

# CAPSAICINOIDES EN CHILES NATIVOS DE PUEBLA, MÉXICO

## CAPSAICINOIDS IN CHILE PEPPER LANDRACES OF PUEBLA, MEXICO

S. Hirán Morán-Bañuelos<sup>1\*</sup>, V. Heber Aguilar-Rincón<sup>1</sup>, Tarsicio Corona-Torres<sup>1</sup>, Fernando Castillo-González<sup>1</sup>,  
R. Marcos Soto-Hernández<sup>2</sup> y Rubén San Miguel-Chávez<sup>2</sup>

Genética<sup>1</sup> y Botánica<sup>2</sup>. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (shiran@colpos.mx)

### RESUMEN

Los recursos genéticos del chile (*Capsicum* spp.) son importantes por ser la fuente natural de capsaicinoides que confieren el sabor picante a los frutos. Los reportes sobre la amplitud de esta característica en los chiles nativos cultivados por agricultores tradicionales en México son escasos. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue identificar y cuantificar los capsaicinoides predominantes en 22 poblaciones recolectadas en nueve municipios de Puebla, México, mediante la extracción de la oleoresina de frutos secos. Todos los chiles estudiados pertenecen a la especie *C. annuum* y son de los tipos Miahuateco, Copi, Nativos de Tecamatlán y Poblano. Los contenidos de capsaicina y dihidrocapsaicina en los extractos filtrados fueron determinados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC): el de capsaicina fue mayor que el de dihidrocapsaicina, excepto en dos recolectas de los Municipios de Tlacotepec y Texmelucan. El contenido de capsaicinoides varió entre y dentro de los tipos de chile. En el tipo Copi el contenido de capsaicina de chile seco varió de 36.86 a 556.78  $\mu\text{g g}^{-1}$  y el de dihidrocapsaicina de 30.54 a 348.26  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; de chile seco en el tipo Miahuateco fue 21.54 a 158.07  $\mu\text{g g}^{-1}$  y 19.54 a 99.24  $\mu\text{g g}^{-1}$ . La colecta de chile Copi CP654cl, proveniente de Xochitlán, tuvo los valores mayores para ambos alcaloides. Se puede concluir que hay materiales con potencial para seleccionar hacia distintos grados de picor.

**Palabras clave:** *Capsicum annuum*, capsaicina, chile Copi, chile Miahuateco, dihidrocapsaicina, nativos de Tecamatlán.

### INTRODUCCIÓN

Los frutos de chile (*Capsicum* spp.) son relevantes en la alimentación humana y se consumen en fresco y como condimento. La planta sintetiza y acumula capsaicinoides, un grupo de alcaloides responsables del picor y ubicados principalmente en el tejido de la placenta adyacente a las semillas (De, 2003; Ben-Chaim *et al.*, 2006). Su contenido depende del genotipo, la madurez del fruto

### ABSTRACT

The genetic resources of pepper (*Capsicum* spp.) are important because they are the natural source of capsaicinoids that confer hotness to its fruits. There is little information about the magnitude of this characteristic in native peppers grown by traditional agriculture in México. Therefore, the objective of this study was to identify and quantify the predominant capsaicinoids in 22 pepper populations collected in nine municipalities of the State of Puebla, México, using oleoresin extraction from dry pepper fruits. All peppers studied belong to the species *C. annuum* and are of the following types: Miahuateco, Copi, Natives of Tecamatlán and Poblano. Capsaicin and dihydrocapsaicin contents in filtered extracts were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Capsaicin content was greater than dihydrocapsaicin content, except in two samples from Tlacotepec and Texmelucan municipalities. Capsaicinoid concentration varied among and within pepper types. In Copi peppers capsaicin concentration ranged from 36.86 to 556.78  $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight, and dihydrocapsaicin concentration ranged from 30.54 to 348.26  $\mu\text{g g}^{-1}$ . The range of capsaicin and dihydrocapsaicin concentration in Miahuateco peppers was 21.54 to 158.07  $\mu\text{g g}^{-1}$  and 19.54 to 99.24  $\mu\text{g g}^{-1}$ . The Copi pepper CP654cl collected from Xochitlán had the greatest values for both alkaloids. It may be concluded that there are peppers with the potential to select for different grades of hotness.

**Key words:** *Capsicum annuum*, capsaicin, Copi pepper, Miahuateco pepper, dihydrocapsaicin, native Tecamatlán pepper.

### INTRODUCTION

Chile peppers (*Capsicum* spp.) are important in the human diet and are consumed both fresh and as seasoning. The plant synthesizes and accumulates capsaicinoids, a group of alkaloids responsible for the hot or spicy flavor, which are located primarily in the tissue of the placenta adjacent to the seeds (De, 2003; Ben-Chaim *et al.*, 2006). Their concentration depends on the genotype, fruit maturity, and cultivation conditions (Zewdie and Bosland, 2000). The main capsaicinoids are nornorcapsaicin, norcapsaicin, capsaicin, homocapsaicin,

\* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Enero, 2008. Aprobado: Julio, 2008.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 42: 807-816. 2008.

y las condiciones de cultivo (Zewdie y Bosland, 2000). Los principales capsaicinoides son nornorcapsaicina, norcapsaicina, capsaicina, homocapsaicina, nornordihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, dihidrocapsaicina, y homodihidrocapsaicina. La capsaicina (CAP, N-[(4-hidroxi-3-metoxifenil)methyl]-8-metil(-6-nonenamida) y la dihidrocapsaicina (DH, N-[(4-hidroxi-3-metoxifenil)methyl]-8-metilnonanamida) son los responsables de más de 90 % del picor (Betts, 1999; Manirakiza *et al.*, 2003).

Los capsaicinoides también poseen propiedades analgésicas, anti-inflamatorias, antioxidantes e incluso anticancerígenas al inhibir el crecimiento dependiente de andrógenos en células cancerígenas de seno, colon, adenocarcinoma gástrico y de próstata (Djamgoz e Isbilen, 2006; Mori *et al.*, 2006). El potencial de los chiles como fuentes de capsaicinoides en la industria farmacéutica ha promovido su estudio fitoquímico. La investigación se ha enfocado a variedades mejoradas de tipos de chile (Sathiyamurthy *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2003), en especial de tipo habanero (*C. chinense* Jacq.) por su mayor contenido de alcaloides. En la variedad Red Savina Habanero hay 577 000 Unidades Scoville de Picor (USP), y recientemente se ha identificado a la variedad Naga Jolokia (*C. chinense*) de India como la más picante, con más de 1 000 000 USP (Frontal Agritech, 2007). No obstante, es probable que en el área de origen y domesticación de esta especie exista una mayor amplitud y variabilidad en la concentración de capsaicinas, aunque hay pocos estudios al respecto.

