

# HERENCIA DE CAPSAICINOIDES EN CHILE MANZANO (*Capsicum pubescens* R. y P.)

## INHERITANCE OF CAPSAICINOIDS IN MANZANO HOT CHILI PEPPER (*Capsicum pubescens* R. and P.)

Hermilo Sánchez-Sánchez<sup>1</sup>, Víctor A. González-Hernández<sup>1\*</sup>, Ana B. Cruz-Pérez<sup>1</sup>, Mario Pérez-Grajales<sup>2</sup>,  
María A. Gutiérrez-Espinosa<sup>1</sup>, Alfonso A. Gardea-Béjar<sup>3</sup>, Miguel Á. Gómez-Lim<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. Km 36.5 Carretera México-Texcoco. 56230. Montecillo, Estado de México. (vagh@colpos.mx). <sup>2</sup>Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera México-Texcoco. 56230. Chapingo, Estado de México. <sup>3</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Km 0.6 Carretera a la Victoria. 83000. Hermosillo, Sonora, México. (gardea@ciad.mx). <sup>4</sup>Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato. Km 9.6 libramiento norte carrtera Irapuato-León. 36500. Irapuato, Guanajuato. México. (mgomez@ciea.ira.cinvestav.mx).

### RESUMEN

Los capsaicinoides son alcaloides importantes en la salud humana, alimentaria y farmacéutica, y sólo son producidos por plantas del género *Capsicum*. En este estudio se analizó la herencia del contenido de los tres principales capsaicinoides causantes del picor (nordihidro-, dihidro- y capsaicina), en 25 materiales genéticos de chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.), que incluyen a cinco poblaciones (Huatusco, Zongolica, Tacámbaro, Puebla y Perú) más sus 20 cruza interpopulacionales posibles en F1. El análisis dialélico con el Método I de Griffing permitió determinar los efectos de aptitud combinatoria general y específica (ACG y ACE), así como los efectos maternos (EM). Se usó un diseño completamente al azar con tres repeticiones. Sólo en la nordihidrocapsaicina hubo efectos significativos de la ACG, mientras que la ACE fue significativa para los tres capsaicinoides evaluados. Las cruza Puebla×Tacámbaro, Tacámbaro×Perú, y Huatusco×Zongolica destacaron por tener alta ACE y los frutos más picosos. Se detectaron EM positivos en el picor, los cuales representan 45 % de la variación en los materiales genéticos en capsaicinoides totales. Las poblaciones Zongolica y Perú poseen EM en los tres alcaloides, mientras que Puebla sólo los tiene en dihidro- y capsaicina. En contraste, en los progenitores Tacámbaro y Huatusco predominan los EM negativos. El análisis de los resultados permite concluir que el picor en frutos de los materiales de chile manzano aquí estudiados, está regulado principalmente por genes de efectos dominantes más que

### ABSTRACT

Capsaicinoids are alkaloids that are important for human health, as food and pharmaceuticals, and are produced only by plants of the genus *Capsicum*. This study analyzes the inheritance of the content of the three main capsaicinoids that cause the burning sensation (pungency) (nordihydro-, dihydro- and capsaicin) in 25 genetic materials of manzano hot pepper (*Capsicum pubescens* R. and P.), that include five populations (Huatusco, Zongolica, Tacámbaro, Puebla and Perú) plus their 20 possible inter-population F1 crosses. The diallel analysis with the Griffing Method I permitted us to determine the effects of general and specific combining ability effects (GCA and SCA) as well as maternal effects (ME). A completely randomized design was used with three replications. Only in nordihydrocapsaicin there were significant effects of GCA, while SCA was significant for the three capsaicinoids evaluated. The crosses Puebla×Tacámbaro, Tacámbaro×Perú, and Huatusco×Zongolica were outstanding for their high SCA and for having the most pungent fruits. Positive ME on pungency was detected, accounting for 45 % of the variation in total capsaicinoids due to the genetic materials. The Zongolica and Perú populations possess ME in the three alkaloids, while the Puebla population has ME only in dihydrocapsaicin and capsaicin. In contrast, in the progenitors Tacámbaro and Huatusco negative ME are predominant. The analysis of the results suggests that fruit pungency of the manzano chili materials used in this study is regulated mainly by dominant genes, more than by additive effect genes, and that extra-nuclear genes also have a significant influence, a result that had not been previously reported.

\*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: Septiembre, 2009. Aprobado: Mayo, 2010.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 44: 655-665. 2010.

Key words: *Capsicum pubescens*, capsaicinoids, maternal effects.

por genes de efecto aditivo, y que también está influenciado significativamente por genes extranucleares, lo cual no se había reportado con anterioridad.

**Palabras clave:** *Capsicum pubescens*, capsaicinoides, efectos maternos.

## INTRODUCCIÓN

El chile (*Capsicum* spp.) produce un grupo único de alcaloides llamados capsaicinoides que le confieren picor al fruto (Kobata *et al.*, 1998). Los capsaicinoides tienen relevancia en la salud humana (Antonious y Jarret, 2006) y se usan en productos farmacológicos, cosméticos y alimenticios (Rosa *et al.*, 2002). El picor se debe a siete alcaloides de los cuales la dihidro- y capsaicina son responsables del 90 % (Govindarajan y Sathyanarayana, 1991; Vázquez-Flota *et al.*, 2007). Los capsaicinoides se sintetizan y acumulan en la placenta de los frutos de *Capsicum* (Fujiwake *et al.*, 1982; Cruz-Pérez *et al.*, 2007), específicamente en la vacuola celular (Blum *et al.*, 2003).

La cantidad de capsaicinoides acumulados en la placenta depende del ambiente, los genes y su interacción (Zewdie y Bosland, 2000). El locus *C* simple, ahora denominado *Pun1*, es un gen recesivo que codifica a una supuesta aciltransferasa, que está ubicado en el cromosoma 2 y es esencial para el control de la producción de capsaicinoides; el alelo picoso es dominante sobre el no picoso, *pun1* (Blum *et al.*, 2002; Lefebvre *et al.*, 2002; Stewart *et al.*, 2005). Además Blum *et al.* (2003) reportan que el QTL *cap* ubicado en el cromosoma 7 explica 34 a 36 % de la variación total de capsaicinoides y está asociado con efectos ambientales. Otros QTL detectados en los cromosomas 2, 3 y 4 se han relacionado con la variación de capsaicinoides en frutos de *Capsicum* (Ben-Chaim *et al.*, 2006). Algunos de estos genes podrían estar asociados con la producción de capsaicinoides (Blum *et al.*, 2003). En la síntesis de capsaicinoides también se ha reportado al gen *AT3*, perteneciente a la súper familia BADH de las aciltransferasas (Stewart *et al.*, 2005); y al gen recesivo *pun1<sup>2</sup>*, el cual junto con el dominante *Pun1* controla la formación de las vesículas de la placenta donde se acumulan los capsaicinoides en la placenta en *C. chinense*, ya que la ausencia de vesículas resulta en carencia total de picor (Stewart *et al.*, 2007).

