

CAPSAICINOIDES, VITAMINA C Y HETEROSIS DURANTE EL DESARROLLO DEL FRUTO DE CHILE MANZANO

CAPSAICINOIDS, VITAMIN C AND HETEROSIS DURING FRUIT DEVELOPMENT OF MANZANO HOT PEPPER

Ana B. Cruz-Pérez¹, Víctor A. González-Hernández¹, Ramón M. Soto-Hernández²,
M. Alejandra Gutiérrez-Espinosa², Alfonso A. Gardea-Béjar³ y Mario Pérez-Grajales⁴

¹Genética, ²Recursos Naturales. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (abcruz@colpos.mx). ³Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Hermosillo, Sonora. ⁴Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. 56230. Chapingo, Estado de México.

RESUMEN

Los capsaicinoides, entre los que destacan capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina y homocapsaicina causan picor en el fruto de chile (*Capsicum* spp.). Estos componentes se usan en la industria alimentaria como especia, y en la farmacéutica por su variada actividad biológica. La vitamina C es un nutriente indispensable para el humano que ha sido implicada en aspectos clínicos como la prevención de cáncer y otras enfermedades. Con el fin de evaluar los niveles de estos componentes en chile manzano (*Capsicum pubescens* R y P), se determinó el contenido de capsaicinoides y vitamina C en diferentes grados de desarrollo de fruto en tres híbridos y sus progenitores, así como la heterosis para tales características. La concentración de capsaicinoides se redujo en todas las variedades después de 58 a 96 d de desarrollo; el híbrido Puebla×Chiapas y el progenitor Chiapas tuvieron mayor contenido (68 337 y 55 927 Scoville Heat Units, SHU) y el menor contenido lo tuvo el híbrido Puebla×Zongolica (25 923 SHU) y Puebla de fruto rojo (7125 SHU). Los híbridos superaron en picor a sus progenitores debido a la heterosis positiva para este carácter (hasta 225%). La máxima acumulación de vitamina C ocurrió al inicio de la pigmentación del fruto (76 d) y luego disminuyó; el progenitor Puebla rojo tuvo el mayor contenido (455 mg 100 g⁻¹ de peso fresco). En vitamina C la heterosis fue negativa, por lo que la hibridación redujo su síntesis.

Palabras clave: *Capsicum pubescens*, ácido ascórbico, estado de desarrollo, capsaicinoides.

INTRODUCCIÓN

El chile (*Capsicum* spp.), el maíz (*Zea mays* L.) y la calabaza (*Cucurbita* spp.) son tres de los alimentos más importantes en la dieta mexicana (Pérez *et al.*, 1997). El gusto por el chile en México se basa principalmente en su picor, ya que se prefieren los chiles picantes a los llamados dulces. El cultivo

ABSTRACT

The capsaicinoids, among which capsaicin, dehydrocapsaicin, norhydrocapsaicin and homocapsaicin are outstanding, cause hotness in the fruit of hot pepper (*Capsicum* spp.). These components are used in the food industry as spice, and in the pharmaceutical industry for their varied biological activity. Vitamin C is an indispensable nutrient for humans which has been involved in clinical aspects such as the prevention of cancer and other diseases. In order to evaluate the levels of these components in manzano hot pepper (*Capsicum pubescens* R and P), the content of capsaicinoids and vitamin C was determined in different degrees of development of the fruit in three hybrids and their parents, as well as the heterosis for these traits. The concentration of capsaicinoids was reduced in all of the varieties after 58 to 96 d of development; the hybrid Puebla×Chiapas and the parent Chiapas had a higher content (68 337 and 55 927 Scoville Heat Units, SHU) and the lowest content was in the hybrid Puebla×Zongolica (25 923 SHU) and red fruit Puebla (7125 SHU). The hybrids surpassed their parents in hotness due to the positive heterosis for this trait (up to 225%). The maximum accumulation of vitamin C occurred at the onset of pigmentation of the fruit (76 d) and later decreased; the parent red Puebla had the highest content (455 mg 100 g⁻¹ of fresh weight). In vitamin C, heterosis was negative, thus hybridation reduced its synthesis.

Key words: *Capsicum pubescens*, ascorbic acid, development stage, capsaicinoids.

INTRODUCTION

Hot pepper (*Capsicum* spp.), maize (*Zea mays* L.) and squash (*Cucurbita* spp.) are three of the most important foods in the Mexican diet (Pérez *et al.*, 1997). The taste for pepper in México is based mainly on its hotness, given that the hot peppers are preferred over the sweet varieties. The cultivation of *Capsicum* (Solanaceae) originated in Central and South America, with the species *C. annum*, *C. frutescens*, *C. baccatum*, *C. pubescens* and *C. chinense* (López, 2003).

de *Capsicum* (Solanaceae) se originó en América Central y América del Sur, con las especies *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. baccatum*, *C. pubescens* y *C. chinense* (López, 2003).

El chile manzano (*C. pubescens* R y P) se originó en Perú, pero se cultiva en diversos países. Además de dar sabor a las comidas, tiene cualidades nutritivas por su contenido de vitaminas A y C (Maroto, 2002). El picor de estos chiles se debe a los capsaicinoides, 80% de los cuales son la capsaicina y la dihidrocapsaicina (Topuz y Ozdemir, 2004). Además de participar en el picor del fruto, los capsaicinoides tienen diversas propiedades biológicas, explotadas en la industria y en farmacéutica (Surch y Lee, 1996). Entre estas propiedades destacan la estimulación del sistema cardiovascular (Govindarajan y Sathyanarayana, 1991) su actividad antiinflamatoria (Sancho *et al.*, 2000) y su capacidad para aumentar la secreción de catecolamina (Kobata *et al.*, 1998).

