl 1% y otra dos veces con agua caliente. La semilla de *P. lunatus* no es excesivamente grasa (como, por ejemplo, la chufa), por lo que, no fue necesario un paso de desengrasado final. Por ello, tras dichas extracciones se procedió al paso de secado y calcinado: se guardó el carrusel con las cápsulas en estufa. Además de las cápsulas, se secaron también crisoles numerados y después del secado se dejó todo enfriar en un desecador durante 30 min. Pasado este tiempo, se pesó un crisol (haciendo uso de nuevo de la balanza de precisión), se anotó el peso (W3) y se taró. A continuación, se pesó una cápsula seca (W4) y se introdujeron los crisoles conteniendo cada cápsula en un horno de cámara/mufla Carbolite CWF 1100 a 450 °C durante 2 h hasta que la cápsula y su contenido se redujeron a cenizas. Finalmente, se dejaron enfriar los crisoles en un desecador y se pesó el crisol con las cenizas (W5) en la balanza de precisión.

Los pesos obtenidos se corrigieron multiplicándolos por un factor de 1000 y, así, se aplicó la siguiente ecuación para calcular el contenido de fibra (en g/100g de materia fresca) de cada muestra de *P. lunatus*:

$$\text{FIBRA (\%)} = (((W3 - ((W1 * 0,99993364) - (W5 - W4 - 1,507))))/W2)) * 100$$

(Ecuación 1)



Figura 12. Sistema de extracción de fibra FT 221 FiberCap™ incluyendo la placa calefactora Foss Tecator 2022 Hot Plate, las jarras de extracción, el carrusel y las cápsulas FiberCap™. Fuente: Severn Sales.

3.4.2.6. Análisis de hidratos de carbono

El contenido en hidratos de carbono (en g/100g de materia fresca) de cada muestra de *P. lunatus* se determinó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{CARBOHIDRATOS (\%)} = 100 - \text{PH} - \text{PM} - \text{PF} - \text{PP} - \text{PG} \quad (\text{Ecuación 2})$$

PH: Porcentaje de humedad; PM: Porcentaje de minerales; PF: Porcentaje de fibra; PP: Porcentaje de proteínas; PG: Porcentaje de grasa

3.4.2.7. Análisis del valor energético.

El valor energético o calórico de las diferentes entradas de *P. lunatus* se calculó teniendo en cuenta que los hidratos de carbono aportan 4 kcal/g, las proteínas aportan 4 kcal/g y las grasas o lípidos aportan 9 kcal/g. Así, este valor se expresó en kcal/100g.

3.4.2.8. Análisis de polifenoles

La determinación de polifenoles se llevó a cabo mediante el método descrito por Singleton y Rossi (1965) con algunas modificaciones.

En primer lugar, se pesaron en tubos Falcon de 15 mL numerados aproximadamente 0,15 g de muestra de *P. lunatus* que se había congelado a -18°C . A continuación, para extraer los polifenoles, se añadieron 6 mL de agua destilada en cada tubo y se agitaron en Vortex durante varios segundos. Se dejaron reposar los tubos durante 5 min en oscuridad. Tras dicho tiempo, se agregaron a cada cubeta desechable de poliestireno óptico 50 μL de sobrenadante de los tubos Falcon, 500 μL de Folin (1:10), se dejó reposar 3 minutos y se adicionaron 500 μL de Na_2CO_3 (60g/L). Además, se debió también preparar el "cero" o "blanco" (con 50 μL de agua destilada en lugar de las muestras de *P. lunatus* de los tubos) y los patrones que sirvieron para construir la curva de calibración (con 50 μL de ácido gálico a diferentes concentraciones: 10, 25, 50, 75, 100 y 150 ppm en vez de muestra). Se dejó reposar en oscuridad durante 1 h y se midió la absorbancia de cada muestra en el espectrofotómetro UviLine 9100/9400 a 750 nm. Previamente a la medida de las muestras de *P. lunatus* y aquellas para la curva de calibración, se debió poner "a cero" o "en blanco" el espectrofotómetro para la calibración de este. Finalmente, tras medir las respectivas absorbancias y haciendo uso de la ecuación de la recta de calibrado obtenida (figura 13), se calculó la concentración de polifenoles en cada muestra.

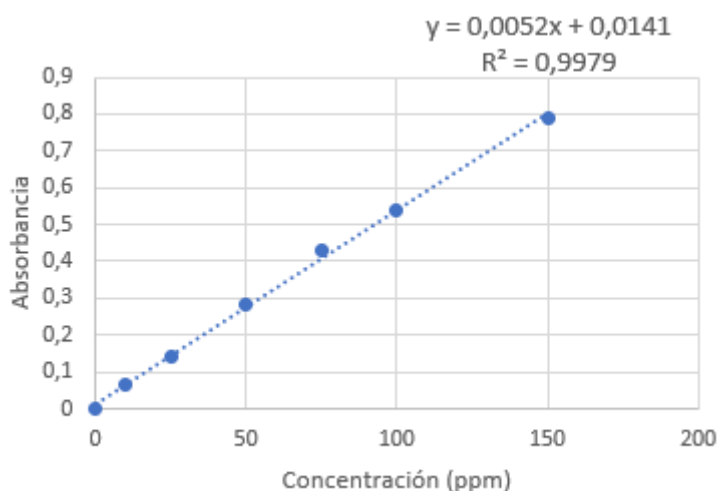


Figura 13. Recta de calibrado de ácido gálico para la determinación del contenido en polifenoles.

Los resultados para el contenido en polifenoles se expresaron en mg/100 g de materia fresca.

3.4.2.9. Análisis de antioxidantes

La determinación del contenido en antioxidantes totales (AOT) se basó en la reducción de 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) como radical libre (Brand-Williams et al., 1995).

Primero, se pesaron 0,1 g de muestra (congelada a -18°C) en tubos Eppendorf de 2 mL numerados y se añadieron 1,5 mL de $\text{MeOH}:\text{HCl}$ (1000:4). El HCl permite mantener los antioxidantes (se

observó que con menor cantidad de HCl no se conseguía la extracción de antioxidantes). A continuación, se agitó cada tubo en Vortex durante 10 s y después se dejaron en el agitador durante 15 min a 200 rpm. Se sacaron las muestras del agitador y se colocaron en la centrífuga a 2500 rpm durante 1 min. Tras dicha centrifugación, se recuperó el sobrenadante (aproximadamente 1 mL) en un nuevo tubo Eppendorf de 2 mL numerado y se guardaron estos nuevos tubos en oscuridad constituyendo, así, el resultado de la primera extracción. Sin embargo, fue necesaria una segunda extracción, por lo que, se repitió el proceso anterior sobre el tubo original donde se habían pesado 0,1 g de muestra; es decir, se volvió a añadir MeOH:HCl (1000:4) aunque en este caso 1 mL, se usó el Vortex durante 10 s, se agitó durante 15 min a 200 rpm y se centrifugó durante 1 min a 2500 rpm. A continuación, se recuperó el sobrenadante resultante de esta segunda extracción y se introdujo en el tubo que contenía el sobrenadante de la primera extracción, es decir, se mezclaron ambos extractos y se guardaron en oscuridad mientras se preparó la solución de DPPH. Para evaluar la actividad antioxidante de compuestos o extractos específicos, estos se dejaron reaccionar con un radical estable, 2,2-Diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH) en una solución de metanol. La reducción del DPPH es monitoreada mediante la disminución en su absorbancia a una característica longitud de onda durante la reacción. En su forma radical, el DPPH absorbe a 515 nm, pero después de la reducción por un antioxidante (AH), la absorción desaparece.



Para preparar 100 mL de dicha disolución, se pesaron en la balanza de precisión aproximadamente 0,0030 g de 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) que se introdujeron en un vaso de precipitado de 100 mL. En este vaso se añadieron 80 o 90 mL de metanol y se disolvió la solución haciendo uso de un agitador magnético durante unos segundos. Una vez disuelto, se vertió la solución en un matraz aforado de 100 mL forrado con papel de aluminio (para evitar que la luz incidiese en el DPPH ya que se trata de un compuesto fotosensible) y, por último, se aforó el matraz con metanol. Una vez lista la solución de DPPH, se pipetearon 100 µL de sobrenadante y 3,9 mL del DPPH en tubos de cristal de 12x75 mm y se taparon y dejaron reaccionar en oscuridad durante 1 h.

Además, durante dicha espera, se debió también preparar el “cero” o “blanco” (llenando la cubeta de vidrio óptico con 1 mL de metanol puro) y los patrones que sirvieron para construir la curva de calibración. La cuantificación de AOT se realizó en base a una recta de calibrado con TROLOX. El compuesto TROLOX (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) es un antioxidante, análogo de la vitamina E, universalmente empleado como estándar en diversos ensayos de actividad antioxidante. Para preparar los patrones se pesaron 0,0626 g de TROLOX y, en un aforado de 25 mL se enrasó con etanol puro. Las soluciones necesarias para la curva fueron 0 – 0,3 – 0,5 – 0,8 – 1 – 1,3 mM ET (equivalentes TROLOX), por lo que, la solución correspondiente a 0 se preparó añadiendo etanol puro en un aforado de 10 mL; la correspondiente a 0,3, se preparó vertiendo 300 µL de la solución de TROLOX y aforando con etanol y, así, con el resto de soluciones (añadiendo 500 µL, 800 µL, 1 mL y 1,3 mL de solución de TROLOX y enrasando con etanol los matraces aforados de 10 mL). Una vez listas las soluciones para obtener la curva de calibración, se añadieron en tubos de cristal de 12x75 mm 100 µL de cada solución de los matraces aforados y 3,9 mL de DPPH, se dejó reaccionar durante varios minutos y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro UviLine 9100/9400 a longitud de onda 515 nm. Finalmente, tras haber dejado las muestras reposando durante una hora, se midieron también en el espectrofotómetro a dicha longitud de onda usando una cubeta de vidrio óptico. A partir de las absorbancias obtenidas y haciendo uso de la ecuación de la recta de calibrado (figura 14), se

calculó la concentración de cada muestra. Los resultados se expresaron en $\mu\text{M ET}/100 \text{ g}$ de materia fresca. La solución DPPH se debió preparar cada día y mantener en oscuridad ya que, como ya se ha mencionado, es un compuesto inestable y fotosensible. En su caso, los patrones de la curva de TROLOX se debieron preparar cada semana.