En el Estado de Yucatán, México, el contenido de capsaicinoides en los morfotipos de chile nativos de las especies *C. chinense* y *C. annuum* varía de 1000 a más de 235 000 USP (Alpizar *et al.*, 2002; Cázares *et al.*, 2005; Casanova *et al.*, 2006). Tal variación estaría determinada por el genotipo, las condiciones climáticas y las prácticas de cultivo en cada localidad, asociadas a su vez con la selección, multiplicación e intercambio tradicional de semillas, así como con el uso culinario de cada tipo de chile, pues los consumidores identifican características organolépticas específicas.

En México, los tipos de chile más sembrados son los serranos, de árbol, jalapeños, guajillos pasilla, anchos, piquines, habanero y manzano (Laborde y Pozo, 1984; Hernández *et al.*, 1999). Sin embargo, se desconoce la distribución geográfica precisa y no se ha estudiado la diversidad genética de un conjunto de chiles nativos. En el Estado de Puebla, Aguilar *et al.* (2006) encontraron que entre Miahuatlán y Tecamachalco predomina el cultivo de chile con riego y de diversos orígenes, debido al flujo de germoplasma en la etapa de almácigo, e identificaron variedades de chile ancho de tipo Miahuateco que se diferencian del tipo Poblano

nornordihidrocapsaicin, nordihidrocapsaicin, dihidrocapsaicin, and homodihidrocapsaicin. Capsaicin (CAP, N-[(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)methyl]-8-methyl-non-6-enamide) and dihydrocapsaicin (DH, N-[(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)methyl]-8-methyl-nonanamide) are responsible for greater than 90% of the hotness (Betts, 1999; Manirakiza *et al.*, 2003).

Capsaicinoids also have analgesic, anti-inflammatory, and antioxidant properties, including anticarcinogenic properties that inhibit androgen-dependent growth of breast, colon, gastric adenocarcinoma, and prostate cancer cells (Djamgoz and Isbilen, 2006; Mori *et al.*, 2006). The potential for peppers as a source of capsaicinoids in the pharmaceutical industry has advanced its biochemical analysis. Investigation has focused on improved varieties of pepper (Sathiyamurthy *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2003), particularly habanero pepper (*C. chinense* Jacq.), due to its high alkaloid concentration. The variety Red Savina Habanero registers 577 000 Scoville Heat Units (SHU). The variety Naga Jolokia (*C. chinense*) from India has recently been identified as the hottest pepper with an SHU rating of greater than 1 000 000 (Frontal Agritech, 2007). However, it is likely that within the region of origin and domestication of *C. annuum* there is a greater range and variability of capsaicin concentration, although there are few studies addressing this.

Capsaicinoid contents in native pepper morphotypes of *C. chinense* and *C. annuum* from Yucatán State, México, range from 1000 SHU to greater than 235 000 SHU (Alpizar *et al.*, 2002; Cázares *et al.*, 2005; Casanova *et al.*, 2006). This variation would be determined by genotype, climatic conditions, and cultivation practices in each location, which are in turn associated with traditional seed selection, multiplication, and traditional exchange of seeds, as well as in the culinary use of each pepper type, as consumers identify specific organoleptic characteristics.

The pepper types most commonly grown in México are serrano, árbol, jalapeño, guajillos, pasilla, anchos, piquines, habanero and manzano (Laborde and Pozo, 1984; Hernández *et al.*, 1999). However, exact geographic distributions are not known, and the genetic diversity of a set of native peppers has not been investigated. Aguilar *et al.* (2006) found that in Puebla State, pepper cultivation between Miahuatlán and Tecamachalco predominated under irrigation, with material originating from diverse sources due to the exchange of germplasm during seedbed preparation. These authors identified varieties of the Miahuateco type of Ancho pepper that differed from Poblano pepper in having narrower fruit with a less marked depression at the pedicel attachment, as well as the Copi type with an elongated shape used in dry form for salsa

por tener frutos más angostos y con cajete menos acentuado; además, el tipo Copi, de forma alargada se usa seco para preparar salsas. En Tecamatlán, Puebla, se cultivan en temporal y en terrenos pedregosos de baja profundidad, tres tipos de chile que por el color del fruto maduro se identifican como amarillo, colorado y negro. Cada uno de estos tipos de chile son ingredientes esenciales de platillos tradicionales locales y aunque se les reconoce por sus diferencias en sabor y picor, no se ha realizado un estudio fitoquímico con materiales nativos que permita su clasificación, ya que las escalas disponibles han sido desarrolladas en otros países. Así, tipos de chile como el Ancho se ubican en el mismo nivel, aunque en México hay una amplia diversidad que no está reflejada en esas escalas. La comercialización de los tipos de chile se efectúa sin considerar los grados de picor. Por tanto, incluir este atributo permitiría generar variedades con valor agregado por sus características específicas de picor, dirigidas a diferentes necesidades de mercado.

En 1912 se estableció la escala de picor en USP, basada en diluciones de extractos de diversos chiles (Ishikawa, 2003) y métodos analíticos como la espectrofotometría y cromatografía de gases. Además, con la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) los análisis del tipo y cantidad de estos alcaloides son más precisos (Collins *et al.*, 1995; Karnka *et al.*, 2002; Kurian y Starks, 2002) para evaluar capsaicinoides. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue identificar y cuantificar capsaicina y dihidrocapsaicina de 22 tipos de chile nativo cultivados en el Estado de Puebla.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

En 2005, en Montecillo, Texcoco, se establecieron en invernadero 22 poblaciones de chile nativo de la especie *C. annuum* L. procedentes de nueve municipios del Estado de Puebla, México, recolectadas en 2004 (Cuadro 1). Quince fueron de tipo Miahuateco, tres de Copi, tres nativos de Tecamatlán (Amarillo, Colorado y Negro) y una de chile Mulato (Aguilar *et al.*, 2006). Los frutos se cosecharon en estado de madurez y se secaron a temperatura ambiente.

