

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
Y DEL MEDIO NATURAL (ETSIAMN)



**COMPUESTOS BIOACTIVOS EN PIMIENTOS
TRADICIONALES EN DIFERENTES
CONDICIONES DE CULTIVO**

TRABAJO FINAL DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Curso académico: 2018/2019

ALUMNO: JOSÉ ANTONIO CASTELLANOS RUIZ

TUTORA: ANA MARÍA FITA FERNÁNDEZ

COTUTORA: ANA MARÍA ADALID MARTÍNEZ

Licencia: *Creative Commons*



VALENCIA, 29 DE JULIO DE 2019

BIOACTIVE COMPOUNDS IN TRADITIONAL PEPPERS IN DIFFERENT CULTURE CONDITIONS

ABSTRACT

Spain is the fifth ranked country in fresh consumption pepper (*Capsicum annuum* L.) production in the world. In addition, it is a center of diversity of this species and it presents a multitude of traditional varieties adapted to different agroclimatic regions. Peppers contain a lot of bioactive compounds (ascorbic acid, carotenoids and phenolic compounds) that provide them a high added value. There is not much information about compound levels, environmental effects or self improvement of these traditional Spanish varieties.

This task target was to evaluate quercetin, luteolin, myricetin, apigenin and kaempferol flavonoid levels in traditional varieties and their hybrids as well as the environmental effects over these compounds. Different plants of different varieties were cultivated in two places, Pilar de la Horadada (protected crop) and Puerto de Sagunto (outdoors), by two kind of alternative crops, conventional crop and ecologic crop. Flavonoid levels were determined in mature fruits and were analyzed by HPLC.

The results showed that quercetin (1.2 mg/g dry weight) and luteolin (64.7 µg/g dry weight) were the most abundant flavonoids in analyzed peppers, giving higher levels than bibliography described ones. On the other hand, flavonoid levels were highly influenced by the environment where the plants were grown, generally being (although there existed genotype interaction by environment) outdoors culture the most favorable condition for its accumulation, regardless of ecological or conventional management. However, there were high flavonoid levels in Pilar de la Horadada protected crops by ecological management. There were also large differences in flavonoid accumulations between different genotypes. It was observed there were genotypes with very variable responses depending on the culture such as Piquillo and Najerano, while others were more stable, such as Largo de Reus, Cuatro cantos and Morro de vaca.

In general, the content of flavonoids in hybrids was lower than their medium parental ones. Nevertheless, some hybrids showed higher levels in some specific environmental conditions. Hybrid from Valenciano x CW (4) improved the content of quercetin in all environments analyzed except in the conventional Pilar de la Horadada culture that was similar. In addition, this hybrid had similar values to its medium parental in conventional culture, while in both locations were significantly higher in organic crops, highlighting that the content doubled in Pilar de la Horadada.

Therefore, it would be interesting to take advantage of the transgressive effects observed in some hybrids to carry out improvement programs, whenever it is possible to minimize the observed environmental influence.

Key words: *Capsicum annuum*, polyphenols, flavonoids, quercetin, ecological culture, quality.

Autor: Alumno: D. José Antonio Castellanos Ruiz

Tutora: Prof. Dña. Ana María Fita Fernández

Cotutora: Dña. Ana María Adalid Martínez

Valencia, Julio de 2019

COMPUESTOS BIOACTIVOS EN PIMIENTOS TRADICIONALES EN DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO

RESUMEN

España es el quinto país con mayor producción mundial de pimiento (*Capsicum annuum* L.) para consumo fresco. Además, es un centro de diversidad de esta especie, presentando multitud de variedades tradicionales adaptadas a diferentes regiones agroclimáticas. Los pimientos se caracterizan por contener multitud de compuestos bioactivos (ácido ascórbico, carotenoides y compuestos fenólicos) que le proporcionan un alto valor añadido. No existe mucha información de variedades tradicionales españolas sobre los niveles de dichos compuestos, el efecto del ambiente, y las posibilidades de mejora sobre los mismos.

El objetivo del trabajo fue evaluar los niveles de los flavonoides quercetina, luteolina, miricetina, apigenina y kaempferol en variedades de pimientos tradicionales y sus híbridos, así como analizar el efecto ambiental sobre estos compuestos. Para ello, se cultivaron las plantas de las distintas variedades en dos localidades, Pilar de la Horadada (cultivo protegido) y Puerto de Sagunto (al aire libre), bajo dos manejos de cultivo alternativos, cultivo convencional y cultivo ecológico. Los niveles de flavonoides se determinaron en frutos maduros y se analizaron mediante HPLC.

Los resultados mostraron que los flavonoides más abundantes en los pimientos analizados fueron la quercetina (1,2 mg/g de peso seco) y la luteolina (64,7 µg/g peso seco), tomando valores superiores a los descritos en la bibliografía. Por otro lado, los niveles de flavonoides se vieron altamente influenciados por el ambiente en el que se cultivaron las plantas, siendo, en general (aunque existió interacción genotipo x ambiente) el cultivo al aire libre la condición más favorable para su acumulación, independientemente del manejo ecológico o convencional. Sin embargo, en el cultivo protegido (Pilar de la Horadada) se obtuvieron mayores niveles de flavonoides en el manejo ecológico. También se observaron grandes diferencias en la acumulación de flavonoides entre los distintos genotipos. Se observó que existían genotipos con respuestas muy variables dependiendo del cultivo como Piquillo y Najerano, mientras que otros eran más estables, como Largo de Reus, Cuatro cantos y Morro de vaca.

En general, el contenido de flavonoides en los híbridos fue inferior al de su parental medio. Sin embargo, algunos híbridos mostraron niveles superiores en algunas condiciones ambientales específicas. El híbrido procedente del cruce Valenciano x CW (4) mejoró el contenido de quercetina en todos los ambientes analizados menos en el cultivo convencional de Pilar de la Horadada que fue similar. Además, este híbrido tuvo valores similares al de su parental medio en los cultivos convencionales, mientras que en los cultivos ecológicos de ambas localidades fueron significativamente superiores, destacando que en Pilar de la Horadada el contenido se duplicó.

Por tanto, sería interesante aprovechar los efectos transgresivos observados en algunos híbridos para llevar a cabo programas de mejora, siempre que sea posible minimizar la influencia ambiental observada.

Palabras clave: *Capsicum annuum*, polifenoles, flavonoides, quercetina, cultivo ecológico, calidad.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Origen, domesticación y taxonomía del pimiento (<i>Capsicum spp</i>)	1
1.2 Importancia socioeconómica.....	2
1.3 Calidad del pimiento	4
1.3.1 Calidad externa	4
1.3.2 Calidad interna	4
1.3.2.1 Organoléptica.....	4
1.3.2.2 Nutricional	5
1.3.2.3 Funcional.....	6
1.4 Compuestos fenólicos	6
1.5 Mejora genética en el cultivo del pimiento para compuestos funcionales y cultivos ecológicos.....	8
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1 Material vegetal	11
3.2 Condiciones de cultivo.....	14
3.3 Diseño experimental.....	15
3.4 Toma de muestras.....	15
3.5 Extracción de flavonoides.....	16
3.6 Hidrólisis de flavonoides glicosilados.....	17
3.7 Cromatografía líquida de alta resolución	17
3.8 Análisis estadístico	18
4. RESULTADOS	19
4.1 Niveles generales de flavonoides	19
4.2 Efecto del ambiente y del genotipo en el contenido de flavonoides	19
4.3 Efecto del ambiente en el contenido medio de los flavonoides	20
4.4 Niveles de flavonoides por genotipo y condición ambiental	22
4.5 Efecto del ambiente en el contenido de flavonoides en los híbridos	25
5. DISCUSIÓN	30
5.1 Niveles de flavonoides en pimientos	30
5.2 Efecto del ambiente en el contenido de flavonoides	31
5.3 Niveles de flavonoides por genotipo y condición ambiental	31
5.4 Contenido de flavonoides en los híbridos de pimiento.....	32

6. CONCLUSIONES	33
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
8. ANEXOS	38
8.1 Anexo I. Tablas del contenido del contenido medio de los genotipos	38

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Diversidad de frutos de la especie *Capsicum annum*.
- Figura 2.** Gráficas porcentuales de la producción de pimiento en seco y fresco a nivel mundial.
- Figura 3.** Producción europea de pimiento en seco y fresco.
- Figura 4.** Datos de exportación de pimientos por provincias.
- Figura 5.** Estructura general de los flavonoides.
- Figura 6.** Estructura de los flavonoides analizados.
- Figura 7.** Detalle de los parentales analizados.
- Figura 8.** Detalle de los híbridos analizados.
- Figura 9.** Detalle de los controles analizados.
- Figura 10.** Aparato liofilizador de muestras.
- Figura 11a.** Molino triturador de muestras.
- Figura 11b.** Cuchilla interior del molino triturador.
- Figura 12.** Sonicador digital de ultrasonidos modelo DU-32.
- Figura 13.** Centrífuga Eppendorf modelo 5415 D.
- Figura 14.** Dispositivo HPLC y programa informático de análisis.
- Figura 15.** Contenido medio de quercetina (mg/g de peso seco del pimiento) en cada condición ambiental del estudio \pm error estándar. Letras de significación estadística obtenidas mediante el test de Duncan para un p -value <0.05 .
- Figura 16.** Contenido medio de luteolina (μ g/g de peso seco del pimiento) en cada condición ambiental del estudio \pm error estándar. Letras de significación estadística obtenidas mediante el test de Duncan para un p -value <0.05 .
- Figura 17.** Contenido medio de miricetina (μ g/g de peso seco del pimiento) en cada condición ambiental del estudio \pm error estándar. Letras de significación estadística obtenidas mediante el test de Duncan para un p -value <0.05 .
- Figura 18.** Contenido medio de apigenina (μ g/g de peso seco del pimiento) en cada condición ambiental del estudio \pm error estándar. Letras de significación estadística obtenidas mediante el test de Duncan para un p -value <0.05 .
- Figura 19.** Contenido medio de kaempferol (μ g/g de peso seco del pimiento) en cada condición ambiental del estudio \pm error estándar. Letras de significación estadística obtenidas mediante el test de Duncan para un p -value <0.05 .
- Figura 20.** Heatmap del contenido medio de flavonoides en las variedades y ambientes.
- Figura 21.** Ratio Híbrido/Parental medio del contenido en quercetina de los híbridos en las cuatro condiciones ambientales del análisis.
- Figura 22.** Ratio Híbrido/Parental medio del contenido en luteolina de los híbridos en las cuatro condiciones ambientales del análisis.

Figura 23. Ratio Híbrido/Parental medio del contenido en miricetina de los híbridos en las cuatro condiciones ambientales del análisis.

Figura 24. Ratio Híbrido/Parental medio del contenido en apigenina de los híbridos en las cuatro condiciones ambientales del análisis.

Figura 25. Ratio Híbrido/Parental medio del contenido en kaempferol de los híbridos en las cuatro condiciones ambientales del análisis.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica del pimiento.

Tabla 2. Clasificación, estructura y patrón de sustitución de los flavonoides.

Tabla 3. Acciones, grupo, origen y características del fruto.

Tabla 4. Variación de la fase móvil en gradiente.

Tabla 5. Valores del contenido medio, mínimo y máximo de los flavonoides.

Tabla 6. ANOVA multifactorial basado en los cuadrados medios (CM) para los efectos del ambiente, del genotipo y la interacción entre ambos sobre la quercetina (Q), luteolina (L), miricetina (M), kaempferol (K) y apigenina (A).

Anexo I. Tabla 1. ANOVA simple del contenido en quercetina (mg/g peso seco del pimiento) con letras de significación estadística obtenidas mediante el test de Duncan para un p-value<0.05.

Anexo I. Tabla 2. ANOVA simple del contenido en luteolina (µg/g peso seco del pimiento) con letras de significación estadística obtenidas mediante el test de Duncan para un p-value<0.05.

Anexo I. Tabla 3. ANOVA simple del contenido en miricetina (µg/g peso seco del pimiento) con letras de significación estadística obtenidas mediante el test de Duncan para un p-value<0.05.

Anexo I. Tabla 4. ANOVA simple del contenido en apigenina (µg/g peso seco del pimiento) con letras de significación estadística obtenidas mediante el test de Duncan para un p-value<0.05.

Anexo I. Tabla 5. ANOVA simple del contenido en kaempferol (µg/g peso seco del pimiento) con letras de significación estadística obtenidas mediante el test de Duncan para un p-value<0.05.

ABREVIATURAS

‰: porcentaje

FAO: Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación

UV: ultravioleta

°C: grado Celsius

L: litro

pH: potencial de hidrógeno

m: metro

kg: kilogramo

BHT: butil hidroxitolueno

mg: miligramo

ml: mililitro

rpm: revoluciones por minuto

HPLC: cromatografía de alta presión

M: molar

g: gramo

HCl: ácido clorhídrico

μl: microlitro

meOH: metanol

PTFE: filtro de membrana de politetrafluoroetileno

μm: micrómetro

mm: milímetro

min: minuto

nm: nanómetro

μg: microgramo

g.l.: grados de libertad

CM: cuadrado medio

PH/ph: Pilar de la Horadada

PS/ps: Puerto de Sagunto

ECO/eco: Cultivo ecológico

CON/con: Cultivo convencional

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Origen, domesticación y taxonomía del pimiento (*Capsicum spp.*)

El pimiento (*Capsicum annuum*) también conocido como chile o ají (Tabla 1) pertenece a la familia de las *Solanáceas* que se caracteriza por ser una familia compleja que incluye 98 géneros y 2716 especies (Olmstead y Bohs, 2007). El género *Capsicum* surgió en América del Sur, concretamente en Bolivia y está compuesto por unas 30 especies distintas (Eshbaugh, 1993). El descubrimiento de microfósiles arqueológicos procedentes de pimiento en América del Sur y América Central, estima la domesticación del género hace más de 6000 años (Perry *et al.*, 2007).

Tabla 1. Clasificación taxonómica del pimiento (Nuez *et al.*, 2003).

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Solanales</i>
Familia	<i>Solanaceae</i>
Subfamilia	<i>Solanoideae</i>
Género	<i>Capsicum</i>

Al hablar de pimientos se incluyen cinco especies domesticadas (*C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinese*, *C. frutescens* y *C. pubescens*) destacando la especie *C. annuum* cuyas variedades están distribuidas por todo el mundo (Eshbaugh, 1993).

Durante el proceso de domesticación del pimiento, se seleccionaron dos rasgos fundamentales para su cultivo: fruto no caducifolio que permanece en la planta hasta su cosecha y cambio en la posición del fruto de erecto a colgante. De esta forma, el cambio en la posición del fruto propició mejoras en cuanto al tamaño del fruto, protección frente a la exposición del sol y al ataque por parte de las aves. Además, se mejoró la apariencia de los frutos y se redujo el nivel de pungencia o picor. Por otro lado, mediante el proceso de selección también se obtuvieron frutos de pimientos de color amarillo, naranja, marrón y rojo presente en todas las especies de pimiento cultivadas (Paran y van der Knaap, 2007).

El cultivo del pimiento llegó a España a finales del siglo XV con el descubrimiento de América. Desde entonces, los productores han seleccionado distintas variedades de pimiento en función de la calidad nutricional y producción, dando como resultado un gran número de cultivares que difieren entre ellos en las propiedades morfológicas y organolépticas (Guil-Guerrero *et al.*, 2006).

La especie *C. annuum* se caracteriza por tener flores solitarias en cada nudo, ocasionalmente fasciculadas. La corola es de color blanca o púrpura y suele presentar los pétalos rectos. Los frutos tienen un espesor de carne muy variable (Figura 1) y las semillas son de color paja. Su número cromosómico es $2n=24$ (Eshbaugh, 2012).



Figura 1. Diversidad de frutos de la especie *Capsicum annuum* (Gimeno, 2014)

Según la publicación de Rodríguez-Burruezo *et al.*, (2016), los pimientos se pueden clasificar en 9 grupos. Las variedades empleadas en nuestro experimento pertenecen al grupo Morrón de cascós (pimientos de carne gruesa, lisos y no deprimidos), Morrón Valenciano, Morrón de bola (morfología redonda y de tamaño pequeño), Piquillo (morfología triangular y de tamaño pequeño) y otros pimientos de carne gruesa (morfología triangular y tamaño medio-largo).

1.2. Importancia socioeconómica

El cultivo del pimiento es muy importante en el ámbito social y económico. Está muy distribuido por todo el mundo y su producción total es de 40.718.464 toneladas cultivadas en un área de 3.843.700 hectáreas (FAO, 2017). Se puede consumir en fresco, para pimentón y para conserva, lo que provoca el aumento de la producción de pimiento cada año.

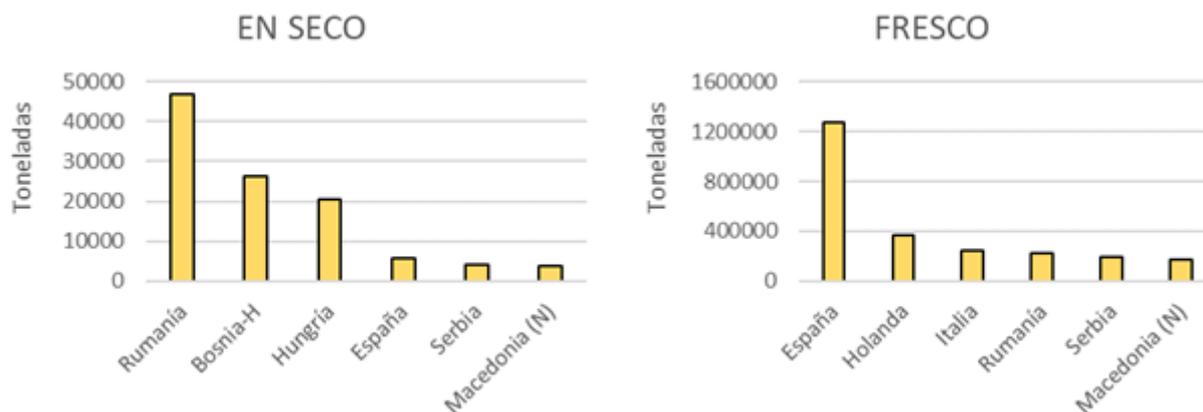
Si analizamos por separado los usos principales del pimiento, como producto seco y producto fresco, observamos que el mayor productor a nivel mundial de pimientos en seco es India, seguido por Tailandia y China. En el consumo fresco del pimiento, el mayor productor es China con un 58% de la producción mundial, seguido por México, Turquía e Indonesia. Cabe destacar que, España es el quinto país con mayor producción mundial de pimiento para consumo fresco generando 1.277.908 toneladas de frutos (Figura 2).