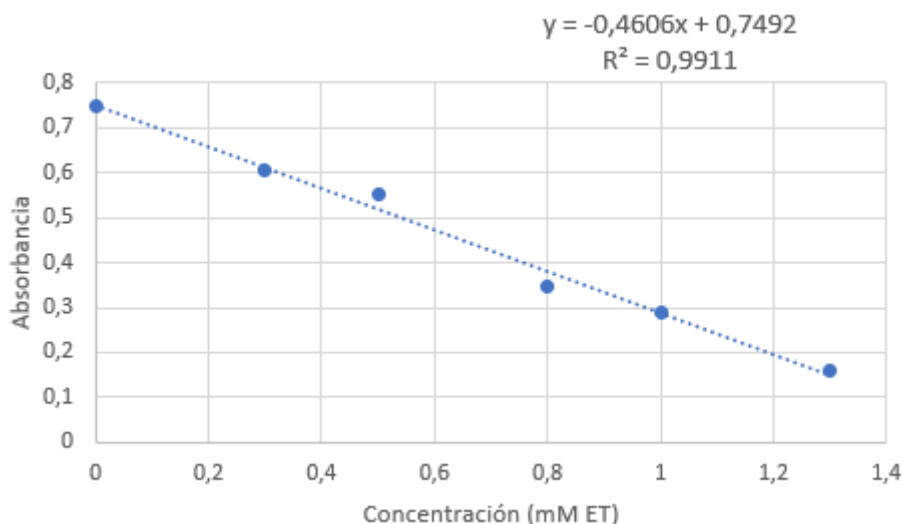


Figura 14. Recta de calibrado de TROLOX para la determinación de antioxidantes totales.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó haciendo uso del programa STATGRAPHICS Centurion XVIII. En primer lugar, se analizó cada variable, es decir, cada componente de calidad nutricional calculando su media, su rango y su coeficiente de variación entre los valores de las distintas entradas.

Por otra parte, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) simple para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las entradas para cada componente de calidad nutricional. Esta técnica recibe este nombre porque la comparación entre las medias la efectúa en base al cálculo de la varianza entre tales medias. El análisis ANOVA (“Analysis Of Variance”) simple o con un factor analiza el comportamiento de una variable dependiente en las subpoblaciones o grupos establecidos por los valores de una única variable (o factor) independiente (en este caso, el componente de calidad nutricional). Se aplica para contrastar la hipótesis nula de que las muestras proceden de subpoblaciones en las que la media de la variable dependiente es la misma; o lo que es lo mismo, no existen diferencias significativas entre las medias observadas y las diferencias son debidas al azar (Rodríguez-Jaume y Mora Catalá, 2001).

Por último, se efectuó un análisis multivariado de componentes principales (ACP) para los datos de calidad nutricional de las distintas entradas. El análisis de componentes principales (ACP) es un algoritmo matemático que reduce la dimensionalidad de los datos mientras conserva la mayor parte de la variación en el conjunto de datos (Jolliffe, 2002). Logra esta reducción al identificar direcciones, llamadas componentes principales, a lo largo de las cuales la variación en los datos es máxima. Al utilizar unos pocos componentes, cada muestra se puede representar con relativamente pocos números en lugar de valores para gran cantidad de variables. Luego, las muestras se pueden trazar, lo que permite evaluar visualmente las similitudes y diferencias entre las muestras y determinar si las muestras se pueden agrupar (Ringnér, 2008).

Además, partiendo de los datos de caracterización fenotípica de dichas entradas también se calcularon las medias, rangos y coeficientes de variación, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) simple y se realizó un ACP.

Finalmente, se efectuó un último análisis multivariado de componentes principales con el total de datos (datos de calidad nutricional y fenotipado) y se obtuvieron los coeficientes de correlación de Pearson con el objetivo de encontrar una posible relación entre los distintos caracteres.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

Para estudiar las diferencias en cuanto a características morfológicas entre las distintas entradas de “Garrofo”, se analizaron los datos obtenidos en la evaluación para los diferentes descriptores de *P. lunatus* usados, obteniendo los resultados que a continuación se presentan. La tabla resumen de los 12 descriptores utilizados para la caracterización fenotípica (Tabla 4) muestra la ausencia de caracteres monomórficos y la elevada variabilidad de algunos de ellos, como es el caso del patrón de color, la forma del pico de la vaina y especialmente el patrón de la cubierta de la semilla. Esto se ve corroborado por el amplio rango y coeficiente de variación obtenido para estos caracteres. Además, cabe destacar que la gran mayoría de las entradas de “Garrofo” estudiadas en este ensayo (excepto las entradas 11, 17 y 26) presentan un patrón de crecimiento indeterminado.

Al realizar un análisis de varianza (ANOVA) simple, aunque los 12 descriptores utilizados mostraron variación, solo se observaron diferencias significativas en 7 de los mismos: patrón de crecimiento, patrón de color, patrón de la cubierta de la semilla, peso de la semilla, forma del pico de la vaina, longitud de la vaina y número de semillas por vaina (Tabla 4).

Tabla 4. Media, rango, coeficiente de variación y significancia estadística de cada uno de los descriptores de *P. lunatus* evaluados para las 33 entradas cultivadas en el ensayo.

CARACTERÍSTICA	UNIDAD DE MEDIDA	MEDIA	RANGO ^b	COEFICIENTE DE VARIACIÓN
PATRÓN DE CRECIMIENTO	Ir a Tabla 3	1,90909	1,0-2,0***	15,2919%
PATRÓN DE COLOR	Ir a Tabla 3	3,8103	2,0-5,5*	24,1353%
PATRÓN DE CUBIERTA DE LA SEMILLA	Ir a Tabla 3	7,17152	1,0-12,17***	47,2316%
FORMA DE LA SEMILLA	Ir a Tabla 3	11,8103	10,75-12,0 ^{ns}	2,69727%
LONGITUD DE LA SEMILLA	mm	21,4576	19,17-24,42 ^{ns}	5,3347%
ANCHURA DE LA SEMILLA	mm	12,5236	9,75-15,67 ^{ns}	10,1075%
PESO DE LA SEMILLA	mg	1,51	1,19-1,95**	9,13901%
LONGITUD DEL RACIMO FLORAL	cm	23,9806	15,25-29,58 ^{ns}	14,1529%
FORMA DEL PICO DE LA VAINA	Ir a Tabla 3	1,32333	0,33-2,0*	28,331%
ANCHURA DE LA VAINA	cm	2,93576	2,67-3,18 ^{ns}	5,15536%
LONGITUD DE LA VAINA	cm	14,8612	11,67-17,21***	8,88552%
Nº DE SEMILLAS POR VAINA	Ir a Tabla 3	2,71485	1,33-3,5*	14,4684%

ns: no significativo; *: significativo $p \leq 0,05$; **: significativo $p \leq 0,01$; ***: significativo $p \leq 0,001$

Al realizar el análisis de componentes principales (ACP), se vio que la componente principal 1 explicó el 24,626% de la variación observada en la colección probada y la componente principal 2, el 22,992%. Los tres caracteres que afectaron más positivamente a la componente 1 fueron la anchura de la vaina, la longitud de la vaina y la anchura de la semilla (seguido muy de cerca por el patrón de crecimiento); los tres caracteres que más afectaron de forma negativa fueron la forma de la semilla, la longitud del racimo floral y la forma del pico de la vaina. Para la componente 2, los tres caracteres que más influyeron positivamente fueron la longitud, la anchura y el peso de la semilla; y los tres que afectaron de forma negativa, la forma del pico de la vaina, la longitud y la anchura de la vaina (Tabla 5).

Tabla 5. Valores principales para las dos primeras componentes principales (PCs) con los descriptores cuantitativos y pseudo-cuantitativos de *P. lunatus* para las 33 entradas cultivadas en el ensayo.

COMPONENTE	EJE PC ^a	
	PC1	PC2
Valores propios	2,46256	2,29921
Porcentaje de la variación que explica	24,626	22,992
Porcentaje acumulado de variación explicada	24,626	47,618
Carácter (vectores principales)		
PATRÓN DE CRECIMIENTO	0,344509	-0,124432
FORMA DE LA SEMILLA	-0,334992	0,189231
LONGITUD DE LA SEMILLA	0,266099	0,539063
ANCHURA DE LA SEMILLA	0,344561	0,510536
PESO DE LA SEMILLA	0,19569	0,363032
LONGITUD DEL RACIMO FLORAL	-0,333397	0,133366
FORMA DEL PICO DE LA VAINA	-0,0601482	-0,300493
ANCHURA DE LA VAINA	0,456021	-0,264247
LONGITUD DE LA VAINA	0,413988	-0,278453
NÚMERO DE SEMILLAS POR VAINA	0,217153	-0,10117

En el ACP se observó una distribución amplia de las entradas sin agrupaciones evidentes (Figura 15) que indica una gran variabilidad para la colección de entradas estudiadas. Como ya se ha mencionado, del total de los materiales utilizados para el ensayo, tres de ellos han mostrado tipo de crecimiento determinado. Estos son las entradas 11, 17 y 26, correspondientes a las variedades ‘PH-BENAVITES-1’, ‘PH-BENAVITES-2’ y ‘PH-ANNA-1’. Los materiales restantes han mostrado el tipo de crecimiento indeterminado. Esta característica, junto a la elevada longitud del racimo floral de estas entradas, justifica su posición en el gráfico y las diferencia de la mayoría de las entradas de crecimiento indeterminado. Además, la representación gráfica (Figura 15) de los resultados del Análisis de Componentes Principales con los descriptores de caracterización fenotípica muestra que, además de las entradas de crecimiento determinado, los controles 34 y 35 y las entradas 5, 8, 23 y 27 difieren de la homogeneidad del grupo.