### Extracción de capsaicinoides

El pericarpio y la placenta de 10 frutos de diferentes plantas de cada colecta se mezcló, pulverizó y homogeneizó usando N<sub>2</sub>. El polvo total se almacenó en oscuridad hasta su análisis. Se hicieron dos extracciones por colecta y en cada una se depositó 0.5 g de chile pulverizado y 5 mL de acetonitrilo grado HPLC en tubos de vidrio. Los tubos estuvieron 5 h en baño de agua a 60 °C, agitando por duplicado una alícuota de 2 mL, a través de acrodiscos de 25 mm de

preparación. Three pepper types are produced in season in Tecamatlán, Puebla State, on shallow, stony soils and are identified by dry fruit colour as Amarillo, Colorado, and Negro. Each of these pepper types are essential ingredients in local traditional cooking, and although they are distinguished by their taste and hotness, phytochemical analysis of native material allowing classification on measurement scales developed elsewhere has not been done. Consequently, types such as Ancho are placed at the same level, although in México there is a wide diversity that is not currently reflected in these scales. Commercialization of pepper types is being implemented without consideration of the levels of hotness. Inclusion of this property would allow the production of varieties grouped by specific hotness characteristics, as driven by different market needs.

The hotness scale of Scoville Heat Units (SHU) was established in 1912 using extracts from a variety of peppers (Ishikawa, 2003), and analytical methods such as spectrophotometry and gas chromatography were later used. Capsaicinoid analysis by high performance liquid chromatography (HPLC) currently allows more precise determination of the nature and quantity of these alkaloid compounds (Collins *et al.*, 1995; Karnka *et al.*, 2002; Kurian and Starks, 2002). Therefore, the objective of this work was to identify and quantify capsaicin and dihydrocapsaicin in 22 types of native peppers cultivated in Puebla State, México.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

Twenty-two native populations of *C. annuum* L. originating in nine municipalities of Puebla State, Mexico, were established in a greenhouse in Montecillo, Texcoco in 2005 (Table 1). These consisted of fifteen Miahuateco type, three Copi type, three Native of Tecamatlán types (Amarillo, Colorado, and Negro), and one Mulato pepper (Aguilar *et al.*, 2006). Fruits were harvested ripe and dried at ambient temperature.

### Capsaicinoid extraction

The pericarp and placenta of 10 fruits from different plants of each population were mixed, pulverized, and homogenized using N<sub>2</sub>. The entire powdered sample was stored in darkness until analysis. Two extractions were made per collection. For each extraction 0.5 g of pulverized pepper and 5 mL of HPLC grade acetonitrile were placed in glass tubes. The tubes were kept in a 60 °C water bath for 5 h and stirred every 30 min. The supernatant was brought to ambient temperature and filtered in duplicate aliquots of 2 mL using 0.45 µm pore acrodiscs with 25 mm diameter (Millipore Corp.). The filtered extracts were collected in 2mL glass vials and kept in darkness.

**Cuadro 1. Tipo, origen y características de fruto de 22 colectas de chile establecidas en invernadero en Montecillo, Estado de México, en 2005.****Table 1. Type, origin, and characteristics of fruit from 22 collections of peppers established in a greenhouse in Montecillo, State of México, 2005.**

Nombre local	Municipio	Clave	Características del fruto <sup>†</sup>				
			Largo (cm)	Ancho (cm)	Forma	Color	
Miahuateco	Tepanco	CP631	10.2	4.4	T	m	
		CP632	12.2	4.5	T	m	
		CP633	10.8	4.8	T	m	
		CP634	10.8	3.9	T	m	
		CP635	12.1	4.3	T	m	
	Tehuacán	CP637	9.3	3.8	T	m	
		CP639	8.9	3.9	T	m	
		CP640	9.6	3.6	T	m	
	Miahuatlán	CP641	9.3	3.5	T	m	
		Tlacotepec	CP642	9.2	3.4	T	m
	CP643		10.0	4.2	T	m	
	CP644		9.3	4.3	T	m	
	Yehualtepec	CP654	10.4	4.8	T	m	
	Xochitlán	CP655	12.2	4.4	T	m	
	Tecamachalco	CP657	9.2	4.2	T	m	
	Copi	Tecamachalco	CP656	11.2	1.3	E	r
		Xochitlán	CP654cl	10.8	1.3	E	r
Xochitlán		CP654c	7.7	2.1	E	r	
Colorado	Tecomatlán	CP661c	5.7	2.0	T	ro	
Amarillo	Tecomatlán	CP661a	5.8	2.0	T	na	
Negro	Tecomatlán	CP661n	6.1	2.7	T	n	
Mulato	Texmelucan	CP658	9.2	4.1	T	m	

<sup>†</sup> En estado maduro y seco. T=triangular; E=elongado; m=marrón; r=rojo; ro=rojo oscuro; na=naranja; n=negro ♦ Mature and air-dried fruit. T=triangular; E=elongated; m=brown; r=red; ro=dark red; na=orange; n=black.

diámetro y poro de 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore Co.). Los extractos filtrados se colocaron en viales de vidrio (2 mL) y se mantuvieron en oscuridad. Se obtuvieron cuatro muestras por colecta, dos de cada extracción.

#### Cuantificación de capsaicinoides

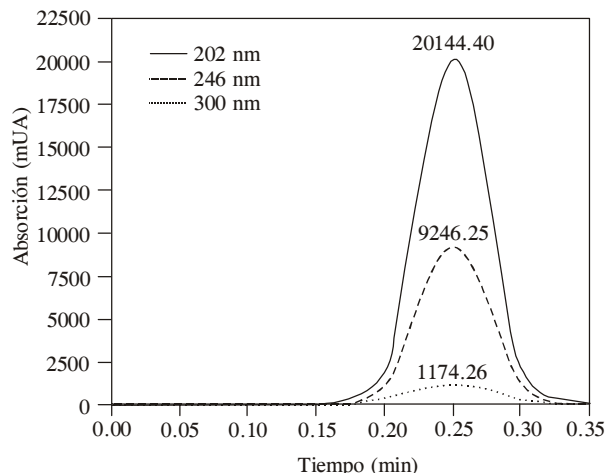
Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Hewlett Packard® serie 1100, con un muestreador automático (Agilent®, Serie 1200 Mod. G1329A) y un detector de arreglo de diodos al que se acondicionó una columna  $C_{18}$  con partículas de 25  $\mu\text{m}$  de diámetro (Waters Spherisorb ODS®, Sigma Co.), 150 mm de longitud y 4.7 mm de diámetro. El aparato se calibró a 202 nm de absorbancia, ya que el análisis previo del espectro de absorbancia del estándar capsaicina: dihidrocapsaicina, 65:35 (Natural Capsaicin®, Sigma Co.) detectó con esta longitud de onda el pico máximo (Figura 1). Esto coincidió con Mathur *et al.* (2000), quienes hicieron sus lecturas a 201 nm. Se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  de cada muestra, filtrados a través de una membrana de nylon con poro de 0.45  $\mu\text{m}$  y 47 mm de diámetro (Millipore® Co.). El tiempo de análisis fue 5 min y la fase móvil consistió en acetonitrilo y solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 35 mM en proporción 65:35, con flujo isocrático de 1.7  $\text{mL min}^{-1}$  a 28 °C.

