



# Interempresas.net | HORTICULTURA



**Patrocinado por:** Sembradoras remolcadas, autopropulsadas y manuales para grandes profesionales

Tel : +33 5 46 35 28 28 — E-mail : terradonis@ics-agri.com — www.terradonis.com — Grupo ICS

## Capsicum sp.: diversidad y capsicinoides



Ana Garcés-Claver

Dra. Ingeniero Agrónomo e Investigadora del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA)

06/07/2015



El género *Capsicum*, originario del continente americano (Andrews, 1984), comprende 33 especies (GRIN, 2014), de las cuales cinco, *Capsicum annuum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L., y *C. pubescens* Ruiz & Pav., han sido domesticadas (Bosland, 1994; Bosland y Votaba, 2000). De ellas, *C. annuum* es la especie más cultivada en todo el mundo. Los restos más antiguos identificados como *C. annuum*, que podrían corresponder a las primeras evidencias de su domesticación, se encontraron en dos estados de Méjico: Puebla y Tamaulipas, en el Valle de Tehuacán (Smith 1967, 1987) y en las cuevas de Ocampo (Mangelsdorf et al., 1965), respectivamente. Recientemente, se ha propuesto que la domesticación de esta especie pudo tener lugar en una o dos áreas de Méjico, concretamente en la zona noroeste y central-este de Méjico (Kraft et al., 2014).

Diversidad de *Capsicum* sp.

Las diferentes especies de *Capsicum* comenzaron a ser introducidas en Europa a finales del siglo XV. Llegaron primero a la Península Ibérica, desde donde se distribuyeron, primero, hacia el resto de Europa y posteriormente, a África, a India y a China (Bosland y Votava, 2000). La domesticación y selección a la que fueron sometidas las distintas especies por los agricultores durante cientos de años, así como, el amplio abanico de condiciones agro-ambientales en las que fueron cultivadas, ha hecho, que en la actualidad, haya una gran variabilidad morfológica de cultivares de pimiento en cuanto a su forma, tamaño y colores, entre otras características (Nuez et al., 1996). En los programas de mejora de pimiento se aprovecha esta amplia variabilidad para obtener nuevas variedades que respondan a las demandas del sector agrícola y de los consumidores. Para ello, es esencial, disponer de una detallada caracterización geográfica, morfológica y molecular de la diversidad de *Capsicum*. En este sentido, se han realizado trabajos de caracterización de distintas colecciones de germoplasma de pimiento. A nivel morfológico se han analizado los principales descriptores cuantitativos y cualitativos para este género (Villota-Cerón et al 2012; Occhiuto et al 2014; Carvalho et al 2014; Bozokalfa y Eşiyok, 2011).



*Variabilidad morfológica de Capsicum.*

A nivel molecular se han utilizado distintos tipos de marcadores moleculares, como RFLPS, RAPDS, AFLPS y SSRs, para estudiar el nivel de variabilidad genética, así como las relaciones genéticas, de entradas de *Capsicum* de distintas colecciones de germoplasma (Lefebvre et al., 1993; Paran et al., 1998; Ibiza et al. 2011; González-Pérez et al., 2014). La reciente secuenciación del genoma del pimiento (Qin et al., 2014; Kim et al., 2014) es una oportunidad para los mejoradores para continuar los estudios de variabilidad genética y evolución de las especies, así como, para profundizar en el conocimiento del control genético de importante caracteres de mejora como la calidad y las resistencias a estreses bióticos y abióticos.

### **Los capsicinoides son los responsables de picor de los pimientos**

Los capsicinoides son compuestos alcaloides que pertenecen al metabolismo secundario de la planta de pimiento. La biosíntesis de estos compuestos es única del género *Capsicum* y comienza a partir de los 20 días post-antesis, acumulándose en unas vesículas localizadas a lo largo de la epidermis del tejido placentario de los frutos de pimiento (Iwai et al., 1979; Ohta, 1962; Suzuki et al., 1980; Zamski et al., 1987).