En el caso de las entradas 34 y 35, se corresponden con los controles comerciales “Garrofón Algitama” comprado en la cadena de supermercados “CONSUM” con origen Perú y obtenido a partir del cultivo en València (entrada 34) y “Garrofón Valenciano” de la casa Mascarell (entrada 35). Para justificar su posición es necesario remitirse a la Tabla 5, donde se observa que la posición de las entradas 34 y 35 responde a los descriptores de peso, longitud y anchura de la

semilla. Esto se debe a que la entrada 34 es la que presenta el mayor peso de semilla (1,95 mg) de toda la colección (lo que la diferencia principalmente del “Garrofó Valencià”) y una elevada anchura y longitud de semilla; mientras que, la entrada 35 es la que presenta mayor longitud (24,42 mm) y anchura de semilla (15,67 mm) de toda la colección y semilla de elevado peso. Así, cabe destacar que, como era de esperar los descriptores de anchura y longitud de la semilla están directamente relacionados y, por tanto, las entradas con mayor anchura de semilla también suelen presentar una mayor longitud, y viceversa.

Por su parte, las entradas 5 y 8 (correspondientes a ‘PH-AGULLENT-1’ y ‘PH-SOLLER-1’, respectivamente) también aparecen representadas fuera del conjunto de datos debido principalmente al largo racimo floral que poseen. Además, la entrada 5 aparece representada en el cuadrante inferior del gráfico puesto que es la entrada que muestra los valores más bajos en cuanto a peso (1,24 mg) y longitud de semilla (19,17 mm) y la segunda entrada con los valores más bajos en lo relativo a la anchura de semilla (10,25 mm).

Por último, las entradas 23 (‘PH-CARCAIXENT-3’) y 27 (‘PH-CATARROJA-2’) son las más situadas a la derecha del gráfico. Esto puede deberse principalmente a la elevada anchura de vaina observada en estas entradas, además de otras características (como la forma de la semilla) que contribuyen en menor medida a su posición en el gráfico. Asimismo, la baja longitud y peso de semilla de la entrada 27 justifica que esté ubicada en la mitad inferior.

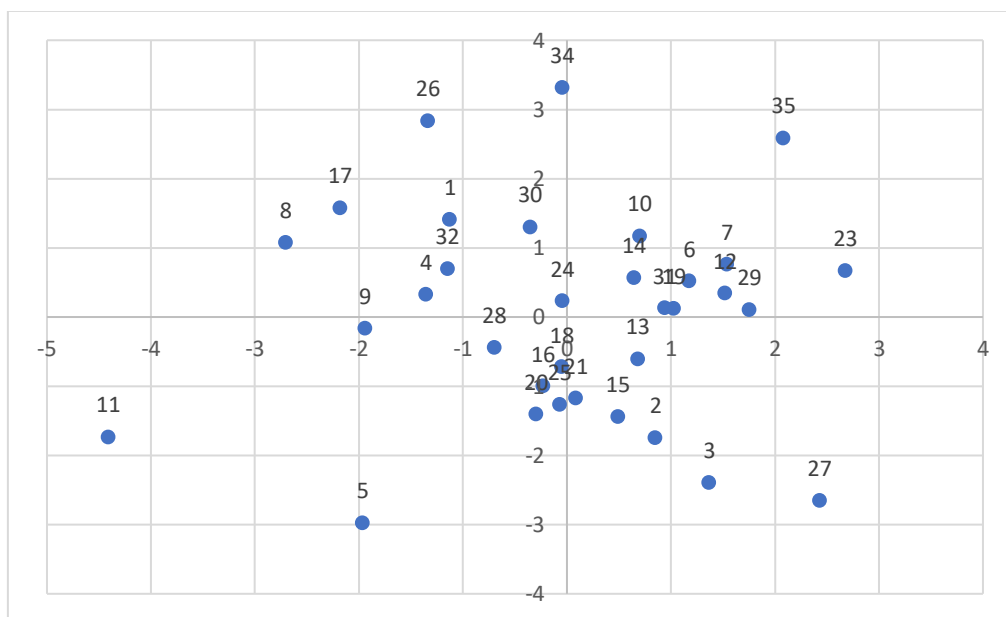


Figura 15. Representación gráfica de la distribución obtenida tras el análisis ACP, con los descriptores cuantitativos y pseudo-cuantitativos de *P. lunatus*, para las 33 entradas cultivadas.

Para estudiar mejor el comportamiento de los descriptores cualitativos, se han representado gráficamente en los histogramas de las Figura 16 y 17.

Para el carácter “Patrón de color de la semilla” se puede observar la variabilidad existente en las entradas de la colección y aparece el color rojo-púrpura como patrón predominante. Además, 10 de las entradas mostraron un patrón de color marrón oscuro, 5 exhibieron un patrón marrón claro y únicamente la entrada 24 (‘PH-(IVIA, 106-1)-1’) mostró un patrón de color negro (Figura 16).

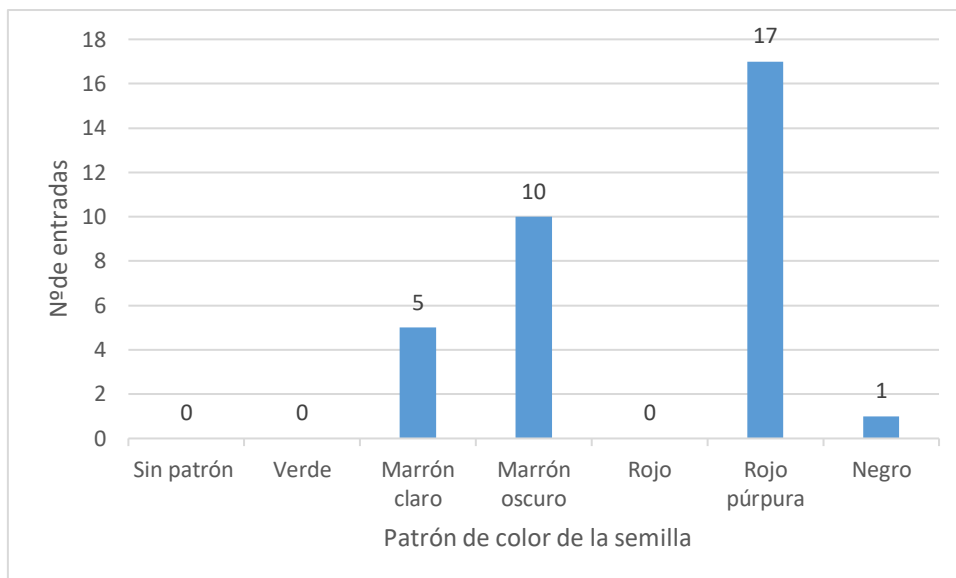


Figura 16. Histograma para el descriptor de *P. lunatus* “Patrón de color de la semilla” para todas las entradas de la colección evaluada.

La Figura 17 representa la variabilidad existente en las entradas de la colección para el descriptor “Patrón de cubierta de la semilla”, siendo el patrón más repetido el 6: “Ojo ligado a otras partes del patrón, manchas en la región del hilo (más desarrolladas hacia el micrópilo), algunas motas pueden estar presentes”. Sin embargo, entre las entradas de la colección también destacaron los patrones 12 (“Cuerpo moderadamente moteado, algunas unidas para formar una mancha”) y 1 (“Patrón alrededor del ojo solamente”).

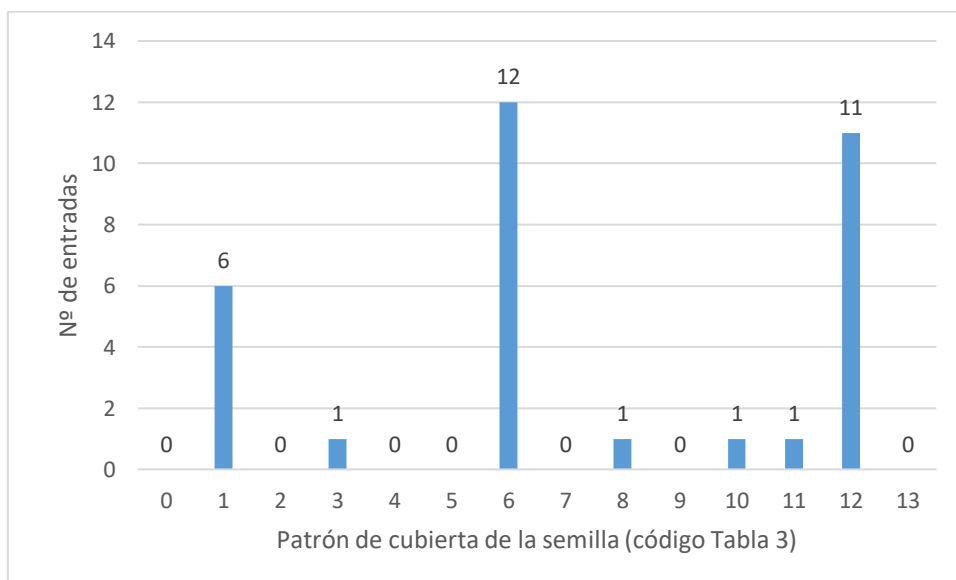


Figura 17. Histograma para el descriptor de *P. lunatus* “Patrón de cubierta de la semilla” para todas las entradas de la colección evaluada.