Two samples were taken from each extraction, resulting in four samples per population.

#### Capsaicinoid measurement

Samples were analyzed with a high-performance liquid chromatograph (HPLC) (Hewlett Packard® Series 1100) with autosampler (Agilent®, Series 1200 Mod. G1329A) and diode array detector, fitted with a  $C_{18}$  column with 25  $\mu\text{m}$  diameter particles (Waters Spherisorb ODS, Sigma Co.). Column dimensions were 150 mm length by 4.7 mm diameter. The instrument was calibrated at 202 nm absorbance, based on previous work which determined that the absorbance spectrum of the capsaicin:dihydrocapsaicin standard 65:35 (Natural Capsaicin®, Sigma Co.) showed the maximum peak at this wavelength (Figure 1). This is consistent with Mathur *et al.* (2000), who registered absorbances at 201 nm. Twenty microliters of each sample, filtered through a 47 mm diameter, 0.45  $\mu\text{m}$  pore nylon membrane (Millipore® Co.), were injected. Analysis time was 5 min and the mobile phase consisted of acetonitrile and a buffer solution of 35 mM monobasic potassium phosphate in a 65:35 ratio with isocratic flow of 1.7  $\text{mL min}^{-1}$  at 28 °C.

Capsaicin and dihydrocapsaicin were identified and measured using external standards. Solutions of pure compounds of 8-methyl-



**Figura 1.** Picos de absorción (mUA) para capsaicina natural (Sigma® Co.) en metanol, detectadas a  $\lambda=202, 246$  y  $300$  nm en HPLC (HP® Serie 1100) con detector de arreglo de diodos y fase móvil acetonitrilo:amortiguador de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  35mM (65:35) a  $1.7 \text{ mL min}^{-1}$  en columna  $\text{C}_{18}$ .

**Figure 1.** Absorption peaks (mUA) for natural capsaicin (Sigma® Co.) in methanol, detected at  $\lambda=202, 246$  and  $300$  nm on HPLC (HP® Serie 1100) with diode array detector and a mobile phase of acetonitrile: buffer  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  35mM (65:35), at a flow of  $1.7 \text{ mL min}^{-1}$  in  $\text{C}_{18}$  column.

Para identificar y cuantificar la capsaicina y dihidrocapsaicina se usó estándar externo; se prepararon soluciones de los compuestos puros 8-metil-N-vanillil-6-nonenamida (Capsaicin®, Sigma Co.) y 8-metil-N-vanillilnonamida (Dihidrocapsaicin®, Sigma Co.), a concentraciones de 0.0016, 0.003, 0.006, 0.012 y  $0.024 \text{ mg mL}^{-1}$  en metanol grado HPLC. Con las lecturas de cada serie de soluciones estándar para áreas de pico de absorción y concentración de capsaicinoide, se obtuvieron las ecuaciones de regresión (Cuadro 2) para calcular el contenido de ambos compuestos en las muestras. La suma del contenido de capsaicina y dihidrocapsaicina se transformó a USP con base en la relación  $1 \mu\text{g}$  de capsaicinoides totales que equivale a 15 USP (AOAC, 1998). El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro repeticiones. Se hizo un análisis de varianza con base en un modelo lineal; las diferencias entre tipos y entre poblaciones dentro de tipo se compararon con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.01$ ). Se usó el programa SAS versión 8.0 (SAS Institute, 1999).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cromatogramas permitieron identificar los picos de absorción con tiempos de retención promedio de  $1.745 \pm 0.013$  min de capsaicina y  $2.161 \pm 0.019$  min de dihidrocapsaicina. Son similares a los encontrados por Kurian y Starks (2002) de 1.87 y 2.38 min, al usar como fase móvil una solución de metanol 60%: agua 20%: acetonitrilo 20%. Hubo una serie de picos adicionales no identificados, aunque probablemente

**Cuadro 2.** Tiempos de retención promedio, ecuación de regresión lineal y coeficiente de correlación para contenidos de capsaicina y dihidrocapsaicina.

**Table 2.** Mean retention times, linear regression equation, and correlation coefficient for capsaicin and dihydrocapsaicin contents

Concepto	Capsaicina	Dihidrocapsaicina
Regresión lineal	$y = 5157.24x + 90.13^\dagger$	$y = 5523.20x + 50.07$
Coefficiente de correlación	0.99	0.99
Tiempo de retención (min)	1.7	2.0

$^\dagger y =$  Área bajo la curva en miliunidades de absorbancia por minuto ( $\text{mUA min}^{-1}$ );  $x =$  mg de capsaicinoide por mililitro ( $\text{mg mL}^{-1}$ )  $\diamond y =$  Area under the curve in units of milliabsorbance per minute ( $\text{mUA min}^{-1}$ );  $x =$  mg of capsaicinoid per milliliter ( $\text{mg mL}^{-1}$ ).

N-vanillyl-6-nonenamide (Capsaicin®, Sigma Co.) and 8-methyl-N-vanillylnonanamide (Dihidrocapsaicin®, Sigma Co.) were prepared at concentrations of 0.0016, 0.003, 0.006, 0.012 and  $0.024 \text{ mg mL}^{-1}$  in HPLC grade methanol. Regression equations were obtained from peak absorption area readings of the standard solutions and capsaicinoid concentration (Table 2). The regression equations were used to determine the concentration of capsaicin and dihydrocapsaicin in the samples. The sum of capsaicin and dihydrocapsaicin was converted to SHU by taking  $1 \mu\text{g}$  of total capsaicinoids as equivalent to 15 SHU (AOAC, 1998). The experimental design was completely randomized with four replicates. Data were subjected to analysis of variance using a linear model, and differences among types and among populations were determined using the Tukey test ( $p \leq 0.01$ ). Analysis was done using SAS, Version 8.0 (SAS Institute, 1999).