Estos compuestos son los responsables del carácter picante de los frutos y aunque se han descrito al menos 11 compuestos, la capsicina es el mayoritario, seguido por la dihidrocapsicina (Reilly et al. 2001; Maillard et al. 1997). Ambos compuestos pueden representar hasta el 80% del total del contenido de capsicinoides. La condensación catalizada, por la *capsicina sintetasa* (CS), entre un anillo aromático y una cadena de ácidos grasos de entre 9 y 11 C da lugar a estos compuestos. El anillo aromático es la vanillilamina, que deriva de la fenilalanina. La cadena de ácidos grasos se biosintetiza a partir de los aminoácidos valina y leucina (Bennett and Kirby, 1968; Leete y Loudon, 1968; Sukrasno y Yeoman, 1993; Suzuki et al., 1981). Los distintos capsicinoides difieren en la longitud de la cadena, su saturación y la posición del metilo terminal (Figura 1).

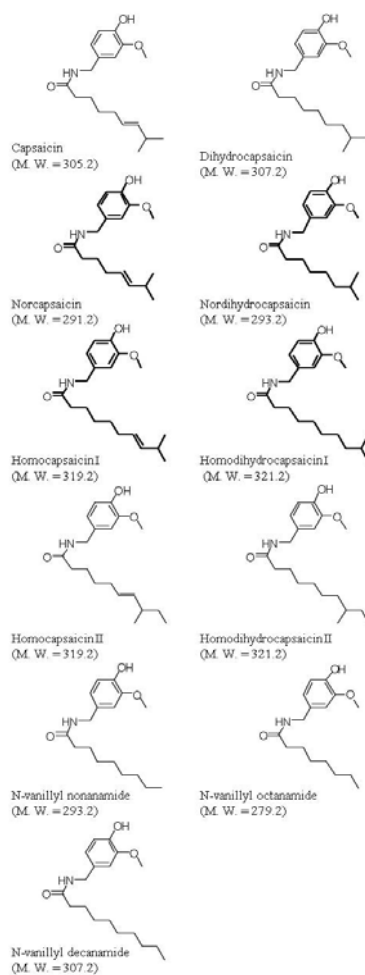


Figura 1. Estructura química y peso molecular (M.W.) de los capsicinoides.

La presencia de estos compuestos en los frutos podría haber facilitado la dispersión de las especies de *Capsicum*, ya que actúa como un mecanismo de defensa y disuasivo contra los pequeños mamíferos que intentan comerse los frutos, evitando su desaparición. No sucede lo mismo con los pájaros, que al no percibir el picor, los consumen y distribuyen las semillas consumidas, siendo la tasa de germinación de estas semillas similar a la de las semillas sin consumir y nula para aquellas consumidas por pequeños mamíferos (Tewksbury y Nabhan, 2001).

El carácter picante, así como el nivel de picor, depende de la especie de *Capsicum* y de la variedad. Aunque hay que tener en cuenta que el perfil de capsicinas no es un criterio taxonómico para distinguir las especies de *Capsicum* (Zewdie y Bosland, 2001). Hay algunas especies de *Capsicum* que son polimórficas para el carácter picante, ya que producen tanto frutos picantes como no picantes, como sucede con *C. chacoense*. Estudios realizados por Haak et al., (2011), en diferentes poblaciones naturales de frutos picantes y no picantes de *C. chacoense*, proponen que la presencia de plantas picantes está limitada por su adaptación a la regiones secas y depende de la eficiencia del uso del agua y de la densidad de estomas. Es decir, la relación densidad de estomas/picor limitaría la evolución del carácter picante en las

poblaciones. Por otro lado, el contenido de capsicinoides varía a lo largo del desarrollo del fruto (Díaz et al., 2004; Estrada et al., 2000) y está fuertemente influenciado por el ambiente (Blum et al., 2003; Garcés-Claver et al., 2007b; Harvell y Bosland, 1997; Zewdie y Bosland, 2000b).