La acumulación de capsaicinoides en los frutos de chile está relacionada con la edad y el estado de desarrollo del fruto. Empiezan a acumularse en el fruto en las primeras etapas de desarrollo, y alcanza su máxima concentración en las etapas finales. Otro factor que influye es el contenido de carotenoides del fruto (Sakamoto *et al.*, 1994; Estrada *et al.*, 1997). Además, la variación en el picor del chile está determinada por factores genéticos y ambientales, y por la interacción genotipo \times ambiente (Zewdie y Bosland, 2000).

Los chiles tienen mayor contenido de vitamina C que otras hortalizas y frutas reconocidas como fuentes de esta vitamina (Dürüst *et al.*, 1997; Fawell, 1998). Lo anterior es interesante debido a que la vitamina C sería un factor preventivo del cáncer por su capacidad de inhibir la síntesis de compuestos N-nitrosos en el estómago y por estimular al sistema inmune (Byers y Perry, 1992). Las variaciones en los niveles de vitaminas en el chile se han atribuido a diferencias en cultivares, madurez del fruto, manejo agronómico de la planta y factores climáticos; incluso hay diferencias debidas al método analítico utilizado (Mozafar, 1994).

En la presente investigación se evaluó el chile manzano cultivado en invernadero con fertirriego, con el objetivo de determinar el contenido de vitamina C y capsaicinoides en diferentes grados de madurez del fruto. Para ello se utilizaron tres híbridos y sus progenitores, para evaluar el grado de heterosis entre ellos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron tres híbridos (Puebla \times Chiapas, Puebla \times Huatusco, y Puebla \times Zongolica) y sus progenitores (Chiapas, Puebla, Huatusco y Zongolica) cuyas características se resumen en el Cuadro 1. Estos materiales son variedades criollas de México elegidas por

Manzano hot pepper (*C. pubescens* R and P) originated in Peru, but is cultivated in diverse countries. In addition to flavoring foods, it possesses nutritive qualities because of its content of vitamins A and C (Maroto, 2002). The hotness of these peppers is due to the capsaicinoids, 80% of which are capsaicin and dihydrocapsaicin (Topuz and Ozdemir, 2004). In addition to their participation in the hotness of the fruit, the capsaicinoids have diverse biological qualities, which are exploited in both the industrial and pharmaceutical levels (Surch and Lee, 1996). Among these properties, the stimulation of the cardiovascular system (Govindarajan and Sathyanarayana, 1991), their anti-inflammatory activity (Sancho *et al.*, 2000) and their capacity for increasing the secretion of catecholamin (Kobata *et al.*, 1998) are outstanding.

The accumulation of capsaicinoids in pepper fruits is related to the age and growth stage of the fruit. They begin to accumulate in the fruit in the first stages of growth, and reach their maximum concentration in the final stages. Another factor that influences is the carotenoid content of the fruit (Sakamoto *et al.*, 1994; Estrada *et al.*, 1997). Furthermore, the variation in hotness of the pepper is determined by genetic and environmental factors, and by the interaction genotype \times environment (Zewdie and Bosland, 2000).

The peppers have a higher content of vitamin C than other vegetables and fruits recognized as sources of this vitamin (Dürüst *et al.*, 1997; Fawell, 1998). The above is interesting due to the fact that vitamin C would be a preventative factor of cancer because of its capacity to inhibit the synthesis of N-nitrose compounds in the stomach and to stimulate the immune system (Byers and Perry, 1992). The variations in the vitamin levels in pepper have been attributed to the differences in cultivars, fruit maturity, agronomic management of the plant and climatic factors; there are differences even from the analytical method used (Mozafar, 1994).

In the present investigation, an evaluation was made of manzano hot pepper grown in a greenhouse with ferti-irrigation, with the objective of determining the content of vitamin C and capsaicinoids in different degrees of maturity of the fruit. For this purpose, three hybrids and their parents were used to evaluate the degree of heterosis among them.

MATERIALS AND METHODS

Three hybrids (Puebla \times Chiapas, Puebla \times Huatusco, and Puebla \times Zongolica) were used, as well as their parents (Chiapas, Puebla and Zongolica), whose characteristics are summarized in Table 1. These materials are native varieties of México that were chosen because of their outstanding qualities, according to the evaluation carried out by Pérez in 2002 (personal communication⁵).

sus características sobresalientes, según la evaluación realizada por Pérez en 2002 (comunicación personal⁵). El experimento se estableció en un invernadero del Colegio de Postgraduados, mediante transplante de plántulas obtenidas de semillas sembradas en charolas usando Growing Mix No. 2 como sustrato. Las plántulas se transplantaron a vasos de unicel (250 mL) rellenos con el mismo sustrato, cuando presentaron cuatro hojas verdaderas (30 a 40 d después de la siembra). Esta etapa se requiere como acondicionamiento antes del transplante a campo o maceta. Luego, las plántulas se transplantaron individualmente a macetas al presentar 12 hojas verdaderas (30 a 40 d después del transplante). Para ello se colocaron en bolsas de polietileno negro (40 cm ancho y 45 cm altura) donde como sustrato se usó 50% tezontle grueso en la parte inferior de la bolsa y una mezcla de 25% Growing mix No. 2 y 25% tezontle fino en la parte superior. Las macetas se colocaron a una distancia de 50 cm entre planta y 1 m entre hileras. El riego y la solución nutritiva se aplicaron de acuerdo con lo recomendado por Pérez y Castro (comunicación personal⁶).

Durante la etapa de fructificación se recolectaron cinco frutos por planta en tres repeticiones, y en tres fechas de muestreo. Los muestreos se realizaron a los 58 (fruto verde), 76 (fruto al inicio de pigmentación) y 94 (fruto totalmente pigmentado, rojo o amarillo) días de desarrollo del fruto desde la floración. En esta especie la cosecha comercial se realiza a los 76 d. Estas muestras se conservaron a -20°C hasta su análisis en el laboratorio.