## RESULTS AND DISCUSSION

Chromatograms allowed the identification of absorption peaks with mean retention times of  $1.745 \pm 0.013$  min for capsaicin and  $2.161 \pm 0.019$  min for dihydrocapsaicin. These were similar to the results of Kurian and Starks (2002) of 1.87 and 2.38 min, using a solution of 60% methanol, 20% water, and 20% acetonitrile as the mobile phase. There was an additional series of peaks not identified, although they likely correspond to other types of capsaicinoids which could be recognized easily using other standards. There were significant differences ( $p \leq 0.01$ ) in both capsaicinoids among populations, as well as for the breakdown of variation among types and among populations within in a type (Table 3).

There was wide variation in capsaicinoid concentration among the collections: 21.54 to  $556.78 \mu\text{g g}^{-1}$  for CAP and 19.54 to  $348.25 \mu\text{g g}^{-1}$  for DH (Table 4). Maximum values for both compounds occurred in the population of Copi pepper CP654cl from Xochitlán, while minimum values were observed in Miahuateco

correspondan a otros tipos de capsaicinoides susceptibles de ser reconocidos al usar otros estándares externos. Los resultados para ambos capsaicinoides fueron diferentes ( $p \leq 0.01$ ) entre poblaciones; así como para la descomposición de la variación entre tipos y entre poblaciones dentro de cada tipo (Cuadro 3).

La variación entre colectas fue amplia: 21.54 a 556.78  $\mu\text{g g}^{-1}$  para CAP y 19.54 a 348.25  $\mu\text{g g}^{-1}$  para DH (Cuadro 4). Los valores máximos para ambos compuestos se registraron en la población de chile Copi CP654cl de Xochitlán y los valores mínimos en la de Miahuateco CP639 de Tehuacán. Hubo una alta correlación ( $r=0.98$ ) entre ambos compuestos; además, la ecuación de regresión  $dh=7.8+0.6c$ , donde  $dh$  y  $c$  representan los contenidos de cada uno de ellos, indica que en la mayoría de las colectas el contenido de capsaicina fue mayor que de dihidrocapsaicina, excepto para CP643 y CP658 donde la proporción relativa fue 1:1.05 y 1:1.68 (Cuadro 4). Cázares *et al.* (2005) observaron proporciones relativas semejantes (1:1.5 y 1:1.8) en poblaciones del tipo Sukurre y Bobo que también pertenecen a la especie *C. annuum*. En *C. annuum* la proporción es cercana a 1:1, en tanto que para *C. frutescens* L. es 2:1 (Manirakiza *et al.* (2003); además, Cruz (2007)<sup>3</sup> observó un mayor contenido de DH en muestras de *C. pubescens*.

El contenido de ambos capsaicinoides entre poblaciones dentro de cada tipo fue amplio (Cuadro 4). En el caso de Miahuateco, que estuvo representado por un mayor número de colectas, para CAP varió desde 21.54  $\mu\text{g g}^{-1}$  en CP639, proveniente de Tehuacán hasta 158.07  $\mu\text{g g}^{-1}$  en CP655 de Xochitlán, este último significativamente mayor que las otras colectas dentro de su tipo; y para DH de 19.54  $\mu\text{g g}^{-1}$  a 99.24  $\mu\text{g g}^{-1}$  en las mismas colectas. El material CP641 de

CP639 from Tehuacán. There was a high correlation ( $r=0.98$ ) between both compounds. In addition, the regression equation  $dh = 7.8 + 0.6 c$ , where  $dh$  and  $c$  represent the concentration of each compound, indicates that in the majority of the collections capsaicin concentration was greater than dihydrocapsaicin concentration, except for in CP643 and CP658 where the relative proportion was 1:1.05 and 1:1.68 (Table 4). Similar relative proportions (1:1.5 and 1:1.8) were observed by Cázares *et al.* (2005) in populations of Sukurre and Bobo pepper types which are also members of *C. annuum*. Manirakiza *et al.* (2003) indicate that in *C. annuum* the ratio is close to 1:1, while in *C. frutescens* L. the ratio is 2:1. As well, Cruz (2007)<sup>3</sup> observed a greater concentration of DH in samples of *C. pubescens*.

The concentration of both capsaicinoids among populations within each type varied widely (Table 4). In the case of Miahuateco which was represented in a large number of collections, CAP varied from 21.54  $\mu\text{g g}^{-1}$  in CP639 originating in Tehuacan, to 158.07  $\mu\text{g g}^{-1}$  in CP655 originating in Xochitlán. The latter was significantly greater than other collections within its type. Concentrations of DH ranged from 19.54  $\mu\text{g g}^{-1}$  to 99.24  $\mu\text{g g}^{-1}$  in the same collections. Material of CP641 from Miahuatlán also showed significantly greater concentrations of CAP and DH than the Miahuateco type.

Within the Copi peppers, CP654cl originating in Xochitlán (556.78 and 348.25  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) was significantly greater than CP654c from the same location (36.86 and 30.54  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) and than CP656 from Tecamachalco. In this case, a relationship was observed between these alkaloids and the length and width of the fruits (Tables 1 and 4). In the native populations from Tecomatlán,

**Cuadro 3. Análisis de varianza para capsaicina y dihidrocapsaicina en 22 poblaciones de cuatro tipos de chile provenientes de Puebla, México.**

**Table 3. Analysis of variance for capsaicin and dihydrocapsaicin in 22 populations of four pepper types originating in Puebla, Mexico.**

Fuente de variación	GL	Capsaicina	Dihidrocapsaicina	USP
Tipos	3	149 915.23**	59 477.89†	92 758 272.5†
Poblaciones/Tipos	18	35 401.38**	11 601.73†	18 356 291.4†
Miahuatecos	14	5 101.18**	1 675.62†	2 819 071.4†
Copi	2	280 719.58**	92 541.19†	144 700 496.9†
Criollos de Tecomatlán	2	2 184.58**	144.99†	772 625.6†
Mulato	0	-	-	-
Error	66	417.39	329.40	274 368.4

GL = grados de libertad.

† significativo ( $p \leq 0.01$ ) ♦ Significant at ( $p \leq 0.01$ ).

<sup>3</sup> Cruz P., A. B. 2007. Capsaicinoides, antioxidantes y análisis molecular de chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) mediante RAPDs. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México. 74 p.

