



**Efecto del genotipo, tejido y estado de madurez en  
la composición de la fracción volátil del pimiento y  
especies relacionadas (*Capsicum* spp.):  
implicaciones en la mejora de la calidad  
organoléptica**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:

**D<sup>a</sup>. ESTELA MORENO PERIS**

Dirigida por:

**Dra. D<sup>a</sup>. MÓNICA DíEZ DíAZ**

**Dr. D. ADRIÁN RODRÍGUEZ BURRUEZO**



## **Agradecimientos**

Agradecer en primer lugar a mis directores de tesis la doctora Mónica Díez y el doctor Adrián Rodríguez por todo su apoyo y por darme la oportunidad de poder realizar esta tesis.

A mis compañeros María José y Carlos por compartir conmigo esta etapa, ayudándonos y recorriendo juntos cada paso de esta aventura.

A la doctora M<sup>a</sup> Carmen González por introducirme en el mundo de los volátiles, por su paciencia y cariño.

A Loles por su complicidad, por tantas risas, por valorarme y confiar en mi, en definitiva por su amistad incondicional.

A todas aquellas personas que, de una u otra manera, han colaborado en el desarrollo de esta tesis.

Gracias a mi familia y amigos por estar siempre ahí. Especialmente a mi padre y a Cristina, lo sois todo para mi.



*in memoriam* Pura Peris Añón



## Resumen

Los pimientos, chiles y ajíes (*Capsicum* spp.), especialmente los pertenecientes a la especie más extendida *C. annuum* L., son unos de los vegetales y especias más importantes del mundo y sus frutos se utilizan en una gran variedad de platos, para proporcionar aroma y sabor. España es el principal productor y exportador de pimiento de Europa, así como centro de diversidad de gran relevancia para el pimiento común (*C. annuum* L.), destacando los tipos morrones o gruesos (incluyendo cuatrocantos como Valenciano, Largo de Reus o Trompa de Vaca) así como numerosos tipos varietales y ecotipos locales como guindillas, riojanos, cornicabra, padrón, bola, piquillos, jalapeños, serranos, etc. En los últimos años, se ha incrementado la demanda de frutas y hortalizas con mayor calidad interna, tanto nutricional como organoléptica. En este sentido, los principales factores responsables de la calidad organoléptica o flavor en pimiento son los capsaicinoides (responsables de la pungencia en frutos picantes) y los volátiles responsables del aroma. Los capsaicinoides han sido los componentes de sabor más estudiados, mientras que los trabajos sobre la fracción volátil han sido más recientes y escasos, especialmente desde el punto de vista de la diversidad genética y la mejora vegetal. Si bien, los estudios más recientes han revelado una considerable diversidad interespecífica e intraespecífica en términos de composición volátil. Sin embargo, el conocimiento sobre la diversidad intravarietal aún es escaso y este hecho podría ser de suma importancia para los mejoradores que buscan mejorar el sabor de cultivares modernos o para recuperar variedades locales basadas en un alto valor añadido.

En la presente tesis doctoral se ha estudiado una considerable diversidad varietal entre los pimientos en términos de calidad de aroma y la variación cualitativa y cuantitativa en la fracción volátil, particularmente en frutos completamente maduros, que abarcan las más diversas aplicaciones alimentarias y perfiles de aroma. Con el objetivo de poder establecer, de forma preliminar, el modo de herencia de los compuestos aromáticos se diseñó una primera línea experimental donde se caracterizó cualitativa y cuantitativamente la fracción volátil de 175 muestras de frutos maduros de una colección diversa de 10 variedades de pimientos, que abarcaba diferentes tipos varietales y cualidades aromáticas, así como varios híbridos entre ellos, analizando además por separado el pericarpio y los tejidos placentarios.

Adicionalmente, se planteó un segundo objetivo experimental dirigido a determinar la diversidad intravarietal a partir de la caracterización cualitativa y cuantitativa de la fracción volátil de pimientos de un tipo varietal representativo a nivel mundial, i.e. jalapeño, en estado inmaduro, el más importante económicamente en el caso de esta variedad, incluyendo cuatro cultivares ancestrales, dos variedades modernas, una variedad de polinización abierta y el chile serrano como variedad ancestral de los jalapeños.

En ambas líneas experimentales la fracción volátil se aisló mediante microextracción en fase sólida en el espacio en cabeza (head space-solid phase microextraction, HS-SPME) y se analizó mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS).

En la primera línea experimental se encontró un perfil de volátiles muy diverso entre las accesiones evaluadas y sus híbridos, incluidos terpenoides, ésteres, alcanos y varios aldehídos y alcoholes. En la mayoría de los casos, la hibridación proporcionó mayores cantidades de volátiles totales y una composición más compleja (i.e. mayor número de volátiles que los correspondientes parentales). Además, la fracción volátil se puede heredar de los padres a la descendencia, ya que la mayoría de los volátiles individuales en los híbridos, especialmente los volátiles principales, estaban presentes en al menos uno de los padres, siguiendo modelos de herencia intermedia (niveles entre los de los padres) o herencia transgresiva (niveles superiores al mejor parental). Adicionalmente, se encontraron compuestos de novo (presentes en el híbrido, ausentes en los padres) en muchas muestras, lo que sugiere la existencia de fenómenos de complementación génica y confirma la compleja base genética y metabólica de estos compuestos. Comparativamente, los tejidos placentarios tenían niveles volátiles totales e individuales más altos en comparación con el pericarpio en la mayoría de las accesiones parentales e híbridos. Este hecho es importante a considerar por los mejoradores varietales, especialmente en variedades empleadas en fórmulas culinarias que incluyan esta parte del fruto.

En la línea experimental correspondiente al segundo objetivo, los antiguos jalapeños (los espinaltecos) mostraron los niveles más altos de volátiles totales, mientras que los valores más bajos en volátiles totales se encontraron en las variedades modernas F1 (Delicias y Jalapa). Además, tanto la variedad tradicional de polinización abierta Jalapeño M como el ancestro de jalapeños Serrano mostraron niveles intermedios. Este patrón también se encontró dentro de los principales grupos de

volátiles, así como en muchos compuestos individuales, en terpenoides (3-careno,  $\alpha$ -longipineno,  $\alpha$ -coapeno,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -himachaleno y  $\beta$ -himachaleno), ésteres (4-metilpentil-3-metilbutanoato, 2-metilbutanoato de hexilo, 4-metilfenil pentanoato), 3-isobutil-2-metoxipirazina y salicilato de metilo.

En conclusión, nuestros resultados indican que combinar líneas parentales con fracciones volátiles complementarias mediante hibridación es un método factible para mejorar la composición volátil de los frutos maduros en pimientos *Capsicum*, al permitir fracciones más abundantes, ricas y complejas que los propios parentales. Además, hemos encontrado que las variedades locales antiguas son muy ricas en la fracción volátil total y en volátiles individuales. Esto ofrece a los mejoradores la oportunidad de mejorar y seleccionar cultivares antiguos por su sabor mejorado, o alternativamente, usarlos para mejorar el aroma y flavor de los cultivares modernos mediante hibridación o alternativamente mediante introgresión y retrocruzamiento.

## **Abstract**

Peppers and chilies (*Capsicum* spp.), especially those belonging to the most widespread species *C. annuum* L., are some of the most important vegetables and spices in the world and their fruits are used in a wide variety of dishes, to provide their particular aroma and flavor. Spain is the main producer and exporter of pepper in Europe, as well as a remarkable center of diversity for the above mentioned common pepper (*C. annuum* L.), particularly bell peppers or thick-fleshed types (including "cuatro cantos" types such as Valenciano, Largo de Reus o Trompa de Vaca), as well as a range of varietal types and local ecotypes such as guindillas, riojanos, cornicabra, padrón, bola, piquillos, jalapeños, serranos, etc. In recent years, the demand for fruits and vegetables with higher internal quality, both nutritional and organoleptic, has increased. In this sense, the main factors responsible for the organoleptic quality and flavor of peppers are i) the capsaicinoids (active compounds for pungency in hot genotypes) and ii) the volatiles responsible for the aroma (detected in the nose) and flavor (detected in the retronasal area during mastication). Capsaicinoids have been the most studied flavor components, while works on the volatile fraction has been more recent and scarce, especially from the point of view of genetic diversity and plant breeding and varieties enhancement, although the most recent studies have revealed considerable interspecific and intraspecific diversity in terms of volatile composition.

However, the knowledge about intra-varietal diversity is still scarce and this fact could be of utmost importance for breeders looking to improve the taste of modern cultivar or to recover local varieties based on high added value in terms of their fruit quality.

In this doctoral thesis, a considerable varietal diversity of *Capsicum* peppers has been studied in terms of aroma quality and the qualitative and quantitative variation in fully ripe fruits, but also at the unripe stage, encompassing the most diverse food applications and aroma profiles. Aimed to assess the mode of inheritance of volatile compounds, a research line was designed to analyse the volatile fraction of 175 samples of ripe fruits of a diverse collection of 10 varieties of peppers and several hybrids between them was qualitatively and quantitatively characterized, covering different varietal types and aromatic qualities. Also the pericarp and placental tissues were analysed separately.

In addition, a second experimental objective was proposed aimed at determining the intra-varietal diversity of the volatile fraction at both the qualitative and quantitative levels in the jalapeño type, one of the most well known chiles, at the immature stage, the most economically important in the case of this variety. The evaluated materials in this experiment included four old cultivars (called espinaltecos), two modern F1 hybrid varieties, an open-pollinated variety, and a serrano pepper, considered the ancestor of jalapeños. In both experimental lines, the volatile fraction was isolated by means of headspace-solid-phase microextraction (HS-SPME) and analysed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

In the first experimental line, a very diverse profile of volatiles was found among the evaluated accessions and their hybrids, including a plethora of terpenoids, esters, alkanes, and several aldehydes and alcohols. In most cases, hybridization provided higher amounts of total volatiles and more complex composition (i.e. greater number of volatiles than the corresponding parents). Furthermore, the volatile fraction can be inherited from the parents to the offspring, since most of the individual volatiles in the hybrids, especially the main volatiles, were present in at least one of the parents, following models of intermediate inheritance (levels between those of the parents) or transgressive inheritance (levels higher than the best parent). Additionally, *de novo* compounds (present in the hybrid, absent in the parents) were found in many samples, which suggests the occurrence of gene complementation phenomena and confirms the complex genetic and metabolic basis of these compounds. Comparatively, placental tissues had higher total and individual volatile levels compared to the pericarp in most

parental and hybrid accessions and samples. This fact is important for breeders, especially for those working with varieties whose used in culinary formulas that include this part of fruit.

In the second experimental line, the old jalapeños showed the highest levels of total volatiles, while the lowest values in total volatiles were found in the modern F1 varieties (Delicias and Jalapa). Furthermore, both the open-pollinated variety Jalapeño M and the Serrano peppers showed intermediate levels. This pattern was also found within the main groups of volatiles, as well as in most individual compounds: in terpenoids (3-carene,  $\alpha$ -longipinene,  $\alpha$ -copaene,  $\beta$ -caryophyllene,  $\alpha$ - and  $\beta$ -himachalene), esters (4-methylpentyl-3-methylbutanoate, hexyl 2-methylbutanoate, 4-methylphenyl pentanoate), 3-isobutyl-2-methoxypyrazine and methyl salicylate.

In conclusion, our results indicate that combining parental lines with complementary volatile fractions by hybridization is a feasible method to improve the volatile composition of ripe fruits in *Capsicum* peppers, enabling more abundant, richer and more complex fractions than the parents. Furthermore, we have found that the old local varieties can be very rich in the total volatile content and in individual volatiles. This gives the opportunity to breeders the opportunity to improve and select older cultivars for their improved flavor, or alternatively, use them to enhance the aroma and flavor of modern cultivars by hybridization or by introgression and backcrossing.



# ÍNDICE



## Índice general

<b>1.-</b>	<b>Introducción</b>	<b>1</b>
1.1.-	Situación botánica y formas cultivadas	1
1.2.-	Orígen, domesticación y difusión	5
1.3.-	Impotancia económica del pimiento	7
1.4.-	Calidad del fruto	9
1.4.1.-	Calidad externa	9
1.4.2.-	Calidad nutricional	10
1.4.2.1.-	Carotenoides	11
1.4.2.2.-	Vitaminas	13
1.4.2.3.-	Polifenoles	17
1.4.3.-	Calidad organoléptica	18
1.4.3.1.-	Pungencia	18
1.4.3.2.-	Volátiles	20
<b>2.-</b>	<b>Objetivos</b>	<b>29</b>
<b>3.-</b>	<b>Fase experimental, resultados y discusión</b>	<b>31</b>
<b>3.1.-</b>	<b>Línea experimental 1: Hibridación en pimientos y chiles (<i>Capsicum</i> sp.) para la mejora de su composición volátil en fruto maduro: efecto de la combinación parental y del tejido del fruto</b>	<b>31</b>
<b>3.1.1.-</b>	<b>Metodología</b>	<b>31</b>
3.1.1.1.-	Material vegetal	31
3.1.1.2.-	Preparación de muestras y extracción de volátiles	33
3.1.1.3.-	Extracción de la fracción volátil	33
3.1.1.4.-	Análisis de volátiles	34
3.1.1.5.-	Análisis de datos	35
<b>3.1.2.-</b>	<b>Resultados y discusión</b>	<b>35</b>
3.1.2.1.-	Fracción volátil en el pericarpio	37
3.1.2.1.1.-	Accesiones parentales	37
3.1.2.1.2.-	Accesiones híbridas	41
3.1.2.2.-	Fracción volátil en los tejidos placentarios	44
3.1.2.2.1.-	Accesiones parentales	44

## Índice

3.1.2.2.2.-	Accesiones híbridas	45
3.1.2.3.-	Acumulación comparativa de volátiles en tejidos de frutos	48
<b>3.2.-</b>	<b>Línea experimental 2: Estudio de diversidad intra-varietal de compuestos aromáticos en pimientos y chiles: evolución de las variedades tradicionales a las modernas F1</b>	<b>55</b>
<b>3.2.1.-</b>	<b>Metodología</b>	<b>55</b>
3.2.1.1.-	Material vegetal	55
3.2.1.2.-	Preparación de muestras y extracción de volátiles	56
3.2.1.3.-	Extracción de la fracción volátil	56
3.2.1.4.-	Análisis de volátiles	57
3.2.1.5.-	Análisis de datos	58
<b>3.2.2.-</b>	<b>Resultados y discusión</b>	<b>58</b>
<b>4.-</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>65</b>
<b>5.-</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>67</b>

## Índice de figuras y tablas

<b>Figura 1.</b>	Flor de <i>C. annuum</i> .	2
<b>Figura 2.</b>	Diversidad de frutos.	2
<b>Figura 3.</b>	Flores y frutos de <i>C. frutescens</i> .	3
<b>Figura 4.</b>	Detalle de constricción anular, flor y frutos de <i>C. chinense</i> .	3
<b>Figura 5.</b>	Flor y frutos de <i>C. baccatum</i> .	4
<b>Figura 6.</b>	Flor y frutos de <i>C. pubescens</i> .	5
<b>Figura 7.</b>	Mapa de localización del “área nuclear” y expansión precolombina del pimiento. Composición basada en Heiser (1976) y McLeod <i>et al.</i> (1982).	6
<b>Figura 8.</b>	Distribución de la producción de pimiento en España por comunidades. Fuente: (MAPA, 2020).	9
<b>Figura 9.</b>	Principales carotenoides encontrados dentro del género <i>Capsicum</i> . Fuente: (Antonio <i>et al.</i> , 2018).	12
<b>Figura 10.</b>	Análisis de agrupamiento jerárquico de mapa de calor de los volátiles identificados en las accesiones parentales estudiadas, correspondientes a los tejidos pericarpio (Pe) y placentario (Pl). las abreviaturas de accesiones y volátiles corresponden a las indicadas en las tablas 1 y 2, respectivamente.	50
<b>Figura 11.</b>	Análisis de agrupamiento jerárquico de mapa de calor de los volátiles identificados en las accesiones híbridas estudiadas, correspondientes a los tejidos pericarpio (Pe) y placentario (Pl). las abreviaturas de accesiones y volátiles corresponden a las indicadas en las tablas 1 y 2, respectivamente.	51
<b>Figura 12.</b>	Gráficos de análisis de componentes principales (PCA) de los volátiles identificados (superior) y las accesiones parentales e híbridas evaluadas, correspondientes a los tejidos pericarpio (Pe) y placentario (Pl) (parte inferior). Las abreviaturas de accesiones y volátiles corresponden a las indicadas en las tablas 1 y 2, respectivamente.	53
<b>Figura 13.</b>	Comparativas de cromatogramas de las modernas F1 (fila superior; azda. <i>Delicias F1</i> , dcha. <i>Jalapa f1</i> ) frente a los espinaltecos (fila central y fila inferior).	64

<b>Tabla 1.</b>	Estructuras químicas y niveles de pungencia de capsaicionoides. Fuente: (Zachariah and Gobinath, 2008; Eich, 2008; Ravishankar <i>et al.</i> , 2003).	19
<b>Tabla 2.</b>	Pungencia en escala Scoville (Scoville Heat Units) y principales especies/variedades de <i>Capsicum</i> spp. Fuente: (Peralta, 2007).	20
<b>Tabla 3.</b>	Nombre, tipo varietal, origen y rasgos frutales de las accesiones parentales de <i>Capsicum</i> evaluadas y lista de híbridos evaluados.	32
<b>Tabla 4.</b>	Lista de volátiles identificados en el experimento con su correspondiente abreviatura, índice de retención (IR) y método de identificación (Id).	36
<b>Tabla 5.</b>	Compuestos individuales y sus unidades promedio de área de pico de GC ( $\times 10^6$ ) identificadas en el pericarpio del fruto de las accesiones e híbridos de <i>Capsicum</i> estudiados.	39
<b>Tabla 6.</b>	Compuestos individuales y sus unidades promedio de área de pico de GC ( $\times 10^6$ ) identificadas en los tejidos placentarios de las accesiones e híbridos de <i>Capsicum</i> estudiados.	47
<b>Tabla 7.</b>	Nombre, tipo varietal, origen y rasgos frutales de las accesiones de <i>Capsicum</i> evaluadas.	55
<b>Tabla 8.</b>	Volátiles identificados en el experimento con su correspondiente abreviatura, grupo, índice de retención (IR) y método de identificación (Id).	59
<b>Tabla 9.</b>	Compuestos individuales y sus unidades promedio de área de pico de GC ( $\times 10^6$ ) identificadas en los frutos en estado inmaduro de las accesiones de jalapeños estudiados.	60

# Introducción



## 1.- Introducción

### 1.1.- Situación botánica y formas cultivadas

El nombre científico del género *Capsicum* deriva según unos autores del griego *kapso* (picar) y según otros de *kapsakes* (cápsula). Este género pertenece a la extensa familia de las Solanáceas (Nuez *et al.*, 2003):

División: *Spermatophyta*

Línea XIV: *Angiospermae*

Clase A: *Dicotyledones*

Rama 2: Malvales-Tubiflorae

Orden XXI: *Solanales (Personatae)*

Familia: *Solanaceae*

Género: *Capsicum*

La taxonomía dentro del género es compleja, debido a la diversidad de criterios utilizados en la clasificación y la existencia en las especies cultivadas de una gran variedad de formas.

Bajo las voces de “pimientos”, “chiles” (México, EEUU y mundo anglosajón, derivada de la voz nauahtl *chilli*) y “ajíes” (Centroamérica y Sudamérica, derivada del taino de Santo Domingo *axi*) se integran una de las hortalizas cultivadas más importantes del mundo (FAO, 2020). Se reconocen 32 especies en el género, de las cuales 27 son silvestres y cinco se cultivan (Gurnani *et al.*, 2016; Nickels, 2015). Estas últimas son: i) *C. annuum* L., la especie más popular y económicamente importante de todas es la comúnmente llamada pimiento y abarca una extraordinaria diversidad varietal, e incluye los tipos “california”, “jalapeños”, “numex” y “ancho”, entre otros; ii) *C. chinense* Jacq., muy extendida en Latinoamérica, es muy popular en México y el Caribe, que incluye pimientos muy picantes como el tipo “habanero”; iii) *C. frutescens* L. es especialmente popular en Asia, África, Latinoamérica y Sur de EEUU cuya forma más conocida es “tabasco”; iv) *C. baccatum* L. o “ají”, presenta una amplia distribución mundial, siendo las guindillas su forma más popular, que contiene la “gota de limón” y

## Introducción

“ají escabeche” como algunas de sus formas más comunes; y finalmente; v) *C. pubescens* Ruiz et Pav., que contiene los tipos “rocoto” y “manzano” la menos conocida pero la más arraigada en la región andina (DeWitt y Bosland, 1996; Kraft, 2009; Nuez *et al.*, 2003).

El complejo *annuum* está integrado por las especies cultivadas de flor completamente blanca: *C. annuum*, *C. chinense* y *C. frutescens* (DeWitt y Bosland, 1996; Nuez *et al.*, 2003). Los cruzamientos entre estas especies son viables lo que indica proximidad filogenética. *C. annuum* posee flores solitarias en cada nudo, no presentan manchas difusas en la base de los pétalos, la corola es de color blanco lechoso (ocasionalmente púrpuras) y en la antesis los pedicelos son a menudo pendientes. Los frutos maduros no muestran constricción anular en el cáliz en la unión con el pedicelo (Figura 1). Los frutos son de carne habitualmente firme de semillas de color paja (Nuez *et al.*, 2003). Es la especie a nivel morfológico que manifiesta una mayor diversidad, como puede observarse en la extraordinaria variedad de tamaños, formas y colores de fruto que presentan los cultivares de esta especie (Figura 2). Debido a que ha experimentado un mayor número de procesos de adaptación y selección hacia distintos usos al ser la especie más ampliamente difundida.



Figura 1. Flor de *C. annuum*



Figura 2. Diversidad de frutos

*C. frutescens* presenta flores solitarias en cada nudo con pedicelos erectos en la antesis. Las flores de corola blanca-verdosa, en muchas ocasiones los pétalos aparecen ligeramente revolutos y no presentan manchas difusas en la base. Los frutos maduros presentan un cáliz sin constricción anular en la unión con el pedicelo siendo a menudo irregularmente rugoso (Figura 3). Los frutos con semillas de color paja y de carne con frecuencia blanda. *C. frutescens* es una especie semicultivada, aunque se han desarrollado varias líneas cultivadas (e.g. tipo tabasco), en muchas regiones de Sudamérica (Brasil, Perú y Ecuador) sus frutos son recolectados de plantas que crecen espontáneamente en la naturaleza. Es la especie que ha experimentado un proceso de

domesticación menos intenso y como consecuencia es la especie cultivada de *Capsicum* con la menor variabilidad morfológica (DeWitt y Bosland, 1996).



Figura 3. Flores y frutos de *C. frutescens*.

*C. chinense* presenta dos o más flores en cada nudo en ocasiones aparecen solitarias, en la antesis los pedicelos aparecen pendientes o erectos, de corola blanca-verdosa aunque en ocasiones puede aparecer blanca o púrpura, con pétalos normalmente rectos y sin manchas difusas en su base. Se observa normalmente constricción anular en la unión con el pedicelo en el cáliz de sus frutos maduros. Los frutos de carne firme y semillas de color paja. *C. chinense* es la especie, tras *C. annuum*, más variable del complejo (Figura 4).



Figura 4. Detalle de constricción anular, flor y frutos de *C. chinense*.

## Introducción

*Capsicum baccatum* var. *pendulum* representa otra estirpe o constituye una línea genética claramente diferenciada del complejo *annuum*. Eshbaugh (1968) apuntó que distintas especies Sudamericanas se caracterizaban por flores de color crema con manchas amarillas o verdes en la corola, solitarias en cada nudo, de pedicelos erectos o pendientes en la antesis y pétalos ligeramente revolutos (Figura 5). Los frutos recuerdan a guindillas largas de mayor o menor longitud, superficie tosca, carne firme y semillas de color crema. El tipo silvestre de esta especie, designado a *C. baccatum* var. *baccatum* y es muy común en Bolivia, con poblaciones en Paraguay, norte de Argentina, sur de Brasil y Perú (menos frecuentes). Comúnmente conocido como “ají”, es la especie más popular en Sudamérica, no solo por ser picante sino también por los distintos sabores y suave aroma que ofrecen sus diferentes cultivares. Su nivel de variabilidad cercano a los de *C. annuum* y *C. chinense* es debido al proceso de selección y mejora intenso debido a su importancia histórica desde las civilizaciones precolombinas. Fuera de Sudamérica es poco conocido, aunque ha llegado a México, Hawái y la India. El hecho de que esta especie no haya alcanzado el nivel de difusión del pimiento común podría ser debido a la dominancia desde fechas tempranas de *C. annuum*.



Figura 5. Flor y frutos de *C. baccatum*.

*Capsicum pubescens* forma otro linaje genético distinto de *C. baccatum* y del complejo *annuum*. Esta especie, descrita por primera vez por Ruíz (1952) no despertó la atención de los taxonomistas hasta fechas relativamente recientes (Eshbaugh 1979 y 1982). Morfológicamente, es distinto a cualquier otro pimiento domesticado, posee grandes flores moradas o moradas difuminadas con blanco y frutos con semillas marrones/negras (Figura 6).



Figura 6. Flor y frutos de *C. pubescens*.

Genéticamente, pertenece a un grupo consolidado de taxones salvajes que incluyen a *C. eximium* (Bolivia y norte de Argentina), *C. cardenasii* (Bolivia) y *C. tovarii* (Peru). *C. pubescens* es una especie muy particular, pues su cultivo se desarrolla fundamentalmente en las tierras altas, frescas y húmedas de los Andes (> 2000 m), en países como Bolivia, Ecuador y Perú, donde el resto de las especies difícilmente prosperarían (Bo y Carpizo, 2015; Espinosa-Torres y Ramírez-Abarca, 2016; Wahyuni *et al.*, 2013). Presenta mala adaptación a condiciones agroclimáticas diferentes, por ello se ha extendido inicialmente a las tierras altas de Guatemala y Sur de México, especialmente Chiapas, y también posee un mercado exportador de semillas en el sur de California. Aunque sus frutos aparecen muy arraigados en la gastronomía andina, esta especie ha permanecido prácticamente desconocida para el resto del Mundo.

## 1.2.- Origen, domesticación y difusión

El género *Capsicum* es originario de Sudamérica, en concreto del Altiplano boliviano. Los frutos de este género han sido aprovechados por el ser humano desde la noche de los tiempos. Su domesticación y cultivo son también muy antiguos, existiendo vestigios que datan de miles de años a.C.. Los restos de chiles más antiguos, con 7.000 a 9.000 años de antigüedad, fueron recuperados de estratos precerámicos de cuevas secas en dos estados de México: las cuevas de Coxcatlán, en el Valle de Tehuacán (Puebla) y las cuevas de Romero y Valenzuela, en Ocampo (Tamaulipas), junto con restos de otros cultivos como calabaza (*Cucurbita* spp), frijol/judía (*Phaseolus* spp.) y maíz (*Zea mays* L.) (Kraft *et al.* 2014). De hecho el consumo de productos de origen vegetal entre las

## Introducción

diversas poblaciones prehispánicas, según el Códice Florentino, estaba constituido básicamente por chile (*Capsicum* spp.), frijoles (*Phaseolus vulgaris* L.), maíz (*Zea mays* L.) y calabaza (*Cucurbita* spp.) (Meckelmann *et al.*, 2015; Vera-Guzmán *et al.*, 2011).

La hipótesis comúnmente aceptada sobre el origen y domesticación de las especies cultivadas de *Capsicum* fue propuesta por McLeod *et al.* (1982). Estos investigadores sugirieron que gran parte del género *Capsicum* surgió en un área nuclear del centro de Bolivia, en una región comprendida actualmente entre las ciudades de Cochabamba, Santa Cruz y Sucre. En esta región se producirían dos flujos migratorios genéticos: i) hacia los Andes y ii) hacia las tierras bajas, en dirección a la Amazonía. La estirpe de flores púrpura (*C. eximium* o un ancestro similar) se habría desplazado a los Andes, dando lugar a la silvestre *C. cardenasii* y a la cultivada *C. pubescens*. Esto explicaría la adaptación específica de *C. pubescens* a estas condiciones ambientales y su mal comportamiento fuera de ellas. Migrando el linaje de flores blancas hacia las tierras bajas de la Cuenca amazónica, siguiendo el curso del río Mizque (Figura 7). Por el camino, se habría domesticado *C. baccatum* en las zonas secas del sur de Bolivia. Del resto del flujo genético habría surgido el ancestro silvestre del complejo *annuum*, posteriormente se habría domesticado en la misma Amazonía *C. chinense*, mientras que *C. annuum* lo haría en México (Pickersgill, 1988).

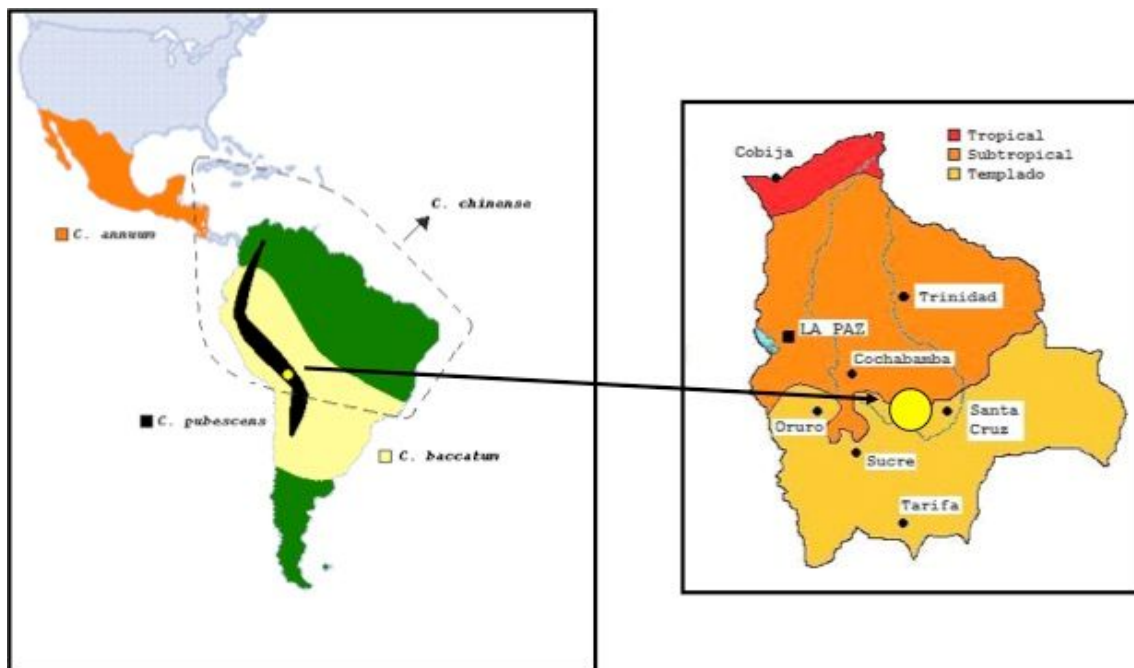


Figura 7. Mapa de localización del “área nuclear” y expansión precolombina del pimiento. Composición basada en Heiser (1976) y McLeod *et al.* (1982).