4.2. CARACTERIZACIÓN DE COMPOSICIÓN

Con el objetivo de determinar la variabilidad en cuanto a composición nutricional en la colección de entradas de *Phaseolus lunatus*, se procedió a analizar los datos obtenidos para los diferentes parámetros de calidad nutricional estudiados, obteniendo los resultados que a continuación se presentan.

Comparando las medias obtenidas para los caracteres de calidad evaluados en este ensayo (Tabla 6) con los datos de las variedades americanas de *P. lunatus* “large lima” y “baby lima” (Tabla 1) se confirma que esta especie se caracteriza por una baja cantidad de humedad, un bajo contenido en grasa y un elevado contenido en proteína y carbohidratos (Nwokolo, 1996). Sin embargo, en este estudio se observa un menor porcentaje en proteína y un mayor contenido en fibra (Tabla 6) que puede ser debido a las condiciones edafoclimáticas y prácticas de cultivo. En este sentido, el menor porcentaje en proteína puede ser debido a que los suelos valencianos con bajos niveles de nitrógeno estén afectando directamente a la síntesis de proteínas (Comunicación personal, Dra. García). Estos valores de porcentaje en proteína y fibra afectan directamente al contenido final de carbohidratos (Ecuación 2). Además, se aprecia un amplio rango y coeficiente de variación para el contenido en fibra como consecuencia de haberse empleado un método gravimétrico para su análisis (Comunicación personal, Dra. García). Por otra parte, como ya se ha mencionado, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) simple para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las entradas para cada parámetro de calidad nutricional. Así, se observaron diferencias significativas para todos los caracteres excepto para el contenido en minerales, que no varió apenas entre las distintas entradas (Tabla 6). Esto muestra la diversidad existente para los parámetros de calidad entre las entradas de la colección.

Tabla 6. Media, rango, coeficiente de variación y significancia estadística de cada uno de los caracteres de calidad evaluados para las 34 entradas estudiadas en el ensayo.

CARACTERÍSTICA	UNIDAD DE MEDIDA	MEDIA	RANGO ^b	COEFICIENTE DE VARIACIÓN
MATERIA SECA	g/100g	91,3579	89,2388-92,2769***	0,715223%
GRASA	g/100g	0,714757	0,460913-0,938434***	15,0726%
PROTEÍNA	g/100g	16,6707	13,8182-25,0628***	13,4273%
FIBRA	g/100g	14,3548	6,846-25,838***	33,7209%
MINERALES	g/100g	5,16641	4,16329-5,91547 ^{ns}	6,46942%
CARBOHIDRATOS	g/100g	54,4513	40,6008-64,5186***	11,6937%
POLIFENOLES	mg/100g	320,773	266,603-422,067***	13,2934%
ANTIOXIDANTES	μM ET/100g	1384,7	711,122-1773,79**	14,388%
VALOR ENERGÉTICO	kcal/100g	290,921	245,816-319,348***	6,54126%

ns: no significativo; *: significativo $p \leq 0,05$; **: significativo $p \leq 0,01$; ***: significativo $p \leq 0,001$

El resultado del análisis de componentes principales (ACP), permitió observar la distribución de las entradas según los caracteres evaluados de una forma rápida y visual. La componente principal 1 explicó el 45,602% de la variación observada en la colección probada y la componente principal 2, el 21,358%. Los tres caracteres que afectaron más positivamente a la componente 1 fueron el contenido en fibra, en proteína y en grasa; los tres caracteres que más afectaron de forma negativa fueron el contenido en carbohidratos, el valor energético y el contenido en antioxidantes. Para la componente 2, los tres caracteres que más influyeron positivamente fueron el porcentaje de materia seca y el contenido en polifenoles y en minerales; y los que afectaron de forma negativa, el contenido en antioxidantes y en fibra (Tabla 7).

Tabla 7. Valores principales para las dos primeras componentes principales (PCs) con los caracteres de calidad evaluados para las 34 entradas estudiadas en el ensayo.

COMPONENTE	EJE PC ^a	
	PC1	PC2
Valores propios	4,1042	1,92219
Porcentaje de la variación que explica	45,602	21,358
Porcentaje acumulado de variación explicada	45,602	66,96
Carácter (vectores principales)		
MATERIA SECA	0,034902	0,600533
GRASA	0,376695	0,0487825
PROTEÍNA	0,3868	0,174605
FIBRA	0,454434	-0,148616
MINERALES	-0,0687989	0,397788
CARBOHIDRATOS	-0,480626	0,0915147
POLIFENOLES	0,0690334	0,503116
ANTIOXIDANTES	-0,254606	-0,348958
VALOR ENERGÉTICO	-0,442079	0,207121

En el ACP se observó una distribución amplia de las entradas sin agrupaciones evidentes (Figura 18). Esta distribución muestra una gran variabilidad en cuanto a composición que presentaron las entradas estudiadas. A pesar de esta amplia distribución, la mayor parte de las entradas se encuentran situadas en torno al 0 (incluido el control 34); sin embargo, el control 35, el control “Perú” y la entrada 11 se sitúan fuera del conjunto.

El control denominado “Perú” correspondiente a semillas secas de “Garrofón Algitama” (origen Perú) compradas en la cadena de supermercados “CONSUM” se encuentra muy separado en el gráfico de la entrada 34 (muestra de semillas obtenidas a partir del cultivo en València de las semillas secas citadas anteriormente) lo que indica que las condiciones edafoclimáticas y las técnicas de cultivo parecen haber afectado directamente a las características de composición y calidad de la semilla.

Al estudiar las componentes que determinan la posición (Tabla 7), podemos determinar que los descriptores que más peso tienen para explicar la posición en el cuadrante inferior de la entrada “Perú” (semillas originales cultivadas en Perú) son la cantidad de materia seca y el contenido en polifenoles y en minerales. Así, esta entrada es la que muestra los valores más bajos de toda la colección en cuanto a materia seca (89,24%) y minerales (4,16%) y de los más bajos en cuanto a polifenoles. Estos resultados vuelven a sugerir que las características diferenciales en cuanto a composición entre el “Garrofó Valencià” y el procedente de Perú posiblemente se deban a las condiciones edafoclimáticas y las técnicas de cultivo empleadas. Por otra parte, los descriptores que permiten justificar la posición más alejada a la derecha de la entrada 35 (control comercial “Garrofón Valenciano” de la casa Mascarell) son el contenido en fibra y en carbohidratos debido a que es la entrada que presentó un mayor contenido en fibra (25,84%) y la segunda con menor contenido en carbohidratos (43,44%). Por último, en la zona superior derecha de la figura 18 aparece la entrada 11 de crecimiento determinado correspondiente a ‘PH-BENAVITES-1’. Las otras 2 entradas de crecimiento determinado (las entradas 17 y 26, correspondientes a ‘PH-BENAVITES-2’ y ‘PH-ANNA-1’) se sitúan significativamente alejadas de la entrada 11, aunque

son de las entradas que más se asemejan a sus características de composición. Esto muestra que, además del tipo de crecimiento, parece que hay otros componentes comunes que las diferencian de las entradas con crecimiento indeterminado. Por ejemplo, el contenido en carbohidratos, ya que estas entradas de crecimiento determinado presentan valores de los más bajos de toda la colección; lo que explica que estén ubicadas en la zona derecha de la representación gráfica del ACP. Así, según los componentes que determinan la posición (Tabla 7), podemos determinar que los descriptores que más peso tienen para explicar el distanciamiento de la entrada 11 son la cantidad de materia seca y el contenido en polifenoles, en proteínas y en grasa. Esto se debe a que esta entrada es la que muestra los valores más altos de toda la colección en cuanto a contenido en proteínas (25,06%) y de los más altos en lo relativo a materia seca, grasa y polifenoles. Por lo tanto, los resultados observados sugieren que la entrada 11 ('PH-BENAVITES-1') se trata de una entrada muy prometedora en cuanto a calidad.