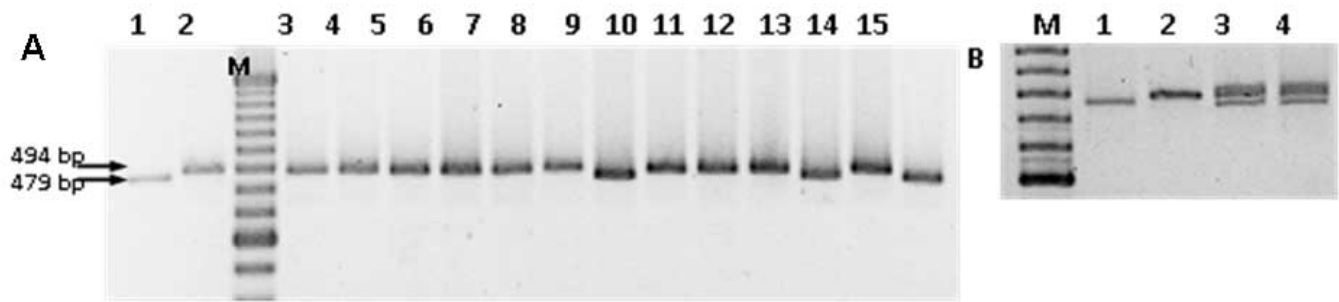


Figura 2. Fragmentos amplificados con el marcador alelo específico MAP1. Los genotipos no picantes presentan el fragmento de 479 pb y los picantes de 494 bp. (A) Genotipos 1: 'Yolo Wonder'; 2: 'Serrano Criollo de Morelos-334'; M: marcador de tamaño 50 bp; 3: 'C-234'; 4: 'C-235'; 5: 'C-236'; 6: 'C-237'; 7: 'C-238'; 8: 'C-261'; 9: 'Doux D'Alger'; 10: 'C-306'; 11: 'C-323'; 12: 'Agridulce'; 13: 'UF15'; 14: 'C-342'; 15: 'Morrón de Fresno'. (B) Amplificación con MAP1 de los parentales 'Yolo Wonder' (no picante) y 'Serrano Criollo de Morelos-334' (picante) y dos individuos de su descendencia F1; 1: 'Yolo Wonder'; 2: 'Serrano Criollo de Morelos-334'; 3 y 4: F1.

El control genético del carácter picante está determinado por el gen dominante *C*, localizado en el mapa de pimiento en el cromosoma 2 (Blum et al., 2002) y co-localizado con el gen *Pun1/AT3*. Este gen codifica para una aciltransferasa, la cual ha sido propuesta para ser la *capsicina sintetasa* (CS), responsable del último paso catalítico de la biosíntesis de los capsicinoides (Arce-Rodríguez y Ochoa-Alejo, 2015; Stewart et al., 2005, 2007). Del gen *Pun1*, se han identificado tres alelos mutantes que confieren la característica de no picante: *pun1*<sup>1</sup>, *pun1*<sup>2</sup> y *pun1*<sup>3</sup>. El alelo, *pun1*<sup>1</sup>, se ha identificado exclusivamente en *C. annuum* y es el utilizado habitualmente en los programas de mejora para seleccionar los genotipos no picantes (Stewart et al., 2005). Los alelos *pun1*<sup>2</sup> (Stewart et al., 2007) y *pun1*<sup>3</sup> no llegan a traducirse a proteínas (Stellari et al., 2010) y se han encontrado en otras especies.

Para la identificación molecular del carácter picante se han desarrollado distintos marcadores moleculares. El marcador molecular alelo específico Map1 discrimina entre individuos picantes y no, pertenecientes a distintas especies de *Capsicum* (Rodríguez-Maza et al., 2012; Garcés-Claver et al., 2007a). También, se han desarrollado marcadores para identificar los distintos alelos de *Pun1* (Wyatt et al., 2012).



*Eppendorf con una solución de extracto de capsicinoides, preparado para su análisis por HPLC-MS.*

El contenido de capsicinoides es un carácter que se hereda cuantitativamente (Zewdie y Bosland, 2000a, b). Pocos estudios se han llevado a cabo para comprender mejor el control genético de la biosíntesis de los capsicinoides. En uno de ellos, se detectó el QTL mayor, *cap*, en el cromosoma 7 (Blum et al., 2003), que posteriormente, fue relacionado con el QTL *ndhc7a.1*, identificado por afectar al contenido de la nordihidrocapsicina (Ben-Chaim et al., 2006). En este mismo trabajo también se detectó el QTL *cap3.1*, afectando a los contenidos de capsicina y total de capsicinoides.