## INTRODUCTION

Chili peppers (*Capsicum* spp.) produce a unique group of alkaloids called capsaicinoids that give the fruit their hot, pungent taste (Kobata *et al.*, 1998). Capsaicinoids are relevant in human health (Antonious and Jarret, 2006) and they are used in pharmacological products, cosmetics and food (Rosa *et al.*, 2002). Pungency is caused by seven alkaloids, of which dihydrocapsaicin and capsaicin are responsible for 90 % (Govindarajan and Sathyanarayana, 1991; Vázquez-Flota *et al.*, 2007). Capsaicinoids are synthesized and accumulated in the placenta of *Capsicum* fruits (Fujiwake *et al.*, 1982; Cruz-Pérez *et al.*, 2007), specifically in the cell vacuole (Blum *et al.*, 2003).

The amount of capsaicinoids that accumulate in the placenta depends on environment, genes and the interaction between the two (Zewdie and Bosland, 2000). The simple *C* locus, now called *Pun1*, is a recessive gene that encodes an assumed acyltransferase, which is located on chromosome 2 and is essential to the control of capsaicinoid production; the allele for pungency is dominant over the non-pungent *pun1* (Blum *et al.*, 2002; Lefebvre *et al.*, 2002; Stewart *et al.*, 2005). Blum *et al.* (2003) also report that QTL *cap* located on chromosome 7 explain 34 to 36 % of the total variation in capsaicinoids and is associated with environmental effects. Other QTL detected on chromosomes 2, 3 and 4 have been associated with capsaicinoid variation in *Capsicum* fruits (Ben-Chaim *et al.*, 2006). Some of these genes may be associated with the production of capsaicinoids (Blum *et al.*, 2003). The *AT3* gene, belonging to the BAHD superfamily of acyltransferases, has also been implicated in capsaicinoid synthesis (Stewart *et al.*, 2005), as well as the recessive gene *pun1<sup>2</sup>* which together with the dominant *Pun1* control the formation of vesicles in the placenta where capsaicinoids accumulate in *C. chinense*, since the absence of vesicles results in a total lack of pungency (Stewart *et al.*, 2007).

Biosynthesis of capsaicinoids occurs in the cytoplasm through fatty acid metabolism and phenylpropanoid pathways (Ochoa-Alejo and Gómez-Peralta, 1993). Numerous enzymes act in both routes, but little is known of their effect on phenotypic variation. Aluru *et al.* (2003) report three genes, *Acl*, *Fat* and *Kas*, that encode enzymes

En el citoplasma ocurre la biosíntesis de capsaicinoides mediante el metabolismo de ácidos grasos y la ruta del fenilpropanoide (Ochoa-Alejo y Gómez-Peralta, 1993). En ambas rutas actúan numerosas enzimas de las cuales se conoce poco respecto a su efecto en la variación fenotípica. Aluru *et al.* (2003) reportan tres genes, *Acl*, *Fat* y *Kas*, que codifican enzimas en la ruta sintética de los ácidos grasos necesarios para el desarrollo de la placenta, de los cuales sólo el alelo dominante *KAS* está correlacionado positivamente con el picor. Curry *et al.* (1999) aislaron genes que codifican para la aminotransferasa 3-ceto-acil-ACP-sintasa. Kim *et al.* (2001) aislaron 39 cADN de la placenta de frutos de Chile e identificaron genes que codifican a las enzimas capsaicinoide sintetasa SB2-66, aminotransferasa SB2-149, y 3-ceto-acil-ACP sintasa SB1-58.

Los métodos de Griffing (1956) para análisis dialélicos se usan para selección en plantas (Zhan y Kang, 1997) porque generan información sobre el comportamiento de las cruza y sus progenitores, así como sobre la acción génica (dominancia o aditividad), heterosis o depresión endogámica (Murray *et al.*, 2003). Con los diseños I y II se puede evaluar la magnitud de efectos de herencia materna (Sentz, 1971). La ACG explica la varianza genotípica debida a los efectos genéticos aditivos, y la ACE la varianza genotípica de dominancia (Gutiérrez *et al.*, 2002).

En Chile manzano (*C. pubescens* R. y P.) se encontró heterosis para el contenido de capsaicinoides al evaluar cruza directas de cuatro poblaciones criollas (Huatusco, Zongolica, Puebla y Chiapas). Los contenidos fueron bajos (4000 a 6000 SHU) en fruto completo (Pérez *et al.*, 2004), aunque en otro estudio la población Huatusco tuvo más de 10 000 SHU (Cruz-Pérez *et al.*, 2007). El objetivo de esta investigación fue estimar, con el diseño dialélico tipo I de Griffing (1956), la herencia del picor mediante el análisis de híbridos de Chile manzano generados con cuatro poblaciones mexicanas (Huatusco, Zongolica, Puebla y Tacámbaro) y una peruana. La hipótesis fue que la herencia de los capsaicinoides puede tener efectos maternos debidos a genes extranucleares.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Producción de híbridos simples en invernadero

Se sembraron 20 semillas de las variedades Puebla, Huatusco, Zongolica, Perú y Tacámbaro en charolas con sustrato

in the synthetic route of the fatty acids necessary for the development of the placenta; of these genes, only the dominant *KAS* allele correlates positively with pungency. Curry *et al.* (1999) isolated genes that code for the aminotransferase 3-keto-acyl-ACP-synthase. Kim *et al.* (2001) isolated 39 cDNA from the placenta of chili fruits and identified genes that encode the capsaicinoid synthetase enzymes SB2-66, aminotransferase SB2-149, and 3-keto-acyl-ACP synthase SB1-58.