La determinación de capsaicinoides se hizo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con un HP-1100 (Agilent Technologies, EE.UU.) equipado con un detector de UV mod. G1314A, una bomba cuaternaria mod. G1311A y un inyector manual. Se utilizó una columna Supelcosil LC-18 ($25\text{ cm} \times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$) (Supelco), según Collins *et al.* (1995). Para la extracción se tomó 1 g de muestra liofilizada (Labconco 77500, MI. EE.UU.) de cada tratamiento. Se añadieron 10 mL de acetonitrilo y las muestras se colocaron en baño maría durante 5 h a 60°C . Del homogenizado obtenido se tomó una alícuota de 3 mL, se filtró en acrodiscos de nilón ($45\text{ }\mu\text{m} \times 25\text{ mm}$) y se inyectaron $20\text{ }\mu\text{L}$ al cromatógrafo. La fase móvil usada fue acetonitrilo:agua (45:55) a un flujo de 1.5 mL. La corrida se hizo a $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ y una longitud de onda de 280 nm.

A partir de los estándares de capsaicina y dihidrocapsaicina (Sigma) se elaboró una curva de calibración, para lo cual se preparó una solución de 0.15 mg mL^{-1} de cada uno. La determinación de nordihidrocapsaicina se hizo a partir de la capsaicina, debido a que no se contó con este estándar.

La concentración de cada capsaicinoide se calculó a partir de las ecuaciones del método oficial 995.03 de la AOAC (1995):

$$N = (Pn/Ps) \times (Cs/Wt) \times (10/0.98) \times 9300$$

$$C = (Pc/Ps) \times (Cs/Wt) \times (10/0.89) \times 16100$$

$$D = (Pd/Ps) \times (Cs/Wt) \times (10/0.93) \times 16100$$

The experiment was established in a greenhouse of the Colegio de Postgraduados, through a transplant of seedlings obtained from seeds sown in trays using Growing Mix No. 2 as substrate. The seedlings were transplanted to styrofoam cups (250 mL) filled with the same substrate, when four true leaves appeared (30 to 40 d after sowing). This stage is required as conditioning prior to transplanting to the field or pot. Then, the seedlings were individually transplanted to pots when 12 true leaves appeared (30 to 40 d after transplanting). For this purpose, they were placed in black polyethylene bags (40 cm wide and 45 cm high) in which 50% coarse tezontle was used as substrate in the lower part of the bag and a mixture of 25% Growing Mix No. 2 and 25% fine tezontle was used in the upper portion. The pots were placed at a distance of 50 cm between plants and 1 m between rows. The irrigation and the nutritive solution were applied according to the recommendations of Pérez and Castro (personal communication⁶).

During the fructification stage, five fruits per plant were collected in three replicates, and on three sampling dates. The samplings were carried out at 58 (green fruit), 76 (fruit at the onset of pigmentation) and 94 (totally pigmented fruit, red or yellow) days of development after flowering. In this species, the commercial harvest is carried out at 76 d. These samples were kept at -20° until their analysis in the laboratory.

The determination of capsaicinoids was carried out through high resolution liquid chromatography (HPLC) with an HP-1100 chromatograph (Agilent Technologies, USA) equipped with a UV detector mod. G1314A, a quaternary pump mod. G1311A and a

Cuadro 1. Características de los materiales genéticos de chile manzano evaluados.

Table 1. Characteristics of the genetic materials of manzano hot pepper evaluated.

Procedencia	Nombre	Color de fruto
Progenitores		
Tlatlahuitepec, Puebla	Puebla	Rojo, amarillo
San Cristóbal de las Casas, Chiapas	Chiapas	Rojo
Huatusco, Veracruz	Huatusco	Amarillo
Zongolica, Veracruz	Zongolica	Amarillo
Híbridos		
	Puebla rojo \times Chiapas	Rojo
	Puebla amarillo \times Huatusco	Amarillo
	Puebla amarillo \times Zongolica	Amarillo

⁵ Pérez G., M. 2002. Estudio genético y fisiológico del crecimiento, rendimiento y calidad de fruto en chile manzano (*Capsicum pubescens* R y P). Tesis de Doctor en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 106 p.

⁶ Pérez G., M. y R. Castro B. 1998. Guía Para La Producción Intensiva de Chile Manzano. Boletín de Divulgación No. 1 Programa Nacional de Investigación en Olericultura. Departamento de Fitotecnia. UACH. Chapingo, México. 17 p.

donde, N =nordihidrocapsaicina (SHU); C =capsaicina (SHU); D =dihidrocapsaicina (SHU); P_n , P_c , P_d =área del pico para nordihidrocapsaicina, capsaicina y dihidrocapsaicina; P_s =área del pico del estándar correspondiente; C_s =concentración de la solución del estándar (mg mL^{-1}); W_t =peso de la muestra (g).

Los capsaicinoides totales se calcularon como la suma de cada uno de estos compuestos ($N+C+D$ =capsaicinoides totales), donde $1 \mu\text{g}$ de capsaicinoides $\text{g}^{-1} = 15$ Scoville heat units (SHU).

La determinación de vitamina C se hizo con la metodología de Nisperos-Carriedos *et al.* (1992), modificada como se describe a continuación. Se tomó una muestra fresca de 10 g, se molió en una licuadora por 2 min con 40 mL de ácido cítrico al 3% (v/v), y se centrifugó (Hermle Z 230, Labnet Company, EE.UU.) por 10 min a 1 500 g. El sobrenadante se filtró (Whatman 541) y fue la primera parte del extracto. Se hicieron tres extracciones adicionales al precipitado (bagazo) usando 20 mL de ácido cítrico, con un volumen final de 100 mL. La determinación se hizo con HPLC, se tomaron 4 mL del extracto y se pasaron a través de una columna C_{18} Sep-Pack, precondicionada con 2 mL de acetonitrilo seguido por 5 mL de agua bidestilada. Se desecharon los primeros 3 mL y se recolectó 1 mL, del cual se inyectaron 20 μL al cromatógrafo. Estas operaciones fueron inmediatas a la extracción debido a que la solución patrón de vitamina C sólo es estable 3 h. Se utilizó una columna Supelcosil LC-18 (25 cm \times 4.6 mm, 5 μm), con fase móvil de metanol:fosfato dipotásico (K_2HPO_4) 50 mM (pH 2.0) (30:70), a un flujo de 1.5 mL min^{-1} , y se leyó a una longitud de onda de 254 nm.