La evaluación del contenido de capsicinoides es de gran interés, en primer lugar, para los mejoradores de pimiento, ya que es un carácter a tener en cuenta en los procesos de selección de los programas de mejora de *Capsicum*. En segundo lugar, para las industrias del sector agroalimentario, dado el interés que despierta el picante y que ha hecho que los pimientos sean tan populares y consumidos. Y finalmente, en el sector farmacéutico, por sus características analgésicas y antitumorales (Caterina et al., 1997, 2000; Huang et al., 2013).



Fruto abierto de la variedad Habanero naranja (*C. chinense*). Su estado de desarrollo es de 20 días postantesis, donde ya se han comenzado a biosintetizar los capsicinoides. En la foto se observa la placenta y septos.

El primer método que se utilizó para evaluar el picante en pimiento fue el Test Scoville (Scoville, 1912), que estimaba, a través de medidas organolépticas, el contenido total de capsicinoides utilizando las denominadas Unidades Scoville. Este método, aunque popular, es impreciso y subjetivo. Posteriormente, una vez se identificaron las principales moléculas responsables del picor, la capsicina y la dihidrocapsicina (Bennett y Kirby, 1968), se desarrollaron metodologías analíticas para cuantificarlas, como la colorimetría (Gibbs y O'Garro 2004), espectrofotometría (Mori et al., 1976; Ramos, 1979; Bajaj, 1980; Rymal et al., 1984) y la cromatografía de papel (Trejo-González y Tamirano, 1973). El desarrollo y aplicación de otras técnicas analíticas ha permitido separar e identificar otros capsicinoides, como la nordihidrocapsicina y los isómeros de la homocapsicina y homodihidrocapsicina, entre otros. Estas técnicas analíticas son: la cromatografía de gases (Todd et al., 1977; Iwai et al., 1979; Hawer et al., 1994); y, principalmente, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a distintas técnicas de detección como ultravioleta visible (UV-vis) (Collins et al., 1995; Maillard et al., 1997) y espectrometría de masas (Garcés-Claver et al., 2007b). Esta última técnica es la que permite una mayor selectividad y sensibilidad en la detección de los distintos capsicinoides. La aplicación de este método ha permitido cuantificar la variabilidad de este carácter, encontrando valores desde 2,3 mg de dihidrocapsicina/kg de fruto seco y cero de capsicina, para la variedad 'Sincap' (*C. annum*), hasta 6.639 mg de capsicina/ kg de fruto seco y 3.725 mg de dihidrocapsicina/ kg de fruto seco en la variedad 'Habanero naranja' (*C. chinense*).

#### Referencias bibliográficas

- Andrews, J. 1984. *Peppers: The domesticated Capsicums*. Austin: University of Texas Press.
- Arce-Rodríguez; Ochoa-Alejo. 2015. Silencing AT3 gene reduces the expression of pAmt, BCAT, Kas, and Acl genes involved in capsaicinoid biosynthesis in chili pepper fruits. *Biología Plantarum*. DOI: 10.1007/s10535-015-0525-y. En prensa.
- Bajaj, K.L. 1980. Colorimetric determination of capsaicin in *Capsicum* fruits. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63: 1314-1316.
- Ben-Chaim, A.; Borovsky, Y.; Falise, M.; Mazourek, M.; Kang, B.C.; Paran, I.; Jahn, M. 2006. QTL analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theor. Appl. Genet.* 113: 8; 1481-1490.