The methods of Griffing (1956) for diallel analysis are used for plant selection (Zhan and Kang, 1997) because they generate information on the behavior of crosses and their progenitors, as well as on gene action (dominant or additive), heterosis or endogamic depression (Murray *et al.*, 2003). With designs I and II the magnitude of the effects of maternal inheritance can be assessed (Sentz, 1971). GCA explains genotypic variance due to additive genetic effects, and SCA explains the genotypic variance of dominance (Gutiérrez *et al.*, 2002).

In Chile manzano (*C. pubescens* R. and P.), heterosis was found for capsaicinoid content when evaluating direct crosses of four native populations (Huatusco, Zongolica, Puebla, and Chiapas). These contents were low (4000 to 6000 SHU) in whole fruit (Pérez *et al.*, 2004), although in a later study the Huatusco population had more than 10 000 SHU (Cruz-Pérez *et al.*, 2007). Using the diallel design type I of Griffing (1956), our study aimed to estimate the inheritance of pungency through the analysis of hybrids of Chile manzano generated from four Mexican populations (Huatusco, Zongolica, Puebla, and Tacámbaro) and one Peruvian population. The hypothesis was that inheritance of capsaicinoids has maternal effects due to extra-nuclear genes.

## MATERIALS AND METHODS

### Production of simple hybrids in greenhouse

Twenty seeds of the varieties Puebla, Huatusco, Zongolica, Perú and Tacámbaro were planted in trays filled with the substrate Growing Mix® No. 2. When the seedlings had four leaves (30 d old), they were transplanted to polystyrene cups (240 mL) where they were kept until they had 12 leaves (90 d old). They were then transplanted to black polyethylene bags (40 cm wide; 45 cm high); each bag contained 50 % red volcanic (tezontle) gravel in the lower part and 25 % Growing

Growing Mix® No. 2. Cuando las plántulas tenían cuatro hojas (30 d de edad), se trasplantaron a vasos de unicel (240 mL) donde se mantuvieron hasta tener 12 hojas (90 d de edad). Se trasplantaron a bolsas de polietileno negro (40 cm ancho; 45 cm alto); cada bolsa contenía 50 % de tezontle grueso en la parte inferior, 25 % Growing Mix y 25 % de tezontle fino en la parte superior. De 15 plantas de chile manzano, cinco se usaron para producción de semilla de los progenitores mediante autofecundación porque esta especie es considerada autógama; otras cinco plantas se usaron como progenitores femeninos para producir la semilla de los híbridos de cruce directa; y otras cinco como progenitores masculinos para las cruces recíprocas. Todos los cruzamientos se hicieron planta a planta, sin mezcla de polen. La unidad experimental fue una planta.

Para hacer los cruzamientos entre progenitores, los botones florales de las plantas hembras se emascularon y se cubrieron con bolsas de papel "glassine" para evitar cruzamientos no deseados. La polinización controlada se inició 90 d después del trasplante (ddt) en los primeros botones del tercer nudo. La polinización se efectuó en cinco flores por planta por semana, durante un mes, con polen de dos plantas macho. Después de cada polinización, las flores se cubrieron con bolsas de papel "glassine", las cuales se retiraron cuando el fruto había cuajado (2 mm diámetro). En cada caso se dejó una etiqueta de identificación y la fecha de la cruce.

Se obtuvieron 20 cruces dialélicas, 10 directas y 10 recíprocas. De estas cruces F1 y de los cinco progenitores se trasplantaron 15 plantas por cada material genético, de las cuales se utilizaron cinco plantas para el análisis de capsaicinoides (nordihidro-, dihidro- y capsaicina) en frutos.

#### Extracción y cuantificación de capsaicinoides

De cinco plantas de cada material genético se recolectaron 10 frutos de  $76 \pm 5$  d de desarrollo, seleccionados al azar en forma masiva entre los frutos marcados. Cada muestra se etiquetó y congeló en N líquido y se almacenó a  $-20$  °C hasta su análisis químico.

La determinación de los tres principales capsaicinoides (dihidro-, nordihidro- y capsaicina) se hizo en 1 g de materia seca tomada al azar de la biomasa resultante de los 10 frutos completos muestreados, que se procesó para obtener los extractos de capsaicinoides conforme a la metodología de Collins *et al.* (1995), mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en un cromatógrafo Agilent® mod. HP-1100 equipado con un detector de UV y una columna Hypersil ODS® (25 cm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m). El eluyente fue una mezcla de acetonitrilo y agua (40:60), flujo de 1.0 mL  $\text{min}^{-1}$  y el tiempo de corrida por muestra fue 30 min. La concentración de cada capsaicinoide en unidades de picor Scoville (SHU, Scoville heat units) se calculó con las ecuaciones del método oficial de la AOAC (1998):

Mix and 25 % fine red volcanic (tezontle) sand in the upper part. Of every 15 manzano chili plants, five were used for the production of seed by self-pollination because this species is considered autogamous. Another five plants were used as female parents to produce seed from the direct cross hybrids, while the remaining five were used as male parents for the reciprocal crosses. All of the crosses were done plant to plant, without mixing pollen. The experimental unit was one plant.

To make the crosses, the floral buds of the female plants were emasculated and covered with "glassine" paper bags to prevent undesired crosses. Controlled pollination began 90 d after transplant (dat) in the first buds of the third node. Five flowers per plant per week were pollinated for one month with pollen from two male plants. After each pollination, the flowers were covered with "glassine" paper bags, which were removed when the fruit had set (2 mm diameter). In each case, plants were labeled with their identification and the date of the cross.

Twenty diallel crosses were obtained: 10 direct and 10 reciprocal. Of these F1 crosses from the five progenitors, 15 plants per genetic material were transplanted. Five of these plants were used for the analysis of capsaicinoids (nordihydro-, dihydro- and capsaicin) in fruits.

#### Extraction and quantification of capsaicinoids

Ten fruits with  $76 \pm 5$  d of growth were collected at random and mass selected among the marked fruits of five plants from each genetic material. Each sample was labeled, frozen in liquid N and stored at  $-20$  °C until its chemical analysis.