El contenido de vitamina C se calculó usando una curva de calibración con el estándar del ácido ascórbico (Sigma) y el programa computacional del cromatógrafo (ChemStation for LC Rev. A.10.02, Agilent Technologies, EE.UU.).

Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones por muestra. La unidad experimental tuvo cinco frutos. Para cada repetición se utilizó una maceta diferente. La comparación de medias se hizo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). La estimación y significancia estadística de la heterosis con respecto al progenitor con mayor contenido de capsaicinoides y vitamina C de los tres híbridos se hizo mediante contrastes ortogonales. Todos los análisis estadísticos se hicieron con el programa computacional SAS para Windows versión 8.1 (SAS Institute Inc., 2000). La heterosis respecto al mejor progenitor se estimó mediante la siguiente ecuación (Fehr, 1987):

$$\text{Heterosis (\%)} = \frac{\text{Híbrido} - \text{Progenitor}}{\text{Progenitor}} \times 100$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido de capsaicinoides

La mayor concentración de capsaicinoides se observó en frutos con 58 d de desarrollo. El híbrido

manual injector. A Supelcosil LC-18 column (25 cm \times 4.6 mm, 5 μm) (Supelco) was used according to Collins *et al.* (1995). For the extraction, 1 g of lyophilized sample was taken (Labconco 77500, MI. USA) from each treatment. Ten mL of acetonitrile were added and the samples were placed in a double boiler during 5 h at 60 °C. From the homogenate obtained, an aliquot of 3 mL was taken, then filtered in nylon acrodiscs (45 μm \times 25 mm) and 20 μL were injected into the chromatograph. The mobile phase utilized was acetonitrile:water (45:55) at a flow of 1.5 mL. The run took place at 23 ± 3 °C and a wave length of 280 nm.

A calibration curve was made from the standards of capsaicin and dehydrocapsaicin (Sigma), for which a solution was prepared of 0.15 mg mL^{-1} of each one. The determination of norhydrocapsaicin was made from the capsaicin, due to the fact that this standard was not available.

The concentration of each capsacinoid was calculated from the equations of the official method 995.03 of the AOAC (1995):

$$\begin{aligned} N &= (P_n/P_s) \times (C_s/W_t) \times (10/0.98) \times 9300 \\ C &= (P_c/P_s) \times (C_s/W_t) \times (10/0.89) \times 16100 \\ D &= (P_d/P_s) \times (C_s/W_t) \times (10/0.93) \times 16100 \end{aligned}$$

where, N =nordehydrocapsaicin (SHU); C =capsaicin (SHU); D =dehydrocapsaicin (SHU); P_n , P_c , P_d =area of the peak for nordehydrocapsaicin, capsaicin and dehydrocapsaicin; P_s =area of the peak of the corresponding standard; C_s =concentration of the solution of the standard (mg mL^{-1}); W_t =weight of the sample (g).

The total capsacinoids were calculated as the sum of each one of these compounds ($N+C+D$ =total capsacinoids), where $1 \mu\text{g}$ of capsacinoids $\text{g}^{-1} = 15$ Scoville heat units (SHU).

The determination of vitamin C was carried out with the methodology of Nisperos-Carriedos *et al.* (1992), modified as described below. A fresh sample of 10 g was taken, ground in a blender during 2 min with 40 mL of citric acid at 3% (v/v), and was centrifuged (Hermle Z 230, Labnet Company, USA) for 10 min at 1500 g. The supernatant was filtered (Whatman 541) and was the first part of the extract. Later, three additional extractions were made of the precipitate (pulp) using with 20 mL of citric acid, and the final volume was 100 mL. The determination was carried out by HPLC; 4 mL were taken of the extract and were passed through a column of C_{18} Sep-Pack, preconditioned with 2 mL of acetonitrile followed by 5 mL of bi-distilled water. The first 3 mL were discarded and 1 mL was collected, from which 20 μL were injected to the chromatograph. These operations were immediately after the extraction due to the fact that the patron solution of vitamin C is only stable 3 h. A Supelcosil LC-18 column (25 cm \times 4.6 mm, 5 μm) was used, with mobile phase of methanol:phosphate dipotásico (K_2HPO_4) 50 mM (pH 2.0) (30:70), at a flow of 1.5 mL min^{-1} , and the reading was at a wave length of 254 nm.

The vitamin C content was calculated using a calibration curve with the standard of ascorbic acid (Sigma) and the computer program of the chromatograph (ChemStation for LC Rev. A.10.02, Agilent Technologies, USA).

Puebla×Chiapas y el progenitor Chiapas presentaron los contenidos más altos: 68 337 y 55 927 SHU (Cuadro 2). A los 94 d dichos contenidos se redujeron significativamente ($p \leq 0.05$), a 44 793 y 15 429 SHU. Los genotipos que presentaron la menor concentración a los 58 d, fueron: el progenitor Puebla de fruto rojo (7125 SHU) y el híbrido Puebla×Zongolica (25 923 SHU). Estas concentraciones disminuyeron a los 94 d, a 4472 y 11 268 SHU (Cuadro 2). Este comportamiento concuerda con lo reportado por Contreras-Padilla y Yahia (1998), quienes observaron que el contenido de capsaicinoides disminuye gradualmente después de 40 a 50 d de edad del fruto.