Figura 2. Gráficas porcentuales de la producción de pimiento en seco y fresco a nivel mundial (FAO, 2017)

A nivel Europeo (Figura 3), Rumanía es el mayor productor de pimiento para consumo en seco, con una producción de 46.927 toneladas en el año 2017. En este ámbito, España es el cuarto país con mayor producción para consumo en seco, ya que genera 5.638 toneladas de fruto.

Figura 3. Producción europea de pimiento en seco y fresco (FAO, 2017)



En España, podemos diferenciar entre dos bloques productores de pimiento. El primero, se corresponde con la zona costera del Mar Mediterráneo y engloba Almería, Murcia, Alicante, Valencia y Barcelona. El área cultivada es muy amplia dado que el objetivo es tener producciones muy altas para su exportación a otro país. La provincia de Almería destaca por la gran cantidad de fruto de pimiento que exporta, debido a que en el año 2016 fueron 500.000 toneladas exportadas. El segundo bloque engloba el resto de provincias más céntricas cuya producción es directamente proporcional al consumo (Figura 4).



Figura 4. Datos de exportación de pimientos por provincias (HORTOINFO, 2017)

En las provincias situadas al lado del mar Mediterráneo, la especie cultivada que predomina es *C. annuum*, concretamente las variedades California Wonder del tipo morrón y los pimientos dulces italianos tanto para consumir en la península como

para exportación. En estas zonas, la técnica de producción está muy perfeccionada y se consiguen niveles de fruto muy altos debido al uso de invernaderos (Nuez *et al.*, 2003).

En la actualidad, España es un centro de diversidad de esta especie, con capacidad de ofrecernos muchas variedades locales y ecotipos que han surgido debido a la diversidad de condiciones agroclimáticas y el proceso de adaptación y reproducción tradicional llevado a cabo por generaciones de agricultores. Por esta razón, en nuestro país, *C. annuum* es la verdura con mayor número de denominaciones de origen protegidas (DOP) e indicaciones geográficas protegidas (IGP) (Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2016), concedidas por la Unión Europea, como Piquillo de Lodosa, Pimiento Riojano, Asado del Bierzo, Pimiento de Padrón, Pimiento de Gernika y Pimentón de la Vera. A día de hoy, los pimientos más importantes en el ámbito económico y por tanto, los que más se consumen en todo el mundo son los pimientos frescos no picantes, que pertenecen mayoritariamente a la especie *C. annuum* (Bosland y Votaba, 2000).

De las cinco especies cultivadas del género *Capsicum*, destacamos la especie *C. annuum* que tiene la capacidad de cultivarse en todo el mundo debido a las múltiples variedades que engloba con capacidad para adaptarse a infinidad de condiciones agroclimáticas (González *et al.*, 2014). Esta especie se caracteriza ser un cultivo con mucha importancia a nivel mundial y su comercialización se puede llevar a cabo en distintas etapas de maduración. Además, se puede consumir en fresco, en conservas y en especias, es decir, emplearse como verdura o como especia, por lo que aparece incluido en muchas recetas (Hill *et al.*, 2013).

1.3. Calidad del pimiento

1.3.1. Calidad externa

Como ya se ha comentado, la especie *C. annuum* engloba muchas variedades por lo que se caracteriza por presentar mucha diversidad (Eshbaugh, 1993). Cada una de ellas tiene características externas distintas, destacando la forma, el tamaño y el color como los caracteres más representativos de la calidad externa del fruto. A pesar de que el rendimiento y la resistencia a enfermedades son las dos propiedades más influyentes para las compañías de semillas en el proceso de selección de nuevas variedades, hay otros parámetros importantes que también se incluyen en la calidad externa del pimiento, como pueden ser la apariencia, el peso unitario y la firmeza (Tripodi *et al.*, 2018).

1.3.2. Calidad interna

1.3.2.1. Organoléptica

El aroma del fruto de pimiento viene dado por los compuestos orgánicos volátiles de bajo peso molecular presentes en su estructura, destacando los hidrocarburos derivados del isopreno como los compuestos mayoritariamente responsables del aroma del pimiento (Somos, 1984). El pimiento tiene un aroma característico fuerte que está provocado por la alta concentración de compuestos

volátiles derivados de pirazina (Kollmannsberger *et al.*, 2011). Sin embargo, ninguno de estos compuestos aporta valor nutritivo al pimiento.

En cuanto al sabor, hay una clara diferencia entre los pimientos dulces y picantes. Por un lado, los pimientos dulces deben su sabor característico a los azúcares que contiene, mientras que, en los pimientos picantes el sabor típico de la capsaicina predomina sobre el sabor aportado por los azúcares, dándole la pungencia típica de los pimientos picantes (Díaz *et al.*, 2004).

1.3.2.2. Nutricional

El valor nutricional del pimiento es muy alto debido a que aporta muchos compuestos esenciales en nuestra dieta que favorecen al correcto funcionamiento del organismo. Los pimientos son ricos en hidratos de carbono, fibra alimentaria, minerales y vitaminas.

Macronutrientes (azúcares, lípidos y proteínas)

Los carbohidratos presentes en el pimiento son azúcares reductores, pentosas y fibra dietética. El 80% de la fibra total se sitúa en la piel, mientras que el 20% restante está contenido en el pericarpio. El contenido en lípidos es bajo y se divide en grasas (80%) y glicolípidos (16%) (Bosland y Votava, 2000). Los aminoácidos leucina, alanina, glutamato y aspartato predominan a nivel proteico y se corresponden con un 17% de peso seco en el pericarpio (Somos, 1984).

Vitaminas

Las vitaminas son componentes esenciales presentes en los alimentos, destacando las frutas y verduras. En nuestro organismo, actúan como coenzimas y cofactores, participando en numerosas reacciones metabólicas, por lo que tienen función reguladora y protectora. Su estructura es muy heterogénea, de forma que se clasifican atendiendo a su solubilidad. Las vitaminas hidrosolubles son la C y las del complejo B, mientras que las vitaminas liposolubles son la A, D, E y K (Kuklinski, 2003).

Las vitaminas liposolubles e hidrosolubles tienen que incluirse en la dieta, debido a que el cuerpo humano sólo presenta reservas de vitaminas liposolubles en baja cantidad. El fruto de pimiento contiene vitaminas A, C y en menor medida vitamina E (Bae *et al.*, 2012a).

La vitamina A no está presente en el fruto, pero sí algunos precursores como el β -caroteno, es una molécula importante para la visión humana y para prevenir ciertos tipos de cáncer (Lee *et al.*, 2005). La ausencia de vitamina A inhibe el crecimiento, provoca el endurecimiento del epitelio en los sistemas respiratorios, visual, reproductivo y urinario, y afecta a la estructura ósea y dental (Latham, 2002).

El ácido ascórbico o vitamina C es un compuesto antioxidante que interviene en actividades como la eliminación de radicales libres, la inhibición de la peroxidación de lípidos y la actividad quelante de metales (Bae *et al.*, 2012a). Su ausencia produce el escorbuto, una enfermedad que provoca hemorragias frecuentes en las encías y que, en los pacientes con pronóstico grave, puede provocar la muerte. Los frutos de pimiento presentan contenido muy altos de ácido ascórbico, aumentando el valor nutricional de esta especie. Aun así, el contenido es variable dependiendo de algunos

factores como el estado de maduración, siendo los frutos maduros los mas ricos en vitamina C (Bosland y Votaba, 2000). Además, esta implicada en multitud de funciones en el cuerpo humano como pueden ser: producción de colágeno (mantiene la estructura del cuerpo y participa en la cicatrización de heridas), mejora la salud de la piel, retarda enfermedades como la artritis, ayuda al sistema inmunológico y estimula la producción de varias hormonas (Scott-Moncrieff, 2000).

1.3.2.3. Funcional

Los pimientos son ricos en una amplia diversidad de compuestos bioactivos, que le confieren un valor añadido a dicho cultivar (Ribes-Moya *et al.*, 2018) y que no pueden ser sintetizados por el cuerpo humano (Heim *et al.*, 2002). La genética de cultivos juega un papel importante en el contenido y en la diversidad de los compuestos bioactivos generados por la planta (Navarro *et al.*, 2005), pero el contenido final de estos compuestos es variable en función del genotipo, madurez del fruto y condiciones de cultivo (Howard *et al.*, 2000).

El fruto de pimiento es considerado un “superalimento” debido a que presenta diversos compuestos nutricionales y funcionales, que contribuyen al correcto funcionamiento del organismo, por lo que son beneficiosos para la salud. La mayoría de estos compuestos (carotenoides, compuestos fenólicos y vitamina C) tienen capacidad antioxidante, siendo capaces de eliminar radicales libres de nuestro organismo (Lee *et al.*, 2005). Los compuestos fenólicos se incluyen en un apartado diferente para otorgarle la importancia que requieren.

Carotenoides

Los colores amarillo, naranja y rojo característicos del pimiento en sus etapas de maduración se deben a la acumulación de pigmentos carotenoides (Ghasemnezhad *et al.*, 2011). La especie *Capsicum annum L.*, conocida como pimiento rojo dulce, presenta un alto contenido en pigmentos carotenoides que le proporcionan el color rojo característico (Matsufuji *et al.*, 1998).

En las variedades de pimiento rojo, el carotenoide mayoritario es la capsantina, que junto que con otros carotenoides oxigenados (capsorrubina y criptocapsina) exclusivos del género *Capsicum* tienen capacidad para eliminar radicales libres (Matsufuji *et al.*, 1998). Además, el pimiento también presenta un alto contenido en β -caroteno que contribuye a proporcionar el color característico de las variedades, así como su importante valor nutricional siendo un precursor de la vitamina A. Otro carotenoides predominantes en este cultivo son la luteína y zeaxantina, cuya función más conocida es la de proteger la retina del ojo. La luteína también tiene capacidad de reducir el riesgo de aterosclerosis y enfermedades del corazón (Lee *et al.*, 2005).

1.4. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son sintetizados por las plantas como metabolitos secundarios ante diversas situaciones de estrés abiótico y biótico. Además, contribuyen al color, sabor y aroma de las frutas y verduras (Espín y Tomas, 2006).

Tienen gran amplitud de funciones biológicas, actuando como fitoalexinas, insecticidas, atrayentes para los polinizadores, contribuyentes a la pigmentación,

antioxidantes y agentes de protección frente a la luz UV. Por ello, los compuestos fenólicos se caracterizan por su implicación en el crecimiento y reproducción de las plantas (Ignat *et al.*, 2011). Muchas de las funciones se deben a su estructura, conteniendo un anillo aromático unido a uno o varios grupos hidroxilo (Balasundram *et al.*, 2006).

Los flavonoides (Figura 5) son compuestos polifenólicos (D'Archivio *et al.*, 2007) de bajo peso molecular y su estructura esta siempre formada por 15 átomos de carbono en una combinación C6 – C3 – C6, formando una estructura de dos anillos aromáticos (A y B). Por una parte, el anillo aromático A proviene de la vía del acetato/malonato, mientras que el anillo B tiene su origen en la vía del shikimato a través de la fenilalanina. Los anillos aromáticos A y B permanecen unidos por un puente de tres carbonos, que generalmente es un anillo heterocíclico (anillo C) (Merken y Beecher, 2000), cuyas variaciones en los patrones de sustitución originan las diversas clases de flavonoides (Hollman y Katan, 1999). Sin embargo, los anillos A y B pueden sufrir sustituciones como oxigenación, alquilación, glicosilación, acilación y sulfonación (Balasundram *et al.*, 2006), dando lugar a los diferentes compuestos dentro de cada clase de flavonoides (Pietta, 2000).

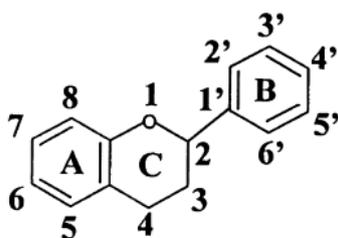


Figura 5. Estructura general de los flavonoides (Heim *et al.*, 2002)

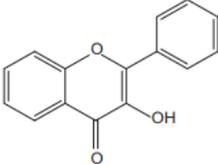
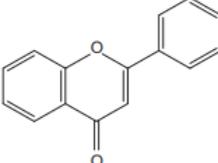
Las plantas sintetizan flavonoides como metabolitos secundarios con función protectora frente a la radiación UV, patógenos y herbívoros. En los humanos, de igual forma que el ácido ascórbico, los flavonoides muestran efectos beneficiosos, por sus capacidades antioxidantes, quelantes e inhibidoras de la oxidación de LDL (lipoproteínas de baja densidad) que le proporcionan efectos cardioprotectores (Heim *et al.*, 2002).

Los flavonoides presentan efectos bioquímicos y farmacológicos, como antioxidantes, antiinflamatorios y antialérgicos. En nuestro organismo, encontramos enzimas que debido a la actividad que desempeñan, a menudo están asociadas con el desarrollo de tumores, como puede ser la prostaglandina sintasa, lipooxigenasa y ciclooxigenasa. De esta forma, la ingesta de flavonoides procedentes de cultivo como el pimiento reduce considerablemente el riesgo de padecer cáncer. Por otro lado, también se ha demostrado que el aporte de flavonoides en la dieta contribuye a la desintoxicación de sistemas enzimáticos tales como glutatión S-transferasa (Lee *et al.*, 1995) y a evitar la aparición de enfermedades degenerativas (Deepa *et al.*, 2006).

Además, se pueden clasificar en antocianinas, flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavonoles y flavanoles (Tsao y Yang, 2003). En nuestro análisis, hemos

trabajado con cinco: miricetina, quercetina, luteolina, kaempferol y apigenina (Figura 6), pertenecientes a la clase de los flavonoles y flavonas (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación, estructura y patrón de sustitución de los flavonoides (Heim *et al.*, 2002).

Clase	Estructura	Flavonoide	Patrón de sustitución
FLAVONOLES		Miricetina	3,5,7,3',4',5' -OH
		Quercetina	3,5,7,3',4' -OH
FLAVONAS		Kaempferol	3,5,7,4' -OH
		Luteolina	5,7,3',4' -OH
		Apigenina	5,7,4' -OH

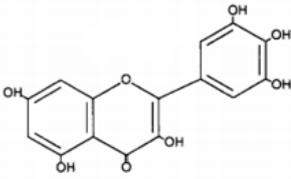
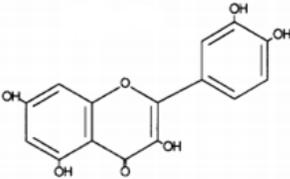
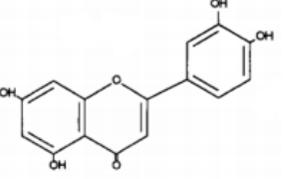
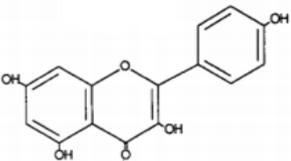
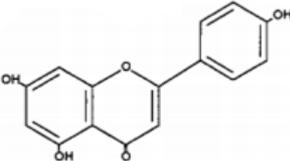
MIRICETINA	QUERCETINA	LUTEOLINA
		
KAEMPFEROL	APIGENINA	
		

Figura 6. Estructura de los flavonoides analizados (Rice-Evans *et al.*, 1996)

1.5. Mejora genética en el cultivo del pimiento para compuestos funcionales y cultivo ecológico

La mejora genética vegetal aplica los principios de la genética con el fin de producir variedades con las características deseables. Aquí podemos incluir aspectos como la resistencia a enfermedades, rendimiento, calidad organoléptica y calidad nutricional (Nazzaro *et al.*, 2009). En la actualidad, el consumidor está concienciado de la importancia de tomar alimentos sanos con valor nutricional alto, que le proporcionen los macronutrientes y micronutrientes necesarios para el correcto funcionamiento de su organismo.

La mejora de la calidad funcional se considera un reto en la actualidad, debido a que el control genético es complejo. Las rutas metabólicas de producción de

carotenoides y compuestos fenólicos están reguladas por muchos genes. Además, la influencia del ambiente en el contenido de compuestos funcionales en el fruto de pimiento es alta. A pesar de ello, es necesario el estudio del control genético y del ambiente con el fin de proporcionar alimentos de calidad superior al consumidor.

Los pimientos son ricos en muchos compuestos bioactivos como ácido ascórbico, vitamina C y compuestos fenólicos. Sin embargo, la concentración de estos compuestos en el fruto de pimiento depende de factores como el genotipo, las condiciones de cultivo y la madurez del fruto (Howard *et al.*, 2000). El ambiente en el que se desarrolla el cultivo es un factor muy importante, dado que tiene mucha influencia en el contenido final de compuestos bioactivos.

En los últimos años, la población humana está incrementando al mismo tiempo que las zonas urbanas se extienden cada vez más, lo que ha provocado un desplazamiento y reajuste de los ecosistemas naturales. Por ello, se está produciendo un aumento de la agricultura sostenible y cuidadosa con el medio ambiente. En Europa, la superficie empleada en agricultura orgánica se duplicó pasando de 6,8 millones de hectáreas en 2005 a 13,5 millones de hectáreas en 2016 (Ribes-Moya *et al.*, 2018).