Determination of the three principal capsaicinoids (dihydro-, nordihydro-, and capsaicin) was done on 1 g of dry matter taken at random from the biomass resulting from the 10 whole fruits sampled, which were processed to obtain the capsaicinoid extracts following the methodology of Collins *et al.* (1995), using high precision liquid chromatography (HPLC) in an Agilent® mod. HP-1100 chromatograph equipped with a UV detector and a Hypersil ODS® column (25 cm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m). The eluant was a mixture of acetonitrile and water (40:60); flow was 1.0 mL  $\text{min}^{-1}$ , and run time per sample was 30 min. The concentration of each capsaicinoid in Scoville units of pungency (SHU, Scoville heat units) was calculated with the equations of the official method of AOAC (1998):

$$N = (P_n / P_s) \times (C_s / W_t) \times (10 / 0.98) \times 9300$$

$$D = (P_d / P_s) \times (C_s / W_t) \times (10 / 0.93) \times 16100$$

$$C = (P_c / P_s) \times (C_s / W_t) \times (10 / 0.89) \times 16100$$

where, *N* = nordihydro-; *D* = dihydro-; *C* = capsaicin; *P<sub>n</sub>*, *P<sub>c</sub>*, and *P<sub>d</sub>* = peak area for nordihydro-, dihydro-, and capsaicin;



$$N = (P_n / P_s) \times (C_s / W_t) \times (10 / 0.98) \times 9300$$

$$D = (P_d / P_s) \times (C_s / W_t) \times (10 / 0.93) \times 16100$$

$$C = (P_c / P_s) \times (C_s / W_t) \times (10 / 0.89) \times 16100$$

donde,  $N$  = nordihidro-;  $D$  = dihidro-;  $C$  = capsaicina;  $P_n$ ,  $P_c$ , y  $P_d$  = área del pico para nordihidro-, dihidro- y capsaicina;  $P_s$  = área del pico del estándar correspondiente;  $C_s$  = concentración de la solución estándar ( $\text{mg mL}^{-1}$ );  $W_t$  = peso de la muestra (g). Los capsaicinoides totales se calcularon como la suma de cada compuesto ( $N + C + D$ ). En la conversión de unidades se consideró que  $1 \mu\text{g}$  capsaicinoides  $\text{g}^{-1} = 15$  SHU.

### Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se usó el diseño dialélico de Griffing (1956) método I, en un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones. Se estimaron los efectos de aptitud combinatoria general (ACG) de cada progenitor y la aptitud combinatoria específica (ACE) de cada cruce, así como el efecto materno de los progenitores. El modelo fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = m + g_i + g_j + s_{ij} + (M_i - M_j) + r_{ij} + e_{ijk}$$

donde,  $Y_{ijk}$  = cada una de las observaciones del modelo;  $\mu$  = media general de todas las observaciones;  $g_i$  = aptitud combinatoria general de la línea  $i$ ;  $g_j$  = aptitud combinatoria general de la línea  $j$ ;  $s_{ij}$  = aptitud combinatoria específica ( $i, j$ );  $(M_i - M_j)$  = efecto materno directo de la cruce;  $r_{ij}$  = efecto materno recíproco de la cruce ( $i, j$ );  $e_{ijk}$  = efecto ambiental aleatorio de cada observación. Además se consideró que la suma de efectos maternos directos y recíprocos  $[(M_i - M_j) + r_{ij}]$  corresponde a los efectos maternos totales. Se usó el programa reportado por Zhan y Kang (1997) para el análisis estadístico con SAS (SAS Institute, 2000).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis dialélico

Se detectaron diferencias ( $p \leq 0.10$ ) entre los materiales genéticos (conjunto de poblaciones progenitoras y sus 20 cruces) en los contenidos de cada capsaicoide evaluado, así como en la suma o el total (Cuadro 1). Los efectos de ACE fueron significativos ( $p \leq 0.05$ ) para los tres alcaloides, mientras que la ACG sólo fue significativa para nordihidro-capsaicina. Es decir, la variación observada entre los materiales estudiados estuvo más asociada con efectos

$P_s$  = correspondiente standard peak area;  $C_s$  = concentración of the standard solution ( $\text{mg mL}^{-1}$ );  $W_t$  = sample weight (g). Total capsaicinoids were calculated as the sum of each compound ( $N + C + D$ ). In the conversion of units, it was considered that  $1 \mu\text{g}$  capsaicinoids  $\text{g}^{-1} = 15$  SHU.

### Statistical analysis

For the statistical analysis, the Griffing (1956) method I diallel design was used in a completely randomized experimental design with three replications. With this, the general combining ability (GCA) effects of each parent and the specific combining ability (SCA) effects of each cross, as well as the maternal effect of the parents, were estimated. The following model was used:

$$Y_{ijk} = m + g_i + g_j + s_{ij} + (M_i - M_j) + r_{ij} + e_{ijk}$$

where  $Y_{ijk}$  = each of the observations of the model;  $\mu$  = general mean of all of the observations;  $g_i$  = general combining ability of line  $i$ ;  $g_j$  = general combining ability of line  $j$ ;  $s_{ij}$  = specific combining ability ( $i, j$ );  $(M_i - M_j)$  = direct maternal effect of the cross;  $r_{ij}$  = reciprocal maternal effect of the cross ( $i, j$ );  $e_{ijk}$  = random environmental effect of each observation. In addition, it was considered that the sum of the direct and reciprocal maternal effects  $[(M_i - M_j) + r_{ij}]$  corresponds to the total maternal effects. The program reported by Zhan and Kang (1997) was used for the statistical analysis in SAS (SAS Institute, 2000).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Diallel analysis

Differences ( $p \leq 0.10$ ) in contents of each of the three capsaicinoids assessed as well in the sum of the three or total contents (Table 1) were detected among the genetic materials (set of parent populations and their 20 crosses). SCA effects were significant ( $p \leq 0.05$ ) for the three alkaloids, while GCA effects were significant only for nordihydrocapsaicin. That is, the variation observed among the materials studied was more associated with dominance effects related to heterosis than with additive effects.