Los contenidos de capsaicinoides obtenidos fueron superiores a los reportados por Pérez (comunicación personal⁵) en estos mismos materiales, en aproximadamente 59% y 68% para los progenitores e híbridos. Estas diferencias podrían deberse a las diferentes condiciones de temperatura y sombreado a que estuvieron expuestos los cultivos. Según Zewdie y Bosland (2000), el efecto de la interacción genotipo×ambiente es significativo en el contenido de capsaicinoides.

En este estudio, el máximo contenido de capsaicinoides en chile manzano fue 68 337 SHU, que triplica las 21 135 SHU reportadas por Collins *et al.* (1995) para esta especie; duplica las 30 555 del chile Jalapeño y cuadruplica las 15 015 de la especie *C. baccatum* (Collins *et al.*, 1995). Las variedades de chiles rojos en la India son las más picantes; la variedad

Cuadro 2. Concentración de capsaicinoides en fruto, en tres grados de desarrollo, de tres híbridos y sus respectivos progenitores.

Table 2. Concentration of capsaicinoids in fruit, in three degrees of development, of three hybrids and their respective parents.

	Capsaicinoides (SHU)		
	58 d	76 d	94 d
Progenitores			
Puebla rojo	7125 g x	4472 f y	2461 e z
Puebla amarillo	13 609 e x	5346 f y	3158 e z
Chiapas	55 927 b x	31 039 b y	15 429 b z
Huatusco	28 947 c x	10 806 d y	2345 e z
Zongolica	9 889 f x	8291 e y	5001 d z
Híbridos			
Puebla×Chiapas	68 337 a x	49 052 a y	44 793 a z
Puebla×Huatusco	29 495 c x	17 407 c y	10 256 c z
Puebla×Zongolica	25 923 d x	11 268 d y	9421 c z

Medias con diferente letra en cada columna (a, b, c, d) o en cada hilera (x, y, z), son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$) ♦ Means with different letter in each column (a, b, c, d) or row (x, y, z) are statistically different ($p \leq 0.05$).

Statistical analysis

The experimental design was completely randomized with three replicates per sample. The experimental unit had five fruits, and a different pot was used for each replicate. A comparison of means was made using Tukey's test ($p \leq 0.05$). The estimation and statistical significance of heterosis with respect to the parent with the highest content of capsaicinoids and vitamin C of the three hybrids was made through orthogonal contrasts. All of the statistical analyses were made with the SAS computer program for Windows version 8.1 (SAS Institute Inc., 2000). Heterosis with respect to the best parent was estimated by means of the following equation (Fehr, 1987):

$$\text{Heterosis (\%)} = \frac{\text{Hybrid} - \text{Parent}}{\text{Parent}} \times 100$$

RESULTS AND DISCUSSION

Capsaicinoid content

The highest capsaicinoid concentration was observed in fruits with 58 d of development. The hybrid Puebla×Chiapas and the parent Chiapas presented the highest contents: 68 337 and 55 927 SHU (Table 2). At 94 d, these contents were reduced significantly ($p \leq 0.05$), to 44 793 and 15 429 SHU. The genotypes that presented the lowest concentration at 58 d were: the red fruit Puebla parent (7125 SHU) and the hybrid Puebla×Zongolica (25 923 SHU). These concentrations decreased at 94 d, to 4472 and 11 268 SHU (Table 2). This behavior concurs with what was reported by Contreras-Padilla and Yahia (1998), who observed that the capsaicinoid content gradually decreases after 40 to 50 d of age of the fruit.

The capsaicinoid contents obtained were higher than those reported by Pérez (personal communication⁵) in these same materials, in approximately 59% and 68% for the parents and hybrids. These differences could be due to the conditions of temperature and shading to which the crops were exposed. According to Zewdie and Bosland (2000), the effect of the interaction genotype×environment is significant in the content of capsaicinoides.

In the present study, the maximum capsaicinoid content in manzano hot pepper was 68 337 SHU, which is three times higher than the 21 135 SHU reported by Collins *et al.* (1995) for this species; two times higher than the 30 555 of Jalapeño pepper and four times higher than the 15 015 of the species *C. baccatum* (Collins *et al.*, 1995). In India, the red pepper varieties are the hottest; the variety Tezpur (*C. frutescens* var. Nagahari) has the highest content (855 000 SHU) and

Tezpur (*C. frutescens* var. Nagahari) posee el mayor contenido (855 000 SHU) y la variedad Kashmir el menor (40 500) (Mathur *et al.*, 2000). En el presente estudio con chile manzano, los frutos más picantes fueron de color rojo (Puebla×Chiapas y Chiapas), con un picor similar al del Chiltepín (70 000 SHU); los menos picosos tuvieron valores similares al chile Serrano (4000 SHU).

A pesar de la disminución en el contenido de capsaicinoides, 63% que presentan los frutos de chile manzano en promedio, éstos continúan siendo picantes. Lo anterior representa un uso potencial para este fruto debido a que en México ha aumentado la demanda de productos con sabor picante, y se han tenido que importar oleoresinas provenientes de África. Por tanto, para usos industriales como elaboración de medicamentos, salsas, embutidos y algunos vinos (industria alimentaria), los frutos de chile manzano con 58 d tendrían el óptimo para la extracción de capsaicinoides, mientras que para consumo directo sería a los 76 y 94 d, cuando son menos picantes.

El contenido de capsaicinoides fue significativamente mayor ($p \leq 0.05$) en los híbridos con respecto a sus progenitores. Lo anterior debido a la heterosis positiva que fluctuó desde 1.9% para el híbrido Puebla×Huatusco a los 58 d, hasta 225% para el mismo híbrido a los 96 d (Cuadro 3). Estos resultados concuerdan con Zewdie y Bosland (2001), quienes reportan heterosis positiva para capsaicinoides en la misma especie. Blum *et al.* (2003) también encontraron que la hibridación incrementa el contenido de capsaicinoides en híbridos de *C. annuum*×*C. frutescens*. En esta característica la hibridación sería un método de mejoramiento genético efectivo para aumentar el picor del fruto.