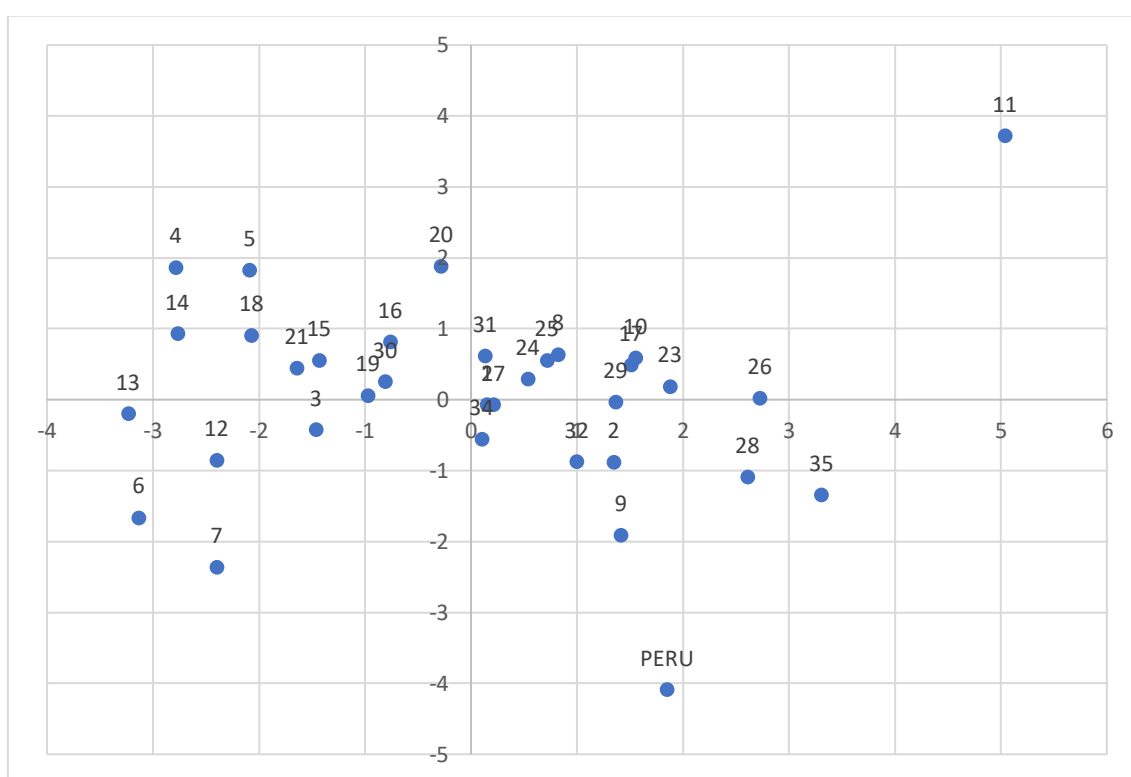


Figura 18. Representación gráfica de la distribución obtenida tras el análisis ACP, con los componentes de calidad nutricional, para las 34 entradas evaluadas.

4.3. CONSIDERACIÓN CONJUNTA

Al realizar un nuevo análisis de componentes principales (ACP) considerando de forma conjunta la caracterización de composición y la caracterización fenotípica, la componente principal 1 explicó el 26,253% de la variación observada en la colección probada y la componente principal 2, el 16,976%. Los tres caracteres que afectaron más positivamente a la componente 1 fueron el contenido en carbohidratos, el valor energético y el patrón de crecimiento; los tres caracteres que más afectaron de forma negativa fueron el contenido en proteína, en fibra y en grasa. Para la componente 2, los tres caracteres que más influyeron positivamente fueron la anchura, la longitud y el peso de la semilla; y los tres que afectaron de forma negativa, el contenido en polifenoles, la cantidad de materia seca y la forma del pico de la vaina (Tabla 8).

Tabla 8. Valores principales para las dos primeras componentes principales (PCs) con los descriptores cuantitativos y pseudo-cuantitativos de *P. lumatus* y caracteres de calidad evaluados para las 33 entradas cultivadas en el ensayo.

COMPONENTE	EJE PC ^a	
	PC1	PC2
Valores propios	4,98811	3,22544
Porcentaje de la variación que explica	26,253	16,976
Porcentaje acumulado de variación explicada	26,253	43,229
Carácter (vectores principales)		
MATERIA SECA	-0,140119	-0,295304
GRASA	-0,312864	-0,0635077
PROTEÍNA	-0,378917	-0,0153642
FIBRA	-0,36512	0,215941
MINERALES	-0,0628631	-0,167661
CARBOHIDRATOS	0,410184	-0,176425
POLIFENOLES	-0,125226	-0,320391
ANTIOXIDANTES	0,242674	0,158815
VALOR ENERGÉTICO	0,352799	-0,246555
PATRÓN DE CRECIMIENTO	0,29996	0,0531519
FORMA DE LA SEMILLA	-0,127019	-0,0495115
LONGITUD DE LA SEMILLA	-0,0157991	0,447013
ANCHURA DE LA SEMILLA	0,03597	0,485224
PESO DE LA SEMILLA	0,078004	0,272751
LONGITUD DEL RACIMO FLORAL	-0,180541	-0,0352942
FORMA DEL PICO DE LA VAINA	0,0810825	-0,270489
ANCHURA DE LA VAINA	0,112575	0,0710235
LONGITUD DE LA VAINA	0,18757	0,121211
NÚMERO DE SEMILLAS POR VAINA	0,183266	0,0701445

En el ACP se observó, nuevamente, una distribución amplia de las entradas sin agrupaciones evidentes (Figura 19). La figura 19 muestra la distribución gráfica de las entradas, en función de los resultados obtenidos en el Análisis de Componentes Principales, donde se puede ver que la mayor parte de las entradas aparecen en el centro y no se detecta la existencia de agrupaciones claras. Únicamente, se puede observar la agrupación de las tres accesiones de crecimiento determinado, que son la 11, 17 y 26 correspondientes a ‘PH-BENAVITES-1’, ‘PH-BENAVITES-2’ y ‘PH-ANNA-1’. La posición de estas viene determinada, de nuevo, por el patrón de crecimiento y la gran longitud de sus racimos florales. Además, el elevado contenido en materia seca, polifenoles, proteínas y grasa de la entrada 11 evidencia su posición en la esquina inferior izquierda del gráfico. Por otra parte, también se podrían agrupar las entradas 6, 7, 12 y 13 situadas en la mitad derecha del gráfico. Estas accesiones son las correspondientes a ‘PH-VILAFAMES-1’, ‘PH-NULES-1’, ‘PH-MUTXAMEL-1’ y ‘PH-FOIOS-1’, respectivamente y su posición en el gráfico está justificada por su bajo contenido en grasa, en proteína y en fibra y su elevado contenido en carbohidratos. Además, al estudiar las componentes que determinan la posición (Tabla 8), podemos determinar que de los descriptores utilizados para realizar el Análisis de Componentes Principales, el contenido en fibra, la longitud, la anchura y el peso de la semilla

justifican la posición más alejada de las entradas 5 ('PH-AGULLENT-1') y 35 (control comercial "Garrofón Valenciano" de la casa Mascarell) en la gráfica de distribución como se puede corroborar con la figura 19; ya que la entrada 35 presenta de los valores más elevados para estos descriptores, mientras que la entrada 5 posee de los valores más bajos.

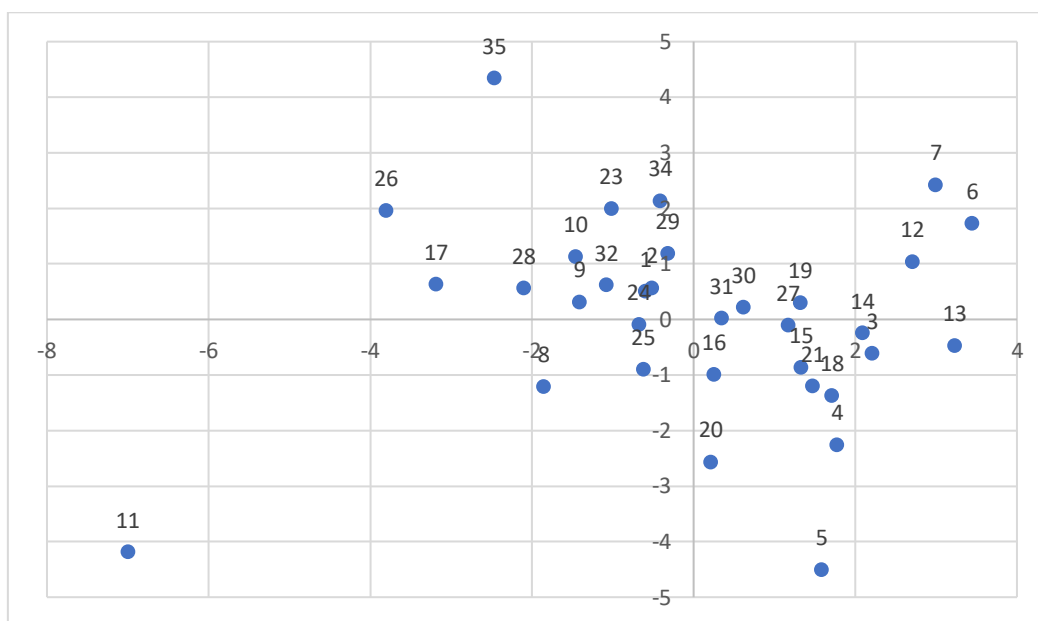


Figura 19. Representación gráfica de la distribución obtenida tras el análisis ACP, con los descriptores cuantitativos y pseudo-cuantitativos de *P. lunatus* y caracteres de calidad evaluados para las 33 entradas cultivadas en el ensayo.

4.4. ESTUDIO DE LAS CORRELACIONES ENTRE CARACTERES

El análisis de correlación mostró, sirviéndose de los correspondientes coeficientes de correlación de Pearson, que algunas de las características estudiadas se encontraban correlacionadas y presentaban una dependencia lineal (Tabla 9).

En primer lugar, se observaron correlaciones positivas muy significativas ($P < 0,001$) entre grasa y proteína y entre grasa y fibra; y, algo menos significativas ($P < 0,01$) entre proteína y fibra. Se presentaron, además, correlaciones negativas muy significativas entre estos 3 componentes y el contenido en carbohidratos. Así, cabe destacar la correlación negativa tan fuerte observada entre el contenido en fibra y el contenido en carbohidratos, siendo el coeficiente de correlación de Pearson de -0,9516 (la segunda mayor correlación observada en este estudio). Por otra parte, tanto grasa como proteína y, especialmente, fibra mostraron correlaciones negativas con el valor energético total; a diferencia de lo ocurrido entre el contenido en carbohidratos y el valor energético, que presentaron una fuerte correlación. Esto se debe al elevado contenido en carbohidratos del cultivo de *P. lunatus* (Nwokolo, 1996), por lo que, estos contribuyen en mayor medida al valor energético total. Por su parte, la fibra, debido a la dificultad para ser digerida, no fue considerada a la hora de calcular el valor energético y, por ello, la correlación entre el contenido en fibra y el valor energético mostró el mayor coeficiente negativo del estudio (-0,9925).