**Cuadro 4.** Contenido de capsaicina (CAP), dihidrocapsaicina (DH), proporción CAP:DH y Unidades Scoville de Picor (USP) de 22 poblaciones de cuatro tipos de chile establecidas en invernadero en Montecillo, Estado de México.

**Table 4.** Capsaicin (CAP) and dihydrocapsaicin (DH) contents, ratio of CAP:DH, and Scoville Heat Units (SHU) of 22 populations of four pepper types grown in a greenhouse in Montecillo, State of México.

Población	CAP ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	DH ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	CAP:DH	USP ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
Miahuateco				
CP631	39.55 efg	37.49 de	1:0.95	1155 ef
CP632	49.56 efg	34.96 de	1:0.71	1267 def
CP633	64.45 cde	47.31 cd	1:0.73	1676 cde
CP634	51.75 ef	34.11 de	1:0.66	1287 def
CP635	57.88 def	43.45 cd	1:0.75	1519 de
CP637	55.97 def	36.27 de	1:0.65	1383 de
CP639	21.54 g	19.54 e	1:0.91	616 f
CP640	40.39 efg	34.52 de	1:0.85	1123 ef
CP641	121.81 b	80.71 ab	1:0.66	3037 b
CP642	82.84 cd	50.66 cd	1:0.61	2002 cd
CP643	31.14 fg	32.73 de	1:1.05	958 ef
CP644	33.62 fg	30.48 de	1:0.91	961 ef
CP654	54.05 ef	35.86 de	1:0.66	1348 def
CP655	158.07 a	99.24 a	1:0.63	3859 a
CP657	91.98 c	65.25 bc	1:0.71	2358 bc
Media	63.64 B	45.51 B		1637 B
Copi				
CP656	208.52 b	124.14 b	1:0.60	4989 b
CP654cl	556.78 a	348.26 a	1:0.63	13 575 a
CP654c	36.86 c	30.54 b	1:0.83	1011 b
Media	267.39 A	167.65 A		6525 A
Nativos de Tecamatlán				
CP661c	39.94 b	30.94 b	1:0.77	1063 b
CP661a	81.50 a	42.52 a	1:0.52	1860 a
CP661n	42.21 b	33.85 ab	1:0.80	1140 b
Media	54.55 BC	35.77 B	1354B	
Mulato				
CP658	29.45 C	49.48 B	1:1.68	1183 B

Medias con diferente letra son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.01$ ); las minúsculas para comparar entre poblaciones dentro de tipo y las mayúsculas para comparar entre tipos ♦ Means with different letters are statistically different ( $p \leq 0.01$ ). Lower case letters show comparisons among populations within a type, and upper case letters show comparisons among types.

Miahuatlán también mostró contenidos de CAP y DH significativamente más altos que la mayoría de las colectas del tipo Miahuateco.

En los chiles tipo Copi, CP654cl proveniente de Xochitlán ( $556.78$  y  $348.25 \mu\text{g g}^{-1}$ ) fue significativamente mayor que CP654c del mismo origen ( $36.86$  y  $30.54 \mu\text{g g}^{-1}$ ) y que CP656 de Tecamachalco; en este caso se observó una relación entre el contenido de

the Amarillo pepper (CP661a) had significantly greater capsaicinoid concentration than the other native populations; for example, CAP concentration was nearly double that of the Colorado pepper CP661c.

By summing the concentrations of both capsaicinoids and converting to SHU, a measurement of the degree of hotness of each collection was calculated (Table 4). On the basis of the hotness scale of Ravishankar *et al.* (2003), the majority of peppers were at a moderate level (0 to 5000 SHU) and only the CP654cl collection was at the average level (5000 to 20 000 SHU).

Collections of the Miahuateco type showed a wide variation in pungency, from 616 to 3859 SHU, which places it near the levels associated with the Jalapeño (3500 to 4500 SHU), Poblano (2500 to 3000 SHU), Pasilla (2500 SHU), Anaheim (1000 to 1400 SHU) and Ancho (1000 SHU) types. This variation could be associated with germplasm diversity under cultivation and its dynamics, that is, the flow of materials within the region and the introduction of plant material originating in other municipalities. The presence of Miahuateco peppers of lower hotness could indicate that its genetic purity has been reduced, as suggested by Aguilar *et al.* (2006) and older agricultural producers, who indicate that this type should be hotter than Poblano pepper. In comparing the mean hotness of representatives of the Poblano-Mulato CP658 (1183 SHU) with populations of the Miahuateco type, the hotness of the Poblano-Mulato is exceeded by only some of the Miahuateco, and the hotness of the Miahuateco CP655 is greater than the range where Poblano is placed by Ravishankar *et al.* (2003).

Despite the fact that the material used in this study was from dry, mature, fruit and that the capsaicinoid concentration was consequently reduced (Estrada *et al.*, 1999; Cruz *et al.*, 2007), it was found that for dry as well as fresh peppers, there are populations of the Miahuateco type that may be hotter than the Poblano, and they could therefore be used in the preparation of filled peppers (*chiles rellenos*), meeting consumer demand for hotter peppers.

It is likely that lack of selection for greater pungency and absence of control of germplasm exchange have favored the prevalence of materials with equal or less pungency than the Poblano pepper, which should be verified with a greater number of representatives of this type. Based on morphological characterization, in this study area Aguilar *et al.* (2006) have reported the presence of populations with typical Miahuateco characteristics, as well as another group with characteristics of both types which are referred to as Miahuatecos-Mulatos, and even some which are similar to the Poblano type. These authors suggest the introduction of Mulato peppers into the region

este alcaloide y el largo y ancho de los frutos (Cuadros 1 y 4). En las poblaciones nativas de Tecmatlán, la Amarillo (CP661a) tuvo un contenido de capsaicinoides significativamente mayor que el resto, incluso para CAP cerca del doble de Colorado CP661c.

Con la suma del contenido de ambos capsaicinoides y su transformación a USP, se calculó una medida del grado de picor de cada colecta (Cuadro 4). Con base en la escala de picor de Ravishankar *et al.* (2003), la mayoría de los chiles estuvo en un nivel moderado (0 a 5000 USP) y sólo la colecta CP654cl en el nivel medio (5000 a 20 000 USP).