El pimiento fue una de las primeras especies americanas introducidas en el Viejo Mundo. De hecho, en el mismo diario de Cristóbal Colón (13 de enero de 1493) ya se describe con interés: “Dice que quiere partir porque ya no aprovecha nada detenerse... Allí hay mucho algodón y muy fino y luengo... También hay mucho ají, que es su pimienta... toda la gente no come sin ella... Puédense cargar cincuenta carabelas cada año de aquella Española”.

Como la expedición fue financiada para buscar una ruta alternativa hacia Asia para comerciar con productos asiáticos (sedas, especias, lacas, etc.), evitando la ruta africana controlada por Portugal, Colón envió a España todo aquello que presentara potencial económico. Los pimientos se presentaban como una alternativa seria a la apreciada (y también picante) pimienta de Asia (*Piper nigrum* L.), lo que explicaría su veloz difusión por el Viejo Mundo. Primero, desde España hacia el Mediterráneo, Inglaterra y Europa Central (Namesny, 2006) y, posteriormente, durante el siglo XVI de la mano de los comerciantes portugueses, se difundirían *C. frutescens* y *C. chinense*, desde sus colonias brasileñas hacia sus áreas de influencia en África, China (S.XVII-XVIII) e India (S.XIX) (Greenleaf, 1986).

### **1.3.- Importancia económica del pimiento**

Tras siglos de dispersión y adaptación específica a diversas condiciones agroclimáticas, existe actualmente una extraordinaria diversidad genética en este cultivo, con una plétora de variedades y ecotipos locales. Esta diversidad se refleja en la versatilidad de aplicaciones culinarias de estos frutos, e.g. fresco, asado, frito, encurtido, salsas, fruto deshidratado (ahumado o sin ahumar), en escamas, polvo de pimentón, oleorresinas, contribuyendo con su particular sabor y aroma a una multitud de platos y recetas (DeWitt y Bosland, 2009; Duelund y Mouritsen, 2017; Fernández-Ronco *et al.*, 2011).

En el mundo se produjo en 2018 un total de 40.936 millones de kg, un 1.24 % más que el año anterior y un 22.29 % más que diez años atrás (FAO, 2020). La superficie dedicada a producir pimiento fue de 3.766.757 hectáreas, con un rendimiento medio por metro cuadrado de 2 kg de pimiento.

Entre los cinco mayores productores mundiales de pimiento (China, México, Turquía, Indonesia y España), obtienen el 69% de la cosecha mundial de esta hortaliza.

## Introducción

De entre ellos destaca China con el 45%, México produce el 8.5%, Turquía el 6.3%, Indonesia el 6.2% y España con algo más del 3% de la producción mundial.

De los 40.936 millones de kg de pimiento que se han producido en el mundo, prácticamente la mitad corresponde a China, primer productor mundial, con 18.506 millones de kg, 816.831 hectáreas y un rendimiento de 3 kg/m<sup>2</sup>. El segundo en el ranking es México con 3.440 millones de kg, 188.389 hectáreas y 2.35 kg/m<sup>2</sup>. Seguido por Turquía con 2.569 millones de kg, 97.947 hectáreas y 3 kg/m<sup>2</sup>. En cuarto lugar figura Indonesia con 2.542 millones de kg, 308.547 hectáreas y 0.82 kg/m<sup>2</sup>.

España ocupa el quinto lugar de la producción mundial de pimiento con 1.282 millones de kg destinando para ello una superficie de 22.608 hectáreas, encontrándose la mayor producción española de pimiento en Almería y Murcia (Figura 8), obteniendo un rendimiento medio de 6.5 kg/m<sup>2</sup>. De entre los treinta mayores productores mundiales solo Marruecos, Israel y Hungría tienen un rendimiento similar. El caso de Holanda es especial (27 kg/m<sup>2</sup>), ya que en ese país no se produce pimiento al aire libre, lo que sí ocurre en España. La superficie que en España se dedica a producir al aire libre es casi 8 veces superior a la superficie total que en Holanda se dedica a producir pimiento en invernadero.

En cuanto al resto de competidores de España en la comercialización de pimiento en los mercados europeos, Egipto ocupa la séptima posición con 776 millones de kg, 66.142 hectáreas y 2 kg/m<sup>2</sup>. Holanda aparece en el decimosegundo lugar con 355 millones de kg, 1.311 hectáreas y 27 kg/m<sup>2</sup>. Marruecos ocupa la décimo tercera posición al haber producido 281 millones de kg sobre una superficie de 6.738 hectáreas y 6,7 kg/m<sup>2</sup>. Italia está en el décimo quinto lugar con 260.7 millones de kg, 10.522 hectáreas y 2.5 kg/m<sup>2</sup>. Israel aparece en el vigésimo lugar del ranking mundial, con una producción de 196.112 millones de kg de pimiento, una superficie 3.243 hectáreas y un rendimiento promedio de 6 kg/m<sup>2</sup>.

España es el primer exportador de la Unión Europea y tercero mundial tras China y EE.UU. Exporta en torno al 50% de la producción. En algunas hortalizas de invernadero supera el 70%. Los principales productos exportados son las hortalizas de invernadero (tomate, pimiento y pepino), cítricos, melocotón y nectarina. Los principales destinos son europeos: Alemania, Francia, Reino Unido y Países Bajos (EUROSTAT, 2019).

El pimiento es uno de los cultivos hortícolas más importantes en España. En cuanto a superficie es el octavo cultivo hortícola, precedido por el tomate, champiñón, lechuga, brócoli, ajo, cebolla y sandía (MAPA, 2020).

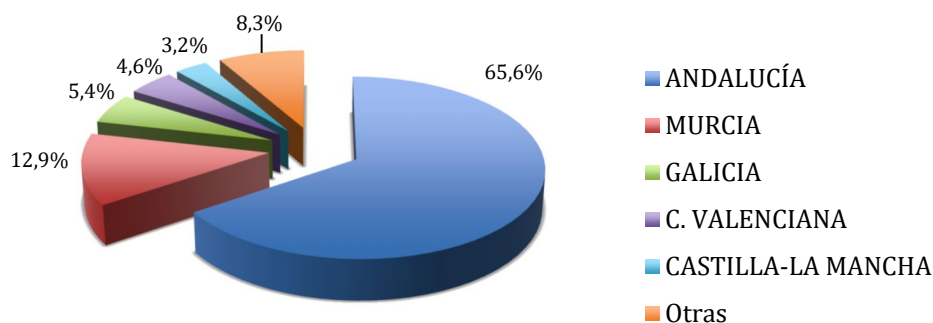


Figura 8. Distribución de la producción de pimiento en España por comunidades. Fuente: (MAPA, 2020).

## 1.4.- Calidad del fruto

### 1.4.1.- Calidad externa

Existen numerosos caracteres relativos a la calidad externa del fruto en el género *Capsicum*, aunque probablemente, el color, la forma y el tamaño son los más importantes. En este sentido, el género *Capsicum* es extraordinariamente variable y abarca una amplia variedad de tamaños, formas y colores.

La apariencia externa de los frutos y su uniformidad, junto al rendimiento y la resistencia a enfermedades, son algunos de los criterios más importantes aplicados por las compañías de semillas para seleccionar nuevas variedades, debido al importante papel que juega la percepción visual en la venta de un producto vegetal.

En opinión de Namesny (2006), el mercado de exportación centra sus preferencias en los pimientos cortos del tipo California en todas sus coloraciones: verde (Alemania y Dinamarca), rojo (Francia y Suecia), amarillo (Italia) y, recientemente, naranja. Los destinos del pimiento del tipo Lamuyo son fundamentalmente Italia, sur de Francia, Portugal y el mercado español. Existe en el mercado nacional cierta preferencia

## Introducción

por los tipos locales o tradicionales, siendo los más representativos Bierzo, Fresno de la Vega, Najerano, Valenciano y los más pequeños Piquillo y Guindilla.

### 1.4.2.- Calidad nutricional

Los pimientos del género *Capsicum* ya se usaban en la dieta de los pueblos precolombinos americanos en muchas recetas, generalmente como parte de salsas o como especias (Reifschneider y Ribeiro, 2008). La ingesta de pimiento permite la incorporación a la dieta de diversos compuestos bioactivos como vitaminas (ácido ascórbico), compuestos fenólicos (flavonoides), carotenoides y capsaicinoides (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2010; Wahyuni *et al.*, 2013).

La cantidad y composición de estos metabolitos varía entre los genotipos, y se ven afectados por muchas condiciones como la madurez del fruto, los sistemas de cultivo y los métodos de procesado (Howard *et al.*, 2000; Markus *et al.*, 1999). La presencia de algunos de estos metabolitos puede funcionar como mecanismo de defensa general contra diversas tensiones bióticas y abióticas (Aloni *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2012; Schulze y Spiteller, 2009).

Aunque los frutos de pimiento se consumen principalmente por su sabor, aroma y color únicos, algunas tribus nativas americanas han usado estas frutas en la medicina tradicional para tratar el asma, la tos, el dolor de garganta y el dolor de muelas (Singletary 2011; Zacharian y Gobinath, 2008). La industria farmacéutica comercializa la capsaicina como un bálsamo de aplicación externa para contrarrestar dolores musculares (Zacharian y Gobinath, 2008). Además, la capsaicina proporciona alivio en osteoartritis (De Silva *et al.*, 2011). Los flavonoides son conocidos por sus efectos bioquímicos y farmacológicos, que incluyen antioxidantes, antiinflamatorios y antialérgicos (Grassi *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 1995). Las vitaminas presentes en los frutos de pimiento también se han reclamado por otros beneficios para la salud. Por ejemplo, la vitamina A (después de convertirse de provitamina A) es importante para la diferenciación de la córnea, las membranas conjuntivales y la retina, así como para la integridad de las células epiteliales (IOM, 2001). La vitamina E ha sido probada por su efecto inhibitorio sobre la tumorigénesis en modelos animales (Ju *et al.*, 2010). La aplicación de  $\beta$ -caroteno o una mezcla de carotenoides, que consiste en  $\beta$ -caroteno y luteína de los pimientos, mostró un efecto fotoprotector contra la irradiación de la luz solar y puede ayudar a suprimir la carcinogénesis de la piel (Nishino *et al.*, 1999; Stahl

y Sies, 2005). Se ha demostrado que una mezcla de polifenoles de ácido cinámico y derivados de quercetina disminuye la proliferación de las células cancerosas (Jeong *et al.*, 2011).

#### 1.4.2.1.- Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos naturales ampliamente distribuidos en la naturaleza. Son principalmente isoprenoides lipofílicos C40 y se sintetizan en todos los organismos fotosintéticos (bacterias, algas y plantas), así como en algunas bacterias y hongos no fotosintéticos jugando un papel importante en la fotosíntesis, la fotoprotección y la estabilización de los radicales libres (Huang *et al.*, 2017; Nisar *et al.*, 2015), son conocidos por sus propiedades cromogénicas que atribuyen vivos colores rojo, naranja y amarillo a los organismos (Sun *et al.*, 2018a). El nombre genérico proviene de la zanahoria, *Daucus carota*, ya que fue de esta hortaliza de donde se aislaron por primera vez (Badui, 2006). No son producidos por animales, pero los carotenoides juegan un papel importante en su nutrición y salud, ya que presentan actividades antioxidantes y anticancerígenas y actúan como precursores de otros compuestos, como la vitamina A y el ácido retinoico (Giuffrida *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2017; Nisar *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2018a). En los humanos, los carotenoides también sirven como antioxidantes y reducen la degeneración macular del ojo relacionada con la edad, la principal causa de ceguera en los ancianos de todo el mundo (Fiedor y Burda, 2014; Johnson y Krinsky, 2009).

Algunos como la capsantina, el  $\beta$ -caroteno, la zeaxantina y la luteína se han confirmado como antioxidantes (Müller *et al.*, 2011) con beneficios para la salud en la prevención o el alivio de diversas enfermedades (Bian *et al.*, 2012; Dhingra y Bansal, 2014; Niranjana *et al.*, 2015).

La capsantina, es el carotenoide más abundante en las variedades de fruto rojo, y es el que presenta la actividad antioxidante más intensa y de efecto más prolongado previniendo las cataratas y procesos degenerativos de la mácula ocular (Matsufuji *et al.*, 1998; Seddon *et al.*, 1994).  $\beta$ -caroteno, el precursor más eficiente de la vitamina A, es el carotenoide mejor conocido y más estudiado (Wang, 1994) y ha sido descrito como un compuesto con actividad antitumoral (National Academy of Science, 1982; Ziegler *et al.*, 1986), la luteína reduce el riesgo de enfermedades coronarias, y junto a su isómero zeaxantina, es fundamental en la protección del ojo a la radiación solar (Lee *et al.*,

## Introducción

2005). La luteína sólo tiene interés nutricional en frutos inmaduros, pues desaparece con la maduración.

El pimiento es una de las fuentes más ricas de carotenoides entre los cultivos de hortalizas (Palevitch y Craker, 1995). La variedad de colores dentro del género *Capsicum* está parcialmente promovida por la variedad de carotenoides presentes en él (Figura 9), principalmente los oxigenados, cuyo perfil puede cambiar en función de la etapa de madurez, especies y cultivares, lo que demuestra la complejidad de la biosíntesis de carotenoides (Conforti *et al.*, 2007; Giuffrida *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2016). Los pimientos rojos maduros presentan una mayor capacidad antioxidante que los frutos verdes (Cervantes-Paz *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2011).

Los genotipos de frutos rojos contienen dos pigmentos carotenoides rojos, capsantina y capsorrubina, que son característicos del pimiento (Minguez-Mosquera y Hornero-Mendez, 1993; Paran y van der Knaap, 2007). La capsantina y capsorubina son productos finales de la vía de los carotenoides y se forman a partir de anteraxantina y violaxantina, respectivamente. Esta conversión es catalizada por la enzima bifuncional capsantina-capsorubina sintasa (Bouvier *et al.*, 1994), codificada por el locus Y dominante (Lefebvre *et al.*, 1998; Paran y van der Knaap, 2007). Además de la capsantina y capsorubina, los frutos de pimiento rojo contienen una cantidad de carotenoides menores, como los naranjas  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, anteraxantina y zeaxantina, así como, los amarillos violaxantina y neoxantina. Estos son intermediarios en la vía que conduce a la capsantina y capsorubina y pueden contribuir al tono del color del fruto rojo (Wahyuni *et al.*, 2011).

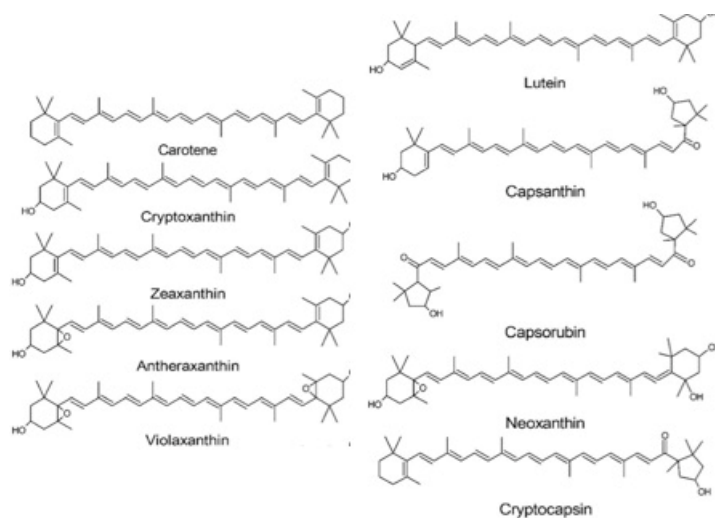


Figura 9. Principales carotenoides en el género *Capsicum* Fuente: (Antonio *et al.*, 2018).

La ausencia de la fracción isocrómica roja en las especies de *Capsicum* con frutos amarillos generalmente se asocia con la inactivación de la enzima capsantina-capsorubina sintasa (Ha *et al.*, 2007; Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2010a) que es básicamente responsable de la transformación de violaxantina y antheraxantina en capsorubina y capsantina ( Ha *et al.*, 2007; Hornero-Méndez *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2017). Esta inactivación también explica la acumulación de violaxantina como el principal carotenoide en especies de frutos amarillos. Entre estas especies también se ha informado la presencia de luteína como un carotenoide principal (Giuffrida *et al.*, 2013; Ha *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2016).

Hay varias combinaciones de genes que conducen a los frutos de pimiento naranjas, según varios estudios el color naranja puede derivarse de al menos dos fenotipos bioquímicos diferentes: un genotipo que produce grandes cantidades de  $\beta$ -caroteno y un genotipo que produce una mezcla de carotenoides amarillos y rojos, pero a niveles mucho más bajos que en los genotipos de frutos rojos (Guzman *et al.*, 2010).

Las accesiones de pimiento de frutos marrones acumulan carotenoides típicos de frutos rojos, como la capsantina y la capsorubina, además de la clorofila b. Los frutos marrones retienen clorofilas debido a una mutación en el gen retenedor de clorofila (cl), en combinación con un locus Y dominante que es el responsable de la producción de capsantina y capsorubina (Efrati *et al.*, 2005). Esta combinación de genes permite que los carotenoides rojos y las clorofilas verdes se acumulen simultáneamente en la fruta madura y causen el color marrón (Borovsky y Paran, 2008).

Esta riqueza en carotenoides ha permitido que los frutos de *Capsicum* se hayan utilizado como colorantes alimentarios durante siglos, cuya versión más moderna son los pimentones y las oleorresinas (Zapata *et al.*, 1992). Pero también convierten a estos frutos en una excelente fuente de compuestos nutricionales con innumerables beneficios para la salud (Rodríguez-Burruezo y Nuez, 2006).

#### 1.4.2.2.- Vitaminas

Las vitaminas son componentes esenciales de los alimentos cuyo aporte adecuado es imprescindible para el normal funcionamiento del organismo humano (Belitz y Grosch, 1997). Las vitaminas actúan como coenzimas y cofactores, e

## Introducción

intervienen en numerosas reacciones metabólicas que se producen en el organismo. Realizan fundamentalmente una función reguladora y protectora (Kuklinski, 2003).

Generalmente la clasificación de las vitaminas se realiza en función de la solubilidad, y así las dividimos en (Pérez Ríos y Ruano, 2004):

Vitaminas liposolubles: vitaminas A, D, E y K.

Vitaminas hidrosolubles: vitamina C y vitaminas del complejo B.

El organismo sólo presenta reservas de vitaminas liposolubles, pero estas reservas son pequeñas y, en consecuencia, tanto las vitaminas liposolubles como hidrosolubles deben ser consumidas cada día. En general, los vegetales contienen una mayor proporción de hidrosolubles que de liposolubles, situación que se invierte en los alimentos de origen animal (Badui, 2006). El pimiento es una fuente importante de diversas vitaminas o precursores de las mismas. Por su elevado aporte a la dieta son de destacar las vitaminas A, C y E (Raigón, 2007).

Tres carotenoides,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina, contribuyen a la actividad de la provitamina A (IOM, 2001). Después del consumo, las enzimas oxigenasas convierten los carotenoides en retinol (Simpson y Chichester, 1981; Topuz y Ozdemir, 2007). La vitamina A, también llamado retinol o axeroftol, no existe en los vegetales como tal, pero sí como sus provitaminas o precursores carotenoides, de los cuales existen más de 500 (Badui, 2006).

Los pimientos son una rica fuente de provitamina A y los niveles de esta vitamina están relacionados con el color específico del fruto. Los cultivares de frutos rojos, frutos naranjas y frutos marrones tienen niveles de provitamina A de 3 a 5 veces más altos por cada 100 g de fruto fresco que los de los cultivares de frutos verdes, frutos amarillo y frutos morados y contribuyen a 5-10% ingesta diaria recomendada (IDR)/100 g de fruto fresco de la porción comestible (Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2010a; Simonne *et al.*, 1997; Topuz y Ozdemir, 2007). Entre todos ellos,  $\beta$ -caroteno es el precursor más efectivo y puede suponer hasta el 90% del aporte de provitamina A en pimientos maduros (Howard *et al.*, 1994; Latham, 2002).

Su carencia inhibe el crecimiento, produce el endurecimiento del epitelio en varias partes del cuerpo, principalmente de los sistemas respiratorio, visual,

reproductivo y urinario, y afecta las estructuras ósea y dental. Está considerado el compuesto más efectivo en la prevención de la xeroftalmia en niños (del griego “ojos secos”, que conlleva una disminución de la transparencia de la córnea) y la ceguera nocturna en adultos.

La vitamina C (ácido ascórbico) es necesaria para la función cardiovascular, el desarrollo de células inmunes, el tejido conectivo y la utilización de hierro. Aunque las plantas y la mayoría de los animales pueden sintetizar ácido ascórbico, los humanos carecen de L-gulono-1,4-lactona oxidoreductasa, que se requiere para el paso final en la síntesis del ácido ascórbico. Como éste no puede almacenarse en el cuerpo, la vitamina C debe adquirirse regularmente de fuentes dietéticas principalmente de plantas ricas en ácido ascórbico. Como muchos alimentos vegetales no son ricos en ácido ascórbico, la capacidad de aumentar el nivel de esta vitamina en los alimentos vegetales aumentaría su valor nutritivo (Chen *et al.*, 2003).

El ácido ascórbico es el principal compuesto de vitamina C y es un componente funcional y nutricional de los frutos de pimiento (Teodoro *et al.*, 2013; Topuz y Ozdemir, 2007). Los pimientos frescos son excelentes fuentes de ácido ascórbico (vitamina C), que participa en varios procesos antioxidantes en las plantas además de actuar en la prevención de enfermedades crónicas humanas, incluidos ciertos tipos de cáncer, trastorno coronario, arteriosclerosis y cataratas (Howard *et al.*, 2000). Es bien conocido como un compuesto antioxidante y bioactivo, particularmente en pimientos maduros (Kim *et al.*, 2011; Topuz y Ozdemir, 2007). Los niveles más altos de ácido ascórbico observados durante la maduración pueden estar relacionados con la intensidad de la luz y los niveles más altos de glucosa, el precursor del ácido ascórbico (Howard y Wildman, 2007; Osuna-Garcia *et al.*, 1998). Además de la maduración, las diferencias en los antecedentes genéticos y las condiciones ambientales de crecimiento también afectan el contenido de ácido ascórbico (Aloni *et al.*, 2008; Howard y Wildman, 2007). En frutos deshidratados el contenido en ácido ascórbico es inapreciable. Así, probablemente por su naturaleza hidrosoluble y extremadamente lábil, este carácter no es un objetivo de mejora en derivados como el pimentón o las oleorresinas.

El contenido en ácido ascórbico suele ser muy alto en pimiento y es uno de sus factores de calidad nutricional más importantes. Los frutos de pimiento son una rica fuente de ácido ascórbico en la dieta humana junto con otras verduras, como el brócoli, las zanahorias, la lechuga, el pepino y los tomates (Howard y Wildman, 2007; Palevitch y Craker, 1995). De hecho, este compuesto fue aislado por primera vez en 1928 a partir

## Introducción

de frutos de pimiento por el investigador húngaro Albert Szent, Premio Nobel en 1937 por sus trabajos con el ácido ascórbico. Los niveles de vitamina C en los genotipos de pimiento pueden variar de 43 mg/100 gr de fruto fresco a 247 mg /100 g de fruto fresco (Eggink *et al.*, 2012; Wahyuni *et al.* 2011) y puede contribuir del 50 % a más del 100 % de la ingesta diaria recomendada (IDR).

La vitamina C es esencial para la producción de colágeno, proteína que mantiene la estructura corporal y contribuye en gran medida a la cicatrización de las heridas. La vitamina C es vital para la salud de la piel, retarda la aparición de arrugas y también de otras afecciones relacionadas con la edad, como la artritis. Refuerza el sistema inmunológico, alivia las alergias y estimula la producción de varias hormonas. Es una de las vitaminas que más se toman como complemento (Scott-Moncrieff, 2000).

La vitamina E, por su estructura química, actúa como antioxidante natural a nivel celular y reduce los peróxidos provenientes de la oxidación de los ácidos linoleico y linolénico. Cabe indicar que una teoría establece que el envejecimiento del ser humano se debe a la acción de estos peróxidos sobre las proteínas (Badui, 2006). De hecho, se recomienda una dieta rica en vitamina E cuando se consumen concentraciones elevadas de dichos ácidos.

Los tocoferoles se presentan como formas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ , determinadas por el número y la posición de los grupos metilo en el anillo aromático (DellaPenna y Pogson, 2006). Cada compuesto de tocoferol individual tiene una contribución relativa diferente a la actividad total de la vitamina E. El  $\alpha$ -tocoferol tiene la mayor actividad de vitamina E, seguido por el  $\beta$ -tocoferol, el  $\gamma$ -tocoferol y el  $\delta$ -tocoferol (DellaPenna y Pogson, 2006). Para la dieta humana, los pimientos son una de las fuentes más ricas de vitamina E natural, además de algunas otras verduras como espárragos, repollo, brócoli y berenjenas (Isabelle *et al.* 2010). Aunque no alcanza los niveles de las vitaminas A y C, el pimiento contiene proporciones considerables de esta vitamina en forma de  $\alpha$ -tocoferol (pericarpio) y  $\gamma$ -tocoferol (semillas) (Osuna-García *et al.*, 1998). Los niveles de tocoferol están influenciados por la etapa de madurez del fruto (Markus *et al.*, 1999; Matsufuji *et al.*, 1998; Osuna-Garcia *et al.*, 1998) y varían entre cultivares de pimiento (Wahyuni *et al.* 2011).

#### 1.4.2.3.- Polifenoles

Los polifenoles son metabolitos secundarios que se hallan ampliamente distribuidos en el reino vegetal que desempeñan una gran diversidad de funciones en las plantas, contribuyendo a la defensa frente a plagas y factores de estrés así como al sabor, aroma y color de frutas y hortalizas (Espín de Gea y Tomás-Barberán, 2006; Taylor y Groteworld, 2005).

Entre los polifenoles, los flavonoides son el grupo más abundante. Actualmente hay alrededor de 6.000 flavonoides que contribuyen a los coloridos pigmentos de frutas, vegetales y plantas medicinales. Kumar y Pandey (2013) revisaron las funciones protectoras de los flavonoides contra las enfermedades humanas, así como sus funciones en las plantas. Tienen diversos efectos bioquímicos y antioxidantes favorables asociados con diversas enfermedades como el cáncer, la enfermedad de Alzheimer (EA), la aterosclerosis, etc. (Burak e Imen, 1999; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009).

Los flavonoides están asociados con un amplio espectro de efectos que promueven la salud y son un componente indispensable en una variedad de aplicaciones nutracéuticas, farmacéuticas, medicinales y cosméticas. Esto se debe a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimutagénicas y anticancerígenas (Panche *et al.*, 2016).

Existen seis grandes familias: antocianos, flavanoles, flavonoles, flavononas, flavonas e isoflavonas. Los pimientos son ricos en compuestos fenólicos, que también muestran propiedades beneficiosas para el organismo humano. En pimiento, los flavonoides más importantes son la quercetina (flavonol) y la luteolina (flavona). El interés de los investigadores por el contenido de estos compuestos fenólicos en pimiento es relativamente reciente y existen algunos estudios interesantes. No está claro como afecta el estado de madurez a los niveles de estos fenoles. Así, mientras que algunos autores señalan que son mayores en fruto verde (Lee *et al.*, 1995; Marín *et al.*, 2004), otros como Howard *et al.* (2000) han descrito niveles similares entre frutos maduros e inmaduros.

### 1.4.3.- Calidad organoléptica

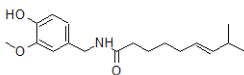
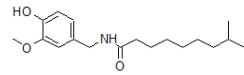
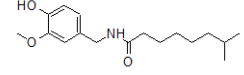
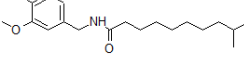
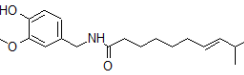
Los atributos de sabor y las funciones de salud de los pimientos juegan un papel importante en su popularidad como producto de consumo. La creciente atención prestada al sabor de los pimientos ha llevado a un aumento en el número de estudios con el objetivo de comprender no solo su sabor, sino también su aroma único (Giuffrida *et al.*, 2013; Lutz y Freitas, 2008). Sin embargo, los compuestos de aroma, así como los compuestos de sabor y los atributos funcionales dependen de muchos factores, como la variedad, la etapa de cosecha, las condiciones de crecimiento y origen geográfico (Lutz y Freitas, 2008; Topuz y Ozdemir, 2007). La gran diversidad genética del género *Capsicum*, además de los efectos edafoclimáticos de su origen geográfico, requiere la investigación de la composición fitoquímica de los pimientos (Lutz y Freitas, 2008).

En este sentido, el contenido en azúcares y ácidos orgánicos (responsables del sabor) de los frutos *Capsicum* es muy bajo, por lo que su calidad organoléptica depende fundamentalmente de dos factores: i) pungencia (capsaicinoides) en frutos picantes y ii) volátiles responsables del aroma, tanto en frutos dulces como picantes (DeWitt y Bosland, 1996; Luning *et al.*, 1994; Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2010b y 2016).

#### 1.4.3.1.- Pungencia

Una característica que distingue a los frutos de pimiento, es la síntesis y acumulación de capsaicinoides, inodoros, insípidos y compuestos no nutritivos (Bosland y Votava, 2000), que son un grupo alcaloide responsable de su pungencia (picante), compuestos que se encuentran principalmente en el tejido de la placenta adyacente a las semillas (Vera-Guzmán *et al.*, 2017), donde el 90% está compuesto por capsaicina y dihidrocapsaicina (Bo y Carpizo, 2015; Wahyuni *et al.*, 2013), cuya función principal es la defensa contra el ataque de los mamíferos (Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2010a) y la presencia de hongos y bacterias (Segura *et al.*, 2013). Otros capsaicinoides relacionados, como son la nordihidrocapsaicina, la homocapsaicina y la homodihidrocapsaicina, también están presentes en cantidades más bajas (Aguiar *et al.*, 2013; Barbero *et al.*, 2008; Laskaridou-Monnerville, 1999) (Tabla 1).

Tabla 1. Estructuras químicas y niveles de pungencia de capsaicinoides Fuente: (Eich, 2008; Ravishankar *et al.*, 2003; Zachariah y Gobinath, 2008).

Compuesto	Cantidad relativa típica	Unidades de calor de Scoville (SHU)	Estructura química
capsaicina	69%	15.000.000	
dihidrocapsaicina	22%	15.000.000	
nordihidrocapsaicina	7%	9.100.000	
homodihidrocapsaicina	1%	8.600.000	
homocapsaicina	1%	8.600.000	

La biosíntesis de capsaicina involucra dos vías, es decir, la vía fenilpropanoide, que proporciona el precursor fenilalanina para la formación de vanililamina, y la vía valina que proporciona la valina precursora del ácido 8-metil-6-nonanoico. La capsaicina es biosintetizada por la capsaicina sintetasa a través de la condensación de productos de las vías fenilpropanoide y valina (Prasad *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que los pimientos son variables con respecto a las concentraciones de capsaicina, que incluye los pimientos cosechados de la misma planta (Keyhaninejad *et al.*, 2014; Kirschbaum-Titze *et al.*, 2002). Esto ha generado una serie de proyectos de investigación que probaron varios factores que podrían aumentar la producción de capsaicinoides. Estos factores incluyen: estrés osmótico (Arrowsmith *et al.*, 2012; Kehie *et al.*, 2012), temporada de cosecha (Pordesimo *et al.*, 2004), fertilización nitrogenada (Medina-Lara *et al.*, 2008; Monforte-Gonzalez *et al.*, 2010).