Zewdie and Bosland (2000) also report positive heterosis in the production of capsaicinoids, as well as differences in GCA among varieties. One outstanding effect of the diallel analysis conducted here is that there were significant ( $p \leq 0.05$ ) maternal effects on the three alkaloids. This implies that the

**Cuadro 1. Cuadrados medios ( $\times 10^3$ ) del análisis de varianza con el Método 1 de cruas dialélicas de Griffing (1956), para capsaicinoides del fruto de chile manzano.****Table 1. Mean squares ( $\times 10^3$ ) of the analysis of variance with the Griffing (1956) Method I for diallel crosses, for capsaicinoids in manzano chili fruits.**

FV	GL	Cap	Nord	Dihid	Tcap
MG	24	30 037.1*	8061.8*	35 873.6*	162 425.9*
ACG	4	24 731.9	17 966.1**	40 699.1	215 457.8
ACE	10	29 893.7**	8209.2**	25 401.7**	128 100.8**
Dial	14	28 418.9*	10 996.9*	29 772.4*	153 060.0*
EM	CD	4	298.8	44 554.1	199 746.3
	CR	6	4595.3*	44 322.9*	159 399.3*
Error	50	78.7	23.06	20.05	217.6
% EM		44.8	20.42	51.57	45.02
CV (%)		5.90	5.61	2.31	3.12
R <sup>2</sup>		0.99	0.99	0.99	0.99
Media		4756	2704	7474	14 936

FV: fuentes de variación; GL: grados de libertad; Nord, Cap, Dihid, Tcap: nordihidro-, dihidro-, capsaicina y total de capsaicinoides; MG: materiales genéticos; ACG y ACE: aptitud combinatoria general y específica; Dial: dialélico; EM: efectos maternos; CD y CR: cruas directas y recíprocas; \*\*significativo  $p \leq 0.05$ ; CV: coeficiente de variación; % EM: porcentaje de la suma de cuadrados de efectos maternos con respecto a la suma de cuadrados de MG; \*significativo  $p \leq 0.10$  ❖ FV: sources of variation; GL: degrees of freedom; Nord, Cap, Dihid, Tcap: nordihydro-, dihydro-, capsaicin, and total capsaicinoids; MG: genetic materials; ACG and ACE: general combining ability and specific combining ability; Dial: diallel; EM: maternal effects; CD and CR: direct and reciprocal crosses; \*\*significant  $p \leq 0.05$ ; CV: coefficient of variation; % EM: percentage of the sum of squares of maternal effects with respect to the sum of squares of MG. \*significant  $p \leq 0.10$ .

de dominancia relacionados con heterosis, que con efectos aditivos.

Zewdie y Bosland (2000) también reportan heterosis positiva en la producción de capsaicinoides, así como diferencias varietales en ACG. Un aspecto sobresaliente del análisis dialélico aquí realizado es que en los tres alcaloides hubo efectos maternos significativos ( $p \leq 0.05$ ). Esto implica que los genes que codifican este conjunto de productos naturales están ubicados en el ADN nuclear y también en el ADN extranuclear, ya sea en cloroplastos o en mitocondrias.

#### **Efectos de aptitud combinatoria general (ACG) en progenitores**

El hecho que la ACG sólo haya sido significativa ( $p \leq 0.01$ ) para nordihidrocapsaicina (Cuadros 1 y 2), indica que los otros capsaicinoides estarían influenciados mayormente por genes dominantes y epistáticos. Al respecto, Cruz-Pérez *et al.* (2007) reportan mayor cantidad de capsaicinoides en híbridos que en progenitores. Aquí se encontró que las poblaciones progenitoras Tacámbaro y Zongolica presentaron los valores positivos más altos de ACG, por lo que son

genes encoding for this set of natural products are not only located in the nuclear DNA but also in the extra-nuclear DNA, either in chloroplasts or in mitochondria.

#### **Effects of parent general combining ability (GCA)**

The fact that GCA was significant ( $p \leq 0.01$ ) for nordihydrocapsaicin only (Tables 1 and 2), indicates that the other capsaicinoids would be influenced mostly by dominant and epistatic genes. In this respect, Cruz-Pérez *et al.* (2007) report a larger quantity of capsaicinoids in hybrids than in parents. Here, we found that the Tacámbaro and Zongolica parent populations had higher positive GCA values, and therefore they are the most suitable for conferring more pungency to the fruit, considering the three alkaloids; the Huatusco parent also confers pungency via dihydrocapsaicin (Table 2).

#### **Specific combining ability (SCA) effects**

Regarding SCA for total capsaicinoids, the crosses Pue $\times$ Tac, Tac $\times$ Per, Hua $\times$ Zon and Hua $\times$ Per were

**Cuadro 2. Valores promedio de efectos de aptitud combinatoria general (ACG) para contenido de capsaicinoides en cinco progenitores de chile manzano.****Table 2. Average values of general combining ability (GCA) effects for capsaicinoid content in five manzano chili parents.**

Progenitor	Nord	Cap	Dihid	Tcap
Tacámbaro	691.04***	511.36	281.91	1484.31
Puebla	-1228.69***	-1097.15	-1850.49	-4176.34
Huatusco	-135.62***	176.15	1014.43	1054.96
Zongolica	622.31***	1131.48	885.40	2639.20
Perú	50.95**	-721.84	-331.25	-1002.14

Nord, Dihid, Cap y Tcap: nordihidro-, dihidro-, capsaicina y total de capsaicinoides; \*\*\*significativo  $p \leq 0.01$ ; \*\*significativo  $p \leq 0.05$  ❖  
 Nord, Dihid, Cap and Tcap: nordihydro-, dihydro-, capsaicin, and total capsaicinoids; \*\*\*significant  $p \leq 0.01$ ; \*\*significant  $p \leq 0.05$ .

las más adecuadas para conferir mayor picor del fruto al considerar los tres alcaloides; el progenitor Huatusco también confiere picor vía dihidrocapsaicina (Cuadro 2).

### Efectos de aptitud combinatoria específica (ACE)

En cuanto a la ACE para capsaicinoides totales, las cruzas Pue×Tac, Tac×Per, Hua×Zon y Hua×Per destacaron por sus valores positivos ( $p \leq 0.01$ ) y por formar los frutos más picosos, como se mostrará adelante. En cambio, las cruzas menos picosas, Tac×Hua y Per×Zon, presentaron valores negativos de ACE, aunque Pue×Hua, Pue×Zon y Tac×Zon también dieron ACE negativas. Estas cruzas podrían usarse como variedades para consumo en fresco, por ser menos picantes. La ACE en capsaicinoides totales se debió principalmente a dihidro- y capsaicina en las cruzas Tac×Per y Hua×Zon, mientras que en la craza Tac×Per se debió fundamentalmente a la nordihidrocapsaicina (Cuadro 3).