Las colectas tipo Miahuateco mostraron una amplia variación en picor, de 616 a 3859 USP, que las ubica dentro de los niveles atribuidos a los tipos Jalapeño (3500 a 4500 USP), Poblano (2500 a 3000 USP), Pasilla (2500 USP), Anaheim (1000 a 1400 USP) y Ancho (1000 USP). Esta variación puede asociarse con la diversidad del germoplasma que se cultiva y su dinámica, es decir, el flujo de materiales dentro de la región y la introducción de plántulas provenientes de otros municipios. La presencia de chiles Miahuatecos de bajo picor pudiera indicar que su pureza ha disminuido, como sugieren Aguilar *et al.* (2006) y los agricultores de mayor edad, quienes señalan que este tipo debe ser más picante que el chile Poblano. Al comparar el picor promedio del representante del tipo Poblano-Mulato CP658 (1183 USP) con las poblaciones de tipo Miahuateco se observa que su picor sólo es superado por algunas de ellas, e incluso el picor del Miahuateco CP655 es mayor que el intervalo donde Ravishankar *et al.* (2003) ubican al Poblano.

A pesar de que el material usado provenía de frutos maduros secos y que el contenido de capsaicinoides ha disminuido en esta etapa (Estrada *et al.*, 1999; Cruz *et al.*, 2007), se encontró que tanto en seco como en fresco hay poblaciones del tipo Miahuateco que pueden ser más picosas que el Poblano y por tanto, usarlas para preparar chiles rellenos y cubrir la demanda de algunos consumidores por platillos con mayor picor.

Es probable que la falta de selección para mayor picor y la ausencia de control en el intercambio de germoplasma hayan favorecido que prevalezcan materiales con igual o menor picor que el Poblano, lo cual deberá verificarse con un mayor número de representantes de este último tipo. Con base en la caracterización morfológica, Aguilar *et al.* (2006) han reportado en la zona de estudio la presencia de poblaciones con las características típicas del Miahuateco, así como otro grupo que presenta atributos de ambos tipos, denominados Miahuatecos-Mulatos e incluso algunos que se ajustan al tipo Poblano. Los autores señalan, como posible causa, la introgresión de chiles Mulatos a la región cultivada tradicionalmente con chile Miahuateco.

traditionally cultivated with Miahuateco peppers as a possible explanation.

Copi peppers are primarily used in mature and dry condition to prepare salsas; the degree of hotness of this pepper type, which is produced and consumed in the region, ranges from moderate to average. The CP654cl collection (13 575 SHU) is at a similar level to the Serrano (7000 to 25 000 SHU), while the less hot representatives are more similar to the Poblano and Jalapeño (3500 to 4500 SHU).

The native Tecmatlán peppers have a moderate degree of pungency similar to the Anaheim (1000 to 1400 SHU), and it is likely that this quality has been maintained for generations. This is due to the conservation of native germplasm by local producers, thereby avoiding its mixture with other types of greater pungency, and conserving preferences in their usage: the hotter Amarillo native pepper for the preparation of the traditional dish *chilate* (Reyes, 1971<sup>4</sup>); the Colorado native pepper which is used fresh in salsas, and the Negro native pepper used mature and dry for the typical *mole* dish of the region.

Given that the climatic conditions in the collection area are similar to the greenhouse where the plants were grown, it is possible that the results are similar to those obtained in the field; however, further investigation must be done to corroborate these observations. The cultivation of the peppers evaluated here was restricted to the aforementioned communities and regions, which have been little studied and are not improved varieties. As well, erosion of genetic resources is occurring by mixing with other peppers that are not hot, which is reducing their genetic and commercial quality. This is the case for the Miahuateco type and in the municipality of Tecmatlán the situation is further exacerbated by reduction of the cultivated area.

## CONCLUSIONS

There was a wide variation in capsaicin and dihydrocapsaicin concentrations in the native peppers evaluated. Copi peppers were notable for capsaicin concentration of 36.86 to 556.78  $\mu\text{g g}^{-1}$ , and dihydrocapsaicin concentration of 30.54 to 348.26  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Also of interest was the lower variation in the Miahuateco type with 21.54 to 158.07  $\mu\text{g g}^{-1}$  and 19.54 to 99.24  $\mu\text{g g}^{-1}$  for each capsacinoid. These materials showed potential for selecting for different degrees of hotness.

—End of the English version—





Los chiles Copi se usan principalmente en estado maduro y seco para preparar salsas; el grado de picor de ese tipo, producido y consumido en la región, va de moderado a medio. La colecta CP654cl (13 575 USP) se ubica en el nivel de picor del Serrano (7000 a 25 000 USP), en tanto que los menos picosos están cercanos al Poblano y Jalapeño (3500 a 4500 USP).

Los chiles nativos de Tecamatlán conservan un grado de picor moderado similar al Anaheim (1000 a 1400 USP) y es probable que esta cualidad se haya mantenido por generaciones. Esto se debe a que los agricultores locales han conservado el germoplasma nativo, evitando su mezcla con otros tipos de mayor picor, y mantienen sus preferencias de uso: el amarillo, de mayor picor para preparar chilate, un platillo tradicional (Reyes, 1971<sup>4</sup>); el colorado se usa en estado fresco en salsas; y el negro en estado maduro y seco para mole típico de la zona.

Dado que las condiciones climáticas en el área de recolección son similares a las del invernadero donde se desarrollaron las plantas, es posible que los resultados sean similares a los que se obtengan en el campo; no obstante, se debe hacer una investigación para verificar esta correlación. El cultivo de los chiles evaluados se restringe a las comunidades y regiones citadas, están poco estudiados y no hay variedades mejoradas. Además están en erosión genética debido a su mezcla con otros chiles no picantes que demeritan su calidad genética y comercial, como en el tipo Miahuatenco y más drástico aún, por la disminución del área cultivada, como en el Municipio de Tecamatlán.

## CONCLUSIONES

Existe una amplia variación en el contenido de capsaicina y dihidrocapsaicina en los chiles nativos evaluados. Destacaron los tipos Copi con un contenido de capsaicina de 36.86 a 556.78  $\mu\text{g g}^{-1}$ , de dihidrocapsaicina de 30.54 a 348.26  $\mu\text{g g}^{-1}$ , y con una variación de menor amplitud en el tipo Miahuatenco con 21.54 a 158.07  $\mu\text{g g}^{-1}$  y 19.54 a 99.24  $\mu\text{g g}^{-1}$  para cada capsaicinoide. Hay materiales con potencial para seleccionar hacia distintos grados de picor.