El picante en los pimientos se expresa en la Unidades de Calor Scoville (SHU) (Tabla 2). La escala de Scoville fue inventada por el científico Wilbur Lincoln Scoville en 1912 cuando utilizó la prueba organoléptica (Scoville, 1912). En esta prueba, se extrae una cierta cantidad de pimiento con etanol, que luego se diluye repetidamente hasta que la sensación picante ya no se puede detectar en la lengua. El número de veces que el extracto tiene que diluirse se toma como el picante en unidades de SHU (Bosland y Votava, 2000; Nickels, 2015). Actualmente, el contenido de capsaicinoides en los

## Introducción

pimientos se mide por HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento) (Duelund y Mouritsen, 2017).

La capsaicina es conocida por su efectividad farmacológica, neurológica y dietética. También tiene una actividad antibiótica significativa y la capacidad de reducir el nivel de colesterol en la sangre (Gurnani *et al.*, 2016). La capsaicina también es capaz de matar algunos tipos de células cancerosas (Anandakumar *et al.*, 2013; Dawan *et al.*, 2017; Prasad *et al.*, 2008) y proporcionar alivio en artritis y enfermedades respiratorias (Prasad *et al.*, 2008), también es antioxidante y tiene propiedades anticancerígenas, antiartríticas y analgésicas (Dawan *et al.*, 2017; Prasad *et al.*, 2008).

Los capsaicinoides tienen fuertes efectos farmacológicos, que pueden usarse para el alivio del dolor, prevención del cáncer, reducción de peso, además de proporcionar beneficios gastrointestinales y cardiovasculares (Luo *et al.*, 2011). Otros componentes menores que afectan en gran medida el flavor y el sabor de los pimientos *Capsicum* son los alcoholes, terpenos, aldehídos, cetonas, ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos (Eggink *et al.*, 2012; Saha *et al.*, 2015).

Tabla 2: Pungencia en escala Scoville (Scoville Heat Units, SHU) y las principales especies/variedades de *Capsicum* spp. Fuente: (Peralta, 2007).

Unidad Scoville	Variedad/Chile
850.000-1.001.304	Bhut Jolokia (India, Sri Lanka)
350.000-570.000	Red Savina Habanero (California, USA)
100.000-350.000	Chile Habanero
100.000-325.000	Scotch Habanero
100.000-200.000	Chile Jamaicano
50.000-100.000	Chilpete, Piquín, Chile Thai
30.000-50.000	Pimienta Cayanna, Chile Tabasco
10.000-30.000	Chile Serrano, Chile de árbol
2.500-8.000	Chile Jalapeño
2.500-5.000	Chile Tabasco
1.000-1.500	Chile Poblano
0	Chile Dulce (Pimiento dulce, Chile verde)

### 1.4.3.2.- Volátiles

En el caso de la pungencia (capsaicinoides), existen numerosos estudios desde muy diferentes perspectivas (tecnología de alimentos, genética y genómica, mejora, química). Por el contrario, el interés por los volátiles responsables del aroma y el flavor (por estímulo sensorial de los volátiles en la cavidad retronasal durante la masticación) ha sido mucho más limitado y no existen líneas de investigación dirigidas a la mejora de

este atributo, a diferencia de otros aspectos relativos a la calidad (carotenoides, vitaminas, compuestos fenólicos) (Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2006 y 2010b).

En los últimos años, han sido identificados más de 300 compuestos volátiles en frutos de pimientos frescos y procesados, pero la importancia de estos compuestos en el aroma no es todavía completamente conocida (Antonio *et al.*, 2018; Kollmannsberger *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2016). Además, usando todo el volatoma del fruto, varios compuestos típicos fueron identificados y vinculados a rasgos de impacto para cada especie de *Capsicum* y juegan un papel clave para evaluar la calidad comercial de frutos (Shim *et al.*, 2014; Taiti *et al.*, 2015). Los compuestos aromáticos de los pimientos se ven afectados por varios factores, relacionados no solo por la variedad y el origen sino también por el crecimiento y condiciones de cosecha/postcosecha, como la etapa de maduración y preservación de frutos (Defilippi *et al.*, 2009; Junior *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2018).

Como el aroma es una de las características de fruto más apreciadas, es probable que los compuestos de sabor volátiles desempeñen un papel clave en la determinación de la percepción y aceptabilidad de los productos por parte de los consumidores. La identificación de metabolitos clave del sabor volátil que tienen el carácter único de la fruta natural es esencial, ya que proporciona la identidad sensorial principal y el sabor característico de los frutos (Cheong *et al.*, 2010).

El aroma es una mezcla compleja de una gran cantidad de compuestos volátiles, cuya composición es específica para las especies y, a menudo, para la variedad (Schwab *et al.*, 2008). Aunque los diferentes frutos a menudo comparten muchas características aromáticas, cada fruto tiene un aroma distintivo que depende de la combinación de volátiles, la concentración y el umbral de percepción de los compuestos volátiles individuales (Tucker, 1993).

Como un rasgo importante de la calidad del fruto, el aroma ha ganado una atención creciente en los últimos años. Con el rápido desarrollo de la ciencia y la tecnología, especialmente la aplicación de GC-MS y otros aparatos analíticos, se ha avanzado en la investigación de aromas en varios campos (Song y Forney, 2008).

Los volátiles de sabor se derivan de una variedad de compuestos que incluyen fitonutrientes como ácidos grasos, aminoácidos, carotenoides, fenoles y terpenoides (Goff y Klee, 2006). Los compuestos volátiles de los frutos se componen principalmente de diversas clases de productos químicos, incluidos ésteres, alcoholes, aldehídos, cetonas, lactonas y terpenoides.

## Introducción

Los factores previos a la cosecha, como la luz solar, la disponibilidad de agua, la fertilización y las aplicaciones químicas, afectan al crecimiento del cultivo y pueden afectar las características de calidad interna del producto cosechado, incluido el sabor. Fuertes lluvias antes de la cosecha diluyen los compuestos aromatizantes en los tomates (*Solanum lycopersicum* L.). El potencial de aroma de uva fue más alto en las vides con déficit hídrico leve y suministro moderado de nitrógeno. El estrés por déficit hídrico severo parecía limitar el potencial de aroma, al igual que la deficiencia de nitrógeno (Peyrot des Gachons *et al.*, 2005).

Como los volátiles se componen de al menos cinco clases químicas, existen varias vías involucradas en la biosíntesis volátil. Estos no se han descrito completamente, pero parecen ser comunes para diferentes frutas. Los volátiles importantes para el aroma y el sabor se biosintetizan a partir de aminoácidos, lípidos de membrana y carbohidratos (Sanz *et al.*, 1997). Aunque los compuestos volátiles se sintetizan a través de algunas vías bioquímicas principales, varias formas de modificaciones enzimáticas, como hidroxilaciones, acetilaciones y metilaciones, se suman a la diversidad de los volátiles emitidos al aumentar su volatilidad en el paso final de su formación (Dudareva *et al.*, 2004; Gang, 2005).

Los ácidos grasos son los principales precursores de los volátiles aromáticos en la mayoría de frutos (Sanz *et al.*, 1997). Los alcoholes, los aldehídos, las cetonas, los ácidos, los ésteres y las lactonas derivados de ácidos grasos que van desde C1 hasta C20 son compuestos aromáticos importantes y son responsables de los sabores de frutas frescas con altas concentraciones, y se forman básicamente por tres procesos:  $\alpha$ -oxidación,  $\beta$ -oxidación y la ruta de la lipoxigenasa (Schwab y Schreier, 2002). Los volátiles aromáticos en los frutos intactos se forman a través de la vía biosintética de  $\beta$ -oxidación, mientras que cuando el tejido del fruto se rompe, los volátiles se forman a través de la vía de la lipoxigenasa (LOX) (Schreier, 1984). Muchos de los ésteres alifáticos, alcoholes, ácidos y carbonilos que se encuentran en las frutas se derivan de la degradación oxidativa de los ácidos linoleico y linolénico (Reineccius, 2006).

Aunque la degradación de los ácidos grasos de cadena lineal por  $\alpha$  y  $\beta$ -oxidación es un proceso importante para la formación de moléculas de sabor en todos los organismos, las vías específicas en las plantas no se conocen bien. La  $\beta$ -oxidación produce la eliminación sucesiva de unidades C2 (acetil CoA) del ácido graso original. Los mecanismos detallados de la  $\beta$ -oxidación convencional están bien establecidos (Goepfert y Poirier, 2007). Sanz *et al.* (1997) informaron que la  $\beta$ -oxidación de ácidos

grasos es el proceso biosintético primario que proporciona alcoholes y acil coenzima A (CoA) para la formación de ésteres. Los acil CoA se reducen con acil CoA reductasa a aldehído que a su vez se reduce por alcohol dehidrogenasa (ADH) a alcohol para que alcohol aciltransferasa (AAT) lo use para producir ésteres (Bartley *et al.*, 1985). Los aromas de pera y manzana han sido dos ejemplos clásicos de formación volátil a través de la vía de  $\beta$ -oxidación (Paillard, 1990). La biosíntesis de lactonas, componentes clave del aroma en frutas como el melocotón y la nectarina ( $\gamma$ -decalactona y  $\gamma$ -dodecalactona), la piña ( $\delta$ -octalactona) o el coco (*Cocos nucifera* L.) ( $\gamma$ -octalactona), también se asocia con la vía de la  $\beta$ -oxidación (Tressl y Albrecht, 1986).

El metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados, a través del primer paso catalizado por LOX y las reacciones posteriores, se conoce comúnmente como la ruta LOX. Los aldehídos C6 y C9 y alcoholes saturados e insaturados volátiles son importantes contribuyentes a los sabores característicos de frutas, verduras y hojas verdes. Los aldehídos y alcoholes de cadena corta son producidos por las plantas en respuesta a las heridas y juegan un papel importante en las estrategias de defensa de las plantas y resistencia a las plagas (Matsui, 2006; Stumpe y Feussner, 2006).

Los aminoácidos, como la alanina, la valina, la leucina, la isoleucina, la fenilalanina y el ácido aspártico, también participan en la biosíntesis de aromas en la fruta como precursores directos, y su metabolismo es responsable de la producción de una gran cantidad de compuestos, incluidos los alcoholes, los carbonilos, ácidos y ésteres (Baldwin *et al.*, 2002; Sanz *et al.*, 1997). Los aminoácidos pueden sufrir una desaminación o transaminación inicial que conduce a la formación del correspondiente cetoácido. La descarboxilación posterior seguida de reducciones, oxidaciones y/o esterificaciones dan lugar a aldehídos, ácidos, alcoholes y ésteres (Reineccius, 2006).

Los terpenoides constituyen una de las familias más diversas de productos naturales. Muchos de los terpenoides producidos son no volátiles y están involucrados en procesos importantes de la planta como la estructura de la membrana (esteroles), la fotosíntesis (cadenas laterales de clorofila, carotenoides), la química redox (quinonas) y la regulación del crecimiento (giberelinas, ácido abcísico) (Croteau *et al.*, 2000).

Los terpenoides volátiles, hemiterpenoides (C5), monoterpenoides (C10), sesquiterpenoides (C15) y algunos diterpenoides (C20), están involucrados en las interacciones entre plantas y herbívoros o polinizadores de insectos y también están implicados en la defensa general o las respuestas al estrés (Dudareva *et al.*, 2004; Pichersky *et al.*, 2006; Pichersky y Gershenzon, 2002). Se descubrió que los

## Introducción

terpenoides, principalmente los miembros C10 y C15 de esta familia, afectan los perfiles de sabor de la mayoría de las frutas y el aroma de las flores en diferentes niveles.

Muchos terpenoides tiene propiedades medicinales, en consecuencia son de interés para la industria farmacéutica como agentes antirretrovirales o compuestos antipalúdicos (Modzelewska *et al.*, 2005). Las variaciones sintéticas y los derivados de terpenos y terpenoides naturales también amplían enormemente la variedad de aromas utilizados en perfumería y sabores utilizados en aditivos alimentarios.

A pesar de su diversidad, todos los terpenoides derivan de las unidades de construcción comunes isopentenil difosfato (IDP) y su isómero dimetilalil difosfato (DMADP) (Croteau *et al.*, 2000; Croteau y Karp, 1991; McGarvey y Croteau, 1995). En las plantas, tanto IDP como DMADP se sintetizan a través de dos vías paralelas, la ruta del mevalonato (MVA), que está activa en el citosol, y la ruta del metileritritol-4-fosfato (MEP), que está activa en los plástidos (Lichtenthaler, 1999; Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002; Rohdich *et al.*, 2002; Rohmer, 2003). En general, se reconoce que la vía citosólica es responsable de la síntesis de sesquiterpenos, fitoesteroles y ubiquinonas, mientras que los monoterpenos, giberelinas, ácido abscísico, carotenoides y la fracción prenilo de clorofilas, plastoquinona y tocoferol se producen en los plástidos (Lichtenthaler, 1999; Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002; Rohdich *et al.*, 2002; Rohmer, 2003).

Los carotenoides son pigmentos tetraterpenoides que se acumulan en los plástidos de las hojas, flores y frutos, donde contribuyen a la coloración roja, naranja y amarilla. Además de su papel en las plantas como pigmentos y colorantes accesorios fotosintéticos, los carotenoides también son precursores de apocarotenoides (también llamados norisoprenos) como el ácido abscísico de fitohormonas, las moléculas visuales y de señalización del ácido retiniano y retinoico, y los volátiles aromáticos como  $\beta$ -ionona. (Schwab *et al.*, 2008).

Los carotenoides y sus derivados apocarotenoides son moléculas isoprenoides importantes para el metabolismo primario y secundario de las plantas y otros organismos vivos (Rosati *et al.*, 2009). La escisión oxidativa de los carotenoides conduce a la producción de apocarotenoides y es catalizada por una familia de dioxigenasas de escisión de carotenoides (CCDs) (Auldridge *et al.*, 2006b). Los volátiles de apocarotenoides se sintetizan solo en la última etapa de maduración, a pesar de que las enzimas CCDs están presentes durante todo el desarrollo de la fruta (Simkin

*et al.*, 2004a). Las CCDs a menudo exhiben promiscuidad del sustrato, lo que probablemente contribuye a la diversidad de apocarotenoides que se encuentran en la naturaleza (Auldrige *et al.*, 2006b). Los CCDs también difieren en su localización subcelular: se predice que algunos, como CCD1, son citosólicos; otros poseen péptidos de tránsito para la selección de plastidios o plastoglobules (Rubio *et al.*, 2008). En general, la biosíntesis de compuestos volátiles derivados de carotenoides se realiza a través de tres pasos: una escisión inicial de dioxigenasa que produce apocarotenoides, seguida de transformaciones enzimáticas de estos apocarotenoides que conducen a la formación de precursores de aroma polar, y finalmente conversiones catalizadas por ácidos de estos precursores a volátiles compuestos (Winterhalter y Rouseff, 2002). Sin embargo, en algunos casos un producto volátil es el resultado de la etapa inicial de escisión de dioxigenasa, como se demostró para la  $\beta$ -ionona en *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) (Auldrige *et al.*, 2006a), tomate (*Solanum lycopersicum*) y petunia (*Petunia hybrida*) (Auldrige *et al.*, 2006b; Simkin *et al.*, 2004b).

Una mejora del flavor, lo que erróneamente conocemos como “sabor”, del pimiento y formas relacionadas pasa por investigar en profundidad la fracción volátil y su diversidad, así como el modo de herencia de este factor de calidad organoléptica. Adicionalmente, el estado de madurez es otro aspecto a tener en cuenta pues pimientos, chiles y ajíes pueden consumirse tanto inmaduros (verdes) como maduros, aunque este último es el más común comercialmente en España y Europa, y el perfil de volátiles (y otros compuestos como los antioxidantes) puede ser muy variable según el momento de desarrollo del fruto (Luning *et al.*, 1994; Pino *et al.*, 2006).

Además, el nivel de compuestos bioactivos/nutricionales aumenta con la maduración (Bosland y Votava, 2000; Ribes-Moya *et al.*, 2018) y también el aroma generalmente evoluciona de notas herbáceas/grasas a perfiles más diversos, es decir, notas frutales, herbáceas, balsámicas, exóticas, etc., aumentando diferencias sensoriales y químicas entre variedades (Bogusz *et al.*, 2012; Morales-Soriano *et al.*, 2018; Pino *et al.*, 2007; Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2010b). En cuanto a los factores organolépticos, la pungencia se debe a la presencia de capsaicinoides en los frutos, que se sintetizan principalmente durante el desarrollo y la maduración del fruto en la placenta y semillas (Buczowska *et al.*, 2016; Olguín-Rojas *et al.*, 2019) y constituyen un sistema de protección evolutivo para las semillas contra los herbívoros (Baby y Ranganathan, 2016; Barchenger y Bosland, 2016). La pungencia es el rasgo activo de sabor más conocido en los pimientos y se ha estudiado durante más de 100 años desde los

## Introducción

primeros estudios de Scoville, que abarca muchos enfoques diferentes, incluidos los organolépticos, la tecnología de alimentos, la genética y mejora, la metabolómica, etc. (Estrada *et al.*, 1999; Jarret *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2017; Olguín-Rojas *et al.*, 2019; Scoville, 1912; Wahyuni *et al.*, 2013). Por el contrario, los estudios sobre el aroma y la fracción volátil han sido relativamente escasos y solo en los últimos años este factor ha llamado la atención de científicos y mejoradores (Eggink *et al.*, 2014; Kollmannsberger *et al.*, 2011; Morales-Soriano *et al.*, 2018; Pino *et al.*, 2007; Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2010b).

Además, como factores relacionados con el aroma y el sabor, los volátiles son esenciales para la calidad organoléptica de las frutas (Cremer y Eichner, 2000; Luning *et al.*, 1994) y para promover el interés y la lealtad del consumidor, que generalmente asocian un sabor y aroma agradables con altos beneficios nutricionales (Brugarolas *et al.*, 2009; Hammer *et al.*, 2003; Ribes-Moya *et al.*, 2018). En este sentido, el aroma de cualquier alimento es el resultado de una combinación cualitativa y cuantitativa de compuestos de su fracción volátil que alcanzan un nivel lo suficientemente alto como para ser percibido por la nariz humana. En otras palabras, todo el aroma depende de la intensidad y la calidad del aroma de cada volátil que contribuye al olor. Además, cada volátil tiene su umbral específico de detección de olores y, por lo tanto, hay compuestos muy potentes que se pueden oler a partes por mil millones como  $\beta$ -damascenona (aceite de rosa, melocotón, tomate, pepino), mesifurano (fresa, piña) o 3-isobutilmetoxipirazina (pimientos). Mientras que otros deben alcanzar concentraciones mucho más altas (Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2004; Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2010b). Además, el aroma contribuye al sabor cuando se detectan estos volátiles en el área retronasal durante la masticación (Luning *et al.*, 1994; Morales-Soriano *et al.*, 2018; Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2010b).

Las preferencias de aroma y sabor en los pimientos son muy diversas, y son en parte responsables de la diversidad varietal explicada anteriormente (DeWitt y Bosland, 2009). Por lo tanto, algunos consumidores prefieren los pimientos picantes, mientras que otros prefieren los pimientos suaves o los pimientos dulces. De la misma manera, se espera que los pimientos Serranos, Numex, Jalapeños o incluso rocotos de la región andina proporcionen un aroma y un sabor sulfurosos intensos a pimiento verde (dominados por pirazinas, aldehídos y otros volátiles con intensas cualidades de aroma herbáceo), mientras que otros mercados o consumidores prefieren el dulce afrutado, incluso con notas exóticas, aromas de Habaneros o Scotch Bonnet muy picantes o el

dulce Ají Dulce de *C. chinense* (dominado por ésteres, alcoholes y ácidos de cadena corta, entre otros, y la falta de volátiles con cualidades de aroma herbáceo) (DeWitt y Bosland, 2009; Morales-Soriano *et al.*, 2018; Pino *et al.*, 2007). También otras variedades como los tipos Cayena de *C. annuum* y *C. frutescens* (por ejemplo, variedades Tabasco) o la mayoría de ajíes *C. baccatum*, que combinan notas de pimiento verde y aroma afrutado, son muy apreciadas en otros nichos de mercado (DeWitt y Bosland, 2009; Eggink *et al.*, 2014; Kollmannsberger *et al.*, 2011). Por lo tanto, los mejoradores de pimiento tienen una amplia gama de preferencias de sabor para trabajar.

En este contexto, se han estudiado más de 300 compuestos en la fracción volátil de frutos de *Capsicum* (Antonio *et al.*, 2018; Kollmannsberger *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2016; Pino *et al.*, 2007; Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2010b), aunque muchos trabajos se han limitado a una diversidad varietal estrecha, perteneciente a tipologías específicas y/o materiales específicos para el procesado de alimentos (Bianchi y Lo Scalzo, 2018; Luning *et al.*, 1994; Simian *et al.*, 2004; Sosa-Moguel *et al.*, 2017; Zimmermann y Schieberle, 2000), y solo unos pocos informes revelaron un papel importante del fondo genotípico en la diversidad de la fracción volátil y la calidad del aroma en pimientos completamente maduros (Eggink *et al.*, 2014; Kollmannsberger *et al.*, 2011; Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2010b). En un estudio preliminar, basado en pimientos verdes menos complejos, mostramos que alguna base de herencia podría estar detrás de la expresión de este rasgo (Moreno-Peris *et al.*, 2012). Sin embargo, aún se desconoce la capacidad de las variedades de *Capsicum* para generar nuevos materiales con aroma mejorado en frutos completamente maduros por hibridación. Para lograr este objetivo, es esencial saber cómo la composición volátil se hereda de los padres a la descendencia, tanto cuantitativa como cualitativamente, como se informó en algunos estudios en pepino y los géneros *Citrus* o *Prunus* (Gancel *et al.*, 2003; Gancel *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 1993; Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2004) entre otros.

Por lo tanto, en base a nuestro conocimiento previo, se seleccionaron varias fuentes de variación de *Capsicum*, que abarcan diferentes cualidades de aroma en la etapa completamente madura para evaluar si los programas de mejora basados en la hibridación son factibles para mejorar este factor de sabor en los pimientos, a pesar de la complejidad de las vías biosintéticas de volátiles en frutas y verduras. En el presente trabajo, las fracciones volátiles de un conjunto diverso de accesiones *C. annuum* y *C. chinense*, y varios híbridos entre ellos *C. annuum* × *C. annuum* y alguno *C. annuum* ×

## Introducción

*C. chinense* han sido analizados y comparados en frutos completamente maduros para evaluar: i) las reglas de herencia de estos rasgos activos de sabor y ii) la oportunidad de desarrollar nuevas combinaciones mejoradas de volátiles por hibridación. Además, el pericarpio y los tejidos placentarios se analizaron por separado para determinar si la composición volátil difiere entre los tejidos del fruto, debido a la relevancia de ambos tejidos en la calidad del sabor de los alimentos derivados de los pimientos.

Los estudios en la última década revelaron una considerable diversidad interespecífica e intraespecífica en términos de composición volátil. Por el contrario, el conocimiento sobre la diversidad intravarietal aún es escaso y este hecho podría ser de suma importancia para los mejoradores que buscan mejorar el sabor de cultivares modernos o para recuperar variedades locales basadas en un alto valor añadido. Aquí presentamos unos resultados preliminares de un estudio sobre la fracción volátil de pimientos de tipo varietal jalapeño en su etapa inmadura, la más importante económicamente en los jalapeños, como caso de estudio. Los pimientos jalapeños han demostrado propiedades antioxidantes (Alvarez-Parrila *et al.*, 2011) y han demostrado una acción efectiva contra los lípidos alimentarios y la oxidación del colesterol LDL humano (Alvarez-Parrila *et al.*, 2012) debido a varios compuestos bioactivos.

## Objetivos



## 2.- Objetivos

Como principal productor y exportador de pimiento de Europa, España es centro de diversidad de gran relevancia para el pimiento común (*C. annuum*), destacando los tipos morrones o gruesos, pero también numerosos tipos varietales y ecotipos locales como guindillas, padrón, bola y piquillos. Asimismo, la diversidad genética presente en el género *Capsicum* es extraordinaria y abarca varias especies cultivadas además de *C. annuum*, las cuales podrían ser fuentes de variación para la mejora de ésta última o, alternativamente, para diversificar el sector productivo español.

A este respecto uno de los principales factores de calidad organoléptica de pimientos, chiles y ajíes es su aroma, conferido por una mezcla diversa de volátiles, cuya combinación cualitativa y cuantitativa marca las diferencias entre genotipos para este atributo. Además, estos volátiles se liberan durante la masticación y son detectados por las terminaciones nerviosas de la cavidad retronasal, llevando al cerebro la percepción de “sabor”, flavor en un sentido estricto. Por ello, cualquier programa de mejora de calidad organoléptica de estos frutos debe abordar el estudio de su fracción volátil, así como su modo de herencia de ésta y el impacto que diversos factores pueden tener en su composición (e.g. variedad, estado de madurez).

Para este fin se dispone de una amplia colección de accesiones pertenecientes a diversos tipos varietales de las especies mencionadas y abarca una amplia representación geográfica, y de materiales híbridos entre ellas. La hipótesis de partida del proyecto es que sobre la base de estos materiales es posible: i) establecer el modo de herencia a partir de la comparación padres-híbridos y determinar si es factible un programa de mejora basado en hibridación/introgresión de fondo genético entre tipos varietales o especies para desarrollar pimientos más sabrosos y con un perfil aromático mejorado y ii) evaluar la diversidad genética (intravarietal, intervarietal e interespecífica) para este carácter de calidad organoléptica, para determinar si también es factible iniciar programas de mejora basado en la selección de genotipos dentro de tipos varietales específicos..

Con esta finalidad se plantean los siguientes objetivos parciales:

Objetivo 1: Caracterización cualitativa y cuantitativa de la fracción volátil de una colección de entradas de pimiento y especies relacionadas e híbridos entre ellas, en

## Objetivos

frutos maduros, para establecer de forma preliminar el modo de herencia de estos compuestos en el principal estado de madurez comercial. Asimismo, determinar si es un carácter claramente heredable o no en base al contenido total de volátiles y/o el contenido de volátiles individuales.

Objetivo 2: Caracterización cualitativa y cuantitativa de la fracción volátil de entradas pertenecientes a tipos varietales de referencia, para estudiar preliminarmente la diversidad intravarietal de este carácter en el estado de madurez más adecuado comercialmente para cada variedad.

Fase experimental,  
resultados y  
discusión



### **3.- Fase experimental, resultados y discusión**

#### **3.1.- Línea experimental 1: Hibridación en pimientos y chiles (*Capsicum* sp.) para la mejora de su composición volátil en fruto maduro: efecto de la combinación parental y del tejido del fruto**

##### **3.1.1.- Metodología**

###### **3.1.1.1.- Material vegetal**

En el presente trabajo se estudió una colección de 10 accesiones de *Capsicum*, 8 de *C. annuum* y 2 de *C. chinense*, incluyendo diversos orígenes geográficos, diversidad varietal, características del fruto y calidades aromáticas en estado completamente maduro (Pereira-Días *et al.*, 2019; Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2010b) (Tabla 3). Esta diversidad de calidades aromáticas abarcaba las diferentes preferencias de flavor de los consumidores en esta hortaliza/especia y sus derivados alimenticios, y por tanto, proporcionaba un enfoque integral y un conjunto de materiales adecuado para inspirar a los mejoradores que trabajan en diferentes sabores y aromas. La evaluación incluyó una colección de híbridos entre accesiones con características y calidades aromáticas complementarias, 6 híbridos de *C. annuum* × *C. annuum* y 3 híbridos de *C. annuum* × *C. chinense*, con objeto de estudiar el efecto de la combinación parental y la herencia de la fracción volátil como responsable del aroma y flavor.

Para minimizar el efecto ambiental en la composición del fruto, las plantas se cultivaron en un invernadero con sistema de control climático ubicado en la Universitat Politècnica de València (UPV), Campus de Vera, Valencia (España), durante el ciclo de cultivo de primavera-verano de 2018. Diez plántulas por accesión se dividieron en cinco bloques (dos plantas por bloque) y se trasplantaron al invernadero en febrero de 2018. Las plantas se distribuyeron siguiendo un diseño factorial completamente al azar. La temperatura varió de 20 °C (noche) a 28 °C (mañana), bajo condiciones de luz natural. Las plantas se regaron y fertilizaron dos veces al día durante 5 minutos usando un fertilizante comercial soluble en agua 15N-2.2P-24.9K (15N-5P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-30K<sub>2</sub>O más micronutrientes, BASF, Barcelona, España) a una concentración de 1 g L<sup>-1</sup>. Las plantas se cultivaron de acuerdo con las prácticas comunes de los productores de pimiento de la

## Fase experimental, resultados y discusión

costa mediterránea de España (Nuez *et al.*, 2003). Los tratamientos fitosanitarios solo se aplicaron cuando se detectaron niveles poblacionales a los que se aconseja tratar de plagas comunes como ácaros, utilizando Acramite® y Oberon® para la mosca blanca.

Tabla 3. Nombre, tipo varietal, origen y rasgos frutales de las accesiones parentales de *Capsicum* evaluadas y lista de híbridos evaluados.

Accesión (abreviatura)	Tipo varietal	Origen	Peso (g)	Largo/ancho (mm)	Calidad de aroma (intensidad) <sup>1</sup>
<i>C. annuum</i>					
Blocky Red1 (BlockyR1)	California, grande	Línea de mejora	200-300	121/105	Pimiento (baja)
Blocky Red2 (BlockyR2)	California, medio	Línea de mejora	150-200	106/93	Pimiento (baja)
Piquillo (Piquillo)	Piquillo/Ancho	PGI Piquillo Lodosa (España)	25-50	90/50	Pimiento verde (intermedia)
Chile de Árbol (Arbol)	Guindilla/Cayena, pequeña	México/sur EEUU	5-10	71/11	Pimiento verde, notas afrutadas (alta)
Guindilla (Guindilla/Cayenne)	Guindilla/Cayena, media	Valencia (España)	5-10	108/12	Afrutado, notas pimiento verde (alta)
Pasilla Bajío (Pasilla)	Guindilla/Cayena, larga	México/sur EEUU	10-25	204/29	Verde, notas afrutadas (intermedia)
Chile Serrano (Serrano)	Serrano, pequeño	México/sur EEUU	5-10	35/16	Pimiento verde, notas afrutadas cítricas (alta)
Serrano Criollo (SerrCrio)	Serrano-Cayena, pequeño	México	<5	39/12	Pimiento verde (interm.-alta)
<i>C. chinense</i>					
PI-152225 (152225)	Chile farolillo	USDA	<5	41/12	Afrutado, dulce, exótico (alta)
Ají Dulce (Ají D)	Scotch Bonnet (dulce)	Cuba	5-10	20/31	Afrutado, dulce (interm.-alta)
<i>C. annuum</i> × <i>C. annuum</i> (abbreviation)		<i>C. annuum</i> × <i>C. chinense</i> (abbreviation)			
Blocky Red1 × Serrano Criollo (BlockyR1 × SerrCrio)		Blocky Red1 × PI-152225 (BlockyR1 × 152225)			
Blocky Red2 × Serrano Criollo (BlockyR2 × SerrCrio)		Blocky Red1 × Ají Dulce (BlockyR1 × AjíD)			
Piquillo × Pasilla Bajío (Piquillo × Pasilla)		Blocky Red2 × Ají Dulce (BlockyR2 × AjíD)			
Piquillo × Chile Serrano (Piquillo × Serrano)					
Chile de Arbol × Chile Serrano (Arbol × Serrano)					
Guindilla × Chile Serrano (Guindilla × Serrano)					

<sup>1</sup>Adaptado de Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2010b.