Contenido de vitamina C

El contenido de vitamina C mostró una curva en forma de campana al graficarse con la edad del fruto (datos no mostrados). La mayor acumulación se observó a los 76 d y luego disminuyó; rápidamente en algunos genotipos y lentamente en otros (Cuadro 4). El progenitor Puebla rojo tuvo el mayor contenido (455 mg 100 g⁻¹) y Huatusco el menor (238 mg 100 g⁻¹ peso fresco), mientras que en estado verde (58 d) los valores fueron 221 y 132 mg 100 g⁻¹ peso fresco. Estos resultados indican que en chile manzano el mejor aprovechamiento de la vitamina C es a los 76 d, que corresponde con la cosecha comercial para consumo en fresco, cuando inicia la pigmentación del fruto.

Gnayfeed *et al.* (2001) encontraron un comportamiento similar en la acumulación de vitamina C en *C. annuum*, pues registraron el valor máximo en el estado

the variety Kashmir has the lowest (40 500) (Mathur *et al.*, 2000). In the present study with manzano hot pepper, the red fruits were the hottest (Puebla×Chiapas and Chiapas), with a hotness similar to that of Chiltepín (70 000 SHU); the least hot had values similar to Serrano pepper (4000 SHU).

Despite the decrease in the capsacinoid content, an average of 63% presented by manzano hot pepper, they continue to be hot. The above represents a potential use for this fruit, due to the fact that in México there has been an increase in the demand for products with a hot flavor, and it has been necessary to import oleoresins from Africa. Therefore, for industrial uses such as the elaboration of medicines, sauces, canned goods and some wines (food industry), the manzano pepper fruits with 58 d would have the optimum level for the extraction of capsacinoids, while for direct consumption it would be at 76 and 94 d, when they have lost some of their hotness.

The capsacinoid content was significantly higher ($p \leq 0.05$) in the hybrids with respect to their parents. The above is a result of the positive heterosis that fluctuated from 1.9% for the hybrid Puebla×Huatusco at 58 d, to 225% for the same hybrid at 96 d (Table 3). These results coincide with Zewdie and Bosland (2001), who report positive heterosis for capsacinoids in the same species. Blum *et al.* (2003) also found that hybridation increases the capsacinoid content in hybrids of *C. annuum*×*C. frutescens*. In this trait, hybridation would be an effective breeding method for increasing hotness of the fruit.

Vitamin C content

The vitamin C content showed a bell shaped curve when graphed with the age of the fruit (data not shown). The highest accumulation was observed at 76 d and later decreased; rapidly in some genotypes and slowly in others (Table 4). The red Puebla parent had the

Cuadro 3. Heterosis (%) con respecto al progenitor con mayor contenido de capsaicinoides en tres híbridos de chile manzano y tres grados de madurez.

Table 3. Heterosis (%) with respect to the parent with the highest capsacinoid content in three hybrids of manzano hot pepper and three degrees of maturity.

Híbridos	Heterosis (%)		
	58 d	76 d	94 d
Puebla×Chiapas	22.19 [†]	58.03 [†]	190.32 [†]
Puebla×Zongolica	90.49 [†]	35.90 [†]	88.38 [†]
Puebla×Huatusco	1.89 [†]	61.09 [†]	224.72 [†]

[†] Significancia ($p \leq 0.05$).

de madurez en color rojo. Según Martínez *et al.* (2005) el contenido de vitamina C en chile Fresno de la Vega (*C. annuum*) es 160 mg 100 g⁻¹ peso fresco en frutos rojos y 109 mg 100 g⁻¹ en fruto verde. En *C. annuum* variedades Jalapeño, Serrano y New Mexican, los valores para frutos verdes y frutos rojos son 122 a 146 mg 100 g⁻¹ peso fresco y 233 mg 100 g⁻¹ peso fresco (Howard *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1995).

Los chiles poseen mayor valor nutritivo en cuanto a vitamina C que el reportado para otras verduras y frutas, incluyendo a los cítricos considerados como una fuente rica en vitamina C en la dieta humana. La porción comestible en la naranja (*Citrus sinensis*) y el limón (*Citrus limon*) contienen 53 y 77 mg 100 g⁻¹ (Salunkhe *et al.*, 1991). Estos valores equivalen a 35% de los encontrados en este estudio para el chile manzano Puebla rojo. La guayaba (*Psidium guajava* L.) se considera como el fruto con mayor contenido de vitamina C (Mitra, 1997); al comparar las concentraciones en el chile manzano Puebla rojo (455 mg 100 g⁻¹) con las de la guayaba (1000 mg 100 g⁻¹), se encontró que esta última posee el doble de esta vitamina. Sin embargo, el consumo de chile manzano aporta los requerimientos diarios recomendados de vitamina C: 60 a 200 mg d⁻¹ (Simon, 2005).

La heterosis en el contenido de vitamina C fue negativa y significativa ($p \leq 0.05$) (Cuadro 5). Lo anterior indica que la hibridación reduce el valor nutritivo de *C. pubescens*, contrario a lo reportado por Geleta y Labuschangne (2006) quienes en variedades de *C. annuum* observaron que la hibridación incrementó el contenido de esta vitamina C. El picor del fruto no influye en su contenido, ya que no se encontró correlación significativa ($r = -0.29$) entre los capsaicinoides y la vitamina.

CONCLUSIONES

En chile manzano la concentración de capsaicinoides disminuyó con la madurez del fruto, en el periodo de 58 a 94 d de edad. La alta heterosis para el picor sugiere que la acción génica del picor no es aditiva y, por tanto, la hibridación sería un método apropiado de fitomejoramiento para elevar el picor del chile manzano.