2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, los objetivos de este trabajo fueron:

- Evaluar el efecto del genotipo y del ambiente en el contenido de quercetina, luteolina, miricetina, apigenina y kaempferol en las variedades de pimiento distintos controles y parentales de pimiento.
- Determinar las condiciones ambientales óptimas para cada variedad con el fin de maximizar el contenido en flavonoides.
- Analizar el contenido de flavonoides en híbridos de pimiento para evaluar el potencial de los parentales en la mejora del pimiento para niveles incrementados de flavonoides.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Todas las entradas evaluadas en este trabajo son distintas variedades de la especie *C. annuum*, siendo representativas de la diversidad varietal del fruto y del origen geográfico de dicha especie (Tabla 3). Concretamente, se han evaluado 10 variedades distintas que actúan como parentales (Figura 7) y 11 híbridos (Figura 8) procedentes del cruce entre los diversos parentales. Además, el trabajo se ha complementado con 7 variedades que actúan como controles (Figura 9).

Tabla 3. Acciones, grupo, origen y características del fruto.

Accesión	Grupo	Origen	Características del fruto		
			Forma	Peso medio (g)	Longitud/Anchura (mm)
Controles					
Cuatro cantos	Morrón de cascós	Valencia	Alargado	161,5	190/100
Gordo morro vaca	Morrón de cascós	Huesca	Alargado	152,5	170/60
Gordo	Morrón de cascós	Zamora	Alargado	177,5	170/110
Carmagnola Rosso	Morrón de cascós	Italia	Redondo	189	140/150
Topepo Rosso	Morrón de bola	Italia	Redondo	83	80/80
De Infantes	Morrón de cascós	Ciudad Real	Cuadrado	118,5	120/110
Largo de Reus	Morrón de cascós	Barcelona	Alargado	204	230/90
Parentales					
Morro de vaca	Morrón de cascós	Murcia	Alargado	92	150/80
Valenciano	Morrón Valenciano	Valencia	Alargado	233,5	180/90
Gordo	Morrón de cascós	Castellón	Cuadrado	220,5	130/100
De Asar Gordo Najerano	Otros de carne gruesa	Vizcaya	Triangular	177,5	180/60
Del Bierzo	Otros de carne gruesa	León	Cuadrado	181,5	170/100
Najerano	Otros de carne gruesa	La Rioja	Alargado	170	200/60
Piquillo	Ancho/Piquillo	Navarra	Triangular	27,5	100/50
California Wonder Rojo (2)	Morrón de cascós	Valencia	Cuadrado	109	100/90
California Wonder Rojo (3)	Morrón de cascós	Valencia	Redondo	121,5	70/70
California Wonder Rojo (4)	Morrón de cascós	Valencia	Cuadrado	132	130/100
Híbridos					
Morro de vaca x California Wonder Rojo (3)			Cuadrado	118,5	120/80
Valenciano x California Wonder Rojo (4)			Alargado	86,5	150/70
De Asar Gordo Najerano x California Wonder Rojo (4)			Triangular	166	150/70
De Asar Gordo Najerano x California Wonder Rojo (2)			Cuadrado	179,5	120/90
Del Bierzo x California Wonder Rojo (2)			Cuadrado	168	120/90
Del Bierzo x California Wonder Rojo (3)			Cuadrado	150,5	130/100

Del Bierzo x California Wonder Rojo (4)	Cuadrado	146	110/100
Najerano x California Wonder Rojo (4)	Alargado	157,5	130/70
Piquillo x California Wonder Rojo (2)	Triangular	56	100/60
Piquillo x California Wonder Rojo (3)	Triangular	61	110/60
Piquillo x California Wonder Rojo (4)	Triangular	66	110/60

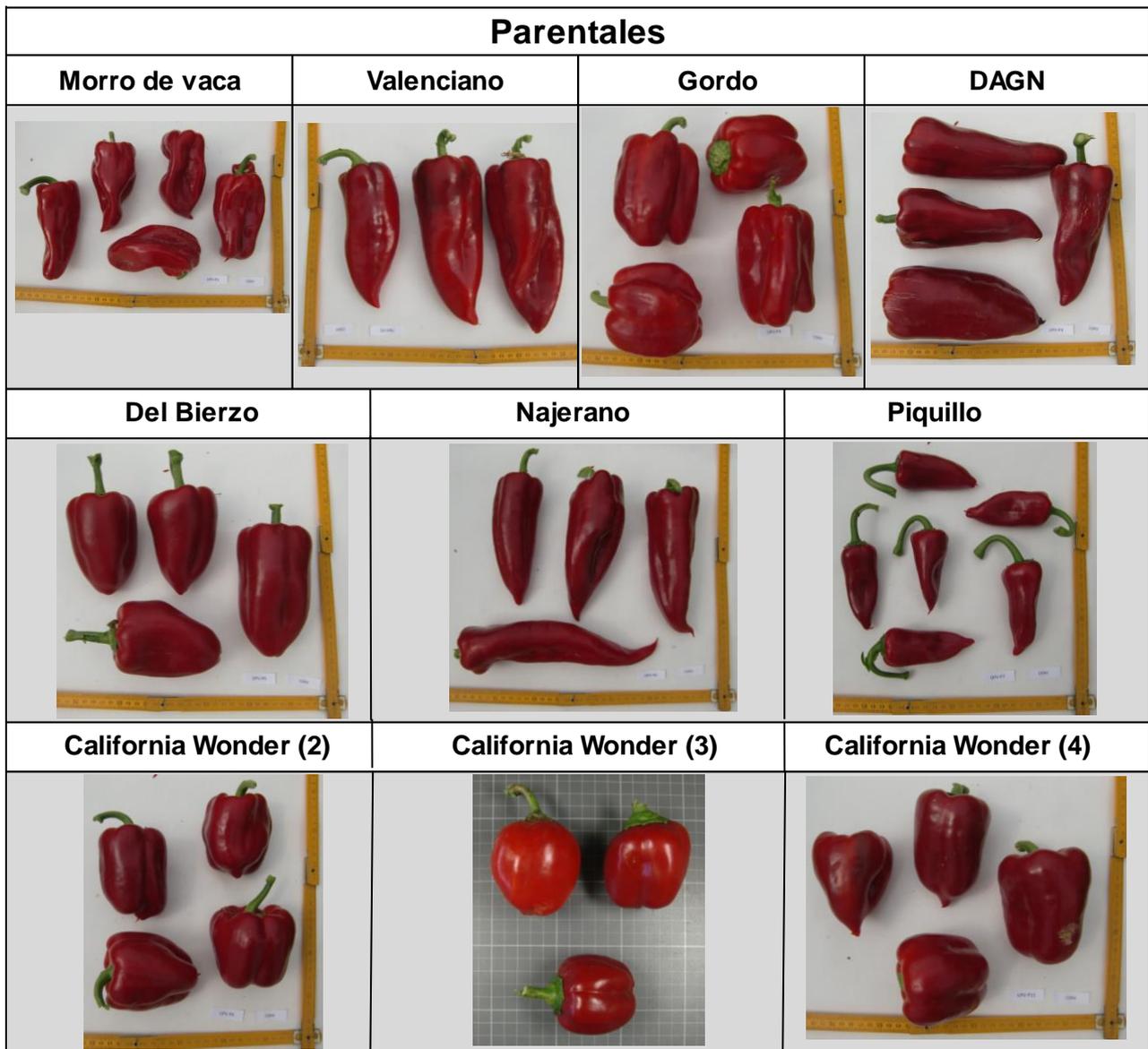


Figura 7. Detalle de los parentales analizados

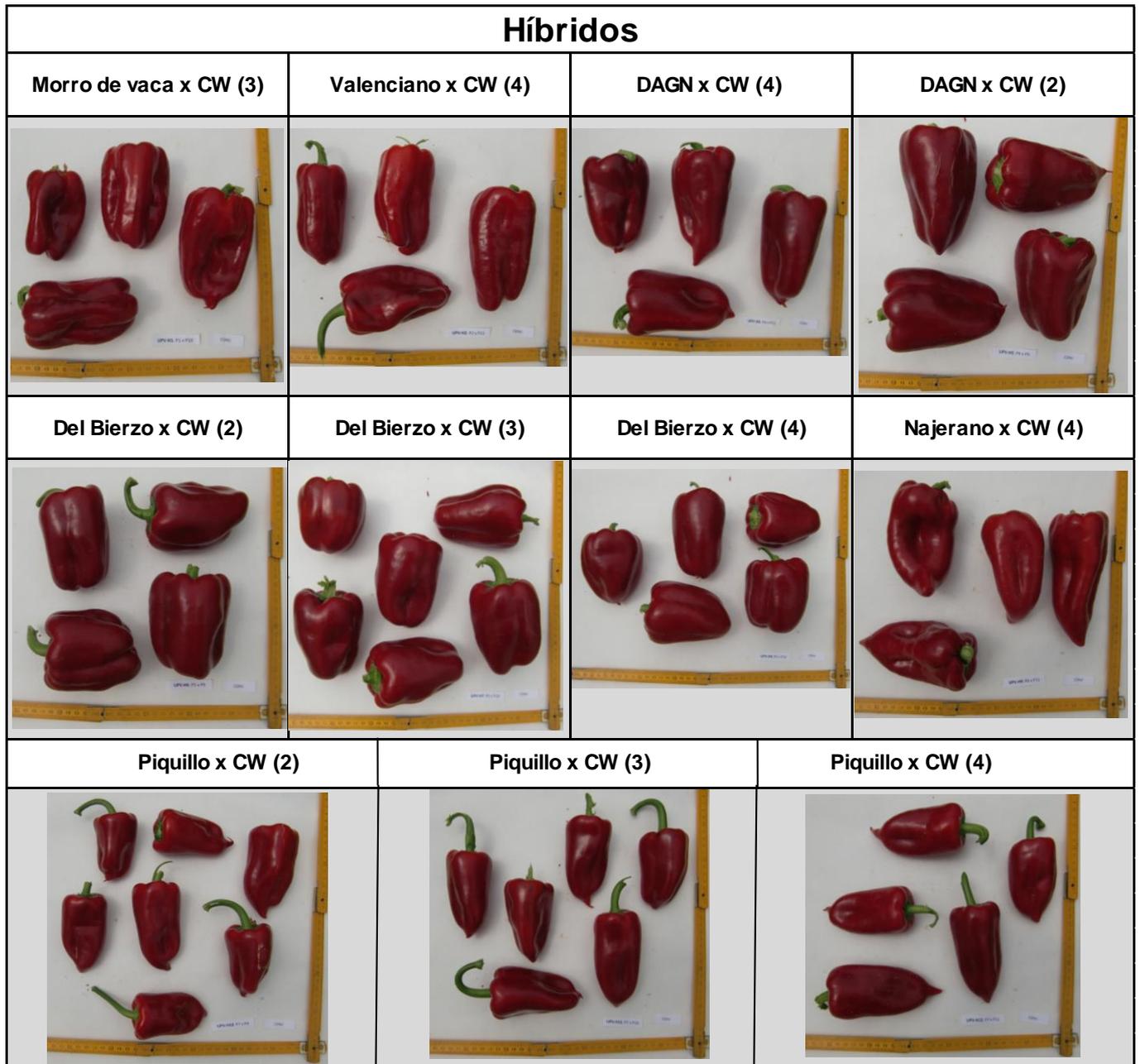


Figura 8. Detalle de los híbridos analizados

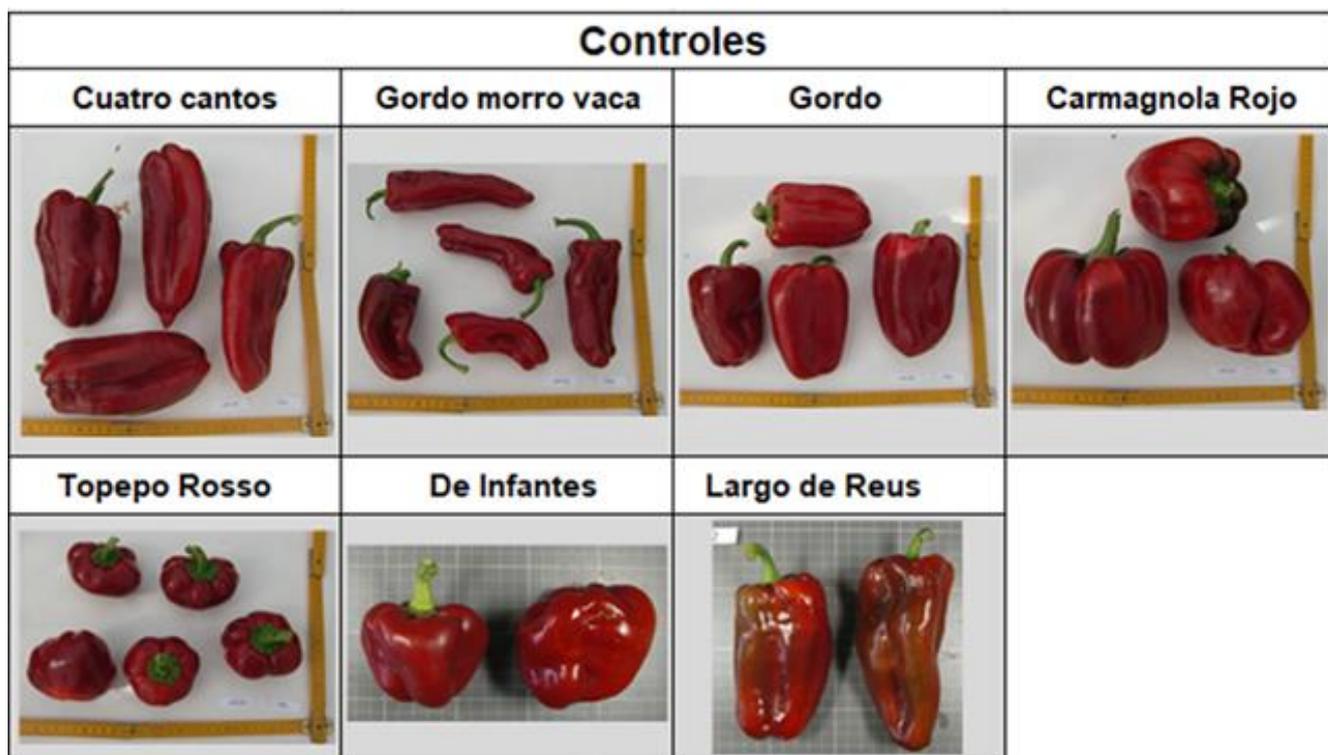


Figura 9. Detalle de los controles analizados

3.2. Condiciones de cultivo

Por un lado, una parte de las semillas se sembraron en los semilleros del COMAV a 25 °C empleando sustrato universal Neuhaus N3 (70L) cuya composición es: 80% de sustrato enriquecido y 20% de perlita para favorecer la aireación. Además, presenta alta capacidad de retención de la humedad y su pH oscila entre 5 y 6. Después de la germinación, cuando las plántulas tenían 4 hojas verdaderas se trasladaron a la parcela situada en el parque natural de Marjal del Moros situada en la localidad de Sagunto. El cultivo se llevó a cabo al aire libre bajo condiciones de cultivo de agricultura ecológica y convencional. El marco de plantación fue de 1 m entre cada fila y 0.4 m entre cada planta, mientras que el agua de riego procedía del pozo cercano a la parcela y se suministraba por el método de riego a manta o por inundación.

Por otro lado, otra parte de las semillas fueron enviadas a la Cooperativa de Surinver situada en la localidad de Pilar de la Horadada, perteneciente a la provincia de Alicante. Allí, se llevó a cabo el proceso de siembra y germinación de las semillas. De nuevo, cuando las plántulas tenían 4 hojas verdaderas, se trasladaron a las parcelas situadas en dicha localidad. El cultivo se llevó a cabo en invernadero bajo condiciones de cultivo de agricultura ecológica y convencional. El marco de plantación fue de 1 m entre filas y 0.4 m entre plantas. El agua de riego procedía del pozo cercano a la parcela y se suministraba por goteo mediante el método de fertirrigación aportando el agua y los nutrientes necesarios al cultivo de forma simultánea.

3.3. Diseño experimental

Para todos los cultivos de ambas localidades (Pilar de la Horadada y Sagunto) se llevó a cabo un diseño experimental de bloques partidos. Cada entrada fue cultivada en 3 bloques distintos y cada bloque fue distribuido al azar en la parcela correspondiente. Además, en cada localidad había 2 parcelas distintas para separar los cultivos ecológicos y convencionales.

En Sagunto, la plantación tuvo lugar entre los días 10-17 de abril de 2018, mientras que en Pilar de la Horadada se llevó a cabo a finales de noviembre y principios de diciembre.

3.4. Toma de muestras

De cada bloque (3 bloques por parcela y por localidad) se cogió una muestra representativa (2-3 kg) y se llevó al laboratorio, donde se realizó el procesado de la muestra. Una parte de la muestra se fragmentó para obtener trozos de distintos frutos de pimientos con el fin de obtener una muestra lo más representativa posible y se liofilizó (Figura 10). A continuación, se molió para pulverizar la muestra con un tamaño inferior a 0.5 mm empleando un molinillo de análisis (Figuras 11a y 11b), concretamente el modelo IKA A11 basic, con el fin de preparar la muestra para la extracción de compuestos bioactivos.

En Sagunto, la recogida se llevó a cabo en la segunda quincena de septiembre de 2018, mientras que en Pilar de la Horadada fue en el mes de junio de 2018 debido a que las plantas fueron cultivadas bajo condiciones controladas en invernadero.



Figura 10. Aparato liofilizador de muestras



Figura 11a. Molino triturador de muestras. 11b. Cuchilla interior del molino triturador

3.5. Extracción de flavonoides

Siguiendo del protocolo de Bae *et al.*, (2012a), se prepara la solución extrayente (80:20 Metanol:agua miliQ v:v, con 0,1% BHT). El BHT se disuelve en muy poca cantidad en agua, por lo que inicialmente se disuelve en el metanol, y luego se añade poco a poco el agua con cuidado para que no precipite. A continuación, se pesan 100 mg de muestra liofilizada en un microtubo (2 ml) y se le añade 1,5 ml de la solución extrayente. Posteriormente, se agitan las muestras con el vortex y se realiza la extracción asistida por ultrasonido a 50 °C durante 60 minutos con el sonicador (Figura 12). Por último, se centrifugan (Figura 13) durante 5 minutos a 10000 rpm.