### 3.1.1.2.- Preparación de muestras y extracción de volátiles

Debido a la diversidad genética incluida en el experimento, las accesiones estudiadas diferían considerablemente en el desarrollo y maduración del fruto y, en consecuencia, la cosecha de frutos se extendió a cinco semanas. Por lo tanto, los frutos completamente maduros de ambas líneas parentales e híbridos se cosecharon durante julio y parte de agosto y se mantuvieron a 10 °C hasta que se realizaban los análisis en menos de 3 días desde la cosecha.

Se prepararon un total de cinco muestras compuestas por accesión (n=5) mezclando frutos de 2 plantas cada una (i.e. cada bloque se utilizó para preparar una muestra), y así se muestrearon las 10 plantas por accesión cultivadas en el experimento. Los frutos de cada muestra se lavaron cuidadosamente. Primero con agua del grifo y luego con agua destilada. Luego las muestras se mantuvieron a 10 °C hasta los análisis. Justo antes de los análisis, cada muestra de fruto se dividió en dos submuestras, es decir, pericarpio y tejidos placentarios. Las submuestras de pericarpio se prepararon pesando 2 g de peso fresco de carne (libre de tejidos placentarios y semillas) cortada finamente en trozos de 3×3 mm se transfirieron inmediatamente a un vial sellado de 20 mL. El tiempo transcurrido entre la preparación de las submuestras y la extracción de volátiles fue inferior a 5 minutos. Las submuestras de tejidos placentarios se prepararon también con 2 g de placenta y semillas de diferentes frutos de la muestra correspondiente y siguieron el mismo protocolo de preparación descrito para el pericarpio. Solo en el caso de *BlockyR1×AjiD*, *BlockyR2×Serrano* y *BlockyR2×AjiD* no fue posible separar adecuadamente la placenta/semillas del pericarpio para obtener muestras útiles (debido al tamaño reducido de la placenta en los frutos, el contacto cercano con el pericarpio y la distribución compleja de los tejidos placentarios) y, por lo tanto, la fracción volátil solo se estudió en el pericarpio en estos híbridos.

### 3.1.1.3.- Extracción de la fracción volátil

Se utilizó la técnica de microextracción en fase sólida-espacio en cabeza (HS-SPME, i.e. head space-solid phase microextraction) para aislar los compuestos volátiles, siguiendo un protocolo adaptado de Rodríguez-Burruezo *et al.* (2010b) y Kollmannsberger *et al.* (2011). La preincubación de viales de espacio en cabeza se realizó a 40 °C durante 30 minutos. Este método de extracción, realizada a temperaturas

## Fase experimental, resultados y discusión

más bajas que otros métodos, combinado con la SPME sin solvente, previene los artefactos térmicos y proporciona una composición volátil más realista. Se usó una fibra SPME de 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR/PDMS (divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano, Supelco, Bellefonte, PA, EE.UU.) para realizar la extracción en el espacio en cabeza. La fracción liberada en el espacio en cabeza fue adsorbida con la fibra SPME durante 40 minutos, también a 40 °C. La fibra se desorbió térmicamente a 250 °C durante 30 s (modo splitless) en el puerto del cromatógrafo de gases (GC). Para asegurar que no hubiera contaminación cruzada de muestras anteriores, la fibra SPME siempre se reacondicionaba durante 30 minutos a 250 °C en el puerto de inyección de otro GC.

### 3.1.1.4.- Análisis de volátiles

La fracción volátil se analizó por cromatografía de gases-espectrometría de masas, usando un equipo GC-MS Agilent Network 6890 con inyector automático acoplado a un detector selectivo de masa inerte Agilent 5973 (Agilent, Santa Clara, CA, EE.UU.). La fracción volátil se inyectó en una columna capilar de sílice HP-5MS J&W (30 m de longitud, 0.25  $\mu\text{m}$  de espesor y 0.25 mm de diámetro interno), utilizando 95% de dimetilpolisiloxano y 5% de fenilo como fase estacionaria. La temperatura de la columna varió de 100 °C a 250 °C a una velocidad de 5 °C  $\text{min}^{-1}$ , manteniendo 250 °C durante 10 minutos al final de cada ciclo según lo descrito por Rodríguez-Burruezo *et al.* (2010b) y Kollmannsberger *et al.* (2011). Se usó un flujo constante (1 mL  $\text{min}^{-1}$ ) de helio como gas portador y la línea de transferencia se mantuvo a 220 °C. El modo de impacto de electrones (EI) a 70 eV de energía de ionización a 225 °C de temperatura de fuente, se utilizó para la detección a través del espectrómetro de masas. La adquisición se realizó en modo de exploración (rango de masa  $m/z$  35-350 amu). Los cromatogramas y los espectros de masas se procesaron mediante MSD Chemstation D.02.00.275 (Agilent Technologies).

Cada compuesto se identificó comparando sus tiempos de retención en cromatograma y sus espectros de masas con los de la biblioteca NIST 2005 Mass Spectral, y con los tiempos de retención observados previamente (datos no mostrados) y también con nuestra biblioteca personalizada de espectros de masas, basada en los espectros de compuestos disponibles comercialmente. Los compuestos disponibles comercialmente se adquirieron de Sigma-Aldrich Química (Madrid, España). Cuando los estándares comerciales no estaban disponibles, la identificación de los compuestos

se realizó tentativamente en base a la comparación entre sus espectros de masas con los de la biblioteca NIST 2005 Mass Spectral.

La cuantificación se basó en la integración del área de pico de cada compuesto, directamente integrada por TIC (cromatograma total de iones) como se ha descrito en trabajos previos sobre frutos *Capsicum* (Kollmannsberger *et al.*, 2011; Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2010b). En los pocos casos en los que se encontraron picos demasiados pequeños o parcialmente superpuestos, la integración se obtuvo del cromatograma de iones extraído en función de sus iones característicos.

### 3.1.1.5.- Análisis de datos

Se realizó un Análisis de la Varianza de efectos fijos (ANOVA) para los datos de áreas de pico integrados de GC en todas las accesiones, es decir, cinco datos por combinación de accesión y tejido del fruto: pericarpio de fruto (n=5) y tejidos placentarios (n=5), para un total de 175 análisis GC-MS. La prueba de Newman-Keuls (trazas no consideradas) se utilizó para detectar diferencias significativas entre las medias de las accesiones (nivel de significancia  $P < 0.05$ ) para volátiles totales y volátiles individuales. Para estos análisis estadísticos se utilizó el software Statgraphics Centurion XVII (StatGraphics Technologies, The Plains, VA, EE.UU).

Finalmente, para obtener una comparación ilustrativa de los perfiles de volátiles tanto en accesiones parentales como híbridas en los diferentes tejidos frutales, se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) y un Análisis de Clúster Jerárquico. Se aplicó la “unit variance scaling” para datos normalizados y centrados para el PCA, utilizando el software Statgraphics Centurion XVII. El análisis jerárquico de clúster se realizó en base a medidas de distancia de las correlaciones de Pearson, utilizando la herramienta ClustVis (Metsalu y Vilo, 2015 ).

### 3.1.2.- Resultados y discusión

Se detectaron 36 compuestos volátiles en las accesiones e híbridos evaluados (Tabla 4), la mayoría de ellos correspondientes a terpenoides, ésteres y alcanos, así como una mezcla de diversos compuestos. Los terpenoides (principalmente sesquiterpenos no oxigenados) fueron el grupo más importante, de acuerdo con nuestros trabajos anteriores (Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2010b). También se encontraron varios

## Fase experimental, resultados y discusión

alcanos y ésteres, en su mayoría relacionados con sabores afrutados (Kollmannsberger *et al.*, 2011; Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2010b) (Tabla 4). Finalmente, la mezcla de otros compuestos incluía una gama de cualidades aromáticas, desde el fuerte aroma sulfuroso de la pirazina del pimiento (3-isobutil-2-metoxipirazina), hasta las notas dulces/afrutadas/ligeramente grasas de los alcoholes o las notas balsámicas del salicilato de metilo (Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2010b).

Tabla 4. Lista de volátiles identificados en el experimento con su correspondiente abreviatura, índice de retención (IR) y método de identificación (Id).

Compuesto volátil	Abreviatura	IR	Id <sup>1</sup>
<i>Terpenoides</i>			
3-Careno	T1	948	R
Ciclosativeno	T2	1125	R
$\alpha$ -Copaeno	T3	1221	R
$\beta$ -Cubebeno	T4	1339	MS
Allo-aromadendreno	T5	1386	MS
$\beta$ -Elemeno	T6	1398	MS
$\alpha$ -Longipineno	T7	1403	R
$\alpha$ -Muuroleno	T8	1440	MS
$\beta$ -Selineno	T9	1469	MS
$\delta$ -Cadineno	T10	1469	MS
Valenceno	T11	1474	R
$\alpha$ -Himachaleno	T12	1494	MS
$\beta$ -Chamigreno	T13	1507	R
$\beta$ -Himachaleno	T14	1528	MS
Longipinocarvono	T15	1569	MS
<i>Esteres</i>			
2-Metilpropanoato de hexilo	E1	1118	R
4-Metilpentanoato de pentilo	E2	1118	R
2,2-Dimetilpropanoato de hexilo	E3	1197	R
2-Metilbutanoato de hexilo	E4	1218	R
4-Hexen-1-il-pentanoato	E5	1290	R
<i>Alcanos</i>			
Tetradecano	A1	1413	R
3-Metiltetradecano	A2	1448	MS
4-Metiltetradecano	A3	1448	MS
Decilciclopentano	A4	1555	MS
Ciclotetradecano	A5	1679	MS
Ciclopentadecano	A6	1799	MS
Nonadecano	A7	1910	R
10-Metilnonadecano	A8	1945	MS
Eicosano	A9	2009	R
8-Hexilpentadecano	A10	2045	MS
<i>Otros/Miscelánea</i>			
Indol	O1	1174	R
3-Isobutil-2-metoxipirazina	O2	1204	R
Salicilato de metilo	O3	1281	R
$\alpha$ -Ionona	O4	1429	R
(E)-2-hexadecen-1-ol	O5	1862	MS
(Z)-9-octadecen-1-ol	O6	2061	R

<sup>1</sup>R = identificado mediante la comparación de su espectro de masas e IR con compuestos de referencia auténticos, MS = identificado tentativamente sobre la base de su espectro de masa e IR con los de la Biblioteca NIST MS y literatura.

### 3.1.2.1.- Fracción volátil en el pericarpio

#### 3.1.2.1.1.- Accesiones parentales

La composición volátil del pericarpio del fruto fue muy diversa entre las accesiones parentales que fueron bastante diferentes, tanto para los volátiles totales como para el número de compuestos volátiles (Tabla 5). El contenido total más alto en volátiles se encontró en *Chile de Árbol*, seguido de *Guindilla* (sin. *Cayenne*), *Pasilla Bajío*, *Serrano* y *PI-152225*, y, aparte de *Pasilla*, estas accesiones también mostraron los perfiles más diversos de volátiles (Tabla 5). Por el contrario, el resto de las accesiones mostraron muy bajos niveles de volátiles totales y diversidad de volátiles, particularmente los pimientos gruesos de *tipo California* (i.e. *blocky*) y *Piquillo* (Tabla 5). Estos hallazgos sugieren que el contenido total de volátiles está altamente correlacionado con la intensidad total del aroma de estas accesiones (Tabla 3).

Además, en muchas accesiones el contenido total de volátiles se debió principalmente a la acumulación de uno o dos volátiles (particularmente terpenoides), mientras que otras accesiones mostraron perfiles más equilibrados. Por lo tanto, el valenceno representaba aproximadamente el 85 % de los volátiles en *Chile de Árbol*, mientras que el resto de los compuestos aparecían a  $\leq 4\%$  del total de los volátiles. De manera similar, el 3-careno representó aproximadamente el 95 % de los volátiles totales en *Pasilla* y, en menor medida, el 3-careno y valenceno en *Guindilla* y el 3-careno en *PI-152225* alcanzaron casi el 60 % de los volátiles totales (Tabla 5). Por el contrario, la abundancia relativa de los volátiles individuales se distribuyó de manera más equilibrada en accesiones como *Guindilla*, *PI-152225* o *Chile Serrano*. Estos hallazgos sugieren que los niveles altos de volátiles totales en los pimientos no están necesariamente correlacionados con una fracción volátil cualitativamente compleja, independientemente del tipo de compuesto volátil, como se observó por Rodríguez-Burruezo *et al.* (2010b). Con respecto a los volátiles individuales, *Chile de Árbol* y *Guindilla* mostraron patrones complejos y niveles notables de terpenoides, seguidos por *Chile Serrano*, *PI-152225* y *Ají Dulce*, que también tenían perfiles diversos de terpenoides pero con contenidos más bajos (Tabla 5). Finalmente, el resto de las accesiones mostraron un número muy bajo de terpenoides ( $\leq 5$ ) (Tabla 5). En general, 3-careno (descripción aromática típica terpénica, i.e. penetrante dulce terroso/pino),  $\alpha$ -copaeno (madera penetrante),  $\alpha$ -muuroleno (madera) y  $\beta$ -himachaleno fueron los

terpenoides más comunes y abundantes, aunque su importancia relativa dependía de la accesión. 3-careno alcanzó valores relativamente altos en la mayoría de las accesiones, particularmente en *Pasilla Bajío* y *PI-152225*, así como en valenceno (aroma cítrico/afutado), particularmente en *Guindilla*, *Chile de Árbol* o *Chile Serrano* (Tabla 5). El contenido de  $\alpha$ -muuroleno fue mucho mayor en *Serrano Criollo* y en *C. chinense Aji Dulce* en comparación con otras accesiones, y  $\alpha$ -copaeno fue sólo relevante en *Chile de Árbol*, *Pasilla Bajío* y *Aji Dulce*. Además, el valenceno sólo se encontró en cuatro accesiones, aunque a niveles muy altos en *Chile de Árbol*, *Guindilla* y *Chile Serrano*, lo que sugiere que la relevancia de este compuesto en la fracción volátil es compartida por los tipos Cayenne, de tamaño pequeño/mediano y carne fina filogenéticamente cercanas (Pereira-Días *et al.*, 2019). Por el contrario, a pesar de ser común en la mayoría de las accesiones, el  $\alpha$ -longipineno se encontró a niveles muy bajos (Tabla 5). Finalmente, la contribución del resto de terpenoides a la fracción volátil fue mucho menor, tanto cuantitativa como cualitativamente.

Los ésteres, que generalmente aparecen en niveles bajos en los pimientos y proporcionan notas afrutadas de aroma dulce, solo se encontraron en dos de las accesiones de *C. annuum* y en las dos accesiones de *C. chinense*. Su contribución a la fracción volátil fue notable en los frutos de *C. chinense* (20-25% de volátiles totales), aunque *PI-152225* mostró el perfil de ésteres más complejo, siendo el 4-metilpentanoato de pentilo y el 2-metilbutanoato de hexilo los más relevantes (Tabla 5). En comparación, las accesiones de *C. annuum*, por ejemplo, *Guindilla* y *Chile Serrano*, mostraron contenidos muy bajos (<1% de volátiles totales) y solo un éster cada una, 2,2-dimetilpropanoato de hexilo y 2-metilpropanoato de hexilo, respectivamente (Tabla 5). Estos resultados coinciden con otros estudios que incluso llaman pimientos aromáticos (i.e. scented peppers) a los frutos de *C. chinense*, debido a su alto contenido en ésteres frutales, así como a algunos tipos de cayenas y guindillas, ricos en ésteres dentro de *C. annuum* (Pino *et al.*, 2007; Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2010b).

*Chile Serrano* y *Guindilla* mostraron los niveles más altos de alcanos, aunque el patrón más diverso se encontró en *PI-152225*. Los alcanos más abundantes fueron nonadecano y eicosano (presentes en todas las accesiones parentales), seguidos de 10-metilnonadecano y 8-hexilpentadecano (que se encuentra en la mayoría de los padres) (Tabla 5). Se cree que estos hidrocarburos alifáticos están relacionados con la biosíntesis de capsaicinoides, y de hecho fueron particularmente abundantes en los genotipos más picantes (mencionados anteriormente), aunque su contribución al sabor y

Fase experimental, resultados y discusión

Tabla 5. Compuestos individuales y sus unidades promedio de área de pico de GC ( $\times 10^6$ ) identificadas en el pericarpio del fruto de las accesiones e híbridos de *Capsicum* estudiados

Compuesto	<i>C. annuum</i>				<i>C. chinense</i>				<i>C. annuum</i> x <i>C. annuum</i>				<i>C. annuum</i> x <i>C. chinense</i>						
	BlockyR1	BlockyR2	Piquillo	Arbol	Guindilla	Pasilla	Serrano	SerrCrio	152225	AjiD	BlockyR1 xSerrCrio	BlockyR2 xSerrCrio	Piquillo xPasilla	Piquillo xSerrano	Arbol xSerrano	Guindilla xSerrano	BlockyR1 x152225	BlockyR1 xAjiD	BlockyR2 xAjiD
<i>Tervenoides</i>																			
T1	--	2.75a <sup>1</sup>	--	--	36.50c	188.38e	2.29a	6.94a	99.45d	4.58a	14.44b	--	--	--	--	--	--	1.67a	20.98b
T2	--	--	--	--	4.04b	0.53a	--	--	--	--	1.08ab	--	1.37	--	--	--	tr	--	--
T3	0.96a	0.44a	1.76a	6.53b	--	7.12b	1.88a	--	--	8.13b	4.33ab	0.57a	2.25a	3.75ab	4.30ab	6.18b	0.62a	9.96b	112.29c
T5	--	--	--	2.41bc	0.98ab	--	0.68ab	--	--	--	--	--	--	0.40a	2.07b	3.34c	0.01a	--	--
T6	--	--	--	--	2.00b	--	--	--	0.42a	--	0.30a	0.30a	0.04a	0.21a	--	5.40c	--	--	--
T7	--	tr <sup>2</sup>	--	0.26ab	0.54b	--	0.06a	0.04a	tr	0.13a	3.05c	0.03a	tr	0.04a	0.16a	0.20a	--	0.67b	tr
T8	--	0.25a	--	tr	2.43b	0.18a	tr	9.74c	--	5.55bc	23.62d	8.49c	--	tr	tr	tr	--	21.32d	164.00e
T9	0.17a	--	--	--	0.41a	--	--	--	--	--	--	--	0.02a	--	--	--	--	--	--
T10	0.04a	--	0.01a	0.12a	--	--	--	--	0.83a	5.19b	--	--	--	--	0.11a	--	--	7.63b	18.42c
T11	--	0.06a	--	205.86e	82.62c	--	68.65c	--	--	--	1.66a	tr	0.05a	33.19b	182.01d	285.88e	--	--	34.60b
T12	--	--	--	3.12c	1.39b	--	0.82ab	0.02a	1.08b	--	--	--	--	0.56ab	2.70c	3.31c	0.01a	--	--
T13	--	--	--	tr	--	--	--	--	3.60b	0.10a	8.32c	--	--	tr	tr	tr	--	--	118.80d
T14	--	--	--	7.08c	5.01bc	--	12.21d	--	0.55a	5.28bc	3.53b	0.24a	--	1.43ab	6.73c	8.13c	--	8.78c	53.32e
T15	--	--	--	--	--	0.09a	--	0.03a	0.86ab	--	0.19a	--	0.05a	--	--	0.81ab	--	1.61b	8.49c
Terp. totales	1.17a	3.50a	1.77a	225.38h	135.92g	196.3h	86.59f	16.77c	106.79fg	28.96cd	60.50e	9.63b	3.78a	39.58d	198.1h	313.25i	0.64a	51.64e	530.9j
<i>Ésteres</i>																			
E1	--	--	--	--	--	--	0.41a	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
E2	--	--	--	--	--	--	--	--	16.57b	14.06b	0.37a	--	--	--	--	--	--	1.07a	57.68c
E3	--	--	--	--	1.90a	--	--	--	5.84b	--	0.60a	--	--	0.62a	--	28.03c	--	--	39.23d
E4	--	--	--	--	--	--	--	--	10.15b	--	--	--	--	--	--	1.48a	--	1.25a	29.00c
E5	--	--	--	--	--	--	--	--	5.49a	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Ésteres totales	--	--	--	--	1.90a	--	0.41a	--	38.05c	14.06b	0.97a	--	--	0.62a	--	29.51c	--	2.32a	125.91d
<i>Alcanos</i>																			
A1	--	--	--	--	8.32c	1.09a	2.22b	--	8.79c	6.99c	1.04a	0.36a	0.40a	1.14a	--	6.42c	--	9.24cd	11.72d
A2	--	--	0.07a	1.51ab	2.53b	0.07a	--	--	1.66ab	0.20a	1.08ab	1.23ab	0.05a	1.00ab	5.21c	--	--	--	19.34d
A3	--	--	--	--	--	--	--	--	7.05a	--	--	--	--	4.89a	--	--	--	--	tr
A4	--	--	--	0.08a	--	--	0.20a	--	--	--	--	0.07a	--	--	0.60b	--	--	0.33ab	--
A5	--	--	--	0.13a	--	--	--	--	--	--	0.22a	0.27a	--	--	--	--	--	2.35b	15.88c
A6	--	--	--	--	14.78c	0.50a	--	--	7.58b	3.06ab	1.18a	--	0.31a	3.14ab	--	20.35d	--	40.50e	70.90f
A7	0.08a	0.03a	0.09a	0.28a	2.10b	tr	53.81e	0.26a	0.36a	0.29a	0.47a	0.45a	0.04a	0.48a	1.92b	7.09c	0.01a	8.20cd	10.68d
A8	0.16a	--	0.08a	8.63c	42.68e	1.19a	12.36d	3.44b	14.02d	--	5.37bc	7.05c	0.76a	6.46c	11.42d	41.92e	0.09a	63.96f	158.82g
A9	0.03a	0.01a	0.05a	0.31a	0.55a	0.03a	10.06d	0.19a	0.08a	0.53a	0.61a	0.63a	0.03a	0.28a	2.18b	3.19b	0.01a	5.70c	15.39e
A10	--	--	0.02a	0.44a	1.05ab	0.03a	4.79c	0.16a	0.49a	0.23a	0.69a	0.39a	0.05a	0.35a	1.90b	3.74bc	tr	4.47c	14.75d
Alcan. totales	0.27a	0.04a	0.31a	11.38c	72.01f	2.91ab	83.44f	4.05b	40.03e	11.30c	10.66c	10.45c	1.64ab	17.74d	23.23d	82.71f	0.11a	134.75g	317.48h
<i>Otros</i>																			
O1	--	0.23a	--	--	0.31a	1.75b	--	--	--	--	--	0.12a	--	--	--	--	--	--	--
O2	--	--	--	0.04a	--	--	--	0.12a	--	--	1.59b	tr	--	0.51ab	0.12a	tr	0.12a	--	1.14b
O3	0.02a	0.02a	--	--	--	--	0.59a	6.28c	--	1.60ab	--	3.11b	--	--	5.43c	tr	0.31a	2.94b	10.63d
O4	--	--	--	--	tr	--	--	tr	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
O5	--	--	--	3.18a	--	--	--	--	--	--	--	1.89a	--	--	9.53b	--	--	--	--
O6	--	--	--	0.28a	0.23a	--	1.07b	0.06a	1.15b	--	0.41a	0.55ab	0.02a	0.11a	1.73b	1.78b	0.01a	1.40b	6.23c
Volátiles totales	1.46a	3.79a	2.08a	242.34e	210.37e	200.96de	172.1d	27.28b	186.02d	55.92bc	74.13c	25.75b	5.44a	58.56bc	237.91e	427.25f	1.19a	193.05d	992.29g

<sup>1</sup> Valores medias con letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre genotipos para el volátil correspondiente para una probabilidad P<0.05 según la prueba de Newman-Keuls. <sup>2</sup> tr indica trazas (<0.01x10<sup>6</sup> unidades de área de pico de GC)

aroma es muy baja o nula (Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2010b). El salicilato de metilo, un volátil activo con un aroma muy peculiar distintivo, con notas tanto verdes como dulces, generalmente presentes en muchos frutos con morfología de Guindilla o Cayena de *C. annuum* y particularmente *C. frutescens* (Morales-Soriano *et al.*, 2018; Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2010b), y (Z)-9-octadecen-1-ol se encontraron en cuatro accesiones de *C. annuum* y en las accesiones de *C. chinense*. Este hecho sugiere que ambos compuestos podrían ser intrínsecos a los linajes filogenéticamente cercanos de la cayena Guindilla y de los pimientos de fruto pequeño (Pereira-Días *et al.*, 2019; Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2010b). Además, los niveles bajos de otros compuestos menores como indol (aroma floral cuando está presente a niveles bajos), 3-isobutil-2-metoxipirazina (aroma penetrante azufrado de pimiento verde),  $\alpha$ -ionona (aroma floral) y (E)-2-hexadecen-1-ol, se encontraron en algunas líneas parentales de *C. annuum*, pero ninguna de ellos en *C. chinense*. Este hecho es bastante habitual cuando se compara *C. chinense* y *C. annuum*, y especialmente la pirazina del pimiento, cuyo aroma sulfuroso es muy común en la mayoría de las especies de *Capsicum* tanto en fruto inmaduro como maduro, pero generalmente está ausente en frutos maduros de *C. chinense* (Cuevas-Glory *et al.*, 2015; Morales-Soriano *et al.*, 2018; Pino *et al.*, 2007; Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2010b).

En general, de acuerdo con sus perfiles volátiles, las cualidades aromáticas afrutadas, dulces y exóticas de las accesiones de *C. chinense* se deben a su relativa abundancia en ésteres, responsables de estas notas de aroma en los frutos, y al bajo o nulo contenido de volátiles relacionados con aromas verdes, herbáceos y/o azufrados como la 3-isobutil-2-metoxipirazina y el salicilato de metilo en el caso de *PI-152225*, como se describió en otros trabajos, incluida esta especie (Pino *et al.*, 2007; Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2010b). Además, el nivel más alto en volátiles y ésteres totales de *PI-152225* en comparación con *Ají Dulce* podría estar relacionado con su mayor intensidad aromática.

En comparación, los pimientos *C. annuum* mostraron diferentes perfiles de composición volátil, lo que está relacionado con su diversidad aromática (Tabla 3). Por lo tanto, el aroma predominante de pimiento (a baja intensidad) de pimientos gruesos tipo *California* se debe a sus fracciones volátiles cuantitativa y cualitativamente menos abundantes, donde el salicilato de metilo y el indol (solo en *BlockyR2*), con notas de aroma verde y/o fenólico, y unos pocos terpenoides son predominantes. Por el contrario, las mezclas de intenso aroma a pimiento verde de *Chile de Árbol* y *Pasilla* (Tabla 3), se

deberían a la combinación de altos niveles en terpenoides (principalmente valenceno en *Chile de Árbol* y 3-careno en *Pasilla*), algunos de ellos con notas afrutadas y falta de ésteres en ambas accesiones, así como la presencia de 3-isobutil-2-metoxipirazina (sulfuroso picante) y varios alcoholes en *Chile de Árbol*. Por el contrario, el intenso aroma verde afrutado con notas de pimiento de la *Guindilla* podría deberse a niveles comparativamente más altos de valenceno que el 3-carene, así como a la presencia del éster 2,2-dimetilpropanoato de hexilo. Finalmente, el intenso aroma herbáceo y a pimiento verde en ambos chiles serranos se debería a sus niveles de salicilato de metilo y a niveles relativamente moderados en terpenoides, mientras que el 2-metilpropanoato de hexilo y los altos niveles de valenceno contribuirían a las notas cítricas frutales del *Chile Serrano* y la presencia de 3-isobutil-2-metoxipirazina contribuiría a las notas terrosas azufradas de *Serrano Criollo*. Las diferencias en la intensidad del aroma de los chiles serranos podrían deberse a sus diferencias en volátiles totales (Tabla 5).

#### 3.1.2.1.2.- Accesiones híbridas

Los híbridos mostraron perfiles de volátiles más complejos que sus accesiones parentales correspondientes (Tabla 5). Por ejemplo, el híbrido interespecífico *BlockyR2*×*AjiD* mostró 24 compuestos, mientras que sus padres correspondientes solo mostraron 9 y 15 volátiles, respectivamente. De hecho, solo los híbridos *Arbol*×*Serrano*, *Cayenne*×*Serrano* y *BlockyR1*×*152225* mostraron una cantidad de volátiles similares o inferiores a los del mejor progenitor correspondiente (Tabla 5). En vista de estos resultados, las hibridaciones intra e interespecíficas aparecen como una estrategia de mejora útil para mejorar cualitativamente la fracción volátil de los pimientos *Capsicum*.

Cuantitativamente, el contenido en volátiles totales de *BlockyR2*×*SerrCrio*, *Piquillo*×*Pasilla*, *Piquillo*×*Serrano*, *Arbol*×*Serrano* y *BlockyR1*×*152225* estaba comprendido entre los niveles de los padres correspondientes, lo que sugiere una herencia intermedia para este rasgo, mientras que otros híbridos excedieron el rango observado en los padres, lo que sugiere una herencia transgresiva: *BlockyR1*×*SerrCrio* (3 veces superior al mejor parental), *Guindilla*×*Serrano* (2 veces), *BlockyR1*×*AjiD* (3-4 veces) y *BlockyR2*×*AjiD* (>17 veces) (Tabla 5).

Considerando los compuestos individuales, la mayoría de los volátiles encontrados en los híbridos también estuvieron presentes en al menos uno de los

correspondientes parentales (Tabla 5), confirmando el efecto primario observado en otras hortícolas como el pepino dulce o el pimiento verde (Bosland y Votava, 2000). La aparición de herencia intermedia y transgresiva fue variable, principalmente dependiendo de la combinación híbrida, en lugar de la volatilidad específica. Por lo tanto, la herencia transgresiva era predominante en los volátiles de híbridos como *BlockyR2*×*AjiD* (niveles transgresivos notables de  $\alpha$ -muuroleno,  $\beta$ -chamigreno,  $\alpha$ -copaeno, ciclopentadecano o salicilato de metilo), *BlockyR1*×*AjiD* y *BlockyR1*×*SerrCrio* mientras que otros híbridos como *Piquilo*×*Pasilla*, *Piquillo*×*Serrano* y *Arbol*×*Serrano* mostraron una herencia intermedia en la mayoría de los compuestos (Tabla 5). Finalmente, algunos híbridos como *BlockyR2*×*SerCrio* o *Guindilla*×*Serrano* mostraron un número similar de casos de herencia intermedia y transgresiva. En comparación, la herencia intermedia era predominante en otros trabajos realizados en hojas de cítricos, *Prunus* o pepino dulce (Gancel *et al.*, 2003; Gancel *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 1993; Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2004). Probablemente, la naturaleza genética de esos materiales, es decir, el uso de clones híbridos, seleccionados en la segregación de descendientes de cruces entre padres clonales (altamente heterocigotos), limita el conjunto de genes subyacentes evaluados y puede explicar tales diferencias con nuestros híbridos *Capsicum*, obtenidos de cruces entre líneas parentales genéticamente diversas.