La concentración de vitamina C aumentó con la edad del fruto hasta los 76 d, lo cual coincide con el inicio de la pigmentación del fruto y el tiempo de cosecha del chile manzano. Este fruto es una buena fuente de vitamina C, cumple con los requerimientos diarios de este nutrimento y equivale a la mitad de la concentración que presenta la guayaba, cuyo fruto es considerado la fuente primordial de vitamina C. Finalmente, el efecto de la heterosis sobre el contenido de vitamina

Cuadro 4. Contenido de vitamina C en tres híbridos y sus progenitores a los 58, 76 y 94 días de desarrollo del fruto.

Table 4. Vitamin C content in three hybrids and their parents at 58, 76 and 94 d of development of the fruit.

	Vitamina C (mg 100 g ⁻¹ peso fresco)		
	58 d	76 d	94 d
	Progenitores		
Puebla rojo	220.72 b y	455.44 a x	180.76 a z
Puebla amarillo	186.45 c y	385.27 c x	130.01 cd z
Chiapas	108.97 f y	344.12 d x	67.73 f z
Huatusco	132.23 e y	238.35 h x	124.67 de z
Zongolica	238.67 a y	428.78 b x	171.91 b z
	Híbridos		
Puebla × Chiapas	171.63 d y	249.61 g x	127.25 de z
Puebla × Huatusco	171.36 d y	285.96 f x	119.54 e z
Puebla × Zongolica	169.94 d y	298.29 e x	35.65 c z

Medias con diferente letra en una columna (a, b, c, d) o en una hilera (x, y, z), son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

highest content (455 mg 100 g⁻¹) and Huatusco the lowest (238 mg 100 g⁻¹ fresh weight), whereas in the green stage (58 d) the values were 221 and 132 mg 100 g⁻¹ fresh weight. These results indicate that in manzano hot pepper the best vitamin C content is at 76 d, which corresponds to the commercial harvest for fresh consumption, at the onset of fruit pigmentation.

Gnayfeed *et al.* (2001) found a similar behavior in the accumulation of vitamin C in *C. annuum*, as they registered the maximum value in the maturity stage of redness. According to Martínez *et al.* (2005), the vitamin C content in Fresno de la Vega pepper (*C. annuum*) is 169 mg 100 g⁻¹ fresh weight in red fruits and 109 mg 100 g⁻¹ in green fruit. In *C. annuum* varieties Jalapeño, Serrano and New Mexican, the values for green fruits and red fruits are 122 to 146 mg 100 g⁻¹ fresh weight and 233 mg 100 g⁻¹ fresh weight, (Howard *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1995).

Hot peppers have a higher nutritive value with respect to vitamin C than what is reported for other vegetables and fruits, including the citrus considered to be a rich source of this vitamin in the human diet. The edible portion in orange (*Citrus sinensis*) and lemon (*Citrus limon*) contains 53 and 77 mg 100 g⁻¹ (Salunkhe *et al.*, 1991). These values are equivalent to 35% of those found in the present study for red Puebla manzano pepper. Guava (*Psidium guajava* L.) is considered the fruit with the highest vitamin C content (Mitra, 1997); when the vitamin C concentrations in red Puebla manzano pepper (455 mg 100 g⁻¹) were compared with those of guava (1000 mg 100 g⁻¹), the latter was

C fue negativo, por lo que la hibridación redujo el valor vitamínico del chile manzano.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México por el financiamiento otorgado para desarrollar este proyecto (Proyecto 45589-Z).

LITERATURA CITADA

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1995. Official Method 995.03. Capsaicinoids in capsicums and their extractives liquid chromatographic method. <http://eoma.aoac.org>. [Consulta: abril de 2007].
- Byers, T., and G. Perry. 1992. Dietary carotens, vitamin C, and vitamin E, as proactive antioxidants in human cancers. *Annu. Rev. Nutr.* 12:139-159.
- Collins, M. D., L. M. Wasmud, and P. W. Bosland. 1995. Improved method for quantifying capsaicinoids in *Capsicum* using high-performance liquid chromatography. *HortScience* 30: 137-139.
- Contreras-Padilla, M., and E. M. Yahia. 1998. Changes in capsaicinoids during development, maturation, and senescence of chile peppers and relation with peroxidase activity. *J. Agric. Food Chem.* 46:2075-2079.
- Dürüst, N., D. Sümengen, and Y. Dürüst. 1997. Ascorbic acid and element contents of Trabzon (Turkey). *J. Agric. Food Chem.* 45:2085-2087.
- Estrada, B. F., Pomar, J. Díaz, F. Merino, and M. A. Bernal. 1997. Evolution of capsaicinoids in *Capsicum annum* L. var. *annuum* cv. Padrón fruit at different growth stages. *Capsicum Eggplant Newsletter* 16:60-63.
- Fawell, D. J. 1998. A comparison of the vitamin C content of fresh and frozen vegetables. *Food Chem.* 62:59-64.
- Fehr, W. R. 1987. Principles of Cultivar Development. Macmillan Publishing Company. A Division of Macmillan, Inc. New York. 536 p.
- Geleta, L. F. and M. T. Labuschagne. 2006. Combining ability and heritability for vitamin C and total soluble solids in pepper (*Capsicum annum* L.). *J. Sci. Food Agric.* 86:1317-1320.
- Gnayfeed, M. H., H. G. Daood, P. A. Biacs, and C. F. Alcaraz. 2001. Content of bioactive compounds in pungent spice red pepper (paprika) as affected by ripening and genotype. *J. Sci. Food Agric.* 81: 1580-1585.
- Govindarajan, V. S., and M. N. Sathyanarayana. 1991. *Capsicum* – production, technology, chemistry and quality. Part V. Impact on physiology, pharmacology, nutrition and metabolism: structure, pungency, pain and desensitization sequences. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 29: 435-474.
- Howard, L. R., R. T. Smith, A. B. Wagner, B. Villalon, and E. E. Burns. 1994. Provitamin A and ascorbic acid content of fresh pepper cultivars (*Capsicum annum* L.) and processed jalapeños. *J. Food Sci.* 59: 362-365.
- Kobata, K., M. Toyoshima, M. Kawamura, and T. Watanabe. 1998. Lipase-catalyzed synthesis of capsaicin analogs using natural oils as an acyl donor. *Biotech. Letters* 20: 781-783.
- Lee, Y., L. R. Howard, and B. Villalón. 1995. Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annum*) cultivars. *J. Food Sci.* 60:473-476.
- López R., G. O. 2003. Chili. La especie del nuevo mundo. *Ciencia* 99: 66-75.
- Maroto B., J. V. 2002. Horticultura Herbácea Especial. 5ª. Edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 702 p.