Figura 12. Sonicador digital de ultrasonidos modelo DU-32



Figura 13. Centrifuga Eppendorf modelo 5415 D

3.6. Hidrólisis de flavonoides glicosilados

El objetivo de este tratamiento es eliminar los azúcares que aparecen unidos a los flavonoides de interés de manera frecuente, ya que los flavonoides glicosilados aún no están disponibles comercialmente y su determinación y cuantificación es un reto. Por tanto, para la cuantificación con HPLC es necesario un tratamiento con Ácido clorhídrico 3M (Bae *et al.*, 2012b).

El ácido clorhídrico comercial tiene un 37% de pureza, 36.46 g/mol de masa molar y 1.19 g/ml de densidad.

Para calcular la cantidad de HCl presente en dicha solución 3M de HCl, se emplea la siguiente ecuación:

$$ml\ HCl = 3 \frac{mol\ HCl}{litro\ sp} \times 36,46 \frac{g}{mol} \times \frac{1\ ml\ HCl}{1,19\ g} \times \frac{100\ ml\ solución\ HCl}{37\ ml\ HCl} \times litros\ sp$$

siendo:

ml HCl: mililitros de ácido clorhídrico

mol HCl: moles de ácido clorhídrico

litro sp: litro de solución a preparar

Finalmente, se recogen 600 µl de la muestra extraída en microtubos de 2 ml con tapón de rosca y se añaden 300 µl de la solución HCl 3M, para que el extracto esté a 1M HCl 50:50 meOH:Agua. Los tubos Eppendorf con tapón de rosca se cierran y se ponen durante 1 hora en el termobloque a 95°C para realizar el tratamiento de hidrólisis.

3.7. Cromatografía líquida de alta resolución

Las muestras procedentes de la hidrólisis de azúcares unidos a los flavonoides se pasan por el vórtex 3 segundos y se centrifugan durante 5 minutos a 7000 rpm. A continuación, se filtran 0,5 ml de la muestra empleando filtros PTFE cuyo tamaño de poro son 0,22 µm y se recoge el filtrado en viales de vidrio ámbar a partir de los que el HPLC toma la muestra para su análisis. El aparato empleado (Figura 14) es un cromatógrafo de alta resolución, concretamente el modelo Agilent 1220 Infinity con bomba binaria, desgasificador, inyector automático, horno de columna y detector UV.



Figura 14. Dispositivo HPLC y programa informático de análisis

Por lo que respecta a la fase estacionaria, se ha empleado una columna estacionaria C₁₈ Brisa de la marca Teknokroma cuyo tamaño de partícula son 3 µm, su longitud son 150 mm y su diámetro 4.6 mm.

En cuanto a la fase móvil, se ha empleado una mezcla en gradiente de dos fases (A y B) reflejado en la tabla 4, siendo la composición de la fase móvil A: agua miliQ con 0.1% ácido fórmico y de la fase móvil B: metanol con 0,1% ácido fórmico. Además, el flujo de la fase móvil (0.8 ml/min) es constante durante los 25 minutos del análisis.

Tabla 4. Variación de la fase móvil en gradiente.

Tiempo (min)	A%	B%
0	60	40
10	0	100
15	0	100
20	60	40
25	60	40

Atendiendo a otras características generales: la columna se mantuvo a 30°C, la cantidad de muestra inyectada son 10 µl, la longitud de onda a la que se detectan los compuestos de interés es 360 nm y la presión de inicio es 210 bares.

3.8. Análisis estadístico

Con el objetivo de estudiar los efectos del ambiente, del genotipo y la interacción entre ambos se lleva a cabo un análisis de varianza multifactorial (ANOVA) empleando el programa Statgraphics Centurion XVII. Los ambientes analizados en el experimento fueron cuatro, debido a que en cada localidad (Pilar de la Horadada y Puerto de Sagunto) había dos tipos de cultivo (ecológico y convencional). Además, se realizan análisis de varianza simples para cada uno de los flavonoides analizados en este trabajo, atendiendo a la localidad y al tipo de cultivo con el fin de seleccionar los genotipos que mejor se adaptan a las condiciones de cultivo correspondientes. Por último, se calcula el ratio (Híbrido/Parental medio) para cada condición ambiental, con el fin de determinar la influencia de los parentales en el comportamiento del híbrido en función de cada carácter estudiado.

4. RESULTADOS

Por motivos explicativos, vamos a analizar primero las 17 variedades correspondientes a los denominados controles y parentales.

4.1. Niveles generales de flavonoides

Los resultados mostraron que la quercetina fue el flavonoide más abundante en los pimientos analizados con un contenido medio de 1,2 mg/g de peso seco (Tabla 5). La luteolina fue el segundo flavonoide más abundante en las muestras de pimientos con un valor medio de 64,7 μ g/g peso seco. El resto de flavonoides tuvieron contenidos medios más bajos (9,6 μ g/g peso seco la miricetina, 8,2 μ g/g peso seco la apigenina y 7,7 μ g/g peso seco el kaempferol). El rango de variación de dichos compuestos fue amplio, ya que los contenidos eran variables entre las distintas accesiones y ambientes.

Tabla 5. Valores del contenido medio, mínimo y máximo de los flavonoides.

	Media	Mínimo	Máximo
Quercetina (mg/g peso seco)	1,2	0,8	2,2
Luteolina (μg/g peso seco)	64,7	42,8	113,7
Miricetina (μg g peso seco)	9,6	8,1	11,7
Apigenina (μg g peso seco)	8,2	3,8	16,3
Kaempferol (μg g peso seco)	7,7	4,2	13,1

4.2. Efecto del ambiente y del genotipo en el contenido de flavonoides

El análisis de varianza (Tabla 6) reveló una contribución significativa del ambiente y del genotipo para la variación observada en el contenido de todos los flavonoides analizados. Las condiciones ambientales del estudio fueron cuatro distintas, ya que hay dos localidades (Pilar de la Horadada y Puerto de Sagunto) y dos tipos de cultivo (convencional y ecológico) para cada una de ellas. Además, la interacción entre los factores ambiente y genotipo también contribuyó de forma significativa en las diferencias observadas para el contenido de todos los flavonoides analizados menos de la apigenina. No obstante, la contribución de cada factor a la variación observada fue distinta. Atendiendo al valor de los cuadrados medios, el ambiente fue el factor más influyente para la variación observada en el contenido de todos los flavonoides analizados menos de la apigenina, seguido en menor proporción por el efecto del genotipo y la interacción ambiente x genotipo. Por tanto, el resultado del análisis de varianza reveló una predominancia del factor ambiente para la mayoría de los caracteres evaluados.

Tabla 6. ANOVA multifactorial basado en los cuadrados medios (CM) para los efectos del ambiente, del genotipo y la interacción entre ambos sobre la quercetina (Q), luteolina (L), miricetina (M), kaempferol (K) y apigenina (A).

	g.l ¹	CM				
		Q (mg/g)	L (µg/g)	M (µg/g)	A (µg/g)	K (µg/g)
AMBIENTE (AMB)	3	13,53***	21874***	166***	98**	208***
GENOTIPO (G)	16	1,74***	3615***	17**	136***	81***
AMBxG	48	0,80***	1591**	13**	31	37***
RESIDUOS	121	0,39	828	7	24	15

¹ Grados de libertad

** Cuadrado medio significativo para una probabilidad $P < 0.01$ del ratio estadístico F

*** Cuadrado medio significativo para una probabilidad $P < 0.001$ del ratio estadístico F

4.3. Efecto del ambiente en el contenido medio de los flavonoides

En los gráficos que representan el contenido medio de quercetina (Figura 15) y luteolina (Figura 16), destacamos las diferencias significativas entre los cultivos desarrollados en cada localidad. Se observa cómo en los cultivos desarrollados en la localidad Pilar de la Horadada el contenido en quercetina y luteolina fue significativamente inferior al de los cultivos de Puerto de Sagunto. Tanto para la quercetina como la luteolina no se observan diferencias entre los valores medios de los cultivos ecológico y convencional desarrollados en Puerto de Sagunto. En cambio, en Pilar de la Horadada observamos que el cultivo ecológico benefició la acumulación de quercetina, pero no de luteolina, en comparación con el cultivo convencional.

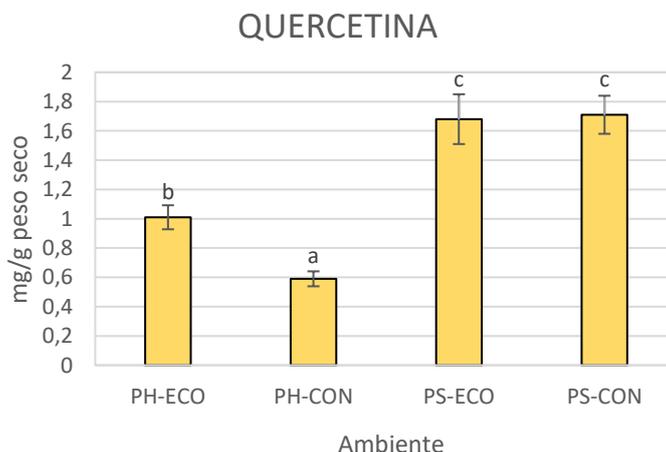


Figura 15. Contenido medio de quercetina (mg/g de peso seco del pimiento) en cada condición ambiental del estudio \pm error estándar. Letras de significación estadística obtenidas mediante el test de Duncan para un p -value < 0.05 .

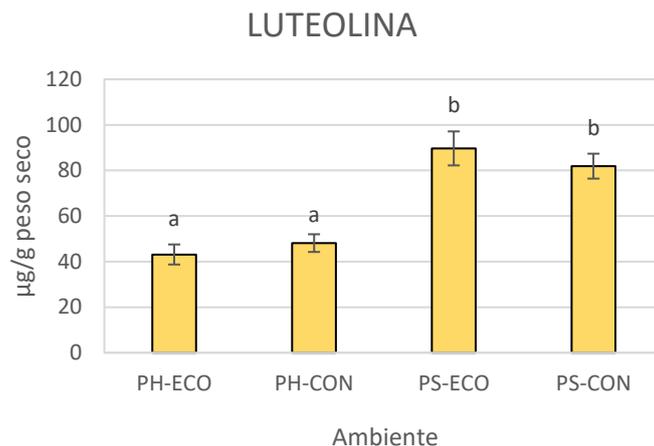


Figura 16. Contenido medio de luteolina ($\mu\text{g/g}$ de peso seco del pimiento) en cada condición ambiental del estudio \pm error estándar. Letras de significación estadística obtenidas mediante el test de Duncan para un $p\text{-value} < 0.05$.

El contenido medio de miricetina entre las distintas condiciones fue variable presentando valores mayores en el cultivo ecológico de Pilar de la Horadada y menores en el cultivo ecológico de Puerto de Sagunto (Figura 17). Los cultivos convencionales de ambas localidades mostraron contenidos medios similares. En cambio, el cultivo ecológico de Pilar de la Horadada y convencional de Puerto de Sagunto fueron los que tenían menor contenido medio de apigenina (Figura 18). Además, el cultivo convencional de Pilar de la Horadada y el ecológico de Puerto de Sagunto mostraron niveles medio de apigenina similares siendo mayores que en el resto de ambientes. Atendiendo al contenido medio de kaempferol (Figura 19), únicamente hubo diferencias significativas en el cultivo convencional de Pilar de la Horadada, siendo el ambiente cuyos valores medios de kaempferol fueron menores.

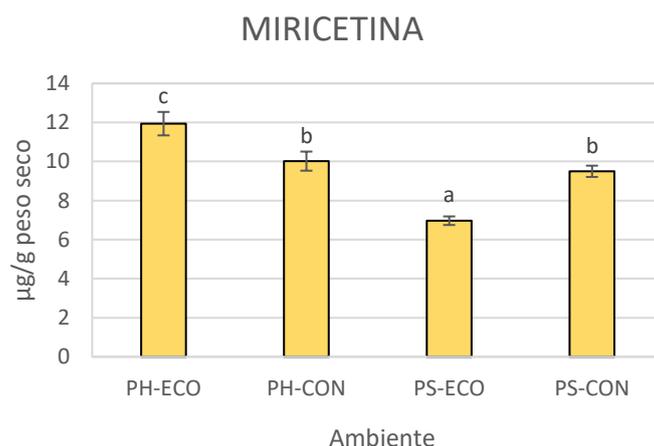


Figura 17. Contenido medio de miricetina ($\mu\text{g/g}$ de peso seco del pimiento) en cada condición ambiental del estudio \pm error estándar. Letras de significación estadística obtenidas mediante el test de Duncan para un $p\text{-value} < 0.05$.

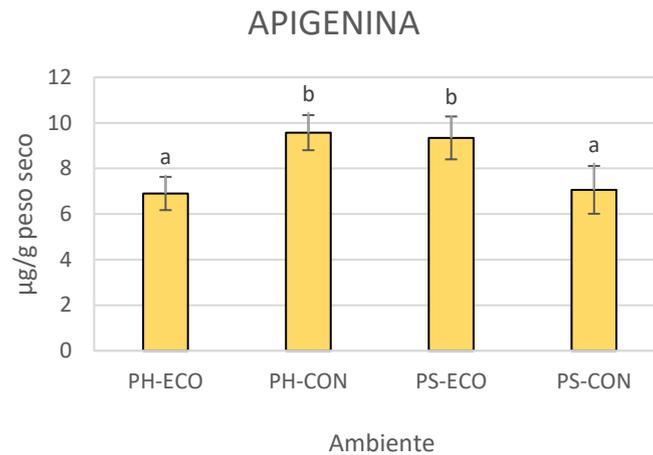


Figura 18. Contenido medio de apigenina ($\mu\text{g/g}$ de peso seco del pimiento) en cada condición ambiental del estudio \pm error estándar. Letras de significación estadística obtenidas mediante el test de Duncan para un $p\text{-value} < 0.05$.

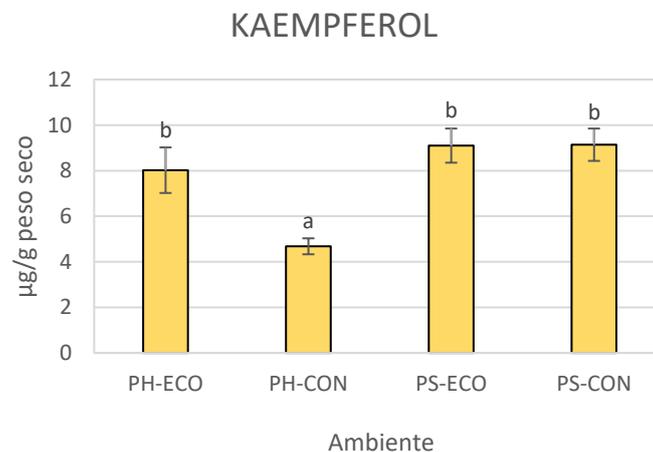


Figura 19. Contenido medio de kaempferol ($\mu\text{g/g}$ de peso seco del pimiento) en cada condición ambiental del estudio \pm error estándar. Letras de significación estadística obtenidas mediante el test de Duncan para un $p\text{-value} < 0.05$.

4.4. Niveles de flavonoides por genotipo y condición ambiental

Dado que el efecto del genotipo también fue importante se estudiaron las diferencias entre genotipos dentro de cada condición. Las tablas con las medias y las letras de significación estadística se encuentran en el Anexo I. Para facilitar la descripción de los resultados se realizó un heatmap (Figura 20). Los datos individuales de cada flavonoide se relativizaron al contenido medio de dicho flavonoide en la condición ambiental correspondiente.

La respuesta de cada genotipo ante los diferentes ambientes fue muy variable. A pesar de ello, algunas variedades mostraron contenidos similares de algún flavonoide concreto en todas las condiciones ambientales del estudio.

De forma general, los genotipos pertenecientes al grupo morrón de cascós (Valenciano, Morro de vaca, Cuatro cantos y Largo de Reus) presentaron contenidos altos para todos los flavonoides menos para la miricetina en todas las condiciones ambientales estudiadas. Por el contrario, otros genotipos que también pertenecen al grupo morrón de cascós (CW (2), CW (3), Gordo_Zamora y Carmagnola Rojo) mostraron resultados contrarios, ya que los niveles de todos los flavonoides menos la miricetina son bajos comparado con el valor medio de todos los genotipos, mientras que el contenido en miricetina para todos los ambientes estudiados fue alto. A pesar de que estos genotipos pertenecen todos al grupo morrón de cascós, los genotipos presentaron niveles muy variables de los flavonoides analizados, considerando así la influencia del genotipo en la acumulación de flavonoides en los frutos. Además, hay otros genotipos (Topepo Rosso, De Infantes, Gordo morro vaca, Gordo_Castellón y CW (4)) que en todas las condiciones ambientales tuvieron bajos contenidos de flavonoides. Por último, las variedades Piquillo y Najerano se caracterizan por ser muy variables para las condiciones ambientales del estudio, ya que en algunos ambientes acumulan mucha cantidad de flavonoides, mientras que en otros ambientes sucede lo contrario.

De forma concreta, el genotipo Largo de Reus mostró contenidos considerablemente superiores, respecto a la media del resto de variedades, para la quercetina (1,28 mg/g de peso seco en PH-CON, 1,59 mg/g de peso seco con PH-ECO, 3,24 mg/g de peso seco en PS-ECO y 2,78 mg/g de peso seco en PS-CON) (Anexo I. Tabla 1) y para el kaempferol (9,96 µg/g de peso seco en PS-ECO) (Anexo I. Tabla 5). Por ello, la variedad Largo de Reus fue la que mejor respuesta tuvo en cuanto a la acumulación de quercetina, destacando nuevamente el cultivo convencional de Pilar de la Horadada, cuyo valor duplica a la media de los demás genotipos para esa condición ambiental concreta.