### Efectos maternos

Todos los progenitores mostraron efectos maternos (EM) significativos en contenido de capsaicinoides, excepto para nordihidrocapsaicina (Cuadro 4). Los progenitores Zongolica, Puebla y Perú tuvieron EM positivos ( $p \leq 0.01$ ) para el picor total y en los dos alcaloides predominantes, lo que indica que estos progenitores darían lugar a híbridos más picosos cuando se usen como progenitores femeninos. En contraste, en los progenitores Tacámbaro y Huatusco predominan los EM negativos. El hecho de que el progenitor Zongolica mostrara la mayor magnitud de EM positivos explicaría que dos de sus cruzas,

outstanding for their positive values ( $p \leq 0.01$ ) and for producing the most pungent fruits, as will be shown below. In contrast, the less pungent crosses, Tac×Hua and Per×Zon, showed negative SCA values, although Pue×Hua, Pue×Zon and Tac×Zon also yielded negative SCA. These crosses can be used as varieties for fresh consumption because they are less pungent. The SCA in total capsaicinoids was due mainly to dihydro- and capsaicin in the crosses Tac×Per and Hua×Zon, while in the cross Tac×Per, it was due fundamentally to nordihydrocapsaicin (Table 3).

### Maternal effects

All of the parents showed significant maternal effects (ME) on capsaicinoid contents, except for that of nordihydrocapsaicin (Table 4). The parents Zongolica, Puebla and Perú had positive ME ( $p \leq 0.01$ ) for total pungency and on the two predominant alkaloids, indicating that these parents would give rise to more pungent hybrids when used as female parents. In contrast, negative ME predominate in the Tacámbaro and Huatusco parents. The fact that the Zongolica parent showed the largest magnitude of positive ME may explain why two of its crosses, in which it was the female parent, presented high total capsaicinoid contents.

It is inferred, then, that the parent populations Zongolica, Perú and Puebla are those that confer greater extra-nuclear genetic effects for high pungency in manzano chili. But in the Tacámbaro population, whose ME were negative for the three alkaloids, extra-nuclear genes with effects of low pungency must predominate. Therefore, the production of capsaicinoids is regulated by nuclear

**Cuadro 3. Valores de efectos de aptitud combinatoria específica (ACE) en las cruzas de cinco progenitores, para capsaicinoides. Table 3. Values of specific combining ability (SCA) effects on crosses of five parents, for capsaicinoids.**

Cruza	Nord	Cap	Dihid	Tcap
Pue×Tac	344***	3730***	2965***	7039***
Pue×Hua	357***	-1149***	-1264***	-2056***
Pue×Per	-242***	-597***	266***	-573***
Pue×Zon	-639***	-834***	-386***	-1858***
Tac×Hua	-1135***	-2455***	-1910***	-5500***
Tac×Per	1730***	881***	248***	2859***
Tac×Zon	-667***	-433***	180***	-920***
Hua×Per	400***	684***	-265***	820
Hua×Zon	-696***	3782***	3426***	6511***
Per×Zon	-1233***	-2761***	-3117***	-7111***

Nord, Dihid, Cap y Tcap: nordihidro-, dihidro-, capsaicina y total de capsaicinoides; Tac: Tacámbaro; Per: Perú; Pue: Puebla; Zon: Zongolica; Hua: Huatusco; \*\*\*significativo  $p \leq 0.01$  ❖ Nord, Dihid, Cap and Tcap: nordihydro-, dihydro-, capsaicin, and total capsaicinoids; Tac: Tacámbaro; Per: Perú; Pue: Puebla; Zon: Zongolica; Hua: Huatusco; \*\*\*significant  $p \leq 0.01$ .

**Cuadro 4. Valores de efectos maternos de cinco progenitores para contenidos de capsaicinoides. Table 4. Values of maternal effects of five parents for capsaicinoid contents.**

Cruza	Nord	Cap	Dihid	Tcap
Tacámbaro	-432.48***	-1388.67***	-1671.50***	-3492.6**
Puebla	-176.63***	724.55***	178.79***	726.71**
Huatusco	36.74	-880.82***	-468.05***	-1312.1***
Zongolica	372.96***	1378.93***	1677.98***	3429.8***
Perú	199.41**	166.01***	282.78***	648.2***

Nord, Dihid, Cap y Tcap: nordihidro-, dihidro-, capsaicina y total de capsaicinoides; \*\*\*significancia  $p \leq 0.01$ ; \*\*significancia  $p \leq 0.05$  ❖ Nord, Dihid, Cap and Tcap: nordihydro-, dihydro-, capsaicin, and total capsaicinoids; \*\*\*significant  $p \leq 0.01$ ; \*\*significant  $p \leq 0.05$ .

donde fungió como hembra, presentaran altos contenidos de capsaicinoides totales.

Se infiere entonces que las poblaciones progenitoras Zongolica, Perú y Puebla son las que confieren mayores efectos genéticos extranucleares para alto picor en chile manzano. Pero en la población Tacámbaro, cuyos EM fueron negativos en los tres alcaloides, deben predominar los genes extranucleares con efectos de bajo picor. Por tanto, la producción de capsaicinoides está regulada por genes nucleares, y además influenciada por genes extranucleares.

La síntesis de capsaicinoides tiene lugar en el citosol y culmina en una fracción de la vacuola (Sokrasno y Yeoman, 1993). Hay otros genes del picor (*Kas*, *Acl* y *Fat*) no relacionados con el locus *C* dominante (Blum *et al.*, 2002), que son necesarios para el desarrollo de la placenta en frutos de *Capsicum* y para la producción de capsaicinoides (Aluru *et al.*, 2003). Así, además de los efectos ambientales reportados por

genes, and it is also influenced by extra-nuclear genes.

Synthesis of capsaicinoids takes place in the cytosol and culminates in a fraction of the vacuole (Sokrasno and Yeoman, 1993). There are other pungent genes (*Kas*, *Acl* and *Fat*) that are not related to the dominant *C* locus (Blum *et al.*, 2002), but are necessary for placenta development in fruits of *Capsicum* and for production of capsaicinoids (Aluru *et al.*, 2003). Thus, besides the environmental effects reported by Zewdie and Bosland (2000), in the cell extra-nuclear genes interact for the production of capsaicinoids in manzano chili, and these effects represent 45 % of the sum of total squares due to genetic materials (Table 1).

### Capsaicinoid content

Total capsaicinoid contents in fruits of manzano chili fluctuated widely among genotypes, from



Zewdie y Bosland (2000), en la célula hay interacción de los genes extranucleares para la producción de capsaicinoides en chile manzano, y estos efectos representan 45 % de la suma de cuadrados total debida a materiales genéticos (Cuadro 1).