El contenido en proteínas mostró, a su vez, correlaciones negativas con el contenido en antioxidantes y el patrón de crecimiento. Esta última se trata de una de las pocas correlaciones obtenidas entre un carácter de composición y uno fenotípico; los otros casos son: la correlación negativa entre el contenido en polifenoles y la longitud de la vaina y la correlación positiva entre

los carbohidratos y el patrón de crecimiento. Como se ha mencionado en el ACP, las entradas con crecimiento determinado mostraron valores de los más bajos de toda la colección en cuanto a cantidad de carbohidratos.

Por último, como era de esperar, se observaron fuertes correlaciones positivas ($P < 0,001$) entre la anchura y la longitud de la vaina y entre la anchura y la longitud de la semilla. También cabe destacar la correlación negativa mostrada entre el patrón de crecimiento y la longitud del racimo floral (como se ha mencionado en el ACP, las entradas con crecimiento determinado mostraron elevada longitud del racimo floral).

Tabla 9. Coeficientes de correlación de Pearson correspondientes a los caracteres de calidad y composición evaluados para las 33 entradas cultivadas en el ensayo.

	GRA	PRO	FIB	MIN	CAR	POL	ANT	MS	VE	PCR	FS	LS	AS	PS	LR	FP	AV	LV	Nº S/V
GRA		0,6066 ***	0,5692 ***	-0,1613 ns	-0,641 ***	0,2918 ns	-0,3474 *	0,23 ns	-0,5185 **	-0,197 ns	0,0249 ns	-0,1899 ns	-0,1604 ns	-0,0117 ns	0,1623 ns	0,1749 ns	-0,0774 ns	-0,4014 *	-0,3066 ns
PRO	0,6066 ***		0,5295 **	0,1483 ns	-0,7553 ***	0,2548 ns	-0,4762 **	0,2584 ns	-0,5044 **	-0,6656 ***	0,1485 ns	0,0165 ns	-0,0568 ns	-0,0948 ns	0,3038 ns	-0,2459 ns	-0,1055 ns	-0,3639 *	-0,3502 *
FIB	0,5692 ***	0,5295 **		-0,0685 ns	-0,9516 ***	-0,0285 ns	-0,3435 **	0,0983 ns	-0,9925 ***	-0,3729 *	0,1198 ns	0,2457 ns	0,1638 ns	-0,0638 ns	0,212 ns	-0,2339 ns	-0,0062 ns	-0,0689 ns	-0,2555 ns
MIN	-0,1613 ns	0,1483 ns	-0,0685 ns		-0,0203 ns	0,0059 ns	0,1537 ns	0,2622 ns	0,0351 ns	-0,3997 *	0,1698 ns	-0,1384 ns	-0,2681 ns	-0,3085 ns	0,2324 ns	-0,1327 ns	-0,1265 ns	-0,1271 ns	-0,0549 ns
CARB	-0,641 ***	-0,7553 ***	-0,9516 ***	-0,0203 ns		-0,0467 ns	0,3987 *	-0,0972 ns	0,9464 ***	0,5263 **	-0,146 ns	-0,2061 ns	-0,1243 ns	0,0732 ns	-0,2757 ns	0,2843 ns	0,0652 ns	0,1848 ns	0,2978 ns
POLIF	0,2918 ns	0,2548 ns	-0,0285 ns	0,0059 ns	-0,0467 ns		-0,3525 *	0,3178 ns	0,0735 ns	-0,2126 ns	0,004 ns	-0,2193 ns	-0,4022 *	-0,2576 ns	-0,0614 ns	0,2572 ns	-0,2394 ns	-0,4662 **	-0,1116 ns
ANTIOX	-0,3474 *	-0,4762 **	-0,3435 ns	0,1537 ns	0,3987 *	-0,3525 *		-0,3775 *	0,2894 ns	0,3499 *	-0,1511 ns	0,2051 ns	0,1846 ns	0,2919 ns	-0,0915 ns	-0,1188 ns	-0,0877 ns	0,1003 ns	0,1862 ns
MAT SECA	0,23 ns	0,2584 ns	0,0983 ns	0,2622 ns	-0,0972 ns	0,3178 ns	-0,3775 *		0,0044 ns	-0,1977 *	0,0771 ns	-0,2539 ns	-0,3967 *	-0,2737 ns	0,0908 ns	0,1746 ns	0,1872 ns	-0,1133 ns	-0,3477 *
VAL ENERG	-0,5185 **	-0,5044 **	-0,9925 ***	0,0351 ns	0,9464 ***	0,0735 ns	0,2894 ns	0,0044 ns		0,3779 *	-0,1234 ns	-0,2776 ns	-0,2014 ns	0,0523 ns	-0,2162 ns	0,2724 ns	0,0332 ns	0,0539 ns	0,2165 ns
PAT CREC	-0,197 ns	-0,6656 ***	-0,3729 *	-0,3997 *	0,5263 **	-0,2126 ns	0,3499 *	-0,1977 *	0,3779 *		-0,1911 ns	0,0113 ns	0,1044 ns	0,2779 ns	-0,4802 **	0,325 ns	0,2699 ns	0,1735 ns	0,0393 ns
FORMA SEM	0,0249 ns	0,1485 ns	0,1198 ns	0,1698 ns	-0,146 ns	0,004 ns	-0,1511 ns	0,0771 ns	-0,1234 ns	-0,1911 ns		-0,1207 ns	-0,1522 ns	0,1189 ns	-0,0633 ns	-0,3136 ns	-0,4327 *	-0,32 ns	-0,3402 ns
LONG SEM	-0,1899 ns	0,0165 ns	0,2457 ns	-0,1384 ns	-0,2061 ns	-0,2193 ns	0,2051 ns	-0,2539 ns	-0,2776 ns	0,0113 ns	-0,1207 ns		0,8772 ***	0,3815 *	0,045 ns	-0,3555 *	-0,0744 ns	-0,0275 ns	0,0269 ns
ANCH SEM	-0,1604 ns	-0,0568 ns	0,1638 ns	-0,2681 ns	-0,1243 ns	-0,4022 *	0,1846 ns	-0,3967 *	-0,2014 ns	0,1044 ns	-0,1522 ns	0,8772 ***		0,4894 **	0,0283 ns	-0,3119 *	0,0721 ns	0,0324 ns	0,1484 ns
PESO SEM	-0,0117 ns	-0,0948 ns	-0,0638 ns	-0,3085 ns	0,0732 ns	-0,2576 ns	0,2919 ns	-0,2737 ns	0,0523 ns	0,2779 ns	0,1189 ns	0,3815 *	0,4894 **		-0,1597 ns	0,0188 ns	0,0585 ns	-0,1797 ns	-0,2407 ns
LONG RACIM	0,1623 ns	0,3038 ns	0,212 ns	0,2324 ns	-0,2757 ns	-0,0614 ns	-0,0915 ns	0,0908 ns	-0,2162 ns	-0,4802 **	-0,0633 ns	0,045 ns	0,0283 ns	-0,1597 ns		0,1785 ns	-0,3756 *	-0,3436 ns	-0,0281 ns
FORMA PICO	0,1749 ns	-0,2459 ns	-0,2339 ns	-0,1327 ns	0,2843 ns	0,2572 ns	-0,1188 ns	0,1746 ns	0,2724 ns	0,325 ns	-0,3136 ns	-0,3555 *	-0,3119 ns	0,0188 ns	0,1785 ns		0,0288 ns	-0,085 ns	-0,1325 ns
ANCH VAINA	-0,0774 ns	-0,1055 ns	-0,0062 ns	-0,1265 ns	0,0652 ns	-0,2394 ns	-0,0877 ns	0,1872 ns	0,0332 ns	0,2699 ns	-0,4327 *	-0,0744 ns	0,0721 ns	0,0585 ns	-0,3756 *	0,0288 ns		0,6392 ***	0,1055 ns
LONG VAINA	-0,4014 *	-0,3639 *	-0,0689 ns	-0,1271 ns	0,1848 ns	-0,4662 **	0,1003 ns	-0,1133 ns	0,0539 ns	0,1735 ns	-0,32 ns	-0,0275 ns	0,0324 ns	-0,1797 ns	-0,3436 ns	-0,085 ns	0,6392 ***		0,2761 ns
Nº SEM/VAI	-0,3066 ns	-0,3502 *	-0,2555 ns	-0,0549 ns	0,2978 ns	-0,1116 ns	0,1862 ns	-0,3477 *	0,2165 ns	0,0393 ns	-0,3402 ns	0,0269 ns	0,1484 ns	-0,2407 ns	-0,0281 ns	0,1325 ns	0,1055 ns	0,2761 ns	

ns: no significativo; *: significativo $p \leq 0,05$; **: significativo $p \leq 0,01$; ***: significativo $p \leq 0,001$

5. CONCLUSIONES

- La colección de variedades locales estudiadas presentó una elevada variabilidad fenotípica, especialmente para el patrón de crecimiento, patrón de color, patrón de la cubierta de la semilla, peso de la semilla, forma del pico de la vaina, longitud de la vaina y número de semillas por vaina. Por otra parte, la colección de variedades locales estudiadas presentó una elevada variabilidad para todos los parámetros de calidad, excepto para el contenido en minerales. Esto hace que la colección empleada constituya un germoplasma muy interesante para la futura mejora genética del “Garrofó”.
- El estudio realizado pone de manifiesto que en València existen tipos de “Garrofó” intermedios o mezcla entre las tipologías clásicas ‘Ull de Perdiu’, ‘De la Cella’ y ‘Pintat’.