El genotipo Morro de vaca se caracterizó por presentar niveles altos de luteolina en todas las condiciones ambientales (67,80 µg/g de peso seco en PH-CON, 122,39 µg/g de peso seco en PH-ECO, 128,82 µg/g de peso seco en PS-ECO y 135,81 µg/g de peso seco en PS-CON) (Anexo I. Tabla 2), destacando el cultivo ecológico de Pilar de la Horadada, donde el contenido se duplicó respecto a la media para el resto de genotipos en ese ambiente.

La variedad Najerano fue favorable para el contenido de kaempferol (21,97 µg/g de peso seco) (Anexo I. Tabla 5) en el cultivo ecológico de Puerto de Sagunto y para el contenido de apigenina (19,94 µg/g de peso seco) (Anexo I. Tabla 4) en el cultivo convencional de Puerto de Sagunto. Sin embargo, atendiendo a los valores correspondientes a la quercetina, el genotipo Najerano se mostró especialmente variable. Para el cultivo ecológico de Pilar de la Horadada el contenido fue bajo (0,46 mg/g de peso seco) (Anexo I. Tabla 1) respecto al resto de genotipos. En cambio, en el cultivo ecológico de Puerto de Sagunto, el nivel de quercetina fue alto (3,81 mg/g de peso seco) (Anexo I. Tabla 1). Por otro lado, en el cultivo convencional de Pilar de la Horadada, el contenido (0,65 mg/g de peso seco) (Anexo I. Tabla 1) tomó valores cercanos a la media del resto de genotipos para esta condición ambiental, mientras que en el cultivo convencional de Puerto de Sagunto el contenido de quercetina para el genotipo Najerano fue muy bajo (0,64 mg/g peso seco) (Anexo I. Tabla 1). Por tanto,

esta variedad no se considera favorable para la acumulación de quercetina ya que el rango de variación entre cada condición ambiental es muy amplio.

Además, otras variedades como Gordo morro vaca se caracterizaron por presentar niveles de flavonoides inferiores al resto de genotipos en la mayoría de las condiciones ambientales del estudio.

Por último, los genotipos California Wonder empleados como parentales para la obtención de híbridos, generalmente tuvieron contenido inferiores al del resto de genotipos para todos los flavonoides analizados excepto para la miricetina. Las tres variedades (CW (2), CW (3) y CW (4)) destacaron por sus valores altos de miricetina en los cultivos de Pilar de la Horadada. Además, el genotipo CW (2) duplicó su contenido en miricetina en el cultivo convencional de Puerto de Sagunto (12,54 µg/g de peso seco) (Anexo I. Tabla 3).

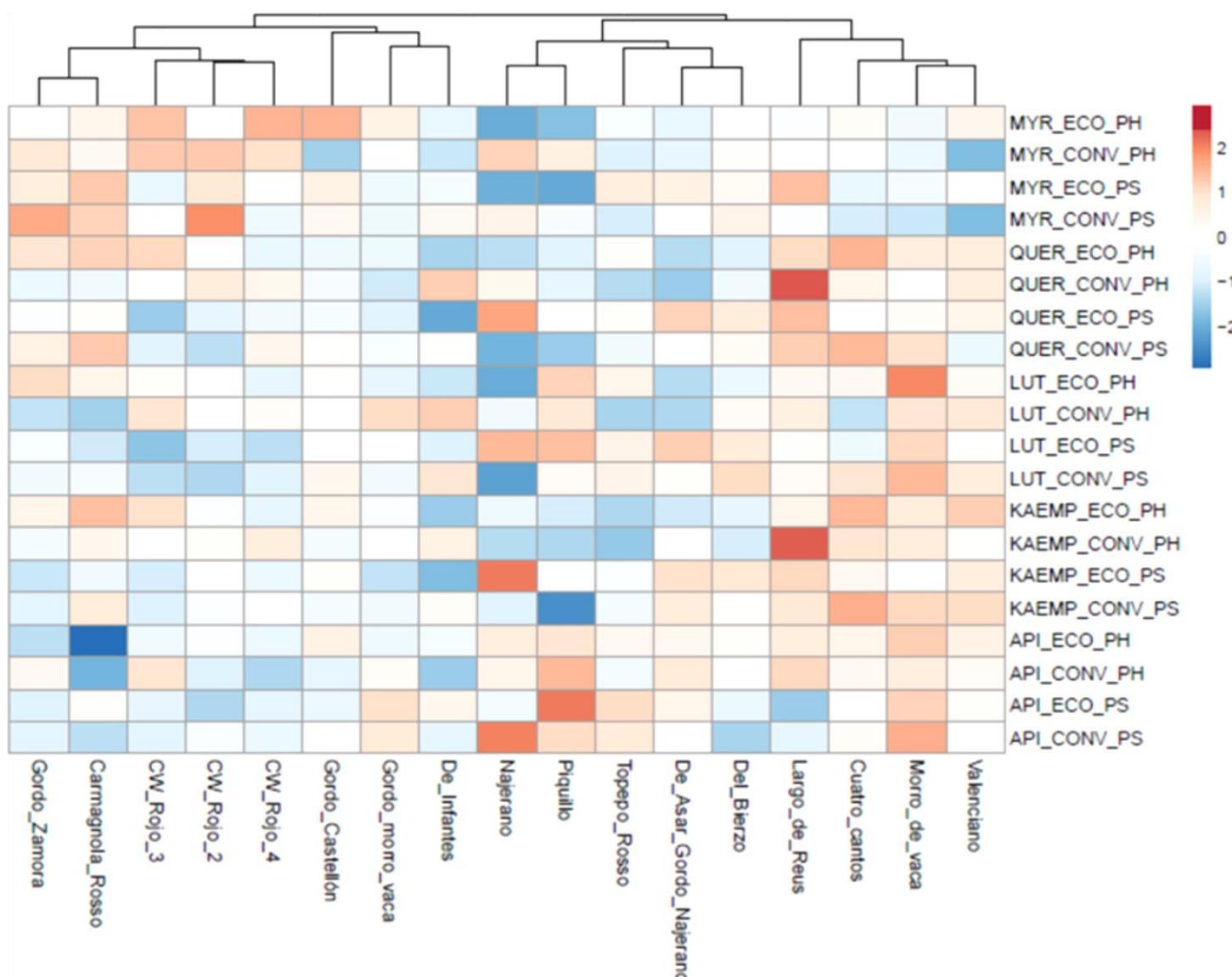


Figura 20. Heatmap del contenido medio de flavonoides en las variedades y ambientes

4.5. Efecto del ambiente en el contenido de flavonoides en los híbridos

El contenido de quercetina en los híbridos (Anexo I. Tabla 1) tomó valores muy variables para las distintas condiciones ambientales estudiadas. En la Figura 21 se muestra el ratio del valor de quercetina en comparación con el parental medio. Generalmente, los híbridos mostraron respuestas diferentes a la predicha por el valor del parental medio, excepto en el híbrido correspondiente al cruce Valenciano x California Wonder (4) Rojo, en el que el contenido de quercetina del híbrido fue igual o ligeramente superior al del parental medio en los diversos ambientes del estudio. De forma general, observamos que el ambiente para el que mejor respuesta hemos obtenido por parte de los híbridos ha sido en el cultivo de tipo convencional en la localidad Pilar de la Horadada, a excepción del cruce Del Bierzo x California Wonder (2) Rojo y los cruces en los que el primer parental es De Asar Gordo Najerano. Por último, destacamos al híbrido procedente del cruce Del Bierzo x California Wonder (2) Rojo cuyo contenido en quercetina triplicó al de su parental medio en el cultivo de tipo convencional de la localidad Puerto de Sagunto.

Los niveles de luteolina de los híbridos fueron, en general, menores que los de su parental medio para todas las condiciones ambientales (Figura 22). A pesar de ello, el híbrido procedente del cruce Valenciano x California Wonder (4) Rojo, que en sus cultivos de tipo convencional se aproxima al valor del parental medio, pero que en los cultivos de tipo ecológicos de ambas localidades de cultivo supera significativamente el contenido en luteolina de su parental medio, resaltando que en Pilar de la Horadada se duplicó. Por tanto, destacamos las condiciones de cultivo en invernadero y el parental Valenciano como factores involucrados en el aumento del contenido en luteolina. Además, el híbrido descendiente del cruce Piquillo x California Wonder (3) Rojo se caracterizó por presentar niveles uniformes de luteolina en todas las condiciones ambientales estudiadas, excepto en el cultivo ecológico de Puerto de Sagunto donde el contenido del híbrido superó considerablemente al del parental medio.

En la Figura 23, observamos que en los cultivos convencionales de las localidades Puerto de Sagunto y Pilar de la Horadada, los híbridos presentaron menor contenido en miricetina que el parental medio, a excepción de algunos híbridos como el procedente del cruce Najerano x California Wonder (4) Rojo que fue ligeramente superior. Además, para este híbrido, los cultivos ecológicos de ambas localidades de cultivos mejoran significativamente el contenido del parental medio, por lo que destacamos al parental Najerano como favorable para el aumento de miricetina en todas las condiciones ambientales estudiadas. Por otro lado, los tres híbridos en los que el primer parental es Piquillo, mejoraron considerablemente sus niveles de miricetina en el cultivo de tipo ecológico de la localidad Puerto de Sagunto. Por último, en la mayoría de los híbridos estudiados, el cultivo ecológico en la localidad Puerto de Sagunto fue la condición ambiental óptima para mejorar el contenido de miricetina del parental medio, destacando los híbridos en los que el ratio se aproxima al valor 1,5.

El contenido de apigenina en el cultivo ecológico de Puerto de Sagunto fue menor en la mayoría de los híbridos respecto al de su parental medio (Figura 24). Sin embargo, en algunos híbridos concretos, los niveles de apigenina se vieron favorecidos en el resto de condiciones ambientales. Concretamente, las condiciones del cultivo ecológico en Pilar de la Horadada mejoraron el contenido de apigenina en

casi todos los híbridos del estudio, a excepción de algunos en los que fue similar o ligeramente reducido. Por último, destacamos el híbrido procedente del cruce Valenciano x California Wonder (4) Rojo cuyos valores de apigenina fueron superiores en todas las condiciones ambientales, llegando a duplicarlos en el cultivo ecológico de Pilar de la Horadada.

En la Figura 25, destacamos algunos híbridos el contenido de kaempferol fue considerablemente superior al de su parental medio. Concretamente, el híbrido resultante del cruce Piquillo x California Wonder (4) Rojo incrementó su contenido en kaempferol en los cultivos convencionales de ambas localidades y en el cultivo ecológico de Pilar de la Horadada, mientras que en cultivo ecológico de Puerto de Sagunto el ratio es 1, por lo que el híbrido mostró el mismo contenido que el parental medio. Además, el híbrido descendiente del cruce Piquillo x California Wonder (2) Rojo se caracterizó por presentar niveles superiores al de su parental medio en todas las condiciones ambientales del estudio. Por ello, resaltamos la influencia favorable del parental Piquillo en el aumento del contenido en kaempferol del híbrido. Por otro lado, el híbrido procedente del cruce Del Bierzo x California Wonder (2) Rojo también tuvo niveles superiores al de su parental medio, debido a que el ratio fue cercano a 1,5 en todas las condiciones ambientales, excepto en el cultivo convencional de Pilar de la Horadada.

Además, en algunos híbridos se ha detectado efecto transgresivo para algunos flavonoides, incrementando así su contenido hasta valores superiores que el de ambos parentales de los que procede. El híbrido procedente del cruce Del Bierzo x CW (2) mostró un valor de quercetina (3,82 mg/g de peso seco) (Anexo I. Tabla 1) considerablemente superior al de cualquiera de sus parentales (Del Bierzo: 1,76 mg/g de peso seco y CW (2): 0,86 mg/g de peso seco) (Anexo I. Tabla 1) para el cultivo convencional de Puerto de Sagunto. El híbrido resultante del cruce Najerano x CW (4) tuvo valores de quercetina (1,17 mg/g de peso seco) (Anexo I. Tabla 1) incrementados respecto a sus parentales (Najerano: 0,65 mg/g de peso seco y CW (4): 0,64 mg/g de peso seco) (Anexo I. Tabla 1) en el cultivo convencional de Pilar de la Horadada. El híbrido descendiente del cruce Piquillo x CW (3) presentó niveles de quercetina (1,81 mg/g de peso seco) (Anexo I. Tabla 1) superiores a los de sus parentales (Piquillo: 1,37 mg/g de peso seco y CW (3): 0,63 mg/g de peso seco) (Anexo I. Tabla 1) en el cultivo ecológico de Puerto de Sagunto. Por otro lado, el híbrido resultante del cruce Valenciano x CW (4) tuvo niveles de luteolina (75,25 µg/g de peso seco) (Anexo I. Tabla 2) considerablemente incrementados respecto a sus parentales (Valenciano: 45,06 µg/g de peso seco y CW (4): 23,27 µg/g de peso seco) (Anexo I. Tabla 2) en el cultivo ecológico de Pilar de la Horadada.

QUERCETINA

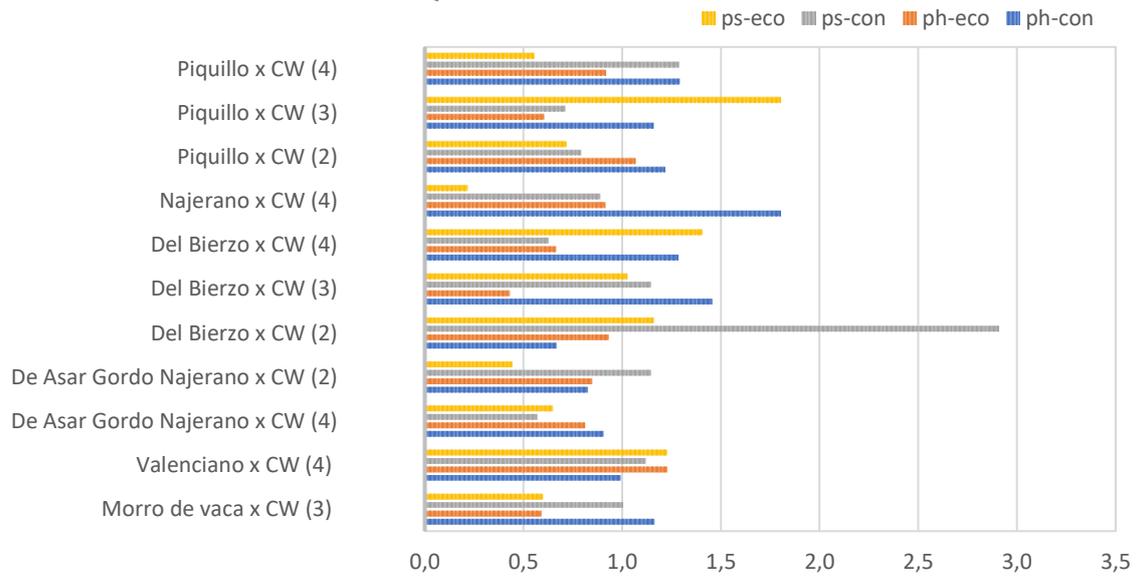


Figura 21. Ratio Híbrido/Parental medio del contenido en quercetina de los híbridos en las cuatro condiciones ambientales del análisis.

LUTEOLINA

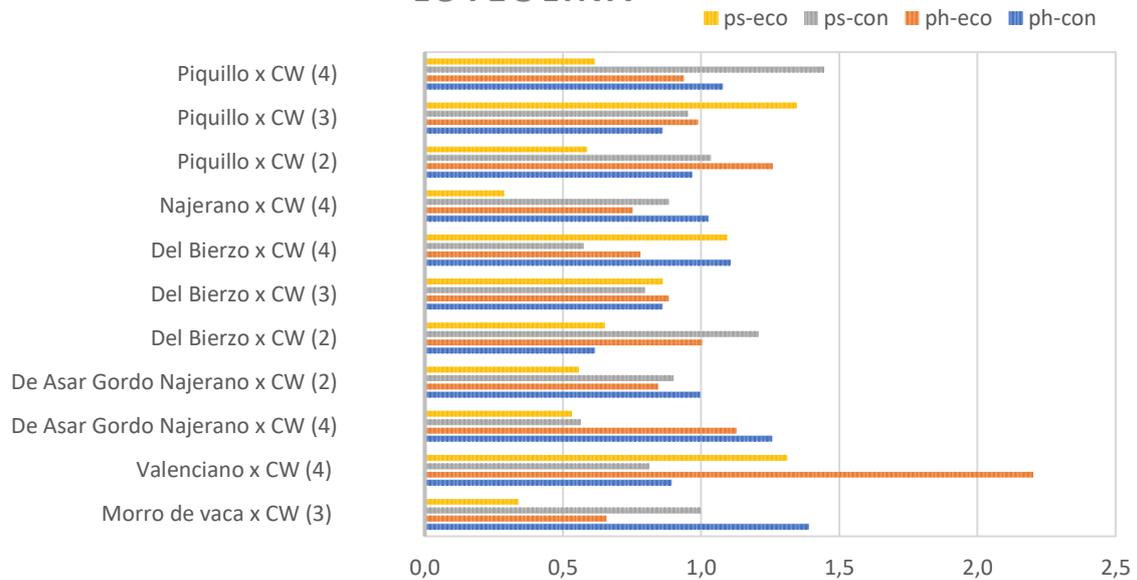


Figura 22. Ratio Híbrido/Parental medio del contenido en luteolina de los híbridos en las cuatro condiciones ambientales del análisis

MIRICETINA

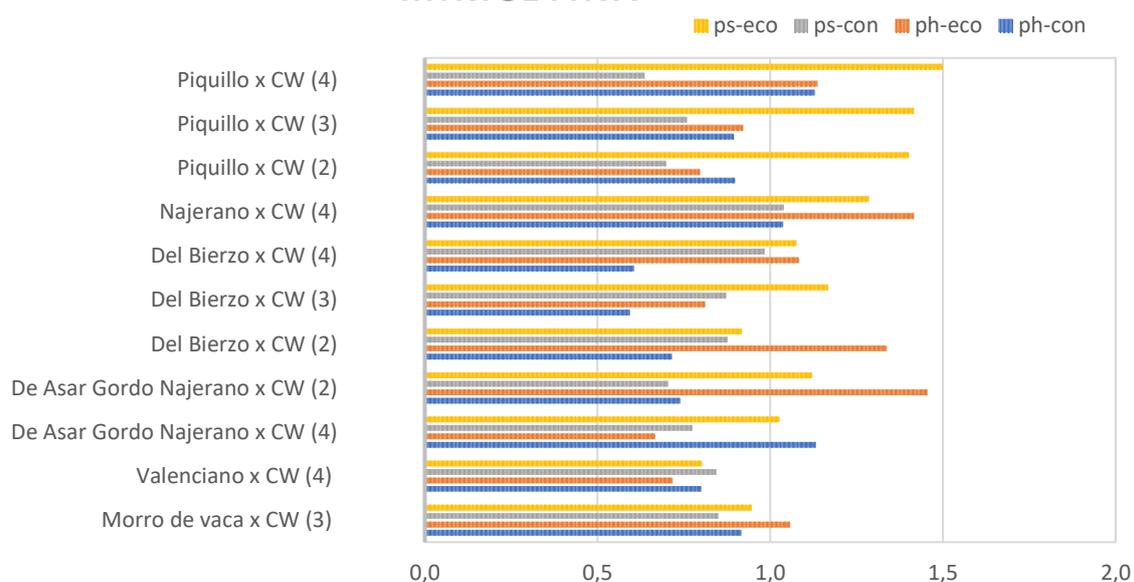


Figura 23. Ratio Híbrido/Parental medio del contenido en miricetina de los híbridos en las cuatro condiciones ambientales del análisis.