### Contenido de capsaicinoides

Los contenidos de capsaicinoides totales en el fruto de chile manzano fluctuaron ampliamente entre genotipos, de 4032 a 36 712 SHU. El picor de los cinco progenitores aquí evaluados mostró el siguiente orden: Zongolica > Huatusco > Perú > Tacámbaro > Puebla. Zongolica superó a los demás progenitores en 26.7, 28.2, 38.8 y 82.9 %, y el progenitor Puebla mostró el menor picor (Cuadro 5).

Entre los híbridos destacó Zongolica × Huatusco por su alto picor, tuvo como progenitor femenino al más picoso, superó en 35.7 % al progenitor Zongolica (el más picoso) y además mostró los efectos más altos de ACG y de EM para picor. Esta cruce fue la segunda más alta en ACE, después de Puebla × Tacámbaro; esta última fue la segunda más picosa, atribuible a su alta ACE, pues aunque de mínimo picor Puebla posee efectos maternos positivos.

El picor total del fruto de chile manzano se debió a la nordihidro- (5-10 %), dihidro- (50-60 %) y a la capsaicina (30-40 %). Los porcentajes de los tres alcaloides estimados están directamente relacionados con su grado de picor, ya que según Govindarajan y Sathyanarayana (1991) la capsaicina y dihidro- explican 90 % del picor de frutos de chile manzano.

### CONCLUSIONES

El picor de los frutos de chile manzano estudiados presentó variación en efectos aditivos de los genes (ACG) y en efectos genéticos de dominancia (ACE), así como en efectos maternos (EM) ubicados en genes extranucleares. Los EM representaron 45 % de la suma de cuadrados total para capsaicinoides, y ésta es la primera vez que se reportan efectos maternos en la herencia de estos compuestos en *Capsicum pubescens* (R. y P.). Los EM positivos en capsaicinoides ocurrieron en los progenitores Zongolica, Puebla y Perú, mientras que en Tacámbaro y Huatusco fueron negativos. Zongolica fue también el progenitor con más picor entre los cinco evaluados, y una de sus cruces

4032 to 36 712 SHU. Pungency of the five parents assessed here showed the following order: Zongolica > Huatusco > Perú > Tacámbaro > Puebla. Zongolica surpassed the other parents by 26.7, 28.2, 38.8 and 82.9 %, and the Puebla parent was the least pungent (Table 5).

Among the hybrids, Zongolica × Huatusco was outstanding for being highly pungent. This hybrid, which had the most pungent variety as its female parent, surpassed Zongolica (the most pungent) by 35.7 %; in addition, it showed the highest effects of GCA and ME for pungency. This cross was the second highest in SCA, after Puebla × Tacámbaro, which was the second most pungent, attributable to its high SCA since, although Puebla is the least pungent, it possesses positive maternal effects.

Total pungency of manzano chili fruit was due to nordihydro- (5-10 %), dihydro- (50-60 %) and capsaicin (30-40 %). The percentages of the three estimated alkaloids are directly related to the degree of pungency since, according to Govindarajan and Sathyanarayana (1991), both dehydro- and capsaicin explains 90 % of the pungency of manzano chili peppers.

### CONCLUSIONS

Pungency of the fruits in the manzano chili studied exhibited variation in additive effects of the genes (GCA) and in genetic dominance effects (SCA), as well as in maternal effects (ME) located in extra-nuclear genes. The ME represented 45 % of the sum of total squares for capsaicinoids, and this is the first time maternal effects are reported in inheritance of these compounds in *Capsicum pubescens* (R. and P.). The positive ME on capsaicinoids occurred in the parents Zongolica, Puebla and Perú, while in Tacámbaro and Huatusco they were negative. Zongolica was also the most pungent parent among the five evaluated, and one of its crosses (Zongolica × Huatusco) produced 35.7 % more capsaicinoids than its feminine parent (Zongolica); this is associated with its high GCA and SCA values.

—End of the English version—



**Cuadro 5. Contenido de capsaicinoides (SHU) en frutos de cinco poblaciones progenitoras y sus 20 cruzas posibles, en chile manzano.****Table 5. Content of capsaicinoids (SHU) in fruits of five parent populations of manzano chili and their 20 possible crosses.**

Cruza	Nord	Cap	Dihid	Total
Zon×Hua	2843 f	14991 a	18876 a	36712 a
Pue×Tac	2023 gh	11892 b	11245 b	25162 b
Zon	7184 a	7265 c	9141 d	23591 c
Zon×Tac	4506 c	7238 c	9731 c	21476 d
Per×Hua	4416 c	6882 c	9824 c	21123 d
Per×Tac	5707 b	5598 d	9802 c	21108 d
Hua×Tac	3089 ef	4498 ef	9805 c	17393 e
Hua	3508 de	4246 fg	9515 cd	17270 e
Per	2151 g	5106 de	9679 c	16937 e
Tac×Per	4645 c	5256 de	5544 ij	15446 f
Tac×Zon	2196 g	4694 ef	7912 e	14803 fg
Hua×Pue	2661 f	3905 fgh	8098 e	14665 fgh
Tac	3815 d	4056 fgh	6555 gh	14427 fgh
Zon×Per	2924 f	3635 ghi	7225 f	13786 gh
Pue×Zon	1878 ghi	4708 ef	7033 fg	13620 gh
Hua×Zon	2145 g	4702 ef	6724 fgh	13572 gh
Tac×Pue	2998 f	3909 fgh	6496 h	13405 h
Hua×Per	1624 hij	2907 ijk	5961 i	10494 i
Pue×Per	1435 jik	2439 jk	5892 i	9767 ij
Zon×Pue	1041 kl	3206 hij	5214 j	9462 ij
Per×Pue	1135 kl	2242 kl	5226 j	8603 j
Tac×Hua	1160 kl	1480 lm	3916 k	6558 k
Per×Zon	1365 jk	1176 m	2598 l	5140 l
Pue×Hua	732 lm	1468 lm	2652 l	4854 l
Pue	427 m	1412 lm	2192 l	4032 l

Valores con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). Nord, Dihid, Cap y Tcap: nordihidro-, dihidro-, capsicina, y total de capsaicinoides; Tac: Tacámbaro; Per: Perú; Pue: Puebla; Zon: Zongolica; Hua: Huatusco. \* Values with different letters are statistically different (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). Nord, Dihid, Cap and Tcap: nordihydro-, dihydro-, capsaicin, and total capsaicinoids; Tac: Tacámbaro; Per: Perú; Pue: Puebla; Zon: Zongolica; Hua: Huatusco.