Además, se encontró un alto número de compuestos *de novo* (i.e. presentes en el híbrido pero ausentes en ambos padres) en algunos híbridos, particularmente *BlockyR1*×*SerrCrio* (la mitad de los volátiles) y en menor medida *BlockyR1*×*AjiD* y *BlockyR2*×*AjiD* (Tabla 5), lo que sugiere la presencia de fenómenos de aparición de complementación genética en este atributo (Orzáez y Granell, 2009; Pinheiro *et al.*, 2019; Rothan *et al.*, 2019). En este sentido, aunque la herencia transgresiva o la complementación genética es más habitual en caracteres relacionados con el vigor (por ejemplo, rendimiento, desarrollo de la planta, vigor y altura, tamaño de fruto, precocidad) (Goulet *et al.*, 2017), la fracción volátil implica un metabolismo muy complejo que depende de muchas rutas diferentes, controladas y reguladas por un gran número de genes y sus interacciones (Orzáez y Granell, 2009; Rambla *et al.*, 2014; Rothan *et al.*, 2019). Por lo tanto, en general, las combinaciones genotípicas obtenidas en híbridos de padres complementarios podrían dar lugar a una confluencia más favorable de factores genéticos, ofreciendo perfiles volátiles más complejos y abundantes, como se observa en este trabajo.

En general, nuestros resultados en el pericarpio sugieren que la hibridación es útil para combinar perfiles volátiles complementarios, ya que este procedimiento aumenta en la mayoría de los casos el contenido total en volátiles, así como el número de volátiles en comparación con las accesiones parentales, debido a la confluencia de volátiles de ambos padres, así como la presencia de algunos compuestos *de novo*. Además, la mayoría de los volátiles aparecen en niveles similares a los parentales o transgresivos. Por lo tanto, los mejoradores tienen la oportunidad de mejorar este atributo de calidad organoléptica, planificando combinaciones de padres complementarios para volátiles deseables y, más tarde, realizar una selección final de aquellos híbridos con el mejor aroma y flavor, basada en pruebas de panel organoléptico.

Por ejemplo, se pueden planificar cruces como *Guindilla* × *Serrano* en la búsqueda de nuevos tipos de Guindillas o Cayenas con combinaciones más intensas de aromas verdes y afrutados, ya que este híbrido combina: i) mayor número de terpenoides que los padres y generalmente a mayores niveles, es decir, aumento esperado de aromas a madera y particularmente el aroma cítrico de valenceno (4-5 veces el nivel de los padres), ii) aumento notable de ésteres frutales, particularmente 2,2-dimetilpropanoato de hexilo (14 veces los valores del parental *Guindilla*) y iii) la combinación de trazas de 3-isobutil-2-metoxipirazina (aroma a pimiento verde sulfuroso) y salicilato de metilo (aroma verde afrutado), no presente en los padres (Tabla 5). Los mejoradores también pueden explorar la oportunidad de mejorar el aroma y el flavor de las variedades modernas Numex o Jalapeño, cruzando líneas de mejora modernas con variedades locales antiguas de estos tipos varietales, que de acuerdo a diversos autores conservan aromas azufrados de pimiento verde más intensos y atractivos para este nicho de mercado (DeWitt y Bosland, 2009). Incluso los cruces entre pimientos tipo California y pimientos de *C. chinense* se podrían usar para lograr materiales de premejora dirigidos a introducir el aroma exótico más afrutado (i.e. predominancia aromática de ésteres) de *C. chinense* en los primeros. Sin embargo, este tipo de híbridos interespecíficos deben abordarse con cierta cautela, debido a la apariencia de esterilidad y translocaciones cromosómicas, y se debería planificar y trabajar con varias combinaciones para seleccionar los materiales más factibles.

## Fase experimental, resultados y discusión

### 3.1.2.2.- Fracción volátil en los tejidos placentarios

#### 3.1.2.2.1.- Accesiones parentales

Los resultados en tejidos placentarios son bastante similares a los encontrados en el pericarpio. Por lo tanto, valores altos totales de la fracción volátil no siempre estuvieron relacionados con perfiles diversos. Comparativamente, *PI-152225* y *Guindilla*, y en menor medida, los dos *Serranos*, mostraron nuevamente los valores más altos para volátiles totales y los perfiles más complejos, y *Chile de Árbol* y *Pasilla Bajío*, dos accesiones con volátiles totales considerablemente más bajos, también mostraron perfiles diversos (Tabla 6). Finalmente, *Ají Dulce* mostró volátiles totales intermedios y baja diversidad, mientras que otros como los pimientos gruesos *California* y el *Piquillo* mostraron los contenidos más bajos y los perfiles volátiles menos diversos (Tabla 6).

En general, los terpenoides más comunes y abundantes en los tejidos placentarios fueron 3-careno,  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -muuroleno, valenceno y  $\beta$ -himachaleno.  $\alpha$ -longipineno,  $\alpha$ -himachaleno y longipinocarvone aparecieron en muchas accesiones, pero a niveles bajos. Finalmente, el  $\delta$ -cadineno y el  $\beta$ -elemeno alcanzaron niveles notables en *Ají Dulce* y *Guindilla*, respectivamente, mientras el resto de los terpenoides mostraron menores contenidos o trazas (Tabla 6). Los niveles más altos correspondieron al valenceno en *Chile Serrano*, *Guindilla*, *PI-152225* y *Chile de Árbol*, y el  $\alpha$ -muuroleno también alcanzó niveles altos en *Serrano Criollo* (Tabla 6). Como se observó en el pericarpio del fruto, encontramos muchas accesiones donde el contenido de terpenoides se debió principalmente a un compuesto. Por lo tanto, el valenceno contribuyó al 80-95% del total de terpenoides en *Chile de Árbol*, *Guindilla*, *Chile Serrano* y *PI-152225* y lo mismo para 3-careno en los pimientos *California* o  $\alpha$ -muuroleno en *Serrano Criollo*, mientras que *Ají Dulce* mostró una distribución más equilibrada (Tabla 6).

La contribución cualitativa y cuantitativa de los ésteres fue considerablemente menor que los terpenoides. Sin embargo, su aparición fue comparativamente mayor en estos tejidos placentarios que en el pericarpio. Así, nuevamente *C. chinense PI-152225* mostró un perfil abundante y diverso, pero también otras accesiones de *C. annuum* como *Guindilla* y *Serrano Criollo* incluyeron varios ésteres en su composición en niveles notables (Tabla 6). Finalmente, *Pasilla Bajío*, *Chile Serrano* y *Ají Dulce*

también mostraron algunos ésteres, aunque solo estos últimos alcanzaron niveles considerables (Tabla 6). El 2,2-dimetilpropanoato de hexilo fue el éster más común y abundante, seguido de altos niveles de 4-metilpentanoato de pentilo y 4-hexen-1-ilpentanoato. Estos hallazgos sugieren que los tejidos placentarios de los pimientos pueden tener notas frutales más intensas que las percibidas en sus pericarpios, y pueden explicar por qué las salsas y pastas formuladas con semillas y placenta tienen sabores más picantes y atractivos (DeWitt y Bosland, 2009; Morales-Soriano *et al.*, 2018; Olguín-Rojas *et al.*, 2019; Patel *et al.*, 2016;).

El perfil en alcanos de la mayoría de los padres fue complejo y abundante en los tejidos placentarios, particularmente en los pimientos picantes: *Chile de Árbol*, *Guindilla*, *Pasilla Bajío*, *Chile Serrano* y *PI-152225* (Tabla 6). Como se encontró en el pericarpio, eicosano, nonadecano, tetradecano, 10-metilnonadecano y 8-hexilpentadecano fueron nuevamente los alcanos más comunes, y ciclopentadecano también fue relevante en *PI-152225* y *Serrano*. Finalmente, entre el resto de volátiles (Z)-9-octadecen-1-ol estuvo presente en todas las accesiones, con la única excepción de los pimientos *California* y *Piquillo*, mientras que el resto de los compuestos de este grupo fueron relativamente raros, y solo (E)-2-hexadecen-1-ol estuvo presente a niveles destacados en la *Guindilla*. Además, la pirazina del pimiento, uno de los volátiles más comunes en este cultivo, solo apareció en la placenta de los chiles serranos y a niveles muy bajos, e incluso el salicilato de metilo estuvo ausente en esta parte del fruto, en contraste con los resultados observados en el pericarpio (Tabla 6), lo que sugiere que esta parte del fruto puede tener notas sulfurosas de pimiento verde más bajas o nulas en la mayoría de los genotipos.

#### 3.1.2.2.2.- Accesiones híbridas

La composición volátil en los tejidos placentarios de los híbridos estudiados mostró similitudes, pero también diferencias con los resultados observados en el pericarpio. A diferencia del pericarpio, el número de volátiles detectados en los híbridos osciló entre 18 y 23, mientras que los padres mostraron un rango similar (10 a 24) y muchos de ellos  $\geq 18$  volátiles (Tabla 6). Además, la mitad de los híbridos (*Piquillo* × *Pasilla*, *Piquillo* × *Serrano* y *Guindilla* × *Serrano*) mostraron un número de volátiles cercanos a su mejor parental, pero no superior, i.e. comprendidos entre los de sus accesiones parentales correspondientes (Tabla 6). Por lo tanto, este aumento

## Fase experimental, resultados y discusión

cualitativo debido a la hibridación fue generalmente más bajo en los tejidos placentarios en comparación al pericarpio. Por otro lado, considerando volátiles totales, nuevamente se encontraron los dos modelos de herencia diferentes: i) híbridos con niveles intermedios en comparación con sus líneas parentales, es decir, *Piquillo*×*Pasilla*, *Piquillo*×*Serrano* y *BlockyRI*×*152225* y ii) híbridos transgresivos, como *Arbol*×*Serrano*, y otros como *BlockyRI*×*SerrCrio* y *Guindilla*×*Serrano* que mostraron 2-3 veces el contenido observado en el mejor padre (Tabla 6). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la hibridación proporciona en ambas partes del fruto una mejora notable en volátiles totales y un incremento cualitativo en la complejidad de la fracción volátil, aunque este aumento en la diversidad de volátiles parece ser menor en los tejidos placentarios.

Con respecto a la herencia de volátiles individuales, los perfiles de los híbridos fueron bastante diferentes de los observados en los parentales correspondientes debido a sus combinaciones genéticas. Como se encontró en el pericarpio, se detectaron diferentes casos de herencia intermedia o transgresiva y el modo de herencia difería mucho entre los híbridos. Además, también se encontraron muchos casos de volátiles no esperados, atribuibles a fenómenos de complementación genética (Tabla 6). Así, perfiles de volátiles con una ocurrencia similar de herencia transgresiva y herencia intermedia fue característica en híbridos como *Piquillo*×*Pasilla*, *Arbol*×*Serrano* y *Guindilla*×*Serrano*, mientras que otros híbridos como *Piquillo*×*Serrano* y *BlockyRI*×*152225* mostraron herencia intermedia en la mayoría de los volátiles, combinados con algunos casos volátiles *de novo* (Tabla 6). Finalmente, en *BlockyRI*×*SerrCrio* predominaban los casos de volátiles *de novo* o incluso la desaparición de otros compuestos menores (Tabla 6).

Fase experimental, resultados y discusión

Tabla 6. Compuestos individuales y sus áreas de pico promedio de GC ( $\times 10^6$ ) identificadas en los tejidos placentarios de las accesiones e híbridos de *Capsicum* estudiados.

Compuesto	<i>C. annum</i>					<i>C. chinense</i>					<i>C. annum</i> $\times$ <i>C. annum</i>				<i>C. annum</i> $\times$ <i>C. chinense</i>	
	BlockyR1	BlockyR2	Piquillo	Arbol	Guindilla	Pasilla	Serrano	SerrCrio	152225	AjiD	BlockyR1 $\times$ SerrCrio	Piquillo $\times$ Pasilla	Piquillo $\times$ Serrano	Arbol $\times$ Serrano	Guindilla $\times$ Serrano	BlockyR1 $\times$ 152225
<i>Terpenoides</i>																
T1	5.56b <sup>1</sup>	4.05b	8.13c	--	51.73g	37.50f	1.42a	15.84de	15.20de	11.98d	17.07e	--	2.03a	--	2.94a	--
T2	tr <sup>2</sup>	--	tr	--	--	0.29a	--	--	--	--	--	0.17a	--	--	--	--
T3	1.35ab	0.28a	0.47a	2.67b	--	2.78b	7.89c	5.95c	--	68.88f	14.38d	3.18b	8.50c	12.55d	25.28e	0.44a
T4	--	--	--	tr	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0.68	--	--
T5	--	--	--	1.29a	2.79ab	--	3.94b	--	--	--	--	--	3.53b	8.63c	15.87d	--
T6	--	--	--	--	27.14e	0.87a	--	--	3.21b	--	8.82d	1.95b	4.26c	--	21.39e	0.38a
T7	0.01a	--	--	0.11a	2.94c	0.04a	0.22a	0.83b	--	--	2.02c	tr	0.25a	0.42ab	0.78b	0.05a
T8	--	0.73a	--	tr	35.23d	tr	tr	301.91e	24.86c	37.82d	--	4.93b	--	--	--	22.25c
T9	0.01a	--	0.05a	0.31b	--	--	--	--	--	--	--	0.05a	--	--	--	--
T10	--	--	--	0.04a	0.27ab	--	--	--	4.24c	39.26d	--	--	--	0.33ab	0.68b	--
T11	0.17a	0.14a	--	110.69b	253.97cd	0.55a	404.62e	--	229.25c	--	1297.48g	0.08a	297.91d	730.40f	1311.56g	--
T12	--	--	--	1.93ab	3.69b	--	3.43b	1.20ab	9.48de	--	--	--	4.49c	8.72d	11.42e	0.11a
T13	--	--	--	tr	--	--	--	tr	--	0.89a	422.36b	tr	--	tr	--	--
T14	--	--	--	4.57ab	29.31e	tr	8.27bc	11.20c	56.55f	--	174.29g	1.65a	10.40c	22.26d	28.97e	--
T15	0.06a	0.02a	0.07a	--	--	0.46b	--	--	5.87d	--	2.59c	0.21ab	--	--	3.92c	0.05a
Terpen. Totales	7.16a	5.22a	8.72ab	121.61f	407.07i	42.49e	429.79i	336.93h	348.66h	158.83g	1516.65k	12.22b	331.43h	783.99j	1422.81k	23.28c
<i>Ésteres</i>																
E1	--	--	--	--	7.74b	--	--	37.03d	5.27b	--	--	--	--	1.22a	19.60c	3.83ab
E2	--	--	--	--	43.09b	--	--	--	149.47c	--	5.75a	--	--	8.85a	--	--
E3	--	--	--	--	117.49g	--	2.46b	144.19h	38.17e	52.22f	8.14c	--	0.98a	15.15d	142.80h	8.52c
E4	--	--	--	--	--	0.52a	--	--	99.01c	--	0.91a	--	--	--	10.66b	0.97a
E5	--	--	--	--	2.54c	0.03a	--	22.91d	49.46e	--	--	--	--	--	--	0.55b
Ésteres totales	--	--	--	--	170.86f	0.55a	2.46b	204.13f	341.38g	52.22e	14.8c	--	0.98a	25.22d	173.06f	13.87c
<i>Alcanos</i>																
A1	0.76a	0.40a	0.45a	0.83a	42.74f	3.37b	16.91d	3.11b	31.44e	--	3.19b	0.97a	6.48c	5.67c	43.58f	0.38a
A2	--	--	0.09a	4.55d	19.27f	0.86a	--	--	9.64e	2.33c	45.81g	--	--	24.75f	--	1.25b
A3	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	248.29a	--
A4	--	--	--	0.69b	1.31c	--	2.01d	0.86b	--	--	--	0.11a	1.13bc	3.19e	2.40d	tr
A5	--	--	--	--	6.49d	0.13a	1.03b	--	--	--	3.90c	0.11a	0.78ab	1.76b	--	--
A6	0.16a	--	--	4.30b	--	3.94b	64.53e	--	103.96f	--	33.51c	4.46b	--	42.59d	96.35f	3.22b
A7	0.12a	0.04a	0.08a	0.94a	15.91e	0.51a	75.66g	8.04c	3.34b	2.18b	7.44c	0.79a	7.56c	9.15d	30.92f	0.28a
A8	2.35b	0.09a	1.41a	8.25c	255.74g	13.98d	83.55f	85.63f	430.49i	--	321.72h	8.32c	57.01e	51.91e	272.00g	7.31c
A9	0.31a	0.03a	0.06a	1.85b	5.68c	0.27a	62.84g	6.05c	1.66b	4.30c	22.36f	0.80a	5.07c	8.64de	12.12e	0.39a
A10	0.07a	--	0.04a	1.13ab	8.10c	0.45a	36.74e	4.97b	2.84ab	2.26ab	14.58d	1.42ab	5.73b	8.70c	15.52d	0.41a
Alcanos totales	3.77b	0.56a	2.13b	22.54d	355.24h	23.51d	343.27h	108.66f	583.37j	11.07c	452.51i	16.98c	83.74e	156.36g	721.18k	13.24c
<i>Otros</i>																
O1	--	--	--	--	--	1.29a	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
O2	--	--	--	--	--	--	tr	0.33b	--	--	0.62c	--	0.03a	tr	--	0.22ab
O4	--	--	--	--	0.83b	--	--	--	--	--	--	tr	--	--	4.12c	0.07a
O5	--	0.07a	--	--	80.61b	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
O6	--	--	--	1.54b	4.18d	0.43a	7.46e	2.51c	19.84g	1.10ab	14.51f	1.33b	5.32de	6.76e	6.44e	0.84a
Volátiles totales	10.93b	5.85a	10.85b	145.69e	1018.79i	68.27d	782.98h	652.56h	1293.25j	223.22f	1999.09k	30.53c	421.5g	972.33i	2327.61j	51.52d

<sup>1</sup> Valores medias con letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre genotipos para el volátil correspondiente para una probabilidad P<0.05 según la prueba de Newman-Keuls. <sup>2</sup> tr indica trazas (<0.01x10<sup>6</sup> unidades de área de pico de GC)

### 3.1.2.3.- Acumulación comparativa de volátiles en tejidos de frutos

Salvo algunas excepciones, la comparación de las fracciones volátiles de ambos tejidos del fruto reveló dos aspectos fundamentales: i) dentro de cada accesión, la fracción volátil de la placenta mostraba generalmente niveles más altos que el pericarpio, tanto en volátiles totales como en la mayoría de los compuestos individuales, y ii) la riqueza cualitativa y cuantitativa en volátiles en el pericarpio coincidía habitualmente con la del tejido placentario, es decir, que los genotipos ricos en volátiles lo eran tanto en el pericarpio también como en la placenta, y análogamente en el caso de genotipos pobres en volátiles.

Así, las accesiones parentales con las fracciones volátiles más abundantes en el pericarpio, es decir, *Guindilla*, *Chile Serrano* o *PI-152225*, también mostraron un contenido notable y diversidad de volátiles en los tejidos placentarios, mientras que lo contrario se dio en los pimientos *tipo California* y *Piquillo*, que mostraron las composiciones volátiles más bajas y menos diversas en ambos tejidos (Tablas 5 y 6). Además, se encontró una tendencia similar en los híbridos, donde los híbridos con la composición volátil más diversa y abundante en los tejidos placentarios también se clasificaron entre los mejores híbridos en la composición del pericarpio, por ejemplo *Guindilla*×*Serrano* y *Arbol*×*Serrano* (Tablas 5 y 6).

Además, este efecto del tejido fue notable dentro de cada accesión parental e híbrido. Por ejemplo, la mayoría de las accesiones mostraron relaciones placenta/pericarpio >4 en volátiles totales, como el *California BlockyRI* y *Ají Dulce* (8 veces y 4 veces, respectivamente), *Serrano Criollo* (24 veces) o híbridos como *BlockyRI*×*SerrCrio* (27 veces) y *BlockyRI*×*152225* (40 veces) (Tablas 5 y 6). Estos resultados sugieren que la acumulación volátil es más pronunciada en las partes internas de los frutos, cerca del área de las semillas. A este respecto, se ha descrito un gradiente similar de composición del fruto en muchos volátiles y otros metabolitos en melocotones, melones, tomates o maracuyá entre otras especies aprovechadas por sus frutos (Adeyeye y Aremu, 2017; Aubert y Milhet, 2007; Moing *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2018) y sugieren un metabolismo más intenso de los volátiles en estos tejidos del pimiento. En este sentido, la ruta fenilpropanoide está involucrada en la producción de metabolitos secundarios que juegan un papel evolutivo importante en la protección de las semillas, como la acumulación de capsaicinoides en la placenta de los pimientos contra los mamíferos herbívoros y, de forma análoga, sería esperable un metabolismo

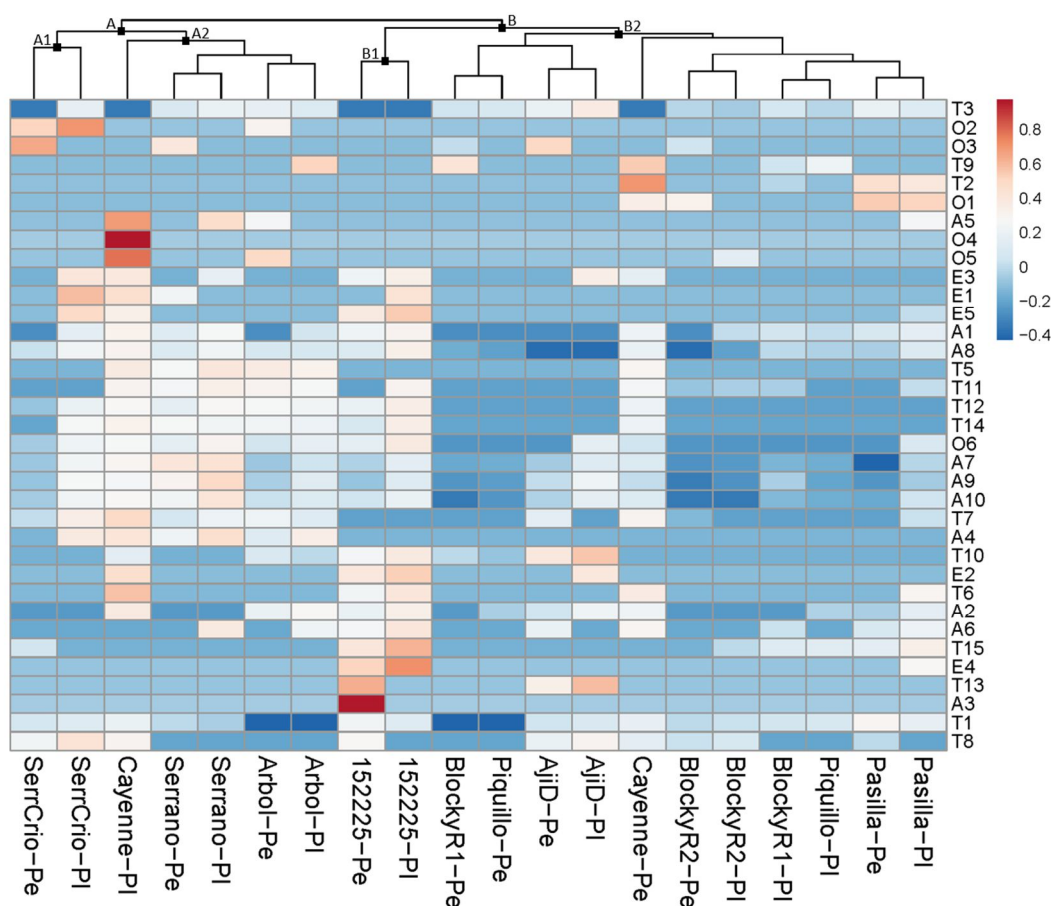
intenso y niveles altos de otros compuestos, como aquellos que contribuyen al sabor y al aroma (Antonio *et al.*, 2018; Bosland *et al.*, 2015; Dardick y Callahan, 2014; Olguín-Rojas *et al.*, 2019). De hecho, en este trabajo hemos encontrado que los alcanos, que se cree que están relacionados con la biosíntesis de capsaicinoides, se acumulan fundamentalmente en los tejidos placentarios y a niveles mucho más bajos o inexistentes en el pericarpio (Tablas 5 y 6). Además, esa riqueza en los tejidos placentarios debe ser considerada por aquellos procesadores alimentarios y mejoradores de pimientos que trabajan en la formulación y mejora de pastas y salsas con pungencia y sabor más intensos (ya que los capsaicinoides también se acumulan principalmente en estos tejidos).

El análisis de agrupamiento jerárquico ilustra estas diferencias y similitudes de las fracciones volátiles. Así, este análisis agrupó a las accesiones parentales en dos clusters principales: i) el grupo A, que incluye a *Serrano Criollo* (subgrupo A1) y *Chile de Árbol*, *Chile Serrano* y la fracción placentaria de la *Guindilla* (subgrupo A2), y ii) el grupo B, que incluye al resto de accesiones y tejidos evaluados en los parentales, con *PI152225* apareciendo por separado en el subgrupo B1 (Figura 10). Es importante señalar que las muestras del pericarpio y de la placenta aparecieron emparejados en la mayoría de las accesiones, lo que confirma el fuerte factor de genotipo mencionado anteriormente para la similitud en el contenido de volátiles individuales y la complejidad del perfil volátil dentro de cada accesión, independientemente del efecto del tejido (Figura 10). Las únicas excepciones donde los perfiles del pericarpio y de la placenta aparecieron por separado correspondieron a *BlockyR1*, *Piquillo* y *Guindilla*. Sin embargo, en el caso de *BlockyR1* y *Piquillo*, sus perfiles se combinaron por tejidos, lo que se debió principalmente a la baja cantidad y diversidad de volátiles de estas accesiones (que aumentaba su similitud). Solo la *Guindilla* mostró claramente sus perfiles de pericarpio y placenta en grupos separados, sugiriendo que es posible encontrar diferencias excepcionalmente grandes entre los tejidos del fruto en algunos genotipos.

De manera similar a las accesiones parentales, los perfiles de pericarpio y placenta en los híbridos se agruparon en dos grupos principales y también fue frecuente el emparejamiento de las muestras de ambos tejidos de un mismo híbrido: *Guindilla*×*Serrano*, *BlockyR1*×*SerrCrio*, *BlockyR1*×*152225* y *Piquillo*×*Pasilla*, por similitud en la composición volátil de sus tejidos. Por el contrario, *Piquillo*×*Serrano* y *Arbol*×*Serrano* mostraron perfiles de pericarpio y de placenta en diferentes grupos del

## Fase experimental, resultados y discusión

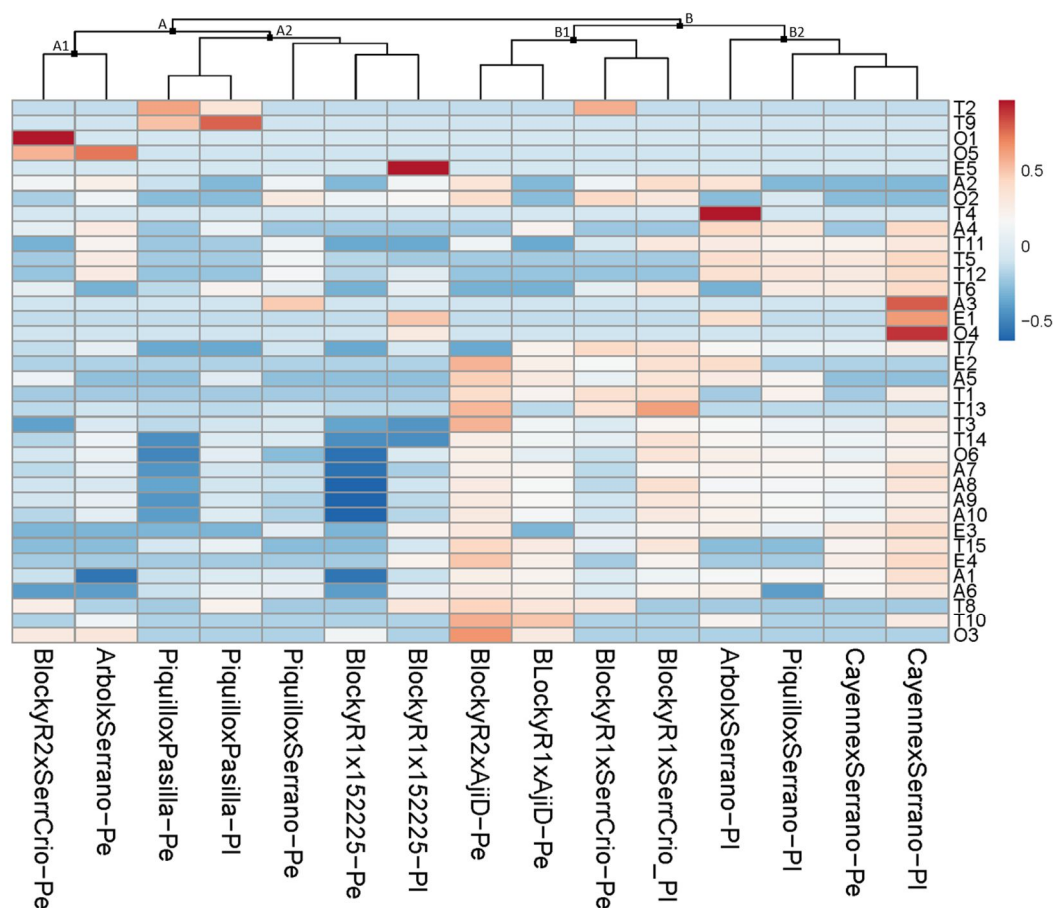
heatmap (Figura 11). Además, debe tenerse en cuenta que *BlockyR1* × *AjiD* y *BlockyR2* × *AjiD*, en los cuales solo se pudo muestrear y analizar el pericarpio, también se emparejaron. En este sentido, probablemente el hecho de tener en común a *Aji Dulce* como parental sobre el fondo genético del pimiento *California* proporciona perfiles similares en los híbridos, lo que sugiere cierto grado de aptitud combinatoria general para este carácter (Goulet *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2018b), aunque deberían evaluarse más combinaciones para confirmarlo.



**Figura 10.** Análisis de agrupamiento jerárquico de mapa de calor de los volátiles identificados en las accesiones parentales estudiadas, correspondientes a los tejidos pericarpio (Pe) y placentario (Pl). Las abreviaturas de accesiones y volátiles corresponden a las indicadas en las tablas 1 y 2, respectivamente.