APIGENINA

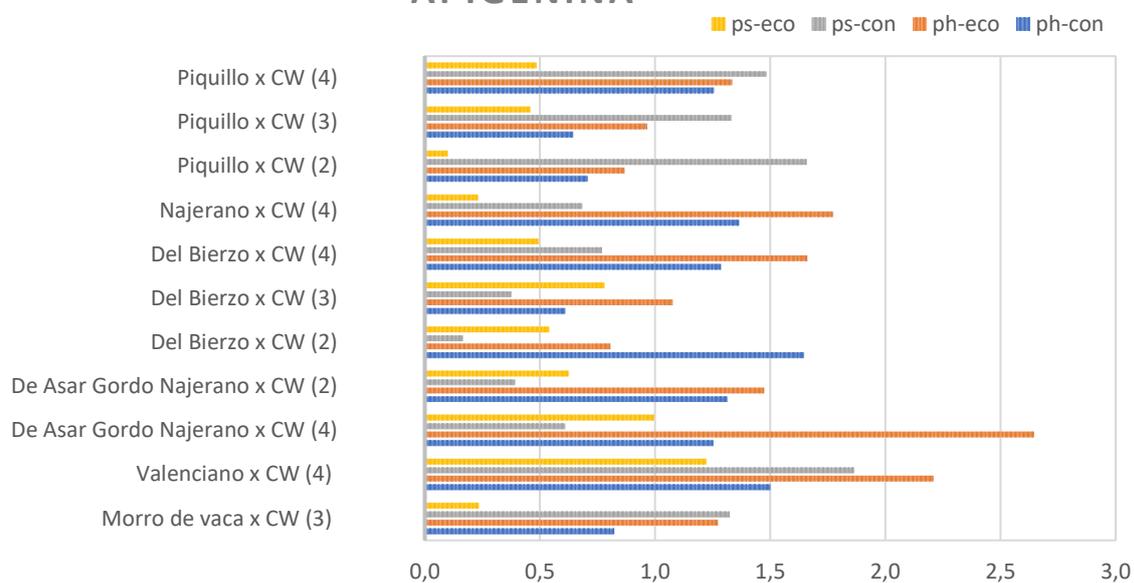


Figura 24. Ratio Híbrido/Parental medio del contenido en apigenina de los híbridos en las cuatro condiciones ambientales del análisis.

KAEMPFEROL

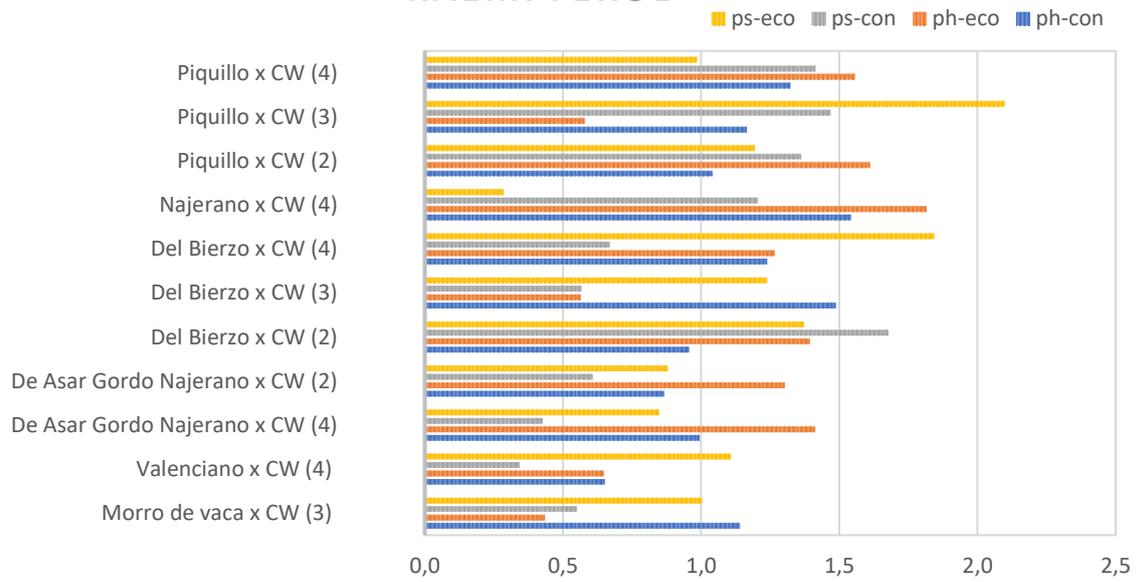


Figura 25. Ratio Híbrido/Parental medio del contenido en kaempferol de los híbridos en las cuatro condiciones ambientales del análisis.

5. DISCUSIÓN

5.1. Niveles de flavonoides en pimiento

Como ya hemos comentado, las especies del género *Capsicum* son capaces de sintetizar compuestos fenólicos como mecanismos de defensa de la planta ante diversas situaciones de estrés biótico y abiótico. Estos compuestos son muy ricos funcionalmente para los seres humanos, debido a que se tratan de compuestos antioxidantes con capacidad de eliminar radicales libres de nuestro organismo.

Los compuestos fenólicos más importantes son los flavonoides, destacando sus efectos bioquímicos y farmacológicos, como antioxidantes, antiinflamatorios y antialérgicos. Por tanto, tienen gran potencial para mejorar la salud de los seres humanos mediante su ingesta en los alimentos. El fruto de pimiento se caracteriza por tener altos contenidos de flavonoides, aunque la concentración de cada flavonoide está determinada por factores como el genotipo y las condiciones de cultivo.

En nuestro estudio, la quercetina ha sido el flavonoide más abundante en los controles y parentales (1,2 mg/g de peso seco) (Anexo I. Tabla 1), seguido de la luteolina (64,7 µg/g de peso seco) (Anexo I. Tabla 2). Los autores Bae *et al.*, (2012b) obtuvieron resultados similares a los nuestros en la extracción de flavonoides con disolvente metanol en el genotipo Paprika. La quercetina tuvo los niveles más altos de los flavonoides identificados (357,86 µg/g de peso seco), aunque considerablemente inferiores a los de nuestro análisis. La luteolina fue el segundo flavonoide más abundante para la variedad Paprika (59,15 µg/g de peso seco), por lo que el contenido de luteolina fue similar al de nuestros genotipos. En cambio, el genotipo Paprika mostró un contenido alto en kaempferol (31,45 µg/g de peso seco), mientras que la miricetina y la apigenina no se detectaron. En nuestro análisis, los valores medios de miricetina (Anexo I. Tabla 3), kaempferol (Anexo I. Tabla 4) y apigenina (Anexo I. Tabla 5) han tomado valores muy bajos en los genotipos correspondientes a los controles y parentales (9,6 µg/g de peso seco, 8,2 µg/g de peso seco y 7,7 µg/g de peso seco, respectivamente). Por tanto, los genotipos de nuestro estudio y el genotipo Paprika son favorables para la acumulación de flavonoides como quercetina y luteolina en el fruto de pimiento, pero son variedades que acumulan bajos contenidos de miricetina, kaempferol y apigenina. Por ello, destacamos la influencia del genotipo en la acumulación de flavonoides en el fruto de pimiento como respuesta a diversas situaciones de estrés (Deepa *et al.*, 2006) (Ghasemnezhad *et al.*, 2011).

Atendiendo a nuestros resultados, todos los parentales California Wonder analizados han tenido niveles muy altos de quercetina (0,85 mg/g de peso seco en CW (2), 0,96 mg/g de peso seco en CW (3) y 1,08 mg/g de peso seco en CW (4)), mientras que el kaempferol y la apigenina también estaban presentes pero su contenido era bajo. Sin embargo, en la publicación de Bae *et al.*, (2012a), en el análisis del contenido de flavonoides extraídos mediante el disolvente metanol en el genotipo California Wonder (CA 408), no se detectó quercetina, kaempferol y apigenina, mientras que el contenido de luteolina fue bajo (26,9 µg/g de peso seco). Además, el contenido de luteolina en nuestras variedades California Wonder (42,76 µg/g de peso seco en CW (2), 48,40 µg/g de peso seco en CW (3) y 43,51 µg/g de peso seco en CW (4)) ha sido mayor que en la variedad CA 408. Suponemos que el genotipo de la variedad CA 408 y de nuestras variedades California Wonder es similar, por lo que la causa asociada a

los diferentes valores de flavonoides observados pueden ser las condiciones de crecimiento en las que se ha desarrollado el cultivo (Howard *et al.*, 2000) (Lee *et al.*, 1995).

La quercetina se caracteriza por presentar efectos anticancerígenos y antimutagénicos, así como su capacidad de inhibir la replicación de virus como el Herpes simple, virus de la polio, virus de tipo parainfluenza y virus sincitiales, mientras que la luteolina tiene capacidad de reducir la formación excesiva de estrógeno mediante la supresión de la enzima aromatasa y el bloqueo de la unión de los estrógenos a los sitios receptores de las células mamarias, de forma que contribuye a la prevención del cáncer de mama (Lee *et al.*, 2005).

Nuestros resultados revelan que el contenido de quercetina y luteolina está influenciado significativamente por el genotipo y por el ambiente (p -value <0.001). Además, la interacción entre el genotipo y el ambiente también ha mostrado influencia en el nivel de quercetina (p -value <0.001) y luteolina (p -value <0.01), por lo que los resultados se asemejan a los obtenidos por Meckelmann *et al.*, (2014) para otras variedades de pimiento.

5.2. Efecto del ambiente en el contenido de flavonoides

Las diferentes condiciones en las que se puede desarrollar un cultivo tienen influencia directa sobre la concentración de flavonoides. Por un lado, en los cultivos desarrollados al aire libre, la planta está sometida a un nivel de estrés alto, debido a factores como la luz UV, el viento, la temperatura y la presencia de insectos. Por otro lado, los cultivos en invernadero someten a la planta a un nivel menor de estrés, ya que se llevan a cabo bajo condiciones controladas.

Nuestros resultados muestran que el contenido medio de quercetina y luteolina es mayor en los cultivos desarrollados en la localidad Puerto de Sagunto, donde los cultivos estaban al aire libre. Estos resultados se confirman en la publicación de Bae *et al.*, (2014), donde se afirma que los cultivos procedentes del cultivo en invernadero muestran valores bajos y poco variables de flavonoides debido a que el cultivo se lleva a cabo en condiciones controladas, evitando algunos tipos de estrés como luz y temperatura y proporcionando el agua y los nutrientes necesarios para el desarrollo correcto de la planta. A pesar de ello, en el estudio realizado por Lee *et al.*, (2005) las variedades de pimiento dulce (Banana Supreme y PI 357509) mostraron niveles superiores de quercetina y luteolina respecto al resto de genotipos en el cultivo desarrollado en invernadero.

5.3. Niveles de flavonoides por genotipo y condición ambiental

En los resultados hemos observado que cada genotipo presenta una respuesta distinta ante los diferentes ambientes estudiados. Sin embargo, hay algunas variedades cuya tendencia siempre es la misma, ya que acumulan contenidos similares de algún flavonoide determinado en las cuatro condiciones ambientales distintas del estudio.

A rasgos generales, los genotipos de tipo morrón de cascós: Valenciano, Morro de vaca, Cuatro cantos y Largo de Reus, mostraron contenidos superiores al resto de genotipos en las condiciones ambientales analizadas en todos los flavonoides del estudio excepto en la miricetina. En cambio, hay otros genotipos de tipo morrón de cascós (CW (2), CW (3), Gordo y Carmagnola Rojo) en los que los resultados son completamente inversos, ya que muestran niveles superiores en todas las condiciones ambientales analizadas para la miricetina. A pesar de que estos genotipos pertenecen todos al grupo morrón de cascós, los genotipos han presentado niveles muy variables de los flavonoides analizados, considerando así la influencia del genotipo en la acumulación de flavonoides en los frutos. Por otro lado, destacamos otras variedades (Piquillo y Najerano) cuyos contenidos en todos los flavonoides analizados son muy variables para las condiciones ambientales del estudio, por lo que se tratan de variedades que en algunos ambientes acumulan mucha cantidad de flavonoides, mientras que en otros ambientes sucede lo contrario.

5.4. Contenido de flavonoides en los híbridos de pimiento

El efecto de los distintos ambientes en la expresión de los flavonoides empleados en nuestro estudio no se ha podido contrastar con resultados de otros autores, debido a que los híbridos que hemos obtenido son novedosos y no hay referencias sobre su contenido.

El contenido de flavonoides en los híbridos ha sido muy variable para los genotipos y las condiciones ambientales del estudio. Sin embargo, hay algunos híbridos que muestran niveles altos para los flavonoides mayoritarios (quercetina y luteolina). El híbrido procedente del cruce Valenciano x California Wonder Rojo (4) mejora los niveles de quercetina correspondientes a su parental medio en las cuatro condiciones ambientales del estudio. Además, el contenido en luteolina se incrementa considerablemente en los cultivos de tipo ecológico de ambas localidades, mientras que en los cultivos convencionales disminuye. Por tanto, dado que el segundo parental de todos los híbridos corresponde a una variedad de tipo California Wonder, destacamos la importancia del genotipo Valenciano como un parental interesante para realizar cruzamientos y obtener híbridos con alto contenido de quercetina y luteolina en sus frutos. Además, el efecto transgresivo observado en algunos híbridos para los flavonoides mayoritarios es un carácter especial mediante el que podemos obtener híbridos con contenidos de flavonoides significativamente superiores al valor de cualquiera de sus parentales para un determinado ambiente. A pesar de ello, es necesario controlar el efecto ambiental para que no condicione nuestros resultados.

Finalmente, el principal problema a la hora de seleccionar un genotipo óptimo para la expresión de flavonoides mayoritarios es que la síntesis de compuestos fenólicos se lleva a cabo en rutas metabólicas muy complejas en las que intervienen muchos genes y cada uno de ellos está influenciado de forma distinta por el ambiente. Por ello, se pretende seleccionar genotipos cuya heredabilidad realizada tome valores cercanos a 1, lo que significa que ese genotipo en esa condición específica varía muy poco debido al ambiente, por lo que, si tomamos ese genotipo como parental para la obtención de híbridos, esperamos que el híbrido tenga valores de flavonoides similares a los de sus parentales.

6. CONCLUSIONES

En nuestro estudio fue más determinante para la concentración de los flavonoides principales en pimiento (quercetina y luteolina) la localidad donde se desarrolló el cultivo que el hecho de utilizar técnicas de cultivo ecológico o convencional.

La localidad Puerto de Sagunto fue más adecuada para la acumulación de flavonoides debido a que el cultivo se llevó a cabo al aire libre, aunque consideramos que otros factores como el clima o la localización también pudieron tener influencia.

En Pilar de la Horadada, donde se realizó cultivo protegido, si resultó ventajoso el manejo ecológico, aunque no se llegara a los niveles de acumulación de flavonoides de Puerto de Sagunto.

La respuesta de los genotipos fue muy variable dependiendo del ambiente, destacando Largo de Reus por sus altos niveles de quercetina.