(Zongolica×Huatusco) produjo 35.7 % más capsaicinoides que su progenitor femenino (Zongolica), lo cual se asocia con sus altos valores de ACG y ACE.

### LITERATURA CITADA

- Aluru, R. M., M. Mazourek, G. L. Landry, J. Curry, M. Jhan, and A. M. O'Connell. 2003. Differential expression of fatty acid synthase genes *Acl*, *Fat* and *Kas*, in *Capsicum* fruit. *J. Exp. Bot.* 54: 1655-1664.
- Antonious, F. G., and L. R. Jarret. 2006. Screening *Capsicum* accessions for capsaicinoids content. *J. Environ. Sci. Health* 41: 717-729.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists International). 1998. Capsaicinoids in capsicum and their extractives. Liquid chromatographic method. Official Methods of Analysis of AOAC International. 2(43): 13-15.
- Ben-Chaim, A., Y. Borovsky, M. Falisse, M. Mazourek, B. C. Kang, I. Paran, and M. Jhan. 2006. QTL analysis for capsaicinoids content in *Capsicum*. *Theor. Appl. Genet.* 113: 1481-1490.
- Blum, E. L., M. Kede, E. Mazourek, E. Young Yoo, M. Jahn, and I. Paran. 2002. Molecular mapping of the *C* locus for presence of pungency in *Capsicum*. *Genome* 45: 702-705.
- Blum, E. L., M. Mazourek, M. O'Connell, J. Curry, T. Thorup, K. Liu, M. Jhan, and I. Paran. 2003. Molecular mapping of capsaicinoids biosynthesis genes and quantitative trait loci analysis for capsaicinoids content in *Capsicum*. *Theor. Appl. Genet.* 108: 79-86.
- Cruz-Pérez, A. B., V. A. González-Hernández, R. M. Soto-Hernández, M. A. Gutiérrez-Espinoza, A. A. Gardea-Béjar, y M. Pérez-Grajales. 2007. Capsaicinoides, vitamina C y heterosis durante el desarrollo del fruto de chile manzano. *Agrociencia* 41: 627-635.
- Collins, M., M. Wasmund, and P. W. Bosland. 1995. Improved method for quantifying capsaicinoids in *Capsicum* using high performance liquid chromatography. *Hort. Sci.* 30: 137-139.
- Curry, J., M. Aluru, M. Mendoza, J. Nevarez, M. Melendrez, and M.A. O'Connell. 1999. Transcripts for possible capsaicinoid biosynthetic genes are different accumulated in pungent and non-pungent *Capsicum* spp. *Plant Sci.* 148: 47-57.

- Fujiwake, H., T. Suzuki, and K. Iwai. 1982. Capsaicinoid formation in the protoplast from the placenta of *Capsicum* fruits. *Agric. Biol. Chem.* 46: 2591-2592.
- 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 Critical Rev. Food Sci. Nutr.* 29: 435-473.
- Griffing, B. 1956. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Aust. J. Biol. Sci.* 9: 463-493.
- Gutiérrez, R. E., A. Palomo, A. Espinoza B., y E. De la Cruz L. 2002. Aptitud combinatoria y heterosis para rendimiento de líneas de maíz en la Comarca Lagunera, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 25: 271-277.
- Kim, M., S. Kim, and B. D. Kim. 2001. Isolation of cDNA clones differentially accumulated in the placenta of pungent pepper by suppression subtractive hybridization. *Molecules and Cells* 11: 213-219.
- Kobata, K., T. Todo, S. Yazawa, K. Iwai, and T. Watanabe. 1998. Novel capsaicinoid-like substances, capsiate and dihydrocapsiate, from the fruits of a nonpungent cultivar, CH-19 sweet, of pepper (*Capsicum annum*). *J. Agric. Food Chem.* 46: 1695-1697.
- Lefebvre, V., S. Pflieger, A. Thabuis, C. Caranta, and A. Blattes. 2002. Towards the saturation of the pepper linkage map by alignment of three intraspecific maps including known-function genes. *Genome* 45: 839-854.
- Murray, L. W., I. M. Ray, H. Dong, and A. Segovia-Lerma. 2003. Clarification and reevaluation of population-based diallel analyses: Gardner and Heberhart analyses II and III revisited. *Crop Sci.* 43: 1930-1937.
- Ochoa-Alejo, N., and J. E. Gómez-Peralta. 1993. Activity of enzymes involved in capsaicin biosynthesis in callus tissue and fruits of chili pepper (*Capsicum annum* L.). *J. Plant Physiol.* 141: 147-152.
- Pérez, G. M., V. A. González H., M. C. Mendoza C., C. Peña V., A. Peña L., and J. Sahagún C. 2004. Physiological characterization of manzano hot pepper (*Capsicum pubescens* R y P) landraces. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 129: 88-92.
- Rosa, A., M. Deiana, V. Casu, S. Paccagnini, G. Appendino, M. Ballero, and A. Dessi. 2002. Antioxidant activity of capsinoids. *J. Agric. Food Chem.* 50: 7396-7401.
- SAS Institute. 2000. Statistical Analysis System software release V 8.1. SAS Institute Inc. Cary, NC.
- Sentz, J. 1971. Genetic variances in a synthetic variety of maize estimated by two mating designs. *Crop Sci.* 11: 234-238.
- Sokrasno, N., and M. M. Yeoman. 1993. Phenylpropanoid metabolism during growth and development of *Capsicum frutescens* fruits. *Phytochemistry* 32: 839-844.
- Stewart, C. Jr., B-C. Kang, K. Liu, M. Mazourek, S. L. Moore, E. Y. Yoo, B. D. Kim, I. Paran, and M. M. Jahn. 2005. The *Pun1* gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. *The Plant J.* 42: 675-688.
- Stewart, C. Jr., M. Mazourek, G. M. Stellari, M. O'Connell, and M. Jahn. 2007. Genetic control of pungency in *C. chinense* via the *Pun1* locus. *J. Exp. Bot.* 58: 979-991.
- Vázquez-Flota, F., Ma. L. Miranda-Ham, M. Monforte-González, G. Gutiérrez-Carbajal, C. Velázquez-García, y Y. Nieto-Pelayo. 2007. La biosíntesis de capsaicinoides, el principio picante del chile. *Rev. Fitotec. Mex.* 30: 353-360.
- Zhan, Y., and M. S. Kang. 1997. Diallel-SAS: A SAS program for Griffing's diallel analysis. *Agron. J.* 89: 176-182.
- 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.