El análisis de componentes principales reforzó los resultados del análisis jerárquico. Los dos primeros componentes explicaron el 43% de la variación total y la PC1 contribuyó aproximadamente el 30% a la variación, que se fundamentalmente se correlacionó positivamente con varios terpenoides como 3-careno (T1), ciclosativeno (T2) y  $\beta$ -selineno (T9), y el compuesto heterocíclico indol (O1); y negativamente

correlacionado con muchos otros compuestos, incluidos varios alcanos, como tetradecano (A1), ciclopentadecano (A6) y 10-metilnonadecno (A8), terpenoides como  $\beta$ -elemeno (T6), valenceno (T11),  $\alpha$ -himachaleno (T12),  $\beta$ -himachaleno (T14) y longipinocarvono (T15), la mayoría de los ésteres y otros compuestos como  $\alpha$ -ionona (O4) o (Z)-9-octadecen-1-ol (O6) (Figura 12, superior). Por otro lado, los volátiles más discriminantes en la PC2 fueron los terpenoides allo-aromadendreno (T5),  $\beta$ -elemeno (T6) y  $\alpha$ -himachaleno (T12), los alcanos 4-metiltetradecano (A3) y decilciclopentano (A4), y  $\alpha$ -ionona (O4), en la escala positiva de esta coordenada, mientras que los terpenoides  $\alpha$ -copaeno (T3), longipinocarvono (T15) y los compuestos de la miscelánea salicilato de metilo (O3) y 3-isobutil-2-metoxipirazina (O2) fueron encontrados en el extremo negativo (Figura 12, superior).



**Figura 11.** Análisis de agrupamiento jerárquico de mapa de calor de los volátiles identificados en las accesiones híbridas estudiadas, correspondientes a los tejidos pericarpio (Pe) y placentario (Pl). Las abreviaturas de accesiones y volátiles corresponden a las indicadas en las tablas 1 y 2, respectivamente.

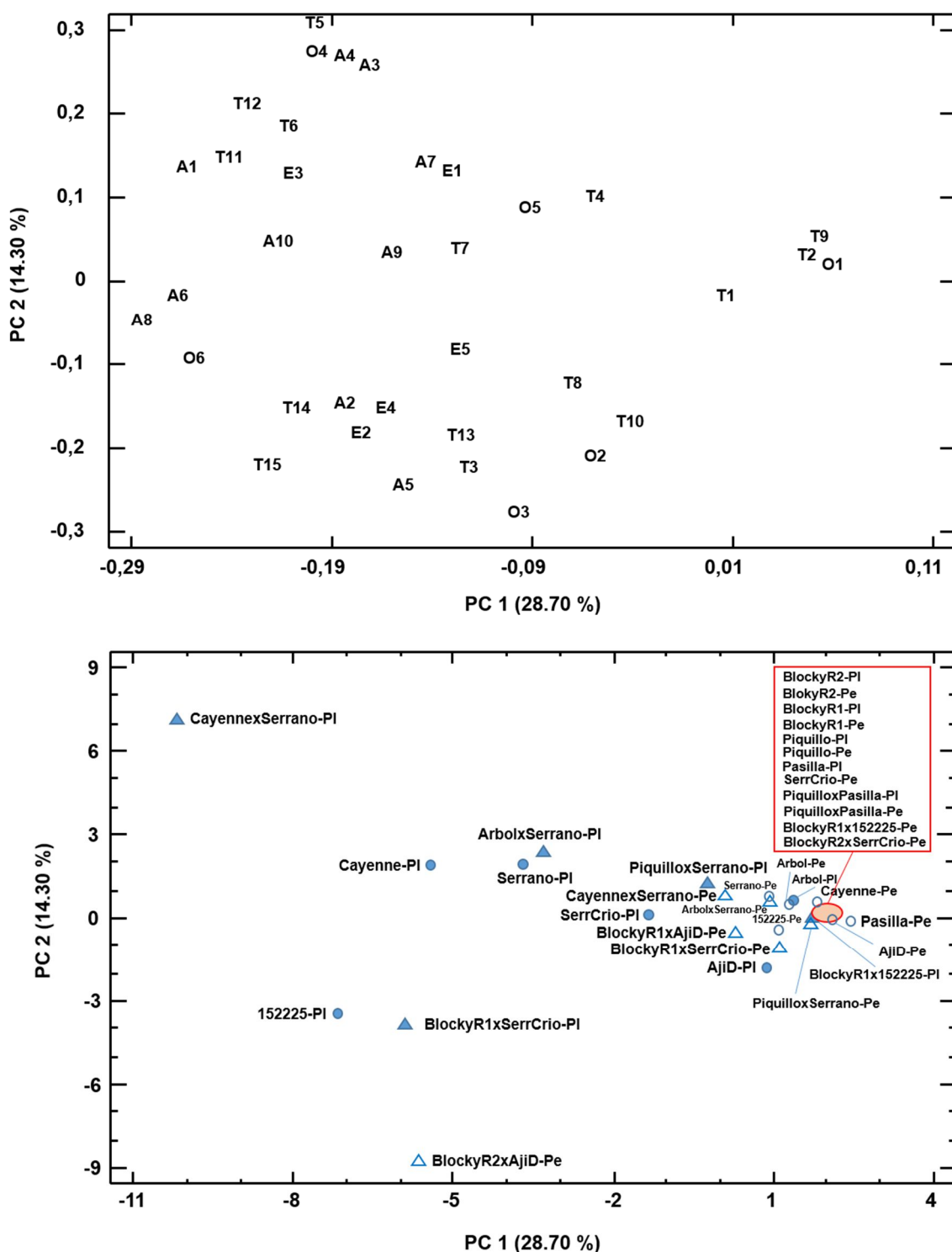
## Fase experimental, resultados y discusión

De acuerdo con la distribución de componentes principales de volátiles, tanto los perfiles de pericarpio como de placenta de todas las accesiones incluidas en el subgrupo B2 (aparte de la fracción de placenta de *Aji Dulce*) (Figura 11) y todos los híbridos del grupo A en la Figura 11, excepción del pericarpio de *Arbol*×*Serrano*, se concentraron en un punto central, señalado en rojo (Figura 12, inferior) en el lado positivo de PC1 y nivel intermedio de PC2 (i.e. valor 0 en esta componente). Alrededor de este grupo encontramos una nube de puntos que corresponden a las fracciones de pericarpio de *Chile de Árbol*, *Chile Serrano* y *PI-152225*, y los híbridos *Arbol*×*Serrano*, *Guindilla*×*Serrano*, *BlockyR1*×*AjiD* y *BlockyR1*×*SerrCrio*, así como las muestras de placenta de *Chile de Árbol* y *Aji Dulce* (Tabla 5). En general, la mayoría de estas fracciones se caracterizaron por valores de volátiles totales entre bajos e intermedios y una complejidad en su composición volátil también baja o intermedia, donde predominaban algunos terpenoides como 3-careno, mientras que los ésteres y otros compuestos adicionales (grupo O) eran muy escasos o nulos. Por lo tanto, la mayoría de las accesiones dotadas de aromas principalmente a pimiento verde, y muy pocas o nulas notas frutales, se encuentran en esta región.

Por el contrario, las muestras de placenta del resto de accesiones se ubicaron fuera de la nube mencionada. Así, *Serrano Criollo* o *Piquillo*×*Serrano*, caracterizados por su contenido intermedio en volátiles totales y la complejidad de los perfiles volátiles, fueron los más cercanos a la nube (Figura 12). Siguiendo gradualmente los valores negativos de PC1, un segundo grupo que incluye las fracciones de placenta de *Serrano*, *Guindilla* y el híbrido *Arbol*×*Serrano*, todos ellos caracterizados por un alto contenido en volátiles totales y perfiles volátiles bastante complejos, que incluían mezclas de terpenoides con algunos ésteres y compuestos del grupo miscelánea, y como resultado un aroma a pimiento verde muy intenso con notas afrutadas, apareció claramente separado de la nube central.

Finalmente, el resto de muestras estudiadas se encontraron alejadas de esta región, en el lado negativo de PC1, a causa de su composición diversa y abundante en ésteres (relacionados con aromas frutales), alcanos (tentativamente relacionados con capsaicinoides) y varios terpenoides como el valenceno. Además, estas fracciones se distribuyeron a lo largo de la PC2, en función de sus diferencias entre sí en terpenoides, ésteres y algunos compuestos de la miscelánea (Figura 12). De hecho, la muestra de placenta del híbrido *Guindilla*×*Serrano* apareció claramente separada del resto, en los valores de PC1 más negativos y PC2 más positivos. De hecho, esta fracción era la que

tenía los volátiles totales más altos del experimento y uno de los perfiles más complejos (Tablas 5 y 6).



**Figura 12.** Gráficos de análisis de componentes principales (PCA) de los volátiles identificados (superior) y las accesiones parentales e híbridas evaluadas, correspondientes a los tejidos pericarpio (Pe) y placentario (PI) (parte inferior). Las abreviaturas de accesiones y volátiles corresponden a las indicadas en las tablas 1 y 2, respectivamente.

## Fase experimental, resultados y discusión

En vista de estos hallazgos, podemos deducir que la hibridación permite fracciones volátiles más complejas y generalmente más abundantes que las observadas en los parentales originales, ampliando y mejorando la riqueza y complejidad de los perfiles de volátiles y en consecuencia de su aroma. Como resultado, los perfiles de muchos híbridos se extendieron ampliamente en la trama de PCA y muchos de ellos por separado de sus padres. Aun más, este hecho es particularmente obvio en el caso de los tejidos placentarios que, debido a sus niveles generalmente más altos en volátiles, proporcionan una distribución más amplia en el PCA (Figura 12).

## 3.2.- Línea experimental 2: Estudio de la diversidad intra-varietal de compuestos aromáticos en pimientos y chiles: evolución de las variedades tradicionales a las modernas F1

### 3.2.1.- Metodología

#### 3.2.1.1.- Material vegetal

Se estudiaron ocho accesiones de Jalapeño, incluyendo cuatro cultivares ancestrales (Espinaltecos), un cultivar tradicional de polinización abierta (Jalapeño M), dos variedades modernas F1 de Jalapeño (Delicias y Jalapa) y un chile Serrano, considerado el antecesor de los jalapeños (Bosland y Votava, 2000; Pereira-Días *et al.*, 2019) (Tabla 7). El perfil volátil se estudió en la etapa inmadura, la más importante económicamente en los jalapeños, los cuales son consumidos y apreciados por su flavor y aroma intensos y predominantemente herbáceos, con notas frutales (DeWitt y Bosland, 2009).

Tabla 7. Nombre, tipo varietal, origen y rasgos frutales de las accesiones de *Capsicum* evaluadas.

Accesión (abreviatura)	Tipo varietal	Origen	Peso (g)	Largo/ancho (mm)	Calidad de aroma (intensidad) <sup>1</sup>
Serrano (Serrano)	Antepasado jalapeños	Reimer seeds	3-5	35/15	Verde, pimiento, afrutado (alta)
Espinalteco-10397 (Esp10397)	Cultivar ancestral				
Espinalteco-10400 (Esp10400)	Cultivar ancestral	P.W. Bosland, The Chile Pepper Institute, las Cruces (NM, USA)	20-30	60/30	---
Espinalteco-10402 (Esp10402)	Cultivar ancestral		20-30	55/35	---
Espinalteco-10415 (Esp10415)	Cultivar ancestral				
Jalapeño M	Variedad tradicional	Roguelands Seed company	15-25	65/25	Verde, terroso, pimiento (media)
Jalapeño Delicias	Variedad moderna (F1)	Peto Seed (Monsanto), PW Bosland	---	---	---
Jalapeño Jalapa	Variedad moderna (F1)	Seminis Seed (Monsanto), PW Bosland	20-30	70/25	---

<sup>1</sup>Adaptado de Rodríguez-Burruezo *et al.* (2010).

## Fase experimental, resultados y discusión

Las plantas se cultivaron, también, en un invernadero con sistema de control climático ubicado en la Univeristat Politècnica de València (UPV), Campus de Vera, Valencia (España), con el fin de minimizar el efecto ambiental en la composición del fruto, durante el ciclo de cultivo de primavera-verano de 2018. Se cultivaron 15 plantas por accesión, las cuales se dividieron en tres bloques (i.e. cinco plantas por bloque), y se trasplantaron al invernadero en febrero de 2018, distribuyéndose los bloques según un diseño factorial completamente al azar. El ensayo se desarrolló bajo condiciones de luz natural y la temperatura varió de 20 °C (noche) a 28° C (mañana). Se añadió al agua de riego un fertilizante comercial soluble en agua 15N-2.2P-24.9K (15N-5P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-30K<sub>2</sub>O más micronutrientes, BASF, Barcelona, España) a una concentración de 1 g L<sup>-1</sup>, los riegos se realizaron dos veces al día durante 5 minutos. Se hicieron tratamientos fitosanitarios solamente cuando fueron detectadas plagas comunes como mosca blanca con Oberon® y ácaros con Acramite®.

### 3.2.1.2.- Preparación de muestras y extracción de volátiles

Se prepararon un total de tres muestras por accesión (n=3), mezclando frutos de cinco plantas cada una (i.e. empleando los frutos de las cinco plantas de cada bloque para preparar una muestra), muestreándose así las 15 plantas por accesión del experimento. Los frutos de cada muestra se lavaron cuidadosamente una vez cosechados y se mantuvieron refrigerados a 10 °C hasta la preparación de las muestras y los análisis, transcurriendo un tiempo no superior a tres días. Para la preparación de muestras, a cada una se le retiraron las semillas y la estructura placentaria y se pesó 1 g de peso fresco de carne cortado finamente en trozos de 3×3 mm que se transfirieron a un vial de espacio en cabeza (HS) sellado de 20 mL. El tiempo transcurrido entre la preparación de las muestras y la extracción de volátiles fue inferior a 5 minutos.

### 3.2.1.3.- Extracción de la fracción volátil

En la extracción de los compuestos volátiles se utilizó la técnica de microextracción en fase sólida del espacio en cabeza (HS-SPME, i.e. head space-solid phase microextraction), siguiendo un protocolo adaptado de Rodríguez-Burruezo *et al.* (2010) y Kollmannsberger *et al.* (2011). Se llevó a cabo la preincubación de viales a 40 °C durante 30 minutos. La extracción se realizó a temperaturas más bajas que otros

métodos, en combinación con la SPME que adsorbe los volátiles liberados en el espacio en cabeza sin emplear disolventes. Esta modalidad de extracción evita la ocurrencia de los artefactos térmicos y permite el uso splitless en la inyección en el cromatógrafo, proporcionando unos resultados de la composición volátil más fiable y precisa que otros protocolos de extracción.

La fibra utilizada para la extracción en el espacio en cabeza fue una SPME de 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR/PDMS (divinilbenzeno/carboxen/polidimethylsiloxano, Supelco, Bellefonte, PA, EE.UU). La fracción liberada en el espacio en cabeza fue adsorbida durante 40 minutos, también a 40  $^{\circ}\text{C}$ . La fibra se desorbió térmicamente a 250  $^{\circ}\text{C}$  durante 30 segundos (modo splitless) en el puerto del cromatógrafo de gases. Para evitar que hubiera contaminación cruzada de muestras anteriores, la fibra SPME se reacondicionaba para la siguiente extracción durante 30 minutos a 250  $^{\circ}\text{C}$  en el puerto de inyección de otro cromatógrafo de gases.

#### 3.2.1.4.- Análisis de volátiles

Se usó un equipo de cromatografía de gases (GC) de la compañía Agilent, modelo Network 6890 GC-MS Agilent Network 6890 con inyector automático/brazo robótico programable autosampler (GERSTEL MPS2 Multi Purpose Autosampler), acoplado a un detector selectivo de masa inerte (MS), también de Agilent, modelo Agilent 5973 (Agilent, Santa Clara, CA, EE.UU.). La fracción volátil extraída con el procedimiento HS-SPME se inyectó a través de una columna capilar de sílice HP-5MS J&W (30 m de longitud, 0.25  $\mu\text{m}$  de espesor y 0.25 mm de diámetro interno), utilizando 95% de dimetilpolisiloxano y 5% de fenilo como fase estacionaria. La temperatura de la columna varió de 100  $^{\circ}\text{C}$  a 250  $^{\circ}\text{C}$  a una velocidad de 5  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , manteniendo 250  $^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos al final de cada ciclo según lo descrito por Rodríguez-Burruezo *et al.* (2010) y Kollmannsberger *et al.* (2011). Se utilizó helio como gas portador a un flujo constante (1 mL  $\text{min}^{-1}$ ) manteniéndose la línea de transferencia a 220  $^{\circ}\text{C}$ . En la detección a través del espectrómetro de masas se utilizó el modo de impacto de electrones (EI) a 70 eV de energía de ionización, 225  $^{\circ}\text{C}$  de temperatura de fuente. La adquisición se realizó en modo de exploración (rango de masa  $m/z$  35-350 amu). Los cromatogramas y los espectros de masas se procesaron mediante MSD Chemstation D.02.00.275 de Agilent (Agilent Technologies).

Para la identificación de compuestos se compararon los tiempos de retención en cromatograma y espectros de masas de cada compuesto con i) los de compuestos de referencia comerciales, ii) o tentativamente comparando con los de la biblioteca NIST 2005 Mass Spectral, y con los tiempos de retención observados previamente (datos no demostrados) y también haciendo coincidir con nuestra biblioteca personalizada de espectros de masas (basada en espectros de compuestos disponibles comercialmente y desarrollada en experimentos anteriores). Los compuestos disponibles comercialmente se adquirieron de Sigma-Aldrich Química (Madrid, España). La identificación de los compuestos se realizó tentativamente en base a la comparación entre sus espectros de masas con los de la biblioteca NIST 2005 Mass Spectral, cuando no estaban disponibles los estándares comerciales.

Se cuantificó el contenido en cada volátil identificado a partir de la integración del área de pico de cada compuesto (peak area units, p.a.u.), directamente integrada por TIC (cromatograma total de iones), como se ha descrito sobre frutos de *Capsicum* (Kollmannsberger *et al.*, 2011; Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2010). La integración se obtuvo del cromatograma de iones extraído en función de sus iones característicos, en los pocos casos en los que encontramos picos demasiado pequeños o parcialmente superpuestos,

### 3.2.1.5.- Análisis de datos

Se realizó un análisis de varianza del modelo de efectos fijos (ANOVA) para los datos de áreas de pico integrados de GC en todas las accesiones, es decir, tres datos por accesión ( $n=3$ ) que abarca un total de 24 análisis GC-MS. La prueba de Newman-Keuls (trazas no consideradas) se utilizó para detectar diferencias significativas entre las medias de las accesiones (nivel de significancia  $p<0.05$ ) para volátiles totales y volátiles individuales. Para estos análisis estadísticos se utilizó el software Statgraphics Centurion XVII (StatGraphics Technologies, The Plains, VA, EE.UU.).

### 3.2.2.- Resultados y discusión

Se identificaron preliminarmente un total de 40 compuestos volátiles entre las accesiones estudiadas, incluyendo 20 terpenoides (seis monoterpenos), 10 ésteres, dos alcanos y una miscelánea de ocho compuestos (i.e. aldehídos, la pirazina del pimiento,

salicilato de metilo, etc.) (Tabla 8). Todos estos compuestos han sido identificados anteriormente en pimiento y chiles (Moreno-Peris *et al.*, 2012; Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2010b). Se encontraron considerables diferencias tanto cualitativas como cuantitativas entre los materiales estudiados.

Tabla 8. Volátiles identificados en el experimento con su correspondien grupo, índice de retención (IR) y método de identificación (Id).

Compuesto volátil	IR	Id <sup>1</sup>	Compuesto volátil	IR	Id <sup>1</sup>
TERPENOIDES			ÉSTERES		
<i>Monoterpenos</i>			3-Metilbutanoato de metilo	771	MS
Triciclono	729	MS	3-Metilbutil butanoato	1019	R
$\alpha$ -Pino	902	R	3-Metilbutanoato de pentilo	1118	R
Canfeno	943	R	2-Metilpropanoato de hexilo	1118	R
$\beta$ -Pino	943	R	4-Metilpentil-3-metilbutanoato	1201	R
(Z)- $\beta$ -Ocimeno	976	R	2-Metilbutanoato de hexilo	1218	R
Limoneno	1018	R	3-Metilbutanoato de hexilo	1218	R
<i>Otros terpenoides</i>			4-Metilfenil pentanoato	1218	MS
$\alpha$ -Cedreno	744	R	3-Metilbutanoato de heptilo	1340	R
3-Careno	948	R	Decanoato de hexilo	1779	MS
(+)-Ciclosativeno	1125	MS	ALCANOS		
$\alpha$ -Ylangeno	1221	MS	Tetradecano	1413	MS
$\alpha$ -Copaeno	1222	R	10-Metilnonadecano	1945	MS
$\alpha$ -Longipino	1403	R	OTROS/MISCELÁNEA		
$\alpha$ -Bergamoteno	1430	MS	3-Metil-1-butano	697	MS
$\delta$ -Cadineno	1469	MS	Hexanal	806	MS
(+)-Valenceno	1474	R	Anisol	870	MS
$\beta$ -Cariofileno	1494	MS	Ácido pentanoico	875	R
$\alpha$ -Himachaleno	1494	MS	$\alpha$ -Felandreno	1004	R
Himachala-2,4-dieno	1499	MS	2-Metoxi-3-isobutil pirazina	1204	R
$\beta$ -Himachaleno	1528	MS	Salicilato de metilo	1281	R
Longipinocarvono	1569	MS	(Z)-9-Octadecen-1-ol	2061	MS

<sup>1</sup>R = identificado mediante la comparación de su espectro de masas e IR con compuestos de referencia auténticos, MS = identificado tentativamente sobre la base de su espectro de masa e IR con los de la Biblioteca NIST MS y literatura.

Los niveles más altos de volátiles totales correspondieron claramente a los jalapeños más ancestrales, i.e. los espinaltecos, con valores que van desde  $645 \times 10^6$  hasta  $8163 \times 10^6$  unidades de área de pico (p.a.u.) de *Esp10402* y *Esp10397* (Tabla 9). Por el contrario, los valores más bajos en volátiles totales se encontraron en las variedades modernas F1 *Delicias* y *Jalapa*, comprendidos entre  $40 \times 10^6$  y  $80 \times 10^6$  p.a.u., mientras que tanto la variedad de polinización abierta tradicional *Jalapeño M* como el ancestro *Serrano* mostraron niveles intermedios:  $249-584 \times 10^6$  (Tabla 9).

Este patrón también se encontró dentro de los principales grupos de volátiles y también en muchos compuestos individuales, como los particularmente relevantes para los pimientos verdes. Así los espinaltecos y el chile *Serrano* mostraron los niveles más altos en terpenoides y ésteres totales e individuales y la mayoría de compuestos del grupo miscelánea, mientras que las variedades modernas F1 mostraron niveles comparativamente menores, especialmente entre los ésteres (Tabla 9).

## Fase experimental, resultados y discusión

Tabla 9. Compuestos individuales y sus unidades promedio de área de pico de GC ( $\times 10^6$ ) identificadas en los frutos en estado inmaduro de las accesiones de jalapeños estudiados

Compuesto	Esp10397	Esp10400	Esp10402	Esp10415	Serrano	Jalapeño M	Delicias F1	Jalapa F1
<b>TERPENOIDES</b>								
<i>Monoterpenos</i>								
Triciclono	-	3.47b	0.29a	-	5.22c	-	0.26a	3.01b
$\alpha$ -Pinenol	-	tr	tr	tr	tr	0.44a	0.52a	0.38a
Canfeno	-	tr	tr	-	0.28a	0.20a	0.27a	0.30a
$\beta$ -Pinenol	-	tr	-	-	tr	-	-	tr
(Z)- $\beta$ -Ocimeno	-	0.31a	0.87ab	-	-	1.50b	0.77ab	0.65a
Limoneno	tr	5.08c	1.10ab	0.52a	0.70a	2.50b	1.50ab	3.06bc
Monoterpenos totales	tr	8.86d	2.26ab	0.52a	6.20c	4.64bc	3.32b	7.40cd
<i>Otros terpenoides</i>								
$\alpha$ -Cedreno	tr	1.39b	-	tr	-	0.92ab	0.42a	0.22a
3-Careno	72.82d	140.81e	9.80b	2.25a	26.40c	3.40a	20.92c	6.33b
(+)-Ciclosativeno	tr	13.29b	30.95c	tr	tr	0.17a	0.66a	0.29a
$\alpha$ -Ylangeno	tr	-	-	-	-	18.02b	tr	0.50a
$\alpha$ -Copaeno	171.30e	12.39b	-	42.69d	24.68c	8.31b	4.13a	5.42a
$\alpha$ -Longipinenol	203.30d	33.84c	8.45b	8.57b	5.16ab	4.20ab	0.13a	1.27a
$\alpha$ -Bergamoteno	2.82b	1.47a	1.39a	4.50c	1.65ab	3.88bc	2.50ab	1.52a
$\delta$ -Cadineno	4.73b	-	-	0.50a	tr	0.55a	tr	0.39a
(+)-Valenceno	tr	-	-	1735.14a	tr	tr	-	tr
$\beta$ -Cariofileno	11.75c	-	1.94ab	3.58b	1.61a	1.46a	0.23a	0.14a
$\alpha$ -Himachaleno	-	66.99e	37.14c	47.58d	34.00c	22.64b	0.29a	1.83a
Himachala, 2,4-dieno	35.78d	1.46a	6.32b	11.43c	6.52b	4.54ab	tr	tr
$\beta$ -Himachaleno	6005.91e	50.79cd	41.84c	78.06d	40.00c	27.48b	0.14a	1.23a
Longipinocarvono	-	-	5.68b	-	6.02b	-	tr	0.24a
Terpenoides totales	6508.41f	322.43d	143.51a	1934.30e	146.04c	95.57b	29.42a	19.38a
<b>ÉSTERES</b>								
3-Metilbutanoato de metilo	tr	tr	-	-	1.21a	0.40a	tr	0.05a
3-Metilbutilbutanoato	2.35b	-	1.03ab	tr	-	0.51a	-	0.40a
3-Metilbutanoato de pentilo	10.05b	1.36ab	1.01ab	tr	0.79a	tr	tr	0.25a
2-Metilpropanoato de hexilo	tr	20.03d	11.78c	6.43b	10.43c	4.06ab	tr	0.26a
4-Metilpentil-3-metilbutanoato	256.86d	257.04d	63.80c	14.27b	19.82b	5.06ab	0.42a	3.52ab
2-Metilbutanoato de hexilo	14.36c	13.96c	5.87b	1.82ab	2.07ab	0.52a	tr	0.21a
3-Metilbutanoato de hexilo	1.41a	3.08b	2.08ab	-	-	-	-	-
4-Metilfenilpentanoato	58.36d	22.74c	33.59cd	23.81c	26.39c	8.27b	tr	1.63a
3-Metilbutanoato de heptilo	-	-	-	tr	-	-	-	-
Decanoato de hexilo	tr	2.51b	-	1.58a	tr	1.07a	-	-
Ésteres totales	343.39g	320.72g	119.16f	47.91d	60.71e	19.89c	0.42a	6.32b
<i>Alcanos</i>								
Tetradecano	108.85e	68.24d	45.35c	111.31e	28.69b	4.33ab	0.52a	tr
10-Metilnonadecano	1151.25h	443.78f	271.74d	722.01g	336.49e	58.96c	2.56a	21.57b
Alcanos totales	1260.10g	512.02e	317.09d	833.32f	365.18d	63.29c	3.08a	21.57b
<i>Otros/Miscelánea</i>								
3-Metil-1-butanol	20.67c	6.89b	5.88b	1.89ab	4.10b	0.73a	1.05ab	-
Hexanal	-	-	-	-	0.29a	-	-	-
Anisol	23.29c	7.10b	38.08d	19.97c	-	38.83d	tr	2.88a
Ácido pentanoico	-	tr	0.44a	tr	tr	tr	-	0.07a
$\alpha$ -Felandreno	-	tr	-	-	tr	tr	-	0.06a
2-Metoxi-3-isobutilpirazina	6.94a	2.96b	5.33c	2.26b	0.86a	1.51ab	0.50a	1.15ab
Salicilato de metilo	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
(Z)-9-Octadecen-1-ol	tr	tr	0.23a	tr	0.59a	tr	0.35a	0.21a
Volátiles totales	8162.80g	1195.71e	644.82d	2847.79f	583.97d	248.21c	40.0a8	79.88b

En términos de contribución individual de los volátiles a la fracción total, la mayoría de accesiones presentaron perfiles de volátiles relativamente equilibrados, con

una distribución representativa de la mayoría de sus volátiles, aunque también se observaron otras accesiones en las que la fracción volátil se debía fundamentalmente a uno o dos volátiles predominante (s). Así, por ejemplo, los jalapeños espinaltecos *Esp10400* y *Esp10402*, así como el cultivar de polinización abierta *Jalapeño M* y las dos variedades modernas F1 *Delicias* y *Jalapa*, a pesar de tener un bajo contenido total en volátiles, presentaron una distribución más equilibrada. Por el contrario,  $\beta$ -himachaleno representó un 74 % de los volátiles en el jalapeño *Esp10397*, valenceno representó el 61% de los volátiles totales en *Esp10415* y el alcano 10-metilnonadecano el 58% de los volátiles totales en *Serrano* (Tabla 9). Estos resultados sugieren que un nivel alto de volátiles totales en los pimientos no está necesariamente relacionado con una fracción volátil cualitativamente compleja. O al revés, una fracción volátil cualitativamente diversa no está siempre relacionada con un alto contenido de volátiles totales. Asimismo, confirman los resultados observados intravarietalmente en la línea experimental anterior, ahora extendido a variación intravarietal, i.e. entre variedades este fenómeno también se produce.

Analizando con más detalle el perfil de volátiles entre los jalapeños ancestrales, se observó el efecto de la diversidad propia de las variedades tradicionales. Así, si bien como se observó anteriormente el contenido en volátiles totales fue comparativamente alto frente a las variedades más modernas, éste fue muy variable, estando comprendido entre 645 y  $8163 \times 10^6$  p.a.u. de *Esp10402* y *Esp10397*, respectivamente, con valores intermedios de *Esp10400* y *Esp10415* (Tabla 9). En general, los terpenoides fueron los principales contribuidores a la fracción volátil de los espinaltecos, especialmente en *Esp10397* y *Esp10415*. Destacaron en la mayoría de espinaltecos  $\alpha$ -himachaleno y  $\beta$ -himachaleno (predominantes en aceite esencial de cedro, aroma a madera, especia) (Martins *et al.*, 2015) y  $\alpha$ -longipineno, y adicionalmente 3-careno (aroma típico terpénico penetrante, dulce pino/terroso) en *Esp10397* y *Esp10400*, ciclosativeno en *Esp10402* y valenceno (cítrico verde/frutal) en *Esp10415* (Tabla 9). En cuanto a los monoterpenos destacaron pineno (aroma a extracto de pino) y limoneno (aroma cítrico penetrante), especialmente en *Esp10400*. En cuanto al perfil de ésteres, *Esp10397* y *Esp10400* fueron las accesiones con el mayor contenido en estos compuestos que generalmente contribuyen al aroma y flavor de los alimentos con notas frutales, dulces y hasta exóticas (Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2010b). En general 4-metilpentil-3-metilbutanoato, seguido de 4-metilfenil pentanoato y 2-metilpropanoato de hexilo fueron los más comunes y abundantes entre los espinaltecos, mientras que el resto de

ésteres, aunque presentes, estuvieron en cantidades considerablemente menores (Tabla 9). En cuanto a los alcanos, en todos los casos 10-metilnonadecano fue el principal compuesto, si bien estos volátiles no suelen tener impacto sensorial. Finalmente, entre el grupo de otros compuestos, en general destacaron 3-metil-1-butanol (alcohol isoamilo, aroma alcohólico brandy/frutal), anisol (anisado) y la pirazina del pimiento, i. e. 2-metoxi-3-isobutil pirazina, (típico aroma azufrado y penetrante a pimiento verde) especialmente en *Esp10397* y *Esp10402* (Tabla 9).