La respuesta de los híbridos fue en general distinta a la del parental medio encontrándose en muchos casos efectos transgresivos que se podrían explotar en la mejora. Sin embargo, sería necesario minimizar la gran influencia ambiental observada.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAE, H., JAYAPRAKASHA, G., CROSBY, K., SUN YOO, K., LESKOBAR, D. I., JIFON, J., & PATIL, B. S. (2014). Ascorbic acid, capsaicinoid, and flavonoid aglycone concentrations as a function of fruit maturity stage in greenhouse-grown peppers. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33(2), 195-202.
2. BAE, H., JAYAPRAKASHA, G., JIFON, J., & PATIL, B. (2012a). Variation of antioxidant activity and the levels of bioactive compounds in lipophilic and hydrophilic extracts from hot pepper (*Capsicum* spp.) cultivars. *Food Chem*, 134(4), 1912-1918.
3. BAE, H., JAYAPRAKASHA, G., JIFON, J., & PATIL, B. S. (2012b). Extraction efficiency and validation of an HPLC method for flavonoid analysis. *Food Chemistry*, 751-758.
4. BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K., & SAMMAN, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191-203.
5. BOSLAND, P., & VOTAVA, E. (2000). *Peppers: vegetable and spice capsicums*. Cabi- Crop production.
6. D'ARCHIVIO, M., FILESI, C., DI BENEDETTO, R., GARGIULO, R., GIOVANNINI, C., & MARSELLA, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita*, 43(4), 348-361.
7. DEEPA, N., KAUR, C., SINGH, B., & KAPOOR, H. (2006). Antioxidant activity in some red sweet pepper cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 572-578.
8. DÍAZ, J., POMAR, F., BERNAL, A., & MERINO, F. (2004). Peroxidases and the metabolism of capsaicin in *Capsicum annum* L. *Phytochemistry Reviews*, 3(1-2), 141-157.
9. ESHBAUGH, W. (1993). History and exploitation of a serendipitous new crop discovery. (J. Janick, & J. Simon, Edits.) *New crops*, 132-139.
10. ESPÍN DE GEA, J., & TOMÁS BARBERÁN, F. (2006). Polifenoles y salud. *Investigación y Ciencia*(356), 34-36.
11. FAO (2017). Consulta de las estadísticas: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
12. GHASEMNEZHAD, M., SHERAFATI, M., & ALI PAYVAST, G. (2011). Variation in phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant activity of five coloured bell pepper (*Capsicum annum*) fruits at two different harvest times. *Journal of Functional Foods*, 3(1), 44-49.
13. GIMENO, E. (2014). *Trabajo final de Máster*. Instituto de Conservación y Mejora de Agrodiversidad Valenciana, Valencia.

14. GONZÁLEZ-PÉREZ, S., GARCÉS-CLAVER, A., MALLOR, C., SÁENZ DE MIERA, L. E., FAYOS, O., POMAR, F., . . . SILVAR, C. (2014). New Insights into Capsicum spp Relatedness and the Diversification Process of Capsicum annuum in Spain. *PLoS ONE*.
15. GUIL-GUERRERO, J. L., MARTÍNEZ-GUIRADO, C., REBOLLOSO-FUENTES, M. D., & CARRIQUE-PÉREZ, A. (2006). Nutrient composition and antioxidant activity of 10 pepper (Capsicum annuum) varieties. *European Food Research and Technology*, 1–9.
16. HARDY ESHBAUGH, W. (2012). *The Taxonomy of the Genus Capsicum*. En *Peppers: Botany, production and uses*. USA: Russo VM.
17. HEIM, K. E., TAGLIAFERRO, A. R., & BOBILYA, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572-584.
18. HILL, T., ASHRAFI, H., REYES-CHIN-WO, S., YAO, J., STOFFEL, K., TRUCO, M., & AL., E. (2013). Characterization of Capsicum annuum Genetic Diversity and Population Structure Based on Parallel Polymorphism Discovery with a 30K Unigene Pepper GeneChip. (J. Zhang, Ed.) *PLoS One*, 8(2).
19. HOLLMAN, P., & KATAN, M. (1999). Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol*, 37(9-10), 937-942.
20. HORTOINFO (2017). Consulta de las estadísticas: <http://www.hortoinfo.es/index.php/informes/cultivos/6011-inf-pim-2017>
21. HOWARD, L., TALCOTT, S., BRENES, C., & VILLALON, B. (2000). Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (Capsicum species) as influenced by maturity. *J Agric Food Chem*, 48(5), 1713-1720.
22. IGNAT, I., VOLF, I., & POPA, I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821-1835.
23. KOLLMANNNSBERGER, H., RODRÍGUEZ-BURRUEZO, A., NITZ, S., & NUEZ, F. (2011). Volatile and capsaicinoid composition of ají (Capsicum baccatum) and rocoto (Capsicum pubescens), two Andean species of chile peppers. *Journal of the Science Food of Food and Agriculture*, 91(9), 1598-1611.
24. KUKLINSKI, C. (2003). *Nutrición y Bromatología*. Omega S.A, Barcelona, España.
25. LATHAM, M.C. (2002). *Nutrición humana en el mundo en desarrollo*. Colección FAO: Alimentación y Nutrición número 29. FAO, Roma, Italia.
26. LEE, J. J., CROSBY, K. M., PIKE, L. M., YOO, K. S., & LESKOVAR, D. I. (2005). Impact of genetic and environmental variation on development of flavonoids and carotenoids in pepper (Capsicum spp.). *Scientia Horticulturae*, 106(3), 341-352.

27. LEE, Y., HOWARD, L., & VILLALÓN, B. (1995). Flavonoids and Antioxidant Activity of Fresh Pepper (*Capsicum annuum*) Cultivars. *Journal of Food Science*, 60(3).
28. MATSUFUJI, H., NAKAMURO, H., CHINO, M., & MITSUHARO, T. (1998). Antioxidant activity of capsanthin and the fatty acid esters in paprika (*Capsicum annuum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3462-3472.
29. MECKELMANN, S., RIEGEL, D., VAN ZONNEVELD, M., RÍOS, L., PEÑA, K., MUELLER-SEITZ, E., & PETZ, M. (2014). Capsaicinoids, flavonoids, tocopherols, antioxidant capacity and color attributes in 23 native Peruvian chili peppers (*Capsicum* spp.) grown in three different locations. *European Food Research and Technology*, 240(2), 273-283.
30. MERKEN, H., & BEECHER, G. (2000). Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *J Agric Food Chem*, 48(3), 577-599.
31. NAVARRO, J. M., FLORES, P., GARRIDO, C., & MARTINEZ, V. (2005). Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chemistry*, 96(1), 66-73.
32. NAZZARO, F., CALIENDO, G., ARNESI, G., VERONESI, A., SARZI, P., & FRATIANNI, F. (2009). COMPARATIVE CONTENT OF SOME BIOACTIVE COMPOUNDS IN TWO VARIETIES OF CAPSICUM ANNUUM L. SWEET PEPPER AND EVALUATION OF THEIR ANTIMICROBIAL AND MUTAGENIC ACTIVITIES. *Journal of Food Biochemistry*, 33(6), 852-868.
33. NUEZ, F.; GIL-ORTEGA, R.; COSTA, J. (2003). *El cultivo de pimiento, chiles y ajíes*. Mundi-Prensa, Madrid, España.
34. OLMSTEAD, R., & BOHS, L. (2007). A Summary of Molecular Systematic Research in Solanaceae: 1982-2006. *Acta horticulturae*, 745(745).
35. PARAN, I., & VAN DER KNAAP, E. (2007). Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. *Journal of Experimental Botany*, 58(14), 3841-3852.
36. PERRY, L., DICKAU, R., ZARRILLO, S., HOLST, I., PEARSALL, D., PIPERNO, D., . . . ZEIDLER, J. (2007). Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. *Science*, 315(5814), 986-988.
37. PIETTA, P. (2000). Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*, 63(7), 1035-1042.
38. RIBES-MOYA, A. M., RAIGÓN, M. D., MORENO-PERIS, E., FITA, A., & RODRÍGUEZ-BURRUEZO, A. (2018). Response to organic cultivation of heirloom *Capsicum* peppers: Variation in the level of bioactive compounds and effect of ripening. *PLoS ONE*, 13(11).
39. RICE-EVANS, C., MILLER, N., & PAGANGA, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*, 20(7), 933-956.

40. RODRIGUEZ BURRUEZO, A., PEREIRA DIAS, L., & FITA, A. (2016). *Las variedades locales en la mejora genética de plantas* (Vol. 21. Pimiento). (J. Ruiz de Galarreta, J. Prohens, & R. Tierno, Edits.) Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco.
41. SCOTT-MON CRIEFF, C. (2000). *El libro de las vitaminas*. Ediciones B S.A., Barcelona, España.
42. SOMOS, A. (1984). *The paprika*. Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungría.
43. TRIPODI, P., CARDI, T., BIANCHI, G., ANNA MIGLIORI, C., SCHIAVI, M., & LEONARDO ROTINO, G. (2018). Genetic and environmental factors underlying variation in yield performance and bioactive compound content of hot pepper varieties (*Capsicum annuum*) cultivated in two contrasting Italian locations. *European Food Research and Technology*, 244(9), 1555-1567.
44. TSAO, R., & YANG, R. (2003). Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 1018(1), 29-40.

8. ANEXOS

8.1. ANEXO I. Tablas del contenido medio de los genotipos

Tabla 1. ANOVA simple del contenido en quercetina (mg/g peso seco del pimiento) con letras de significación estadística obtenidas mediante el test de Duncan para un p-value<0,05.

GENOTIPO	QUERCETINA (mg/g peso seco)				Promedio
	PH		PS		
	ECOLOGICO	CONVENCIONAL	ECOLOGICO	CONVENCIONAL	
Cuatro cantos	1,99 ± 0,3f	0,66 ± 0,2ab	1,44 ± 0,2abc	3,09 ± 1,1de	1,79 ± 0,4
Gordo morro vaca	0,67 ± 0,1ab	0,37 ± 0,0a	0,93 ± 0,2ab	1,32 ± 0,1abc	0,82 ± 0,1
Gordo	1,47 ± 0,3def	0,45 ± 0,0a	1,31 ± 0,0abc	2,04 ± 0,4abcd	1,31 ± 0,2
Carmagnola Rosso	1,67 ± 0,2ef	0,46 ± 0,1a	1,64 ± 0,8abc	2,79 ± 0,3cde	1,64 ± 0,4
Topepo Rosso	1,01 ± 0,0abcd	0,35 ± 0,0a	1,67 ± 0,6abc	1,24 ± 0,4ab	1,07 ± 0,3
De Infantes	0,42 ± 0,1a	0,86 ± 0,6abc	0,47 ± 0,1a	1,65 ± 0,6abcd	0,85 ± 0,3
Largo de Reus	1,59 ± 0,2def	1,28 ± 0,3c	3,24 ± 0,9bc	2,78 ± 0,4cde	2,22 ± 0,4
Morro de vaca	1,28 ± 0,3cde	0,57 ± 0,2a	1,69 ± 0,1abc	2,52 ± 0,2bcde	1,51 ± 0,2
Valenciano	1,28 ± 0,5cde	0,72 ± 0,2ab	1,95 ± 0,6abc	1,19 ± 0,3ab	1,28 ± 0,4
Gordo	0,67 ± 0,1ab	0,47 ± 0,0a	1,17 ± 0,2abc	1,64 ± 0,7abcd	0,99 ± 0,3
DAGN	0,44 ± 0,1a	0,32 ± 0,1a	2,80 ± 1,9abc	1,60 ± 0,3abcd	1,29 ± 0,6
Del Bierzo	0,57 ± 0,1ab	0,45 ± 0,0a	2,26 ± 0,3abc	1,76 ± 0,6abcd	1,26 ± 0,2
Najerano	0,46 ± 0,1a	0,65 ± 0,1ab	3,81 ± 0,0c	0,64 ± 0,2a	1,39 ± 0,1
Piquillo	0,57 ± 0,1ab	0,43 ± 0,0a	1,37 ± 0,1abc	0,77 ± 0,1a	0,78 ± 0,1
CW Rojo (2)	0,84 ± 0,2abc	0,72 ± 0,2ab	0,98 ± 0,0ab	0,86 ± 0,3a	0,85 ± 0,2
CW Rojo (3)	1,61 ± 0,2ef	0,57 ± 0,1a	0,63 ± 0,2ab	1,05 ± 0,1ab	0,96 ± 0,2
CW Rojo (4)	0,63 ± 0,1ab	0,64 ± 0,0ab	1,13 ± 0,0abc	1,90 ± 0,5abcd	1,08 ± 0,2
Morro de vaca x CW (3)	0,85 ± 0,1abc	0,66 ± 0,1ab	0,70 ± 0,0ab	1,79 ± 0,2abcd	1,00 ± 0,2
Valenciano x CW (4)	1,17 ± 0,2bcde	0,68 ± 0,2ab	1,89 ± 0,1abc	1,73 ± 0,5abcd	1,37 ± 0,2
DAGN x CW (4)	0,43 ± 0,2a	0,44 ± 0,1a	1,28 ± 0,8abc	1,00 ± 0,3ab	0,79 ± 0,3
DAGN x CW (2)	0,54 ± 0,1a	0,43 ± 0,1a	0,84 ± 0,1ab	1,41 ± 0,5abc	0,81 ± 0,2
Del Bierzo x CW (2)	0,66 ± 0,2ab	0,39 ± 0,1a	1,88 ± 0,7abc	3,82 ± 0,9e	1,69 ± 0,5

Del Bierzo x CW (3)	0,47 ± 0,1a	0,74 ± 0,2ab	1,48 ± 0,8abc	1,61 ± 0,2abcd	1,08 ± 0,3
Del Bierzo x CW (4)	0,40 ± 0,0a	0,71 ± 0,2ab	2,39 ± 1,4abc	1,15 ± 0,2ab	1,16 ± 0,5
Najerano x CW (4)	0,50 ± 0,1a	1,17 ± 0,1bc	0,54 ± 0,0ab	1,13 ± 0,3ab	0,83 ± 0,2
Piquillo x CW (2)	0,75 ± 0,1abc	0,70 ± 0,1ab	0,84 ± 0,0ab	0,65 ± 0,2a	0,74 ± 0,1
Piquillo x CW (3)	0,66 ± 0,1ab	0,58 ± 0,0ab	1,81 ± 0,0abc	0,65 ± 0,0a	0,92 ± 0,1
Piquillo x CW (4)	0,55 ± 0,0a	0,70 ± 0,0ab	0,70 ± 0,0ab	1,72 ± 0,3abcd	0,92 ± 0,1

Tabla 2. ANOVA simple del contenido en luteolina ($\mu\text{g/g}$ peso seco del pimiento) con letras de significación estadística obtenidas mediante el test de Duncan para un $p\text{-value} < 0,05$.

GENOTIPO	LUTEOLINA ($\mu\text{g/g}$ de peso seco)				Promedio
	PH		PS		
	ECOLOGICO	CONVENCIONAL	ECOLOGICO	CONVENCIONAL	
Cuatro cantos	45,79 ± 11,5abcdefg	25,86 ± 4,5abc	62,01 ± 9,9abcd	110,04 ± 18,2efg	60,92 ± 11,0
Gordo morro vaca	23,19 ± 3,0abcde	71,60 ± 7,8def	74,40 ± 3,6abcd	63,81 ± 16,7abcdef	58,25 ± 7,8
Gordo	68,73 ± 18,4fgh	25,42 ± 7,8abc	69,32 ± 0,0abcd	63,06 ± 20,2abcdef	56,63 ± 15,5
Carmagnola Rosso	49,40 ± 11,7cdefgh	22,40 ± 2,2a	48,85 ± 14,0ab	65,88 ± 7,1abcdef	46,63 ± 8,8
Topepo Rosso	49,63 ± 4,0cdfgh	23,02 ± 4,2ab	100,73 ± 35,4abcd	93,39 ± 32,9cdefg	66,69 ± 19,1
De Infantes	18,08 ± 3,3abcd	77,06 ± 47,5ef	52,69 ± 14,2abc	110,45 ± 32,4efg	64,57 ± 24,3
Largo de Reus	45,74 ± 2,8abcdefg	58,97 ± 14,3abcdef	87,89 ± 21,1abcd	84,25 ± 20,8abcdefg	69,21 ± 14,7
Morro de vaca	122,39 ± 26,5i	67,80 ± 7,2cdef	128,82 ± 20,7bcd	135,81 ± 15,7g	113,70 ± 17,5
Valenciano	45,06 ± 12,1abcdefg	65,44 ± 19,8bcdef	78,65 ± 18,5abcd	102,03 ± 13,6defg	72,79 ± 16,0
Gordo	39,42 ± 5,1abcdef	43,45 ± 3,8abcde	82,82 ± 2,7abcd	90,14 ± 17,9abcdefg	63,96 ± 7,4
DAGN	16,26 ± 8,1abc	23,89 ± 4,9ab	135,48 ± 80,9bcd	81,54 ± 6,8abcdefg	64,29 ± 25,2
Del Bierzo	24,83 ± 6,6abcde	51,11 ± 10,2abcde	114,49 ± 8,9abcd	115,52 ± 28,9fg	76,49 ± 13,7
Najerano	10,71 ± 4,7a	35,58 ± 4,6abcde	151,53 ± 0,0d	32,94 ± 8,7ab	57,69 ± 6,0
Piquillo	75,76 ± 24,4h	66,73 ± 11,1cdef	148,35 ± 2,0cd	85,70 ± 22,3abcdefg	94,13 ± 14,9
CW Rojo (2)	33,96 ± 3,3abcde	41,57 ± 1,0abcde	50,81 ± 21,0abc	44,70 ± 7,9abcd	42,76 ± 8,3
CW Rojo (3)	40,65 ± 10,8abcdefg	67,83 ± 8,0cdef	38,51 ± 4,4ab	46,59 ± 0,2abcd	48,40 ± 5,9

CW Rojo (4)	23,27 ± 3,4abcde	50,22 ± 2,1abcde	45,93 ± 0,0ab	54,63 ± 8,7abcde	43,51 ± 4,7
Morro de vaca x CW (3)	53,59 ± 5,4defgh	94,13 ± 6,3f	28,42 ± 0,0a	91,24 ± 14,1bcdefg	66,84 ± 8,6
Valenciano x CW (4)	75,25 ± 9,5gh	51,59 ± 2,9abcde	81,60 ± 18,0abcd	63,70 ± 6,0abcdef	68,04 ± 9,1
DAGN x CW (4)	22,30 ± 12,4abcde	46,54 ± 9,6abcde	48,18 ± 28,1ab	38,45 ± 13,2abc	38,87 ± 15,8
DAGN x CW (2)	21,23 ± 5,4abcd	32,61 ± 9,9abcd	51,86 ± 4,1abc	56,81 ± 9,1abcde	40,63 ± 7,1
Del Bierzo x CW (2)	29,51 ± 6,9abcde	28,49 ± 8,9abc	53,88 ± 1,0abcd	96,76 ± 11,0cdefg	52,16 ± 7,0
Del Bierzo x CW (3)	28,91 ± 10,8abcde	51,14 ± 3,2abcde	65,83 ± 34,2abcd	64,69 ± 2,7abcdef	52,64 ± 12,7
Del Bierzo x CW (4)	18,77 ± 4,5abcd	56,09 ± 14,9abcdef	87,75 ± 27,4abcd	48,85 ± 8,6abcd	52,86 ± 13,8
Najerano x CW (4)	12,78 ± 1,4ab	43,98 ± 7,0abcde	28,29 ± 0,0a	38,65 ± 15,2abc	30,92 ± 7,9
Piquillo x CW (2)	69,10 ± 0,5fgh	52,36 ± 14,5abcde	58,51 ± 0,0abcd	67,53 ± 21,6abcdef	61,87 ± 12,2
Piquillo x CW (3)	57,55 ± 10,1efgh	57,83 ± 3,9abcdef	125,66 ± 0,0abcd	63,03 ± 17,5abcdef	76,02 ± 10,5
Piquillo x CW (4)	46,41 ± 6,5bcdefgh	62,99 ± 6,1abcdef	59,82 ± 4,5abcd	101,42 ± 8,8defg	67,66 ± 6,5

Tabla 3. ANOVA simple del contenido en miricetina ($\mu\text{g/g}$ peso seco del pimiento) con letras de significación estadística obtenidas mediante el test de Duncan para un $p\text{-value} < 0,05$.