- Los resultados obtenidos indican que, además del hábito de crecimiento, hay parámetros de calidad comunes (como el contenido en carbohidratos) que diferencian las entradas con crecimiento determinado de aquellas con crecimiento indeterminado.
- La entrada 11 ('PH-BENAVITES-1') destacó por su alto contenido en materia seca, grasa, polifenoles y, especialmente, en proteínas. Por lo tanto, esta entrada demostró ser muy prometedora en cuanto a calidad.
- Al comparar el control denominado "Perú" (semillas secas de origen Perú) y la entrada 34 (semillas obtenidas a partir del cultivo en València de las semillas secas citadas anteriormente) se observó que presentaron un perfil de calidad desigual, lo que indica que las condiciones edafoclimáticas y las técnicas de cultivo valencianas parecen afectar a los parámetros de calidad de la semilla siendo estas (cantidad de materia seca, contenido en polifenoles y contenido en minerales). Estos contenidos son mayores en las producciones valencianas.
- En base a los correspondientes coeficientes de correlación de Pearson, son pocas las correlaciones obtenidas entre caracteres de composición y fenotípicos. Únicamente se observó la correlación positiva entre los carbohidratos y el patrón de crecimiento, y correlaciones negativas entre el contenido en polifenoles y la longitud de la vaina y entre el contenido en proteínas y el patrón de crecimiento. Puede ser muy interesante usar estas correlaciones para selección indirecta en programas de mejora.
- El trabajo que se presenta ha posibilitado la generación de información muy útil para la valorización del cultivo del "Garrofó Valencià" contribuyendo a mejorar la rentabilidad de este cultivo para los agricultores valencianos.

6. BIBLIOGRAFÍA

ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P. (2005). Vines and climbing plants of Puerto Rico and the Virgin Islands. *Contributions from the United States National Herbarium*, 51: 1-483.

AL-YASIRI, S. A.; COYNE, D.P. (1966). Interspecific hybridization in the genus *Phaseolus*. *Crop.Sci*, 6: 59-60.

ANDUEZA-NOH, R. H.; SERRANO-SERRANO, M. L.; CHACÓN, M. I.; SÁNCHEZ DEL PINO, I.; CAMACHO-PÉREZ, L.; COELLO-COELLO, J.; MIJANGOS CORTÉS, J.; DEBOUCK, D.G.; MARTÍNEZ-CASTILLO, J. (2013). Multiple domestications of the Mesoamerican gene pool of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.): Evidence from chloroplast DNA sequences. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60: 1069-1086.

ARUFE, F. (20 de julio de 2021). Un proyecto recupera el "garrofó" valenciano, próximo a su desaparición. *Economía 3*. <https://economia3.com/2021/07/20/451431-un-proyecto-recupera-el-garrofo-valenciano-proximo-a-su-desaparicion/>

ARTEAGA, S.; AL HASSAN, M.; CHAMINDA BANDARA, W. M.; YABOR, L.; LLINARES, J. V.; BOSCAIU, M.; VICENTE, O. (2018). Screening for salt tolerance in four local varieties of *Phaseolus lunatus* from Spain. *Agriculture*, 8(12): 201.

AVANTOR. n.d. *UV/Vis Spectrophotometers, UviLine 9100/9400 (SI Analytics)*. [image] Available at: <<https://es.vwr.com/store/product/2190704/uv-vis-spectrophotometers-uviline-9100-9400-si-analytics>> [Accessed 22 July 2022].

- BAUDET, J. C. (1977a). Taxonomic status of the cultivated types of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). *Trop Grain Legume Bull*, 7: 29-30.
- BAUDET, J. C. (1977b). Origine et classification des espèces cultivées du genre *Phaseolus*. *Bulletin de la Société Royale de Botanique de Belgique/Bulletin van de Koninklijke Belgische Botanische Vereniging*, 65-76.
- BAUDOIN, J. P.; ROCHA, O.; DEGREEF, J.; MAQUET, A.; GUARINO, L. (2004). *Ecogeography, demography, diversity and conservation of Phaseolus lunatus L. in the Central Valley of Costa Rica*. International Plant Genetic Resources Institute. Roma.
- BAUDOIN, J. P.; ROCHA, O. J.; DEGREEF, J.; ZORO, B. I.; OUÉDRAOGO, M.; GUARINO, L.; TOUSSAINT, A. (2008). In situ conservation strategy for wild Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) populations in the Central Valley of Costa Rica: a case study of short-lived perennial plants with a mixed mating system, en: *Crop wild relative conservation and use*, Maxted, N., Ford-Lloyd, B.V., Kell, S.P., Iriondo, J., Dulloo, E. and Turok, J., (eds.). Wallingford, 364-379.
- BAUDOIN J.P. (2006). *Phaseolus lunatus* L., en: *Protabase*. Brink, M., Belay, G., (eds.). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2): 248-254.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1): 25-30.
- CAICEDO, A. L.; GAITÁN, E.; DUQUE, M. C.; CHICA, O. T.; DEBOUCK, D. G.; TOHME, J. (1999). AFLP fingerprinting of *Phaseolus lunatus* L. and related wild species from South America. *Crop Science*, 39(5): 1497-1507.
- CAMACHO VILLA, T. C.; MAXTED, N.; SCHOLTEN, M. A.; FORD-LLOYD, B. V. (2005). Defining and identifying crop landraces. *Plant Genet Resour* (3): 373–384.
- CASTILLO, S. M. A. (2021). *Cultivos para el cambio climático: selección y caracterización de variedades de judía (Phaseolus vulgaris L.) y Phaseolus lunatus tolerantes en la sequía y salinidad*. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- CECCARELLI, S. (2012). Landraces: importance and use in breeding and environmentally friendly agronomic systems, en: *Agrobiodiversity conservation: securing the diversity of crop wild relatives and landraces*, Maxted, N., Dulloo, M.E., Ford-Lloyd, B.V., Frese, L., Iriondo, J., Pinheiro de Carvalho, M.A.A. (eds.). CABI Publishing, New York, 103-117.
- CHACÓN, M. I.; PICKERSGILL, B.; DEBOUCK, D. G. (2005). Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the origin of the Mesoamerican and Andean cultivated races. *Theoretical and Applied Genetics*, 110(3): 432-444.
- DEBOUCK, D. G.; LIÑAN JARA, J. H. (1987). Observations on the domestication of *Phaseolus lunatus* L. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 70: 26-32.

- DEBOUCK, D. G. (1991). Systematics and morphology. *Common beans: research for crop improvement*, 55-118.
- DEBOUCK, D. G. (1999). Diversity in *Phaseolus* species in relation to the common bean, en: *Common bean improvement in the twenty-first century*, Springer. Dordrecht, 25-52.
- DELGADO- SALINAS, A.; TURLEY, T.; RICHMAN, A.; LAVIN, M. (1999). Phylogenetic analysis of the cultivated and wild species of *Phaseolus* (Fabaceae). *Systematic Botany*, 438-460.
- DE RON, A.M.; SANTALLA, M.; RODIÑO. A.P.; GONZÁLEZ, A.M.; GODOY, L.; MANSILLA, J.P.; BLAIR, M. (2016). Judía, en: *Las variedades locales en la mejora genética de plantas*, Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, Sociedad Española de Genética. Gobierno Vasco, Vitoria-Gasteiz, 155-170.
- DILACO. n.d. *ST 243 SOXTEC – Sistema de extracción de grasa y materia extraíble*. [image] Available at: <<https://www.dilaco.com/producto-detalle/control-de-calidad/8856/st-243-soxtec-sistema-de-extraccion-de-grasa-y-materia-extraible>> [Accessed 22 July 2022].
- DOEBLEY, J. F.; GAUT, B. S.; SMITH, B. D. (2006). The Molecular Genetics of Crop Domestication. *Cell*, 127(7): 1309–1321.
- FAO (2018). *Legumbres. Pequeñas Semillas, Grandes Soluciones*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Ciudad de Panamá.
- FISHER SCIENTIFIC. n.d. *Carbolite™ CWF Chamber Furnace*. [image] Available at: <<https://www.fishersci.es/shop/products/cwf-11-13-chamber-furnaces/p-8009015>> [Accessed 22 July 2022].
- FRANKEL, O. H.; BROWN, A. H.; BURDON, J. J. (1995). *The conservation of plant biodiversity*. Cambridge University Press. Cambridge.
- FOFANA, B.; BAUDOIN, J. P.; VEKEMANS, X.; DEBOUCK, D. G.; Du Jardin, P. (1999). Molecular evidence for an Andean origin and a secondary gene pool for the Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) using chloroplast DNA. *Theoretical and Applied Genetics*, 98(2): 202-212.
- GEPTS, P. (2004). Crop domestication as a long-term selection experiment. *Plant Breed. Reviews*, 24(2): 1-44.
- GEPTS, P.; DEBOUCK, D. (1991). Origin, domestication and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), en: *Common beans: Research for crop improvement.*, van Schoonhoven, A., Voysest, O. (eds.). Wallingford, 7-53.
- GUTIÉRREZ SALGADO, A.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D. G. (1995). Evidence for two gene pools of the Lima bean, *Phaseolus lunatus* L., in the Americas. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 42(1): 15-28.
- HARLAN, J. R. (1992). *Crops and man* (No. Ed. 2). American Society of Agronomy. Madison.
- HARLAN, J. R. (1975). Our Vanishing Genetic Resources: Modern varieties replace ancient populations that have provided genetic variability for plant breeding programs. *Science*, 188(4188): 618-621.