En comparación, el chile *Serrano*, considerado el antepasado de los jalapeños, seguido de la variedad de polinización abierta *Jalapeño M* mostraron un contenido en volátiles totales intermedios, en los que también fueron predominantes, aunque a menores niveles que en los espinaltecos, los terpenoides, destacando  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -himachaleno y  $\beta$ -himachaleno, así como 3-careno y los monoterpenos triciclono en *Serrano* y limoneno en *Jalapeño M* (Tabla 9). Algo similar se encontró en el caso de los ésteres, con unos niveles comparables a los espinaltecos en el chile *Serrano* y ligeramente inferiores en *Jalapeño M*, y con la predominancia de los mismos compuestos (i.e. 4-metilpentil-3-metilbutanoato, seguido de 4-metilfenil pentanoato y 2-metilpropanoato de hexilo) (Tabla 9). Por lo que respecta a los compuestos de la miscelánea, tanto *Jalapeño M* como *Serrano* mostraron niveles apreciables de 3-metil-1-butanol y la pirazina del pimiento, similares a los espinaltecos, y adicionalmente niveles muy altos de anisol en *Jalapeño M* y relativamente apreciables de hexanal (aroma herbáceo) y Z-9-octadecen-1-ol en *Serrano* (Tabla 9).

Por último, las variedades modernas F1 *Delicias* y *Jalapa* mostraron unos perfiles de volátiles cualitativamente ricos, considerando los compuestos identificados. Sin embargo, en comparación con el chile *Serrano* y *Jalapeño M* y especialmente frente a los espinaltecos, el contenido en volátiles totales y en la mayoría de compuestos individuales, fue considerablemente más bajo. Así, sólo fueron comparables a los espinaltecos en monoterpenos, los terpenoides 3-careno o  $\alpha$ -bergamoteno, y ligeramente inferiores en 3-metil-1-butanol (en *Delicias*) y la pirazina del pimiento, mientras que para el resto de compuestos volátiles predominantes, i.e. resto de terpenoides y mayoría de ésteres sus niveles fueron muy inferiores (Tabla 9)

En base a las diferencias observadas en el perfil de volátiles, podemos deducir que el aroma atractivo del *Jalapeño M* (moderadamente intenso, verde/herbáceo a pimiento verde y notas terrosas) es debido a la predominancia de terpenoides como los himachalenos, copaeno y baja contribución de ésteres, a la que se suma el anisol y la

pirazina del pimiento (aroma herbáceo fuertemente azufrado). En comparación el chile *Serrano*, caracterizado por su aroma intenso, fuertemente herbáceo pero con notas frutales, se debe a una mayor concentración total de volátiles (doble que *Jalapeño M*) y a una proporción ésteres/terpenoides mayor, lo que causa que también se perciban las notas frutales de los ésteres entre la base cítrica, a madera, herbácea y sulfurosas de los terpenos, la pirazina y resto de compuestos de su composición. Frente a estas variedades, se puede deducir que el aroma de las variedades modernas será débil (volátiles totales muy bajos) y fundamentalmente herbáceo, como una suerte de *Jalapeño M* “light”. En comparación, se presume que los espinaltecos estarán dotados de un aroma de intensidad similar o muy superior al del chile *Serrano* (*Esp10397*), y con unas calidades aromáticas muy variables, dependiendo de sus combinaciones cuantitativas de terpenoides, ésteres y otros compuestos.

Finalmente, se puede concluir que las variedades ancestrales del tipo varietal jalapeño presentan un perfil de volátiles muy diverso, cualitativa y cuantitativamente, y en comparación con las modernas variedades F1 mucho más ricas en volátiles totales y la mayoría de volátiles individuales. Estos resultados muestran que la pérdida de calidad aromática y “sabor” (en realidad flavor, i.e. mezcla de estímulos sensoriales que llegan a nuestro cerebro desde la lengua y la cavidad retronasal durante la masticación) atribuida a estos pimientos (DeWitt y Bosland, 2009) se debe muy probablemente a la pérdida de volátiles que ha provocado la moderna mejora varietal. Así, las compañías de desarrollo de variedades híbridas han puesto énfasis en seleccionar variedades dotadas de resistencias a patógenos vegetales, más productivas, con mayor uniformidad y vida poscosecha, pero olvidando caracteres de calidad nutricional y, como en este caso, caracteres de calidad sensorial. Este hecho sería extensible a otras hortalizas como por ejemplo el tomate, de la que es muy común oír comentarios como que ya no saben cómo lo hacían las variedades antiguas.

Además, en el caso de los jalapeños este hecho se confirma al observar como el *Jalapeño M*, un concepto de variedad a mitad de camino entre las variedades ancestrales y las modernas F1 (i.e. moderna pero de polinización abierta), muestra en términos generales unos niveles intermedios de volátiles totales e individuales en comparación a los espinaltecos y a las F1 evaluadas aquí. El hecho de que el chile *Serrano* muestre un perfil de volátiles y niveles de los mismos similares a los espinaltecos refuerza la hipótesis de que estos últimos conservan un perfil de volátiles más próximo al ancestro

## Fase experimental, resultados y discusión

semisilvestre. Aspecto en el que se han alejado las variedades de Jalapeños que han experimentado un proceso de selección y mejora más intenso y moderno.

En cualquier caso, este estudio preliminar debería ampliarse en términos de interpretación de cromatogramas, con una identificación más profunda de otros compuestos que pueden quedar por identificar y que incrementarían las diferencias cualitativas entre las variedades antiguas y las modernas. Más allá de la comparativa establecida aquí en base a 40 volátiles. Así como se observa en la Figura 13, los cromatogramas de los jalapeños espinaltecos suelen presentar picos más pronunciados y de mayor área que las modernas F1 (lo observado en este trabajo), pero también son mucho más variados en picos (diferencias cualitativas, por explorar en el futuro). Asimismo, estos estudios deberían ampliarse a otros tipos varietales para determinar si el proceso de mejora vegetal moderna ha tenido el mismo impacto en el perfil de volátiles que en los jalapeños.

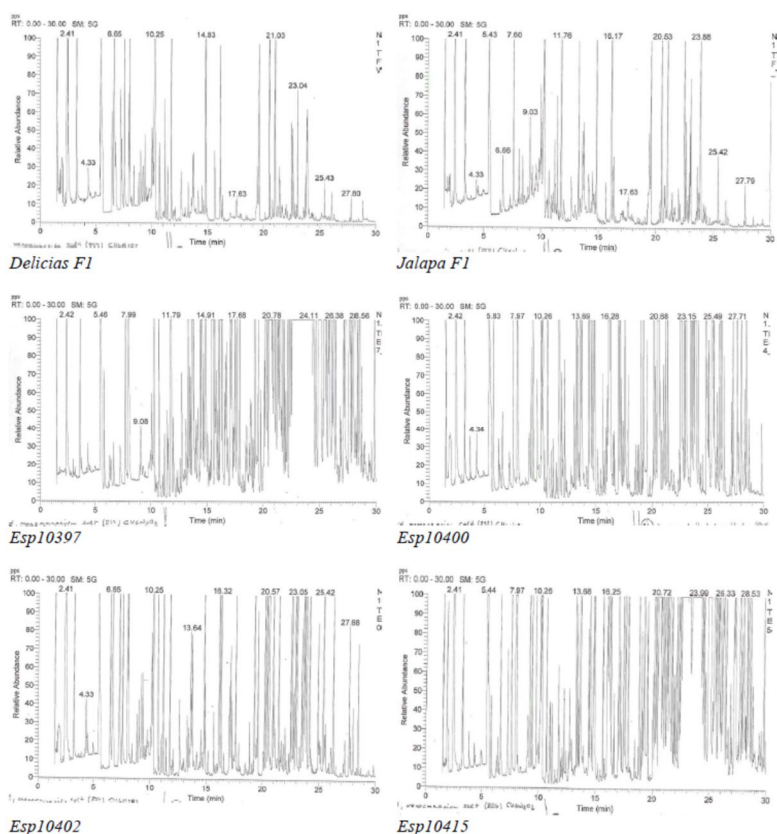


Figura 13. Comparativa de cromatogramas de las modernas F1 (fila superior; izda. *Delicias F1*, dcha. *Jalapa F1*) frente a los espinaltecos (fila central y fila inferior).

## Conclusiones



## 4.- Conclusiones

1. Este trabajo ha demostrado que existen amplias oportunidades para mejorar mediante hibridación los compuestos relacionados con el aroma en pimientos y chiles maduros, tanto cualitativa como cuantitativamente. En comparación, la mayoría de los híbridos mejoraron los perfiles volátiles de sus parentales a través de la confluencia de volátiles de ambas líneas parentales, con casos de herencia intermedia o herencia transgresiva, y también, pero en menor medida, a la aparición de compuestos *de novo*, presumiblemente debido a complementación genética.

2. Nuestros resultados abren la puerta a que los mejoradores de pimientos y chiles puedan planificar numerosas combinaciones híbridas, utilizando parentales complementarios para perfiles de volátiles deseables, y luego realizar selecciones finales, basadas en pruebas organolépticas, de aquellos híbridos con lo mejores aromas y sabores.

3. Las dos partes principales del fruto, el pericarpio y los tejidos placentarios, siguieron estas reglas de herencia. En general, los tejidos placentarios son cuantitativamente más ricos en compuestos volátiles, lo cual es de especial interés para mejorar el aroma y el sabor de aquellas variedades donde se usa el fruto entero en aplicaciones culinarias (e.g. pastas, salsas, moliendas).

4. Nuestros hallazgos indican que la mejora varietal moderna, enfocada principalmente en la mejora de nuevos materiales para la resistencia de enfermedades, altos rendimientos, uniformidad morfológica, buena apariencia y otros objetivos de comercialización y postcosecha, pueden haber ido en detrimento del “sabor”/flavor. En el caso que nos ocupa aquí con el tipo varietal jalapeño, hemos encontrado un claro empobrecimiento de la composición volátil en las variedades modernas F1 en comparación con los jalapeños ancestrales espinaltecos estudiados. Este hecho podría ser una de las claves para explicar porqué el aroma y flavor de las variedades modernas en horatizas, especialmente las de fruto, carecen de la calidad organoléptica atribuida a las variedades tradicionales. No obstante, serían necesarios realizar más estudios de este tipo con otros tipos varietales de pimiento y de otras hortalizas para confirmarlo.

## Conclusiones

5. Hemos encontrado que las variedades locales antiguas son muy ricas en la fracción volátil total y en volátiles individuales. Esto ofrece a los mejoradores la oportunidad de mejorar y seleccionar cultivares antiguos por su sabor mejorado, o alternativamente, usarlos para mejorar el sabor de los cultivares modernos.

## Bibliografía



## 5.- Bibliografía

**Adeyeye, E.; Aremu, M.O.** (2017). Chemical composition of the raw fruit coat, seed and pulp of passion fruit (*Passiflora edulis*). *Journal Trends in Science & Tecnology* 2: 334-341.

**Aguiar, A.C.; Sales, L.P.; Coutinho, J.P.; Barbero, G.F.; Godoy, H.T.; Martínez, J.** (2013). Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Capsicum Pepper: Global Yield and Capsaicinoid Content. *The Journal of Supercritical Fluids* 81: 210-216.

**Aloni, B.; Karni, L.; Deventurero, G.; Turhan, E.; Aktas, H.** (2008). Changes in ascorbic acid concentration, ascorbate oxidase activity, and apoplastic pH in relation to fruit development in pepper (*Capsicum annuum* L.) and the occurrence of blossom-end rot. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 83 (1): 100-105.

**Alvarez-Parrilla, E.; Rosa, L.A.; Amarowicz, R.; Shahidi, F.** (2011). Antioxidant activity of fresh and processed Jalapeño and Serrano peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 163-173.

**Alvarez-Parrilla, E.; Rosa, L.A.; Amarowicz, R.; Shahidi, F.** (2012). Protective effect of fresh and processed Jalapeño and Serrano peppers against food lipid and human LDL cholesterol oxidation. *Food Chemistry* 133: 827-834.

**Anandakumar, P.; Kamaraj, S.; Jagan, S.; Ramakrishan, G.; Devaki, T.** (2013). Capsicin provoques apoptosis and restrics venzo(a)pyrene induced lung tumorigenesis in Swiss albino mice. *International Immunopharmacology* 17 (2): 254-259.

**Antonio, A.S.; Wiedemann, L.S.M.; Veiga-Junior, V.F.** (2018). The genus *Capsicum*: a phytochemical review of bioactive secondary metabolites. *RSC Advances* 8: 25767-25784.

**Arrowsmith, S.; Egan, T.P.; Meekins, F.; Powers, D.; Metcalfe, M.** (2012). Research article: Effects of salt stress on capsaicin content, growth, and fluorescence in a Jalapeño cultivar of *Capsicum annuum* (Solanaceae). *Bios* 83 (1): 1-7.

**Aubert, C.; Milhet, C.** (2007). Distribution of the volatile compounds in the different parts of a White-fleshed peach (*Prunus persica* L. Batsch). *Food Chemistry* 102: 375-384.

## Bibliografía

- Auldrige, M.E.; Block, A.; Vogel, J.T.; Dabney-Smith, C.; Mila, I.; Bouzayen, M.; Magallanes-Lundback, M; DellaPenna, D.; McCarty, D.R.; Klee, H.J.** (2006a). Characterization of three members of the Arabidopsis carotenoid cleavage dioxygenase family demonstrates the divergent roles of this multifunctional enzyme family. *The Plant Journal* 45: 982-993.
- Auldrige, M.E.; McCarty, D.R.; Klee, H.J.** (2006b). Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 315-321.
- Baby, K.C.; Ranganathan, T.V.** (2016). Effect of enzyme pretreatment on yield and quality of fresh green chilli (*Capsicum annuum* L.) oleoresin and its major capsaicinoids. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 7: 95-101.
- Badui, S.** (2006). *Química de los alimentos*. Ed. Pearson Educación. México. 716 pp.
- Baldwin, I.T.; Kessler, A.; Halitscke, R.** (2002). Volatile signaling in plant-plant-herbivore interactions: What is real?. *Current Opinion of Plant Biology* 5: 351-354.
- Barbero, G.F.; Liazid, A.; Palma, M.; Barroso, C.G.** (2008). Fast Determination of Capsicinoids from Peppers by High-Performance Liquid Chromatography Using a Reversed Phase Monolith Column. *Food Chemistry* 107: 1276-1282.
- Barchenger, D.W.; Bosland, P.W.** (2016). Exogenous applications of capsaicin inhibits seed germination of *Capsicum annuum*. *Scientia Horticulturae* 203: 29-31.
- Bartley, J.M.; Stoker, P.G.; Martin, A.D.E.; Hatfield, S.G.S.; Knee, M.** (1985). Synthesis of aroma compounds by apples supplied with alcohols and methyl esters of fatty acids. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 36: 567-574.
- Belitz, H.D.; Grosch, W.** (1997). *Química de los alimentos*, 2ª edición. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza. España. 1088 pp.
- Bian, Q.; Gao, S.; Zhou, J.; Qin, J.; Taylor, A.; Johnson, E.J.; Tang, G.W.; Sparrow, J.R.; Gierhart, D.; Shang, F.** (2012). Lutein and zeaxanthin supplementation reduces photooxidative damage and modulates the expression of inflammation-related genes in retinal pigment epithelial cells. *Free Radical Biological and Medicine* 53: 1298-1307.

- Bianchi, G.; Lo Scalzo, R.** (2018). Characterization of hot pepper spice phytochemicals, taste compounds content and volatile profiles in relation to the drying temperatura. *Journal of Food Biochemistry* 42: e12675.
- Bo, M.L.; Carpizo, G.C.** (2015). Pollen phenotyping and performance in rocoto chili (*Capsicum pubescens* Ruiz et Pav., Solanaceae). *Grana* 54 (1): 37-44.
- Bogusz, Jr.S.; Teixeira-Godoy, H.; Marchi-Tavares, A.; Teixeira, J.** (2012). Analysis of the volatile compounds of Brazilian chilli peppers (*Capsicum* spp.) at two stages of maturity by solid phase micro-extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Research International* 48: 98-107.
- Borovsky, Y.; Paran, I.** (2008). Chlorophyll breakdown during pepper fruit ripening in the *chlorophyll retainer* mutation is impaired at the homolog of the senescence-inducible stay-green gene. *Theoretical and Applied Genetics* 117 (2): 235-240.
- Bosland, P.W.; Votava, E.J.** (2000). Peppers: vegetable and spice capsicums. CABI Publishing. New York. 204 pp.
- Bosland, P.W.; Coon, D.; Cooke, P.H.** (2015). Novel formation of ectopic (nonplacental) capsaicinoid secreting vesicles on fruit walls explains the morphological mechanism for super-hot chile peppers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 140: 253-256.
- Bouvier F.; Hugueney, P.; Dharlingue, A.; Kuntz, M.; Camara, B.** (1994). Xanthophyll biosynthesis in chromoplasts: Isolation and molecular cloning of an enzyme catalyzing the conversion of 5,6-epoxycarotenoid into ketocarotenoid. *The Plant Journal* 6 (1): 45-54.
- Brugarolas, M.; Martinez-Carrasco, L.; Martinez-Poveda, A.; Ruiz, J.J.** (2009). A competitive strategy for vegetable products: traditional varieties of tomato in the local market. *Spanish Journal of Agricultural Research* 7: 294-304.
- Buczowska, H.; Nurzynska-Wierdak, R.; Labuda, H.; Salata, A.** (2016). Relationships of the capsaicinoid content between the fruit parts of hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus* 15: 185-198.
- Burak, M.; Imen, Y.** (1999). Flavonoids and their antioxidant properties. *Turkiye Klinikleri Tip Bilimleri Dergisi* 19: 296-304.

## Bibliografía

**Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Hernández, M.L.; Páez-Hernández, M.E.; Rodríguez, J.A.; Galán-Vidal, C.A.** (2009). Chemical studies of anthocyanins: a review. *Food Chemistry* 113: 859-871.

**Cervantes-Paz, B.; Yahia, E.M.; Ornelas-Paz, J.J.; Gardea-Béjar, A.A.; Ibarra-Junquera, V.; Pérez-Martínez, J.D.** (2012). Effect of heat processing on the profile of pigments and antioxidant capacity of green and red Jalapeño peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 10822-10833.

**Chen, Z.; Young, T.E.; Ling, J.; Chang, S.C.; Gallie, D.R.** (2003). Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *PNAS* 100 (6): 3525-3530.

**Cheong, K.W.; Tan, C.P.; Mirhosseini, H.; Hamid, N.S.A.; Osman, A.; Basri, M.** (2010). Equilibrium headspace analysis of volatile flavour compounds extracted from soursop (*Annona muricata*) using solid phase microextraction. *Food Research* 43: 1267-1276.

**Conforti, F.; Statti, G.A.; Menichini, F.** (2007). Chemical and biological variability of hot pepper fruits (*Capsicum annuum* var. *acuminatum* L.) in relation to maturity stage. *Food Chemistry* 102: 1096-1104.

**Cremer, D.R.; Eichner, K.** (2000). Formation of volatile compounds during heating of spice paprika (*Capsicum annuum*) powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 2454-2460.

**Croteau, R.; Karp, F.** (1991). Origin of natural odorants. In: *Perfumes. Art, Science and Technology* (Muller, P.M.; Lamparsky, D., eds). London: Elsevier Applied Science. 101-126.

**Croteau, R.; Kutchan, T.M.; Lewis, N.G.** (2000). Natural products (secondary metabolites). In: *Biochemistry and molecular biology of plants* (Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R., eds). Rockville, M.D.; American Society of Plant Physiologist. 1250-1318.

**Cuevas-Glory, L.F.; Sosa-Moguel, O.; Pino, J.; Sauri-Duch, E.** (2015). GC-MS characterization of volatile compounds in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) by optimization of headspace solid-phase microextraction conditions. *Food Analytical Methods* 8: 1005-1013.

- Dardick, C.; Callahan, A.M.** (2014). Evolution of the fruit endocarp: molecular mechanisms underlying adaptations in seed protection and dispersal strategies. *Frontiers in Plant Science* 5: 284.
- Dawan, P.; Satarpai, T.; Tuchinda, P.; Shiowatana, J.; Siripinyanond, A.** (2017). A simple analytical platform based on thin-layer chromatography coupled with paper-based analytical device for determination of total capsaicinoids in chilli samples. *Talanta* 162: 460-465.
- De Silva, V.; El-Metwally, A.; Ernst, E.; Lewith, G.; Macfarlane, G.J.** (2011). Evidence for the efficacy of complementary and alternative medicines in the management of osteoarthritis: A systematic review. *Rheumatology* 50 (5): 911-920.
- Defilippi, B.G.; Manriquez, D.; Luengwilai, K.; González-Agüero, M.** (2009). Aroma volatiles: biosynthesis and mechanisms of modulation during fruit ripening. *Advances in Botanical Research* 50: 1-37.
- DellaPenna, D.; Pogson, B.J.** (2006). Vitamin synthesis in plants: Tocopherols and carotenoids. *Annual Review of Plant Biology* 57: 711-738.
- DeWitt, D.; Bosland, P.W.** (1996). *Peppers of the World: An identification Guide*, Ten Speed Press, Berkeley. 219 pp.
- DeWitt, D.; Bosland, P.W.** (2009). *The complete chile pepper book*. Timber Press, Portland, EEUU. 336 pp.
- Dhingra, D.; Bansal, Y.** (2014). Antidepressant-like activity of beta-carotene in unstressed and chronic unpredictable mild stressed mice. *Journal of Functional Foods* 7: 425-434.
- Dudareva, N.; Pichersky, E.; Gershenzon, J.** (2004). Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology* 135: 1893-1902.
- Duelund, L.; Mouritsen, O.G.** (2017). Content of capsaicinoids in chiles grown in Denmark. *Food Chemistry* 221: 913-918.
- Efrati, A.; Eyal, Y.; Paran, I.** (2005). Molecular mapping of the *Chlophyll retainer* (cl) mutation in pepper (*Capsicum* spp.) and screening for candidate genes using tomato ESTs homologous to structural genes of the chlorophyll catabolism pathway. *Genome* 48 (2): 347-351.

## Bibliografía

- Eggink, P.M.; Maliepaard, C.; Tikunov, Y.; Haanstra, J.P.W.; Bovy, A.G.; Visser, R.G.F.** (2012). A taste of sweet pepper: Volatile and non-volatile chemical composition of fresh sweet pepper (*Capsicum annuum*) in relation to sensory evaluation of taste. *Food Chemistry* 132 (1): 301-310.
- Eggink, P.M.; Tikunov, Y.; Maliepaard, C.; Haanstra, J.P.; de Rooji, H.; Vogelaar, A.; Gutteling, E.W.; Freymark, G.; Bovy, A.G.; Visser, R.G.** (2014). Capturing flavors from *Capsicum baccatum* by introgression in sweet pepper. *Theoretical and Applied Genetics* 127 (2): 373-390.
- Eich, E.** (2008). Phenylalanine-derived metabolites/phenylpropanoids. Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary metabolites biosynthesis, chemotaxonomy, biological and economic significance (A Handbook). Springer-Verlag, Berlín. 271-342.
- Eshbaugh, W.H.** (1968). A nomenclatural note on the genus *Capsicum*, *Taxon* 17: 51-52.
- Eshbaugh, W.H.** (1979). Biosystematic and evolutionary study of the *Capsicum pubescens* complex. In: National Geographic Research Reports, 1970 Projects. National Geographic, Washington, DC. 143-162.
- Eshbaugh, W.H.** (1982). Variation and evolution in *Capsicum eximium* Hunz, *Baileya* 21: 193-198.
- Espín de Gea, J.C.; Tomás-Barberán, F.** (2006). Polifenoles y salud. *Investigación y Ciencia* 356: 34-36.
- Espinosa-Torres, L.E.; Ramírez-Abarca, O.** (2016). Rentabilidad de chile manzano (*Capsicum pubescens* R y P) producido en invernadero en Texcoco, Estado de México [Profitability chile apple (*Capsicum pubescens* R y P) produced in greenhouses un Texcoco, state of Mexico]. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7 (2): 325-335.
- Estrada, B.; Pomar, F.; Díaz, J.; Merino, F.; Bernal, M.A.** (1999). Pungency level in fruits of the Padron pepper with different water supply. *Scientia Horticulturae* 81: 385-396.
- EUROSTAT.** (2019). International Trade in goods-detailed data. EU Trade since 1988 by HS 2, 4, 6 y CN8. Datos actualizados 15/01/2019. (consultado en Diciembre de 2019).

- FAO.** (2020). FAOSTAT Statistics Database.. FAO. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat> (consultado en Mayo de 2020).
- Fernández-Ronco, M.P.; Gracia, I.; Zetzl, C.; de Lucas, A.; Garcia, M.T.; Rodríguez, J.F.** (2011). Equilibrium data for the separation of oleoresin capsicum using supercritical CO<sub>2</sub>: A theoretical design of a countercurrent gas extraction column. *Journal of supercritical Fluids* [Online], 57 (1): 1-8.
- Fiedor, J.; Burda, K.** (2014). Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients* 6: 466-488.
- Gancel, A.L.; Ollitrault, P.; Froelicher, Y.; Tomi, F.; Jacquemond, C.; Luro, F.; Brillouet, J.M.** (2003). Leaf volatile compounds of seven citrus somatic tetraploid hybrids sharing willow leaf mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) as their common parent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 6006-6013.
- Gancel, A.L.; Ollitrault, P.; Froelicher, Y.; Tomi, F.; Jacquemond, C.; Luro, F.; Brillouet, J.M.** (2005). Leaf volatile compounds of six citrus somatic allotetraploid hybrids originating from various combinations of lime, lemon, citron, sweet orange, and grapefruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 2224-2230.
- Gang, D.R.** (2005). Evolution of flavors and scents. *Annual Review of Plant Biology* 56: 301-325.
- Giuffrida, D.; Dugo, P.; Torre, G.; Bignardi, C.; Cavazza, A.; Corradini, C.; Dugo, G.** (2013). Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. *Food Chemistry* 140: 794-802.
- Goepfert, S.; Poirier, Y.** (2007).  $\beta$ -oxidation in fatty acid degradation and beyond. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 245-251.
- Goff, S.A.; Klee, H.J.** (2006). Plant volatile compounds: Sensory cues for health and nutritional value. *Science* 311: 815-819.
- Gómez, E.; Ledbetter, C.A.; Hartsell, P.L.** (1993). Volatile compounds in apricot, plum, and their interspecific hybrids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 1669-1676.
- Goulet, B.E.; Roda, F.; Hopkins, R.** (2017). Hybridization in plants: old, ideas, new techniques. *Plant Physiology* 173: 65-78.

## Bibliografía

**Grassi, D.; Desideri, G.; Ferri, C.** (2010). Flavonoids: Antioxidants against atherosclerosis. *Nutrients* 2 (89): 889-902.

**Greenleaf, H.** (1986). Pepper Breeding. Edited by Mark J. Bassett. Vegetable Crops Department. University of Florida. Gainesville, Florida. AVI Publishing Company, INC, Westport, Connecticut. 69-123.

**Gurnani, N.; Gupta, M.; Mehta, D.; Mehta, B.K.** (2016). Chemical composition, total phenolic and flavonoid contents, and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of crude extracts from red chili seeds (*Capsicum frutescens* L.). *Journal of Taibah University for Science* 10 (4): 462-470.

**Guzman, I.; Hamby, S.; Romero, J.; Bosland, P.W.; O'Connell, M.A.** (2010). Variability of carotenoid biosynthesis in orange colored *Capsicum* spp. *Plant Science* 179: 49-59.

**Ha, S.H.; Kim, J.B.; Park, J.S.; Lee, S.W.; Cho, K.J.** (2007). A comparison of the carotenoid accumulation in *Capsicum* varieties that show different ripening colours: deletion of the capsanthin-capsorubin synthase gene is not a prerequisite for the formation of a yellow pepper. *Journal of Experimental Botany* 58: 3135-3144.

**Hammer, K.; Arrowsmith, N.; Gladis, T.** (2003). Agrobiodiversity with emphasis on plant genetic resources. *Naturwissenschaften* 90: 241-250.

**Heiser, C.B.** (1976). Peppers-*Capsicum* (Solanaceae). In: "Simmonds, N. W. (Ed). Evolution of Crop Plants. Longman. London". 256-268.

**Hornero-Méndez, D.; Gómez-Ladrón, R.; Minguéz-Mosquera, M.I.** (2000). Carotenoid biosynthesis changes in five red pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars during ripening. Cultivars selection for breeding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 3857-3864.

**Howard, L.R.; Smith, R.T.; Wagner, A.B.; Villalon, B.; Burns, E.E.** (1994). Provitamin A and ascorbic acid content of fresh pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.) and processed jalapeños. *Journal of Food Science* 59: 362-365.

**Howard, L.R.; Talcott, S.T.; Brenes, C.H.; Villalon, B.** (2000). Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivar as influenced by maturity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48: 1713-1720.

- Howard, L.R.; Wildman, R.E.C.** (2007). Antioxidant vitamin and phytochemical content of fresh and processed pepper fruit (*Capsicum annuum*). In: Wildman R.E.C. (Ed) Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton. 165-191.
- Huang, J.J.; Lin, S.; Xu, W.; Cheung, P.C.K.** (2017). Occurrence and Biosynthesis of carotenoids in phytoplankton. *Biotechnology Advances* 35: 597-618.
- IOM.** (2001). Vitamin A. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, cadmium and zinc. National Academy Press, Washington, DC.
- Isabelle, M.; Lee, B.L.; Lim, M.T.; Koh, W.P.; Huang, D.; Ong, C.N.** (2010). Antioxidant activity and profiles of common vegetables in Singapore. *Food Chemistry* 120 (4): 993-1003.
- Jarret, R.L.; Perkins, B.; Fan, T.; Prince, A.; Guthrie, K.; Skoczinski, B.** (2003). Using EIA to screen *Capsicum* spp. Germplasm for capsaicinoid content. *Journal of Food Composition and Analysis* 16: 189-194.
- Jeong, W.Y.; Jin, J.S.; Cho, Y.A.; Lee, J.H.; Park, S.; Jeong, S.W.; Kim, Y-H.; Lim, C-S.; El-Aty, A.M.A.; Kim, G-S.; Lee, S.J.; Shim, J-H.; Shin, S.C.** (2011). Determination of polyphenols in three *Capsicum annuum* L. (bell pepper) varieties using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Their contribution to overall antioxidant and anticancer activity. *Journal of Separation Science* 34 (21): 2967-2974.
- Johnson, E.J.; Krinsky, N.I.** (2009). Carotenoids and coronary heart disease. In: Carotenoids, Vol.5, Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (eds). Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag). 287-300.
- Ju, J.; Picinich, S.C.; Yang, Z.; Zhao, Y.; Suh, N.; Kong, A.N.; Yang, C.S.** (2010). Cancer-preventive activities of tocopherols and tocotrienols. *Carcinogenesis* 31 (4): 533-542.
- Junior, S.B.; Tavares, A.M.; Teixeira Filho, J.; Zini, C.A.; Godoy, H.T.** (2012). Analysis of the volatile compounds of Brazilian chilli peppers (*Capsicum* spp.) at two stages of maturity by solid phase micro-extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Research International* 48(1): 98-107.