GENOTIPO	MIRICETINA ($\mu\text{g/g}$ de peso seco)				Promedio
	PH		PS		
	ECOLOGICO	CONVENCIONAL	ECOLOGICO	CONVENCIONAL	
Cuatro cantos	12,37 ± 1,4abc	9,35 ± 3,1abcdehij	6,12 ± 0,8abc	8,07 ± 0,8abcd	8,98 ± 1,5
Gordo morro vaca	13,56 ± 0,5abc	9,16 ± 0,2abcdehij	6,33 ± 0,2abc	8,70 ± 0,2abcde	9,44 ± 0,3
Gordo	11,63 ± 0,5abc	12,46 ± 1,1ghij	7,72 ± 0,0abc	12,09 ± 0,2ef	10,97 ± 0,6
Carmagnola Rosso	13,16 ± 1,1abc	10,65 ± 0,3cdehij	8,49 ± 0,0bc	11,27 ± 0,8def	10,89 ± 0,5
Topepo Rosso	10,70 ± 1,4abc	7,03 ± 2,1abc	7,73 ± 0,9abc	8,10 ± 0,5abcd	8,39 ± 1,2
De Infantes	9,75 ± 3,7abc	6,78 ± 2,0abc	6,44 ± 0,8abc	9,89 ± 0,8bcdef	8,21 ± 1,8
Largo de Reus	10,95 ± 1,2abc	9,82 ± 0,6bcdehij	8,80 ± 0,6c	9,14 ± 0,7bcdef	9,68 ± 0,8
Morro de vaca	10,26 ± 0,3abc	8,01 ± 0,9abcdef	6,52 ± 0,2abc	7,99 ± 1,6abcd	8,20 ± 0,7
Valenciano	12,94 ± 0,9abc	5,47 ± 1,6a	6,94 ± 0,0abc	7,22 ± 1,2abc	8,14 ± 0,9
Gordo	16,95 ± 1,2c	6,07 ± 2,4ab	7,65 ± 0,8abc	9,95 ± 1,8bcdef	10,15 ± 1,6

DAGN	9,76 ± 1,2abc	7,60 ± 1,2abcde	7,57 ± 0,3abc	9,26 ± 1,2bcdef	8,55 ± 0,9
Del Bierzo	11,29 ± 0,7abc	10,23 ± 0,7bcdefghij	7,17 ± 0,8abc	10,26 ± 2,0cdef	9,74 ± 1,1
Najerano	7,13 ± 2,6a	13,82 ± 0,8ij	4,96 ± 0,0a	10,31 ± 1,3cdef	9,06 ± 1,6
Piquillo	7,63 ± 1,3a	11,86 ± 0,1efghij	4,84 ± 0,3a	8,83 ± 0,9abcde	8,29 ± 0,7
CW Rojo (2)	11,84 ± 0,8abc	14,33 ± 0,6j	7,97 ± 1,2bc	12,54 ± 0,8f	11,67 ± 0,8
CW Rojo (3)	16,08 ± 1,7bc	14,42 ± 1,0j	6,17 ± 0,9abc	9,32 ± 0,3bcdef	11,50 ± 1,0
CW Rojo (4)	16,90 ± 7,3c	13,25 ± 0,6hij	6,88 ± 0,0abc	8,63 ± 0,5abcde	11,41 ± 2,8
Morro de vaca x CW (3)	13,91 ± 0,7abc	10,27 ± 1,4bcdefghij	6,01 ± 0,0abc	7,36 ± 0,4abc	9,39 ± 0,8
Valenciano x CW (4)	10,71 ± 0,9abc	7,49 ± 0,3abcd	5,54 ± 0,2ab	6,68 ± 1,2ab	7,61 ± 0,6
DAGN x CW (4)	8,89 ± 2,4ab	11,80 ± 2,0defghij	7,42 ± 0,5abc	6,92 ± 0,5abc	8,76 ± 1,3
DAGN x CW (2)	15,71 ± 1,1bc	8,12 ± 1,4abcdef	8,71 ± 0,8c	7,68 ± 0,6abc	10,06 ± 1,0
Del Bierzo x CW (2)	15,45 ± 1,7bc	8,79 ± 1,2abcdefg	6,95 ± 0,3abc	10,00 ± 0,4bcdef	10,30 ± 0,9
Del Bierzo x CW (3)	11,11 ± 4,9abc	7,31 ± 0,4abc	7,79 ± 0,8abc	8,55 ± 1,5abcd	8,69 ± 1,9
Del Bierzo x CW (4)	15,26 ± 1,2bc	7,11 ± 0,5abc	7,56 ± 0,8abc	9,29 ± 0,8bcdef	9,80 ± 0,8
Najerano x CW (4)	17,00 ± 1,2c	14,04 ± 0,5ij	7,61 ± 0,0abc	9,84 ± 1,4bcdef	12,12 ± 1,1
Piquillo x CW (2)	7,76 ± 1,6a	11,76 ± 1,3defghij	8,98 ± 0,0c	7,47 ± 0,9abc	8,99 ± 1,3
Piquillo x CW (3)	10,92 ± 1,0abc	11,76 ± 1,1defghij	7,80 ± 0,0abc	6,89 ± 0,6abc	9,34 ± 0,9
Piquillo x CW (4)	13,94 ± 1,1abc	14,17 ± 0,3j	8,79 ± 0,7c	5,56 ± 0,3a	10,62 ± 0,6

Tabla 4. ANOVA simple del contenido en apigenina ($\mu\text{g/g}$ peso seco del pimiento) con letras de significación estadística obtenidas mediante el test de Duncan para un $p\text{-value} < 0,05$.

GENOTIPO	APIGENINA ($\mu\text{g/g}$ de peso seco)				Promedio
	PH		PS		
	ECOLOGICO	CONVENCIONAL	ECOLOGICO	CONVENCIONAL	
Cuatro cantos	8,29 ± 1,2bcdef	10,19 ± 3,5cdefg	8,88 ± 2,1abc	6,90 ± 2,4abc	8,57 ± 2,3
Gordo morro vaca	3,26 ± 0,4abc	9,74 ± 3,7bcdef	13,39 ± 1,7bcd	9,81 ± 3,4abcd	9,05 ± 2,3
Gordo	1,71 ± 0,7ab	10,51 ± 1,3cdefg	5,82 ± 0,0abc	3,72 ± 1,9abc	5,44 ± 1,3
Carmagnola Rosso	0,37 ± 0,4a	2,60 ± 0,9a	9,30 ± 0,1abc	2,86 ± 1,1abc	3,78 ± 0,6

Topepo Rosso	7,37 ± 0,6abcdef	6,42 ± 2,2abcd	13,74 ± 2,4bcd	9,45 ± 2,5abcd	9,24 ± 1,9
De Infantes	3,75 ± 0,3abc	3,24 ± 1,5a	10,43 ± 3,3abc	3,86 ± 0,3abc	5,32 ± 1,3
Largo de Reus	10,01 ± 4,4cdefg	16,32 ± 2,1gh	4,31 ± 0,9ab	3,79 ± 2,0abc	8,61 ± 2,3
Morro de vaca	16,54 ± 1,5gh	12,80 ± 1,6defg	14,49 ± 2,9cd	14,98 ± 3,1cd	14,71 ± 2,3
Valenciano	9,24 ± 0,6bcdefg	9,90 ± 2,1bcdefg	9,35 ± 6,0abc	5,55 ± 2,1abc	8,51 ± 2,7
Gordo	9,36 ± 2,6bcdefg	5,27 ± 0,6abc	6,40 ± 4,7abc	5,97 ± 0,9abc	6,75 ± 2,2
DAGN	7,27 ± 3,0abcdef	13,54 ± 1,7efg	10,71 ± 1,3abc	5,73 ± 2,9abc	9,31 ± 2,2
Del Bierzo	6,37 ± 3,8abcdef	7,82 ± 1,3abcde	6,40 ± 3,1abc	2,57 ± 0,7abc	5,79 ± 2,2
Najerano	10,42 ± 3,7cdefg	11,24 ± 2,0cdefg	7,07 ± 0,0abc	19,94 ± 13,8d	12,16 ± 6,5
Piquillo	12,51 ± 3,0efgh	19,93 ± 0,7h	21,64 ± 0,0d	11,17 ± 4,5abcd	16,31 ± 2,1
CW Rojo (2)	4,48 ± 0,9abcd	4,83 ± 1,8abc	4,66 ± 4,7abc	4,88 ± 0,7abc	4,71 ± 2,0
CW Rojo (3)	3,37 ± 2,1abc	14,76 ± 2,1fgh	6,12 ± 0,2abc	3,75 ± 3,8abc	7,00 ± 2,0
CW Rojo (4)	2,97 ± 0,5abc	3,63 ± 0,6ab	6,14 ± 0,0abc	4,15 ± 2,3abc	4,22 ± 1,1
Morro de vaca x CW (3)	12,67 ± 2,3efgh	11,35 ± 0,9cdefg	2,43 ± 0,0a	12,40 ± 2,5abcd	9,71 ± 1,9
Valenciano x CW (4)	13,50 ± 4,8fgh	10,17 ± 3,0cdefg	9,47 ± 0,7abc	9,03 ± 3,7abcd	10,54 ± 3,0
DAGN x CW (4)	13,54 ± 4,1fgh	10,78 ± 1,1cdefg	8,40 ± 2,1abc	3,01 ± 1,0abc	8,94 ± 2,1
DAGN x CW (2)	8,66 ± 0,1bcdef	12,08 ± 0,8defg	4,81 ± 0,9abc	2,08 ± 0,9ab	6,91 ± 0,7
Del Bierzo x CW (2)	4,38 ± 0,8abcd	10,42 ± 0,1cdefg	2,99 ± 0,1a	0,62 ± 0,1a	4,60 ± 0,3
Del Bierzo x CW (3)	5,24 ± 2,3abcde	6,89 ± 2,9abcd	4,89 ± 1,8abc	1,19 ± 0,3ab	4,55 ± 1,8
Del Bierzo x CW (4)	7,76 ± 1,3abcdef	7,37 ± 3,2abcde	3,10 ± 1,8a	2,58 ± 1,7abc	5,20 ± 2,0
Najerano x CW (4)	11,87 ± 1,3defg	10,16 ± 0,6cdefg	1,53 ± 0,0a	8,24 ± 0,9abcd	7,95 ± 1,0
Piquillo x CW (2)	7,37 ± 1,3abcdef	8,76 ± 2,7abcdef	1,32 ± 0,0a	13,30 ± 3,2bcd	7,69 ± 2,4
Piquillo x CW (3)	7,67 ± 3,0abcdef	11,18 ± 0,7cdefg	6,38 ± 0,0abc	9,93 ± 6,2abcd	8,79 ± 3,3
Piquillo x CW (4)	10,34 ± 1,0cdefg	14,81 ± 1,2fgh	6,74 ± 2,0abc	11,35 ± 1,2abcd	10,81 ± 1,4

Tabla 5. ANOVA simple del contenido en kaempferol ($\mu\text{g/g}$ peso seco del pimiento) con letras de significación estadística obtenidas mediante el test de Duncan para un $p\text{-value} < 0,05$.

GENOTIPO	KAEMPFEROL ($\mu\text{g/g}$ de peso seco)				Promedio
	PH		PS		
	ECOLOGICO	CONVENCIONAL	ECOLOGICO	CONVENCIONAL	
Cuatro cantos	20,32 \pm 4,4g	6,16 \pm 0,8ab	9,72 \pm 1,3ab	16,14 \pm 4,4e	13,08 \pm 2,7
Gordo morro vaca	4,65 \pm 0,6abc	4,17 \pm 0,2ab	4,72 \pm 0,2a	6,90 \pm 0,9abcd	5,11 \pm 0,5
Gordo	8,87 \pm 1,6bcd	3,78 \pm 0,1ab	4,88 \pm 0,0a	6,19 \pm 1,2abcd	5,93 \pm 1,0
Carmagnola Rosso	19,56 \pm 4,0fg	5,16 \pm 0,5ab	6,52 \pm 0,6a	11,65 \pm 1,2abcde	10,73 \pm 1,6
Topepo Rosso	1,90 \pm 0,8ab	2,57 \pm 0,2a	7,17 \pm 2,7a	7,09 \pm 1,8abcd	4,68 \pm 1,4
De Infantes	1,66 \pm 0,7a	5,50 \pm 3,3ab	3,66 \pm 0,7a	9,34 \pm 2,0abcde	5,04 \pm 1,7
Largo de Reus	8,86 \pm 1,6bcd	9,96 \pm 2,2c	13,93 \pm 2,8ab	12,22 \pm 2,9bcde	11,24 \pm 2,4
Morro de vaca	11,29 \pm 2,5cde	5,74 \pm 1,4ab	7,84 \pm 0,6ab	13,42 \pm 3,7de	9,57 \pm 2,0
Valenciano	17,17 \pm 6,8efg	4,66 \pm 1,5ab	11,52 \pm 3,7ab	13,07 \pm 5,0cde	11,60 \pm 4,3
Gordo	8,61 \pm 1,0abcd	3,82 \pm 0,6ab	8,89 \pm 1,0ab	7,12 \pm 3,0abcd	7,11 \pm 1,4
DAGN	2,33 \pm 0,2ab	4,47 \pm 1,0ab	13,08 \pm 6,2ab	11,66 \pm 2,1abcde	7,88 \pm 2,4
Del Bierzo	3,24 \pm 0,4ab	3,11 \pm 2,4ab	12,56 \pm 2,5ab	8,88 \pm 4,1abcde	6,95 \pm 2,3
Najerano	3,68 \pm 1,4ab	2,85 \pm 0,5ab	21,97 \pm 0,0b	6,04 \pm 2,6abcd	8,63 \pm 1,5
Piquillo	2,57 \pm 0,5ab	2,78 \pm 0,1a	8,49 \pm 0,7ab	3,12 \pm 1,1a	4,24 \pm 0,6
CW Rojo (2)	4,96 \pm 2,1abc	4,77 \pm 0,7ab	8,60 \pm 0,1ab	7,59 \pm 0,8abcde	6,48 \pm 0,9
CW Rojo (3)	13,46 \pm 2,3def	4,44 \pm 0,5ab	5,08 \pm 1,0a	5,76 \pm 0,7abcd	7,19 \pm 1,1
CW Rojo (4)	3,24 \pm 1,1ab	5,66 \pm 0,5ab	6,15 \pm 0,0a	8,08 \pm 1,6abcde	5,78 \pm 1,1
Morro de vaca x CW (3)	5,38 \pm 1,5abc	5,80 \pm 0,3ab	6,48 \pm 0,0a	5,29 \pm 1,4abcd	5,74 \pm 1,1
Valenciano x CW (4)	6,62 \pm 0,7abc	3,36 \pm 0,4ab	9,79 \pm 0,5ab	3,62 \pm 0,4ab	5,85 \pm 0,5
DAGN x CW (4)	3,93 \pm 1,2ab	5,03 \pm 0,7ab	8,15 \pm 4,6ab	4,22 \pm 3,2abc	5,33 \pm 2,4
DAGN x CW (2)	4,75 \pm 1,4abc	4,00 \pm 1,0ab	9,53 \pm 1,6ab	5,84 \pm 2,8abcd	6,03 \pm 1,7
Del Bierzo x CW (2)	5,71 \pm 1,0abc	3,77 \pm 0,4ab	14,52 \pm 6,1ab	13,82 \pm 4,1de	9,45 \pm 2,9
Del Bierzo x CW (3)	4,71 \pm 1,3abc	5,61 \pm 0,1ab	10,92 \pm 5,3ab	4,16 \pm 0,7abc	6,35 \pm 1,8
Del Bierzo x CW (4)	4,10 \pm 1,0ab	5,43 \pm 0,9ab	17,24 \pm 8,6ab	5,67 \pm 2,6abcd	8,11 \pm 3,3

Najerano x CW (4)	6,27 ± 1,3abc	6,56 ± 0,6b	4,01 ± 0,0a	8,50 ± 1,8abcde	6,33 ± 1,2
Piquillo x CW (2)	6,06 ± 1,0abc	3,93 ± 0,8ab	10,20 ± 0,0ab	7,30 ± 2,2abcd	6,87 ± 1,4
Piquillo x CW (3)	4,64 ± 0,6abc	4,20 ± 0,5ab	14,23 ± 0,0ab	6,52 ± 1,5abcd	7,40 ± 0,9
Piquillo x CW (4)	4,52 ± 0,1abc	5,58 ± 0,3ab	7,21 ± 0,9a	7,92 ± 1,0abcde	6,31 ± 0,6