- HAYTOWITZ, D. B. (1986). *Composition of Foods: Legumes and Legume Products, Raw, Processed, Prepared* (No. 8-16). US Department of Agriculture, Human Nutrition Information Service.
- INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES (IBPGR), 1982. *Lima bean descriptors*. Roma.
- I OLTRA, J. R. (2014). L'hort de Roselló: el garrofó de la paella, en perill. *Mètode: Revista de difusió de la investigació*, 84: 107.
- JOLLIFFE, I.T. (2002). *Principal Component Analysis*. Springer. New York.
- KAPLAN, L.; & LYNCH, T. F. (1999). *Phaseolus* (Fabaceae) in archaeology: AMS. *Economic Botany*, 53(3): 261-272.
- KEE, E.; GLANCEY, J.; WOOTEN, T. (2004). *Successful lima bean production in Delaware*. Delaware Cooperative Extension Service, University of Delaware, Newark.
- KUBOYAMA, T.; SHINTAKU, Y.; TAKEDA, G. (1991). Hybrid plant of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. lunatus* L. obtained by means of embryo rescue and confirmed by restriction endonuclease analysis of rDNA. *Euphytica*, 54(2): 177-182.
- LAUREANO CARBAJAL, L. E.; AVELLANEDA TEJADA, M. R. (2018). Influencia de la temperatura de extrusión en la calidad de un snack elaborado a base de pallar (*Phaseolus lunatus*) y arroz (*Oryza sativa*). Tesis de grado. Universidad Nacional del Santa. Ancash.
- LEONARD, M. F.; STEPHENS, L. C.; SUMMERS, W. L. (1987). Effect of maternal genotype on development of *Phaseolus vulgaris* L. × *P. lunatus* L. interspecific hybrid embryos. *Euphytica*, 36(1): 327-332.
- LIM, T.K. (2012). *Phaseolus lunatus*, en: *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants*, Springer. Dordrecht, 656-687.
- LONG, R.; TEMPLE, S.; MEYER, R.; SCHWANKL, L.; GODFREY, L.; CANEVARI, M.; ROBERTS, P. (2014). *Lima bean production in California*. University of California, ANR. Oakland.
- MACKIE, W.W. (1943). Origin, dispersal, and variability of the Lima bean, *Phaseolus lunatus*. *Hilgardia*, 15: 1-24.
- MAQUET, A.; VEKEMANS, X.; BAUDOIN, J. P. (1999). Phylogenetic study on wild allies of Lima bean, *Phaseolus lunatus* (Fabaceae), and implications on its origin. *Plant Systematics and Evolution*, 218(1): 43-54.
- MAQUET, A. (1995). *Étude de la diversité génétique de la légumineuse alimentaire *Phaseolus lunatus* L. par l'analyse de caractères morphophysiologicals et de marqueurs protéiques*. PhD thèses, Fac. Université de Sciences Agronomique. Gembloux.
- MARONE, D.; RUSSO, M. A.; MORES, A.; FICCO, D. B.; LAIDÒ, G.; MASTRANGELO, A. M.; BORRELLI, G. M. (2021). Importance of landraces in cereal breeding for stress tolerance. *Plants*, 10(7): 1267.

- MARTÍNEZ-CASTILLO, J.; CAMACHO-PÉREZ, L.; VILLANUEVA-VIRAMONTES, S.; ANDUEZ-NOH, R. H.; CHACÓN-SÁNCHEZ, M. I. (2014). Genetic structure within the Mesoamerican gene pool of wild *Phaseolus lunatus* (Fabaceae) from Mexico as revealed by microsatellite markers: implications for conservation and the domestication of the species. *American journal of botany*, 101(5): 851-864.
- MARTÍNEZ-CASTILLO, J.; ZIZUMBO-VILLARREAL, D.; GEPTS, P.; COLUNGA-GARCÍA MARÍN, P. (2007). Gene flow and genetic structure in the wild–weedy–domesticated complex of *Phaseolus lunatus* L. in its Mesoamerican center of domestication and diversity. *Crop Science*, 47(1): 58-66.
- MARTÍNEZ-NIETO, M. I.; ESTRELLES, E.; PRIETO-MOSSI, J.; ROSELLÓ, J.; SORIANO, P. (2020). Resilience capacity assessment of the traditional Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.) landraces facing climate change. *Agronomy*, 10(6): 758.
- MOK, D. W. S.; MOK, M. C.; RABAKOARIHANTA, A. (1978). Interspecific hybridization of *Phaseolus vulgaris* with *P. lunatus* and *P. acutifolius*. *Theoretical and Applied Genetics*, 52(5): 209-215.
- MOTTA-ALDANA, J. R.; SERRANO-SERRANO, M. L.; HERNÁNDEZ-TORRES, J.; CASTILLO-VILLAMIZAR, G.; DEBOUCK, D. G.; CHACÓN, M. I. (2010). Multiple origins of lima bean landraces in the Americas: evidence from chloroplast and nuclear DNA polymorphisms. *Crop Science*, 50(5): 1773-1787.
- NEWTON, A. C.; AKAR, T.; BARESEL, J. P.; BEBELI, P. J.; BETTENCOURT, E.; BLADENOPOULOS, K. V.; PATTO, M. C. (2011). Cereal landraces for sustainable agriculture. *Agronomy for Sustainable Development*, 30: 237-269.
- NWOKOLO, E. (1996). Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.), en: *Food and feed from legumes and Oilseeds*, Springer. Boston, 144-158.
- RABAKOARIHANTA, A.; MOK, D. W. S.; MOK, M. C. (1979). Fertilization and early embryo development in reciprocal interspecific crosses of *Phaseolus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 54(2): 55-59.
- RAIGÓN, M. D.; RODRÍGUEZ-BURRUEZO, A.; PROHENS, J. (2010). Effects of organic and conventional cultivation methods on composition of eggplant fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(11): 6833-6840.
- RINGNÉR, M. (2008). What is principal component analysis? *Nature biotechnology*, 26(3), 303-304.
- RODRÍGUEZ-JAUME, M.; MORA, C.R. (2001). Análisis de varianza simple (o con un factor), factorial y multivariable, en: *Estadística Informática: Casos y Ejemplos con el SPSS*, Rodríguez-Jaume, M.; Mora, C.R. (eds.). Universidad de Alicante, Alicante, 179–211.
- SANTALLA, M.; RODIÑO, A. P.; DE RON, A.M. (2002). Alloenzyme evidence supporting southwestern Europe as a secondary center of genetic diversity for common bean. *Theor. Appl. Genet.*, 104: 934-944.

- SANTALLA, M.; DE RON, A.M.; DE LA FUENTE, M. (2010). Integration of genome and phenotypic scanning gives evidence of genetic structure in Mesoamerican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces from the southwest of Europe. *Theor. Appl. Genet.*, 120: 1635-1651.
- SERRANO-SERRANO, M. L.; HERNÁNDEZ-TORRES, J.; CASTILLO-VILLAMIZAR, G.; DEBOUCK, D. G.; CHACÓN, M. I. (2010). Gene pools in wild Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) from the Americas: Evidences for an Andean origin and past migrations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54: 76-87.
- SEVERN SALES. n.d. U11898 FOSS 2022 FIBERTEC-0. [image] Available at: <<https://www.severnsaleslabequip.com/u11898-foss-2022-fibertec-0/>> [Accessed 22 July 2022].
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3): 144-158.
- SPARVOLI, F.; LANAVE, C.; SANTUCCI, A.; BOLLINI, R.; LIOI, L. (2001). Lectin and lectin-related proteins in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) seeds: biochemical and evolutionary studies. *Plant Molecular Biology*, 45(5): 587-597.
- TARDÍO, J.; LÁZARO, A.; ROSELLÓ, J.; MORALES, R.; PARDO DE SANTAYANA, M. (2018). Garrofón (*Phaseolus lunatus* L.), en: *Inventario Español de los Conocimientos Tradicionales relativos a la Biodiversidad Agrícola. Volumen 1*. Tardío, J.; Pardo de Santayana, M.; Morales, R.; Molina, M.; Aceituno, L. (eds.). Madrid, 150-152.
- TELLO FONSECA, A. G. (2018). *Estudio de la actividad antioxidante de aislados proteicos de harina de haba pallar (Phaseolus lunatus L.) y su digestibilidad gástrica y duodenal (in vitro)*. Tesis Doctoral en Ingeniería Bioquímica. Universidad Técnica de Ambato.
- TEMEGNE, N. C.; TSOATA, E.; NGOME, A. F. E.; TONFACK, L. B.; AGENDIA, A. P.; YOUNBI, E. (2021). Lima bean, en: *The Beans and the Peas*, Woodhead Publishing, 133-152.
- ZEDER, M. A.; BRADLEY, D. G.; SMITH, B. D.; EMSHWILLER, E. (2006). *Documenting domestication: new genetic and archaeological paradigms*. Univ. of California Press. London.
- ZEVEN, A. C. (1998). Landraces: a review of definitions and classifications. *Euphytica*, 104(2): 127-139.
- ZORO BI, I.; MAQUET, A.; BAUDOIN, J. P. (2005). Mating system of wild *Phaseolus lunatus* L. and its relationship to population size. *Heredity*, 94(2): 153-158.