## LITERATURA CITADA

Aguilar R., V. H., T. Corona T., y S. H. Morán B. 2006. Chiles nativos (*Capsicum* spp., Solanaceae) de los estados de Puebla y Morelos. In: Avances de Investigación de la Red de Hortalizas del SINAREFI. López L., P., y S. Montes H. (eds). Libro Científico Núm. 1. Campo Experimental Bajío INIFAP. Celaya, Guanajuato, México. pp: 28-58.

- Alpizar L., E., J. Trujillo A., y F. J. Herrera R. 2002. Determinación de capsaicinoides en chile habanero (*Capsicum chinense* Jaq.), colectados en Yucatán. In: Proc. 16th Int. Pepper Conf. November 10-12. Tampico, Tamaulipas, México. pp: 48-49.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1998. Capsaicinoids in capsicums and their extractives. Liquid chromatographic method. Official Methods of Analysis of AOAC International. V. 2. 43: 13-15.
- Ben-Chaim, A., Y. Borovsky, M. Falise, M. Mazourek, B. C. Kang, I. Paran, and M. Jahn. 2006. QTL Analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. Theor. Appl. Genet. 113: 1481-1490.
- Betts, T. A. 1999. Pungency quantitation of hot pepper sauces using HPLC. Chem. Education 76: 240-244.
- Casanova C., C., L. Gutiérrez P., L. Torres T., S. Peraza S., y T. González E. 2006. Caracterización química y molecular de la pungencia de los chiles (*Capsicum* spp.) de Yucatán. In: Memoria de la Tercera Convención Mundial del Chile. 9-11 de julio. Chihuahua y Delicias, Chih., México. pp: 27.
- Cázares S., E., P. Ramírez V., F. Castillo G., R. M. Soto H., M. T. Rodríguez G., y J. L. Chávez S. 2005. Capsaicinoides y preferencia de uso en diferentes morfotipos de chile (*Capsicum annum* L.) del Centro-Oriente de Yucatán. Agrociencia 39: 627-638.
- Collins M. D., L. M. Wasmund, and P. W. Bosland. 1995. Improved method for quantifying capsaicinoids in *Capsicum* using High-performance Liquid Chromatography. Hortscience 30: 137-139.
- Cruz P., A. B., V. A. González H., M. A. Gutiérrez E., A. A. Gardea B., y M. Pérez G. 2007. Capsaicinoides, vitamina C y heterosis durante el desarrollo del fruto de chile manzano. Agrociencia 41: 627-635.
- De, A. K. 2003. *Capsicum*. The Genus *Capsicum*. Taylor and Francis. London. 256 p.
- Djamgoz, M. B. A., and B. Isbilen. 2006. Dietary compounds as anti-cancer agents: a preliminary evaluation of ion channels and membrane excitability as possible target mechanisms. Turkish Biochem. 31: 57-68.
- Estrada B., F. Pomar, J. Díaz, F. Merino, and M. A. Bernal. 1999. Pungency level in fruits of the Padrón pepper with different water supply. Scientia Hort. 81: 385-396.
- Frontal Agritech. 2007. Bih jolokia or Naga jolokia. Dirección URL: <http://www.frontalagritech.co.in/products/bihjolokia\_gen.htm>. [Consulta: 10 de junio de 2007].
- Hernández V., S., A. P. Dávila, y K. Oyama. 1999. Síntesis del conocimiento taxonómico, origen y domesticación del género *Capsicum*. Bol. Soc. Bot. Méx. 64: 65-84.
- Ishikawa, K. 2003. Biosynthesis of capsaicinoids in *Capsicum*. In: De, A. K. (ed). *Capsicum*. The Genus *Capsicum*. Taylor and Francis. London. pp: 87-95.
- Karnka R., M. Rayanakorn, S. Watanesk, and Y. Veneesorn. 2002. Optimization of high-performance liquid chromatographic parameters for the determination of capsaicinoid compounds using the simplex method. Analytical Sci. 18: 661-665.
- Kumar, B. K., A. D. Munshi, S. Joshi, and C. Kaur. 2003. Note on evaluation of chilli (*Capsicum annum* L.) genotypes for biochemical constituents. Capsicum and Eggplant Newsletter 22: 41-42.
- Kurian A. L., and A. N. Starks. 2002. HPLC analysis of capsaicinoids extracted from whole orange habanero chili peppers. Food Sci. 67: 956-962.
- Laborde C., J. A., y O. Pozo C. 1984. Presente y Pasado del Chile en México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Publicación Especial No. 85, México. 80 p.

<sup>4</sup> Reyes S., M. 1971. Monografía del Pueblo de Progreso, Piaxtla, Puebla. (1828-1971). Inédito. 83 p.

- Manirakiza, P., A. Covaci, and P. Schepens. 2003. Pungency principles in *Capsicum* –analytical determinations and toxicology. *In: De, A. K. (ed) Capsicum. The Genus Capsicum.* Taylor and Francis. London. pp: 71-86.
- Mathur, R., R. S. Dangi, S. C. Dass, and R. C. Malhotra. 2000. The hottest chilli variety in India. *Current Sci.* 79: 287-288.
- Mori, A., S. Lehmann, J. O'Kelly, T. Kumagai, J. C. Desmond, M. Pervan, W. H. McBride, M. Kizaki, and H. P. Koeffler. 2006. Capsaicin, a component of red peppers, inhibits the growth of androgen-independent, p53 mutant prostate cancer cells. *Cancer Res.* 66: 3222-3229.
- Ravishankar, G. A., B. Suresh, P. Giridhar, S. Ramachandra, and J. T. Sudhakar. 2003. Biotechnological studies on *Capsicum* for metabolite production and plant improvement. *In: De, A. K. (ed). Capsicum. The Genus Capsicum.* Taylor and Francis. London. pp: 96-128.
- SAS Institute. 1999. SAS/STAT. User's Guide. Version 8, Vol. 1-5. SAS Publishing. Cary, N.C. 3848 p.
- Sathiyamurthy, V. A., D. Veeraragavathatham, and N. Chezhiyan. 2002. Studies on the capsaicin content in chilli hybrids. *Capsicum and Eggplant Newsletter* 21: 44-47.
- Zewdie, Y., and P. W. Bosland. 2000. Evaluation of genotype, environment, and genotype-by-environment interaction for capsaicinoids in *Capsicum annum* L. *Euphytica* 111:185-190.