## Bibliografía

**Kehie, M.; Kumaria, S.; Tandon, P.** (2012). Osmotic stress induced-capsaicin production in suspension cultures of *Capsicum chinense* Jacq. cv. Naga King Chili. *Acta Physiologiae Plantarum* 34: 2039-2044.

**Keyhaninejad, N.; Curry, J.; Romero, J.; O'Connell, M.A.** (2014). Fruit specific variability in capsaicinoid accumulation and transcription of structural and regulatory genes in *Capsicum* fruit. *Plant Science* 215-216: 59-68.

**Kim, J.S.; Ahn, J.; See, J.S.; Moon, B.; Ha, T.Y.; Kim, S.** (2011). Phytochemicals and antioxidant activity of fruits and leaves of Paprika (*Capsicum annuum* L., var *special*) cultivated in Korea. *Journal of Food Science* 76: C193-C198.

**Kim, J-S.; An, C.G.; Park, J-S.; Lim, Y.P.; Kim, S.** (2016). Carotenoid profiling from 27 types of paprika (*Capsicum annuum* L.) with different colors, shapes, and cultivation methods. *Food Chemistry* 201: 64-71.

**Kirschbaum-Titze, P.; Heipler, C.; Mueller-Seitz, E; Petz, M.** (2002). Pungency in paprika (*Capsicum annuum*). 1. Decrease of capsaicinoid content following cellular disruption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1260-1263.

**Kollmannsberger, H.; Rodríguez-Burruezo, A.; Nitz, S.; Nuez, F.** (2011). Volatile and capsaicinoid composition of aji (*Capsicum baccatum*) and rocoto (*Capsicum pubescens*), two Andean species of chili peppers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91(9): 1598-1611.

**Kraft, K.H.** (2009). The domestication of the chile pepper, *Capsicum annuum*: Genetic, ecological, and anthropogenic patterns of genetic diversity. ProQuest Dissertations and Theses.

**Kraft, K.H.; Brown, C.H.; Nabhan, G.P.; Luedelin, E.; Luna-Ruiz, J.J.; Coppens d'Eeckenbrugge, G.; Hijmans, R.J; Gepts, P.** (2014). Multiple lines of evidence for the origin of domesticated chili pepper, *Capsicum annuum*, in México. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111: 6165-6170.

**Kuklinski, C.** (2003). *Nutrición y bromatología*. Ed. Omega, S.A. 410 pp.

**Kumar, S.; Pandey, A.K.** (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal* 2013: 16.

**Laskaridou-Monnerville, A.** (1999). Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography and Its

Application to Various Species of *Capsicum*, Solanaceae. *Journal of Chromatography* 838: 293-302.

**Latham, M.C.** (2002). *Nutrición humana en el mundo en desarrollo*. Colección FAO: Alimentación y nutrición n° 29. FAO. Roma.

**Lee, Y.; Howard, L.R.; Villalón, B.** (1995). Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars. *Journal of Food Science* 60 (3): 473-476.

**Lee, J.J.; Crosby, K.M.; Pike, L.M.; Yoo, K.S.; Leskovar, D.** (2005). Impact of genetic and environmental variation on development of flavonoids and carotenoids in pepper (*Capsicum* spp.). *Scientia Horticulturae* 106: 341-352.

**Lee, Y.K.; Yuk, D.Y.; Lee, J.W.; Lee, S.Y.; Ha, T.Y.; Oh, K.W.; Yun, T.P.; Hong, J.T.** (2009). (-)-Epigallocatechin-3-gallate prevents lipopolysaccharide-induced elevation of beta-amyloid generation and memory deficiency. *Brain Research* 1250: 164-174.

**Lefebvre, V.; Kuntz, M.; Camara, B.; Palloix, A.** (1998). The capsanthin-capsorubin synthase gene: A candidate gene for the *y* locus controlling the red fruit color in pepper. *Plant Molecular Biology* 36 (5): 785-789.

**Lichtenthaler, H.K.** (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 47-65.

**Lu, M.; Ho, C.T.; Huang, Q.** (2017). Extraction, bioavailability, and bioefficacy of capsaicinoids. *Journal of Food and Drug Analysis* 25: 27-36.

**Luning, P.A.; de Rjik, T.; Wichers, H.J.; Roozen, J.P.** (1994). Gas chromatography, mass spectrometry and sniffing port analyses of volatile compounds of fresh bell peppers (*Capsicum annuum*) at different ripening stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 977-983.

**Luo, X.J.; Peng, J.; Li, Y.J.** (2011). Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *European Journal of Pharmacology* 650: 1-7.

**Lutz, D.L.; Freitas, S.C.** (2008). Valor nutricional. Ribeiro, C.S.C.; Lopes, C.A.; Carvalho, S.I.C.; Henz, G.P.; Reifschneider, F.J.B. Eds. *Pimientos Capsicum*: Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias: Brasília, Brasil. 31-38.

## Bibliografía

- MAPA.** (2020). <http://mapa.gob.es/es/estadística/temas/estadísticas-agrarias> (consultado enero 2020).
- Marín, A.; Ferreres, F.; Tomás-Barberán, F.A.; Gil, M.I.** (2004). Characterization and quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 3861-3869.
- Markus, F.; Daood, H.G.; Kapitany, J.; Biacs, P.A.** (1999). Change in the carotenoid and antioxidant content of spice red pepper (paprika) as a function of ripening and some technological factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(1): 100-107.
- Martins, D.F.; Emer, A.A.; Batisti, A.P.; Donatello, N.; Carlesso, M.G.; Mazzardo-Martins, L.; Venzke, D.; Micke, G.A.; Pizzolatti, M.G.; Piovezan, A.P.; dos Santos, A.R.** (2015). Inhalation of *Cedrus atlántica* essential oil alleviates pain behavior through activation of descending pain modulation pathways in a mouse model of postoperative pain. *Journal of Ethnopharmacology* 175: 30-38.
- Matsufuji, H.; Nakamura, H.; Chimo, M.; Takeda, M.** (1998). Antioxidant activity of capsanthin and the fatty acid esters in paprika (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 3468-3472.
- Matsui, K.** (2006). Green leaf volatiles: Hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 274-280.
- McGarvey, D.J.; Croteau, R.** (1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1015-1026.
- McLeod, M.J.; Guttman, S.I.; Eshbaugh, W.H.** (1982). Early Evolution of Chili Peppers (*Capsicum*). *Economy Botany* 36 (4): 361-368.
- Meckelmann, W.S.; Jansen, C.; Riegel, W.D.; Zonneveld, M.; Rios, L.; Peña, K.; Mueller-Seitz, E.** (2015). Phytochemicals in native Peruvian *Capsicum pubescens* (Rocoto). *European Food Research and Technology* 241 (6): 817-825.
- Medina-Lara, F.; Echevarria-Machado, I.; Pacheco-Arjona, R.; Ruiz-Lau, N.; Guzman-Antonio, M.E.M.** (2008). Influence of nitrogen and potassium fertilization on fruiting and capsaicin content in Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *HortScience* 43 (5): 1549-1554.
- Metsalu, T.; Vilo, J.** (2015). ClustVis: A web tool for visualizing clustering of multivariate data using principal component analysis and heatmap. *Nucleic Acids Research* 43: W566-W570.

- Minguez-Mosquera, M.I.; Hornero-Mendez, D.** (1993). Separation and quantification of the carotenoid pigments in red peppers (*Capsicum annuum* L.), paprika, and oleoresin by reversed-phased HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41 (10): 1616-1620.
- Modzelewska, A.; Sur, S.; Kumar, S.K.; Khan, S.R.** (2005). Sesquiterpens: natural products that decrease cáncer growth. *Current Medicinal Chemistry* 5: 477-499.
- Moing, A.; Aharoni, A.; Biais, B.; Rogachev, I.; Meir, S.; Brodsky, L.; Allwood, J.W.; Erban, A.; Dunn, W.B.; Kay, L.; de Koning, S.; de Vos, R.C.H.; Jonker, H.; Mumm, R.; Deborde, C.; Maucourt, M.; Bernillon, S.; Gibon, Y.; Hansen, T.H.; Husted, S.; Goodacre, R.; Kopka, J.; Schjoerring, J.K.; Rolin, D; Hall, R.D.** (2011). Extensive metabolic cross-talk in melón fruit revealed by spatial and developmental combinatorial metabolomics. *New Phytologist* 190: 683-696.
- Monforte-Gonzalez, M.; Guzman-Antonio, A.; Uuh-Chim, F.; Vazquez-Flota, F.** (2010). Capsaicin accumulation is related to nitrate content in placentas of Habanero peppers (*Capsicum chinense* Jacq.). *Journal of the Science of Food and Agricultural* 90: 764-768.
- Morales-Soriano, E.; Kebede, B.T.; Ugás, R.; Grauwet, T.; Van Loey, A.; Hendrickx, M.** (2018). Flavor characterization of nativo Peruvian chili peppers throught integrated aroma fingerprinting and pungency profiling. *Food Research International* 109: 250-259.
- Moreno-Peris, E.; Fita, A.; González-Mas, M.C.; Rodríguez-Burruezo, A.** (2012). HS-SPME study of the volatile fraction of *Capsicum* accessions and hybrids in diffrent parts of the fruit. *Scientia Horticulturae* 135: 87-97.
- Müller, L.; Fröhlich, K.; Böhm, V.** (2011). Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (aTEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry* 129: 139-148.
- Namesny, A.** (2006). Pimientos. 2ª edición. *Compendios de Horticultura* 16. Ediciones de hosticultura, S.L. Reus. España. 254 pp.

## Bibliografia

**National Academy of Science.** (1982). Diet nutrition and cáncer. En: C. Grobstein (Chairman). A report by the Comitee on Diet, Nutrition, and Cancer, Commision On Lufe Sciences. National Academy Press, Washington, D.C. 496 pp.

**Nickels, J.** (2015). Jak pěstovat chili. Průvodce domácím pěstováním chilli papriček. Plzeň: Jason Nickels-Krejčík Josef. 112 pp.

**Niranjana, R.; Gayathri, R.; Mol, S.N.; Sugawara, T.; Hirata, T.; Miyashita, K.; Ganesan, P.** (2015). Carotenoids modulate the hallmarks of cáncer cells. Journal of Functional Foods 18: 968-985.

**Nisar, N; Li, L.; Lu, S.; Khin, N.C.; Pogson, B.J.** (2015). Carotenoid Metabolism in Plants. Molecular Plant 8: 68-82.

**Nishino, H.; Tokuda, H.; Satomi, Y.; Masuda, M.; Bu, P.; Onozuka, M.; Yamaguchi, S.; Okuda, Y.; Takayasu, J.; Tsuruta, J.; Okuda, M.; Ichiishi, E. Murakoshi, M.; Kato, T.; Misawa, N.; Narisawa, T.; Takasuka, N.; Yano, M.** (1999). Cancer prevention by carotenoids. Pure and Applied Chemistry 71 (12): 2273-2278.

**Nuez, F.; Gil-Ortega, R.; Costa, J.** (2003). El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Mundi-Prensa, Madrid. 607 pp.

**Olguín-Rojas, J.A.; Fayos, O.; Vázquez-León, L.A.; Ferreiro-González, M.; Rodríguez-Jimenes, G.C.; Palma, M.; Garcés-Claver, A.; Barbero, G.F.** (2019). Progression of the Total and Individual Capsaicinoids Content in the Fruits of Three Different Cultivars of *Capsicum chinense* Jacq. Agronomy 9 (3): 141.

**Orzáez, D; Granell, A.** (2009). Reverse genetics and transient gene expression in fleshy fruits: Overcoming plant stable transformation. Plant signaling & behavior 4: 864-867.

**Osuna-García, J.A.; Wall, M.M.; Waddell, C.A.** (1998). Endogenous levels of tocopherols and ascorbic acid during fruit ripening of New Mexican-Type chile (*Capsicum annuum* L.) cultivars. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46 (12): 5093-5096.

**Paillard, N.M.M.** (1990). The flavour of apples, pears and quinces. In: Morton, L.D.; MacLeod, A.J., editors. Food Flavours, Part C: The flavour of fruits. Elsevier Science Publishing Company Inc.; Amsterdam, The Netherlands. 1-41.

- Palevitch, D. y Craker, L.E.** (1995). Nutritional and medical importance of red pepper (*Capsicum* spp.). *Journal Herbs Spices Medicinal Plants* 3(2): 55-83.
- Panche, A.N.; Diwan, A.D.; Chandra, S.R.** (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science* 5: 1-15.
- 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): 3481-3852.
- Park, S.; Jeong, W.Y.; Lee, J.H.; Kim, Y.H.; Jeong, S.W.; Kim, G.S.; Bae, D.W.; Lim, C.S.; Jin, J.S.; Lee, J.S.; Shin, S.C.** (2012). Determination of polyphenol levels variation in *Capsicum annuum* L. Cv. Chelsea (yellow bell pepper) infected by anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 130: 981-985.
- Patel, K.; Ruiz, C.; Calderon, R.; Marcelo, M.; Rojas, R.** (2016). Characterization of volatile profiles in 50 native Peruvian chili pepper using solid phase microextraction-gas chromatography mass spectrometry (SPME-GCMS). *Food Research International* 89: 471-475.
- Peralta, G.** (2007). Determinación del nivel de pungencia en Unidades Scoville para *Capsicum annuum* var. aviculare procedente de Regiones Productoras de Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Pereira-Días, L.; Vilanova, S.; Fita, A.; Prohens, J.; Rodríguez-Burruezo, A.** (2019). Genetic diversity, population structure, and relationships in a collection of pepper (*Capsicum* spp.) landraces from the Spanish centre of diversity revealed by genotyping-by-sequencing (GBS). *Journal of Horticultural Research* 6: 54.
- Pérez Ríos, M.; Ruano, A.** (2004). Vitaminas y salud. *Offarm*. vol 23, núm 8. 96-106.
- Peyrot des Gachons, C.; Leeuwen, C.V.; Tominaga, T.; Soyer, J.P.; Gaudillere, J.P.; Denis, D.** (2005). Influence of water and nitrogen deficit on fruit ripening and aroma potential of *Vitis vinifera* L. cv Sauvignon blanc in field conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 73-85.
- Pichersky, E.; Gershenzon, J.** (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 237-243.

## Bibliografía

**Pichersky, E.; Noel, J.P.; Dudareva, N.** (2006). Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science* 311: 808-811.

**Pickersgill, B.** (1988). The genus *Capsicum* a multidisciplinary approach to the taxonomy of cultivated and wild plants. *Biol. Zent. BI.* 107: 381-389.

**Pinheiro, T.T.; Peres, L.E.P.; Purgatto, E.; Latado, R.R.; Maniero, R.A.; Martins, M.M.; Figueira, A.** (2019). *Citrus* carotenoid isomerase gene characterization by complementation of the "Micro-Tom" tangerine mutant. *Plant Cell Reports* 38: 623-636.

**Pino, J.; Sauri-Duch, E.; Marbot, R.** (2006). Changes in volatile compounds of Habanero chile pepper (*Capsicum chinense* Jacq. cv. Habanero) at two ripening stages. *Food Chemistry* 94: 394-398.

**Pino, J.; González, M.; Ceballos, L.; Centurion-Yah, A.R.; Trujillo-Aguirre, J.; Latourniere-Moreno, L.; Sauri-Duch, E.** (2007). Characterization of total capsaicinoids, colour and volatile compounds of Habanero chilli pepper (*Capsicum chinense* Jack.) cultivars grown in Yucatan. *Food Chemistry* 104: 1682-1686.

**Pordesimo, L.O.; Li, H.; Lee, J.H.; Reddick, B.B.** (2004). Effects of drying procedure, cultivar, and harvest number on capsaicin levels in dried Jalapeno Peppers. *Applied Engineering in Agriculture* 20 (1): 35-38.

**Prasad, B.C.N.; Kumar, V.; Gururaj, H.B.; Parimalan, R.; Giridhar, P.; Ravishankar, G.A.** (2008). Characterization of capsaicin synthase and identification of its gene (*csy1*) for pungency factor capsaicin in pepper (*Capsicum* sp.). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (51): 20558.

**Raigón, M.D.** (2007). *Alimentos ecológicos, calidad y salud*. Ed. Junta de Andalucía y SEAE. 197 pp.

**Rambla, J.L.; Tikunov, Y.M.; Monforte, A.J.; Bovy, A.G.; Granell, A.** (2014). The expanded tomato fruit volatile landscape. *Journal of Experimental Botany* 65: 4613-4623.

**Ravishankar, G.A.; Suresh, B. Giridhar, P.; Rao, S.R.; Johnson, T.S.** (2003). Biotechnology studies on *Capsicum* for metabolite production and plant improvement. In: De AK (ed) *Capsicum: The genus Capsicum*, vol. 33. Medicinal And Aromatic Plants-Industrial Profiles. Taylor & Francis, Ltd., London. 96-128.

- Reifschneider, F.J.B.; Ribeiro, C.S.C.** (2008). Cultivo. In: Ribeiro, C.S.C.; Lopes, C.A.; Carvalho, S.I.C.; Henz, G.P.; Reifschneider, F.B.J. (eds). *Pimientos-Capsicum*. Brasília: Embrapa Hortaliças. 11-14.
- Reineccius, G.** (2006). *Flavour chemistry and technology*. 2nd ed. CRC Press; Boca Raton, FL, USA. 465 pp.
- 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, e0207888.
- Rodríguez-Burruezo, A.; Kollmannsberger, H.; Prohens, J.; Nitz, S.; Nuez, F.** (2004). Analysis of the volatile aroma constituents of parental and hybrid clones of pepino (*Solanum muricatum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 5663-5669.
- Rodríguez-Burruezo, A.; Nuez, F.** (2006). Mejora de la calidad en el pimiento. En: Llacer, G.; Diez, M.J.; Carrillo, J.M.; Badenes, M.L. (eds). *Mejora genética de la calidad de plantas*. Servicio de publicaciones de la Universidad Politécnica de Valencia. 361-381.
- Rodríguez-Burruezo, A.; González-Mas, M.C.; Nuez, F.** (2010a). Carotenoid composition and vitamin A value in ají (*Capsicum baccatum* L.) and rocoto (*C. pubescens* R. & P.), two pepper species from Andean Region. *Journal of Food Science* 75 (8): S446-S453.
- Rodríguez-Burruezo, A.; Kollmannsberger, H.; González-Mas, M.C.; Nitz, D.; Nuez, F.** (2010b). HS-SPME comparative analysis of genotypic diversity in volatile fraction and aroma contributing compounds of *Capsicum* fruits from the *annuum-chinense-frutescens* complex. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 4388-4400.
- Rodríguez-Burruezo, A.; Pereira-Dias, L.; Fita, A.** (2016). Cap 21. Pimiento. En: *Las variedades locales en la mejora genética de plantas* (Eds. Ruiz de Galarreta, J.I.; Prohens, J.; Tierno, R.). Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco, Vitoria. 405-426.

## Bibliografía

**Rodríguez-Concepción, M.; Boronat, A.** (2002). Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiology* 130: 1079-1089.

**Rohdich, F.; Hecht, S.; Gärtner, K.; Adam, P.; Krieger, C.; Amslinger, S.; Arigoni, D.; Bacher, A.; Eisenreich, W.** (2002). Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: metabolic role of IspH (LytB) protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 1158-1163.

**Rohmer, M.** (2003). Mevalonate-independent methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis: elucidation and distributios. *Pure and Applied Chemistry* 75: 375-388.

**Rosati, C.; Diretto, G.; Giuliano, G.** (2009). Biosynthesis and engineering of carotenoids and apocarotenoids in plants: state of the art and future prospects. *Biotechnology & Genetic Engineering Review* 26: 151-174.

**Rothan, C.; Diouf, I.; Causse, M.** (2019). Trait discovery and editing in tomato. *The Plant Journal* 97: 73-90.

**Rubio, A.; Rambla, J.L. ; Santaella, M.; Gomez, M.D.; Orzaez, D.; Granell, A.; Gomez-Gomez, L.** (2008). Cytosolic and plastoglobule-targeted carotenoid dioxygenases from *Crocus sativus* are both involved in beta ionone release. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 24816-24825.

**Ruiz, H.** (1952). Relación histórica del viaje que hizo a los reinos de Perú y Chile el botánico D. Hipólito Ruiz en el año 1777 hasta 1788, en cuya época regresó a Madrid. Vol I. Rela Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Madrid, España.

**Saha, S.; Walia, S.; Kundu, A.; Kaur, C.; Singh, J.; Sisodia, R.** (2015). Capsaicinoids, Tocopherol, and Sterols Content in Chili (*Capsicum* sp.) by Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Determination. *International Journal of Food Properties* 18: 1535-1545.

**Sánchez-Sánchez, H.; González-Hernández, V.A.; Cruz-Pérez, A.B.; Pérez-Grajales, M.; Gutiérrez-Espinosa, M.A.; Gardea-Béjar, A.A.; Gómez-Lim, M.A.** (2010). Herencia de capsaicinoides en chile Manzano (*Capsicum pubescens* R. Y P.). *Agrociencia* 44 (6): 656-665.

- Sanz, C.; Olias, J.M.; Perez, A.G.** (1997). *Phytochemistry of fruit and vegetables*. Oxford University Press Inc.; New York, NY, USA. *Aroma Biochemistry of fruits and vegetables*. 125-155.
- Schreier, P.** (1984). *Chromatographic studies of biogénesis of plant volátiles*. Alfred Hüthing Verlag GmbH; Heidelberg, Germany. 171 pp.
- Schulze, B.; Spitteller, D.** (2009). Capsaicin: Tailored chemical defence against unwanted “Frugivores”. *Chembiochem* 10 (3): 428-429.
- Schwab, W.; Schreier, P.** (2002). Enzymic formation of flavor volátiles from lipids. In: Kuo, T.M.; Gardner, H.W., editors. *Lipid Biotechnology*. Marcel Dekker; New York, NY, USA. 293-318.
- Schwab, W.; Davidovich-Rikanati, R.; Lewinsohn, E.** (2008). Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal* 54: 712-732.
- Scott-Moncrieff, C.** (2000). *El libro de las vitaminas*. Ediciones B, S.A. 144 pp.
- Scoville, W.L.** (1912). Note on *Capsicums*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1(5): 453-454.
- Seddon, M.J.; Ajan, U.A.; Sperduto, R.D.; iller, R.; Blair, N.; Burton, T.C.; Farber, M.D.; Gragoudas, E.S.; Hallo, J.; Miller, D.T.** (1994). Dietary carotenoids, vitamina A, C y E, and advanced age-related macular degeneration. Eye disease case-control study group. *The Journal of the American Medical Association* 272 (18): 1413-1420.
- Segura, C.M.R.; Ramirez, G.K.; Moguel, O.Y.; Betancur, A.D.** (2013). Polyphenols, ascorbic acid and carotenoids contents and antioxidant properties of habanero pepper (*Capsicum chinense*) fruit. *Food and Nutrition Sciences* 4: 47-54.
- Shim, J.H.; Ko, A.Y.; Rahman, M.M.; El-Aty, A.A.; Jang, J.; Choi, J.H. Mamun, M.I.R.** (2014). Identification of volatile organic compounds generated from healthy and infected powdered chili using solvent-free solid injection coupled with GC/MS: application to adulteration. *Food Chemistry* 156: 326-332.
- Simian, H.; Robert, F.; Blank, I.** (2004). Identification and synthesis of 2-heptanethiol, a new flavor compound found in bell peppers. *Journal of Agricultural and Foes Chemistry* 52: 306-310.

## Bibliografía

- Simkin, A.J.; Schwartz, S.H.; Aldridge, M.; Taylor, M.G.; Klee, H.J.** (2004a). The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles beta-ionone, pseudoionone and geranylacetone. *The plant Journal* 40: 882-892.
- Simkin, A.J.; Underwood, B.A.; Aldridge, M.; Loucas, H.M.; Shibuya, K.; Schmelz, E.; Clark, D.G.; Klee, H.J.** (2004b). Circadian regulation of the *PhCCD1* carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of beta-ionone, a fragrance volatile of petunia flowers. *Plant Physiology* 136: 3504-3514.
- Simonne A.H.; Simonne, E.H., Eitenmiller, R.R.; Mills, H.A.; Green, N.R.** (1997). Ascorbic acid and provitamin A contents in unusually colored bell peppers (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Food Composition and Analysis* 10 (4): 299-311.
- Simpson, K.L.; Chichester, C.O.** (1981). Metabolism and nutritional significance of carotenoids. *Annual Review of Nutrition* 1 (1): 351-374.
- Singletary, K.** (2011). Red pepper: Overview of potential health benefits. *Nutrition Today* 46 (1): 33-47.
- Song, J.; Forney, C.F.** (2008). Flavour volatile production and regulation in fruit. *Canadian Journal of Plant Science* 88: 537-550.
- Sosa-Moguel, O.; Pino, J.A.; Ayora-Talavera, G.; Sauri-Duch, E.; Cuevas-Glory, L.** (2017). Biological activities of volatile extracts from two varieties of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *International Journal of Food Properties* 20: sup3, S3042-S3051.
- Stahl, W.; Sies, H.** (2005). Bioactivity and protective effects of natural carotenoids (Carotenoids and Dietary Lipids). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Molecular Basis of Disease* 1740 (2): 101-107.
- Stumpe, M.; Feussner, I.** (2006). Formation of oxylipins by CYP74 enzymes. *Phytochemistry Reviews* 5: 347-357.
- Sun, T.; Yuan, H.; Cao, H.; Yazdani, M.; Tadmor, Y. y Li, L.** (2018a). Carotenoid Metabolism in Plants: The Role of Plastids. *Molecular Plant* 11: 58-74.
- Sun, J.Y.; Gao, J.L.; Yu, X.F.; Liu, J.; Su, Z.J.; Feng, Y.; Wang, D.** (2018b). Combining ability of sixteen USA maize inbred lines and their outbreeding prospects in China. *Agronomy* 8: 281.

- Taiti, C.; Costa, C.; Menesatti, P.; Comparini, D.; Bazihizina, N.; Azzarello, E.; Masi, E.; Mancuso, S.** (2015). Class-modeling approach to PTR-TOFMS data: a peppers case study. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95(8): 1757-1763.
- Takahashi, M.; Arakaki, M.; Yonamine, K.; Hashimoto, F.; Takara, K.; Wada, K.** (2018). Influence of fruit ripening on color, organic acid contents, capsaicinoids, aroma compounds, and antioxidant capacity of Shimatogarashi (*Capsicum frutescens*). *Journal of Oleo Science* 67(1): 113-123.
- Taylor, L.P.; Grotewold, E.** (2005). Flavonoids as developmental regulators. *Current Opinion in Plant Biology* 8(3): 317-323.
- Teodoro, A.; Alves, R.; Ribeiro, I.; Reis, K.; Reifschneider, F.; Fonseca, M.E.N.; Silva, J.P.; Agostini-Costa, T.S.** (2013). Vitamin C content in Habanero pepper accessions (*Capsicum chinense*). *Horticultura Brasileira* 31: 59-62.
- Topuz, A.; Ozdemir, F.** (2007). Assessment of carotenoids: capsaicinoids and ascorbic acid composition of some selected pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.) grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis* 20: 596-602.
- Tressl, R.; Albrecht, W.** (1986). Biogenesis of aroma compounds through acyl pathways. In: Parliament T.H.; Croteau, R., editors. *Biogenesis of aromas*. ACS; Washington, DC, USA. 114-133.
- Tucker, G.A.** (1993). Introduction. In: Seymour, G.B.; Taylor, R.J.E.; Tucker, G.A., editors. *Biochemistry of Fruit Ripening*. Chapman & Hall; London, UK. 1-51.
- Vera-Guzmán, A.M.; Chávez-Servia, J.L.; Carrillo-Rodríguez, J.C.; López, G.M.** (2011). Phytochemical evaluation of wild and cultivated pepper (*Capsicum annuum* L. and *C. pubescens* Ruiz & Pav.) from Oaxaca, México. *Chilean Journal of Agricultural Research* 71 (4): 578-585.
- Vera-Guzmán, A.M.; Aquino-Bolaños, E.N.; Heredia-García, E.; Carrillo-Rodríguez, J.C.; Hernández-Delgado, S.; Chávez-Servia, J.L.** (2017). Flavonoid and capsaicinoid contents and consumption of mexican chili pepper (*Capsicum annuum* L.) landraces. In: Gonçalo CJ (Ed). *Flavonoids-from biosynthesis to human health*. In TechOpen, London. 405-437.
- Wahyuni, Y.; Ballester, A.R.; Sudarmonowati, E.; Bino, R.J.; Bovy, A. G.** (2011). Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions:

## Bibliografía

variation in health-related compounds and implications for breeding. *Phytochemistry*, 72(11-12): 1358-1370.

**Wahyuni, Y.; Ballester, A.R.; Sudarmonowati, E.; Bino, R.J.; Bovy, G.A.** (2013). Secondary metabolites of *Capsicum* species and their importance in the human diet. *Journal of Natural Products* 76: 783-793.

**Wang, X.D.** (1994). Review: adsorption and metabolism of beta-carotene. *Journal of the American College of Nutrition* 13: 314-315.

**Wang, L.; Qian, C.; Bai, J.; Luo, W.; Jin, C.; Yu, Z.** (2018). Difference in volatile composition between the pericarp tissue and inner tissue of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit. *Journal of Food Processing and Preservation* 42: 13387.

**Winterhalter, P.; Rouseff, R.L.** (2002). Carotenoid-derived aroma compounds: An introduction. In: Winterhalter, P.; Rouseff, R.L., editors. *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*. American Chemical Society; Washington, DC, USA. 1-17.

**Zacharian, T.J.; Gobinath, P.** (2008). Paprika and chilli. In: Parthasarathy, V.A.; Chempakam, B.; Zacharian, T.J. (eds) *Chemistry of Spices*. CAB International, London UK. 260-286.

**Zapata, M.; Bañón, S.; Cabrera, P.** (1992). *El pimiento para pimentón*. Mundi-Prensa, Madrid. 240 pp.

**Ziegler, R.G. Mason, T.J.; Stenhagen, A.; Hoover, R.; Schoenberg, J.B.; Gridley, G.; Virgo, P.W.; Fraumeri, L.P.** (1986). Carotenoid intake, vegetables and the risk of lung cancer among with men in New Jersey. *American Journal of Epidemiology* 123: 1080-1093.

**Zimmermann, M.; Schieberle, P.** (2000). Important odorants of sweet bell pepper powder (*Capsicum annuum* cv. *annuum*): differences between samples of Hungarian and Moroccan origin. *European Food Research and Technology* 211: 175-180.