Cuadro 5. Heterosis (%) con respecto al progenitor con mayor contenido de vitamina C en tres híbridos de chile manzano y tres grados de madurez.

Table 5. Heterosis (%) with respect to the parent with the highest content of vitamin C in three hybrids of manzano hot pepper and three degrees of maturity.

Híbridos	Heterosis (%)		
	58 días	76 días	94 días
Puebla×Chiapas	-22.70 [†]	-45.20 [†]	-29.60 [†]
Puebla×Zongolica	-28.80	-30.43 [†]	-21.09 [†]
Puebla×Huatusco	-8.09 [†]	-25.77 [†]	-8.05 [†]

[†] Significancia ($p \leq 0.05$).

found to have twice as much of this vitamin. However, the consumption of manzano pepper provides the recommended daily requirements of vitamin C: 60 to 200 mg d⁻¹ (Simon, 2005).

Heterosis in the vitamin C content was negative and significant ($p \leq 0.05$) (Table 5). This indicates that hybridation reduces the nutritional value of *C. pubescens*, contrary to what was reported by Geleta and Labuschagne (2006), who observed in varieties of *C. annum* that hybridation increased this vitamin content. The hotness of the fruit does not influence the vitamin C content, given that no significant correlation ($r = -0.29$) was found between the capsaicinoids and the vitamin.

CONCLUSIONS

In manzano pepper the concentration of capsaicinoids decreased with the maturity of the fruit, in the period of 58 to 94 d of age. The high heterosis for hotness suggests that the genic action of hotness is not additive, and therefore, hybridation would be an appropriate method of breeding to increase the hotness of manzano pepper.

The vitamin C concentration increased with the age of the fruit up to 76 d, which coincides with the onset of pigmentation of the fruit and the time of harvest of manzano pepper. This fruit is a good source of vitamin C, complies with the daily requirements of this nutrient and contains half of the concentration of guava, whose fruit is considered to be the primordial source of vitamin C. Finally, the effect of heterosis on the vitamin C content was negative, therefore, hybridation reduced the vitaminic value of manzano pepper.

—End of the English version—



- Martínez, S., M. López, M. González-Raurich, and A. Bernardo. 2005. The effects of ripening stage and processing systems on vitamin C content in sweet peppers (*Capsicum annuum* L.). *Int. J. Food Sci. Nutr.* 56: 45-51.
- Mathur, R., R. S. Dangi, S. C. Dass, and R. C. Malhotra. 2000. The hottest variety in India. *Current Sci.* 79:287-288.
- Mitra, S. K. 1997. *Postharvest Physiology and Storage of Tropical and Subtropical Fruits*. CAB International, New York. 423 p.
- Mozafar, A. 1994. *Plant Vitamins: Agronomic, Physiological and Nutritional Aspects*. CRC Press. Boca Raton, Fl. 412 p.
- Nisperos-Carriedos, M. O., B. S. Buslig, and P. E. Shaw. 1992. Simultaneous detection of dehydroascorbic, ascorbic and some organic acids in fruits and vegetables by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 40:1127-1130.
- Pérez G., M., F. Márquez S., y A. Peña L. 1997. *Mejoramiento Genético de Hortalizas*. Editorial Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo. México. 380 p.
- Salunkhe, D. K., H. R. Bolin, and N. R. Reddy. 1991. *Storage, Processing and Nutritional Quality of Fruits and Vegetables*. Vol. II. *Processed Fruits and Vegetables*. 2nd ed. Boca Raton, Fl. CRC Press. pp:29-39.
- Sakamoto, S., Y. Goda, T. Maitani, T. Yamada, O. Nunomura, and K. Ishikawa. 1994. High-performance liquid chromatographic analyses of capsaicinoids and their phenolic intermediates in *Capsicum annuum* to characterize their biosynthetic status. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 1141-1142.
- Sancho, R., C. Lucena, A. Macho, M. A. Calzado, M. Blanco-Molina, and A. Minassi. 2002. Immunosuppressive activity of capsaicinoids: Capsiate derived from sweet peppers inhibits NF-kappaB activation and is a potent anti-inflammatory compound in vivo. *Eur. J. Immunol.* 32:1753-1763.
- SAS Institute Inc., 2000. SAS software release 8.1. SAS Institute Inc. Cary, NC. EE. UU.
- Simon, H. 2005. Vitaminas, carotenoides y fotoquímicos. A. D. A. M., Inc. www.wellconnected.com/report.cgi/pdf/000039.pdf. Última fecha de actualización: 10 de noviembre de 2005. [Consulta: noviembre de 2006].
- Surch, Y., and S. S. Lee. 1996. Capsaicin in hot chili pepper: carcinogen, co-carcinogen or anti-carcinogen? *Food Chem. Toxicol.* 34:313-316.
- Topuz, A. and F. Ozdemir. 2004. Influences of gamma irradiation and storage on the capsaicinoids of sundried and dehydrated paprika. *Food Chem.* 86:509-515.
- Zewdie, Y., and P. W. Bosland. 2000. Evaluation of genotype, environment, and genotype-by-environment interaction for capsaicinoids in *Capsicum annuum* L. *Euphytica* 111:185-190.
- Zewdie, Y. and P. W. Bosland. 2001. Combining ability and heterosis for capsaicinoids in *Capsicum pubescens*. *HortScience* 36: 1315-1317.