- Bennett, D.J.; Kirby, G.W. 1968. Constitution and biosynthesis of capsaicin. *J. Chem. Soc. C*: 442–446.
- Blum, E.; Liu, K.; Mazourek, M.; Yoo, E.Y.; Jahn, M.; Paran, I. 2002. Molecular mapping of the C locus for presence of pungency in *Capsicum*. *Genome* 45: 702-705.
- Blum, E.; Mazourek, M.; O'Connell, M.A.; Curry, J.; Thorup, T.; Liu, K.; Jahn, M.M.; Paran, I. 2003. Molecular mapping of capsaicinoid biosynthesis genes and quantitative trait loci analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theor. Appl. Genet.* 108: 79–86.
- Bosland, P.W. 1994. *Chiles: History, cultivation and uses. Spices, Herbs and Edible Fungi*, ed Charambous G (Elsevier, New York).
- Bosland, P.W.; Votava, E.J. 2000. *Peppers: vegetable and spice Capsicum*. CABI Publishing, Oxon. 204p
- Bozokalfa, M.K.; Eşiyok, D. 2011. Evaluation of morphological and agronomical characterization of turkish pepper accessions. *International Journal of Vegetable Science*, 17(2):115-135
- Carvalho, S.I.C.; Faleiro, F.G.; Ragassi, C.F.; Bianchetti, L.B.; Buso, G.S.C.; Reifschneider, F.J.B. 2014. Morphological and genetic relationships between wild and domesticated forms of peppers (*Capsicum frutescens* L. and *C. chinense* Jacquin). *Genetics and Molecular Research*, 13(3):7447-7464
- Caterina, M.J.; Schumacher, M.A.; Tominaga, M.; Rosen, T.A.; Levine, J.D.; Julius, D. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389: 816–824.
- Caterina, M.J.; Leffler, A.; Malmberg, A.B.; Martin, W.J.; Trafton, J.; Petersen-Zeitz, K.R.; Koltzenburg, M.; Blasbaum, A.I.; Julius, D. 2000. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, 288: 306–313.
- Collins, M. D.; Wasmund, L. M.; Bosland, P. W. 1995. Improved method for quantifying capsaicinoids in *Capsicum* using highperformance liquid chromatography. *HortScience* 30: 137-139.
- Díaz, J.; Pomar, F.; Bernal, A.; Merino, F. 2004. Peroxidases and the metabolism of capsaicin in *Capsicum annuum* L. *Phytochem Rev* 3:141–157
- Estrada, B.; Bernal, M.A.; Díaz, J.; Pomar, F.; Merino, F. 2000. Fruit development in *Capsicum annuum*: Changes in capsaicin, lignin, free phenolics, and peroxidase patterns. *J Agric Food Chem* 48: 6234–6239.
- Garcés-Claver, A; Fellman, SM; Gil-Ortega, R; Jahn, M; Arnedo-Andres, MS. 2007a. Identification, validation and survey of a single nucleotide polymorphism (SNP) associated with pungency in *Capsicum* spp. *Theor. Appl. Genet.* 115(7): 907-916
- Garcés-Claver, A.; Gil-Ortega, R.; Álvarez-Fernández A.; Arnedo-Andrés, M.S. 2007b. Inheritance of capsaicin and dihydrocapsaicin, determined by HPLC-ESI/MS, in an intraspecific cross of *Capsicum annuum* L. *J. Agr. Food Chem.* 55: 6951-6957.
- Gibbs, H.A.A.; O'Garro, L.W.O. 2004. Capsaicin content of West Indies hot pepper cultivars using colorimetric and chromatographic techniques. *HortScience*, vol. 39(1): 132–135.
- González-Pérez, S.; Garcés-Claver, A.; Mallor, C.; Saenz de Miera, L.E.; Fayos, O.; Pomar, F.; Merino, F.; Silvar, C. 2014. New Insights into *Capsicum* spp relatedness and the diversification process of *Capsicum annuum* in Spain. *PLoS ONE* 9(12):e116276.
- GRIN. 2014. National Plant Germplasm System: Peppers. Germplasm Resources Information Network <http://www.ars-grin.gov/npgs/stats/>.
- Haak, D.; McGinnis, L.; Levey, D.; Tewksbury, J. 2011. Why are not all chilies hot? A trade-off limits pungency. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. DOI: 10.1098/rspb.2011.2091
- Harvell, K.P.; Bosland, P.W. 1997. The environment produces a significant effect on pungency of chiles. *Hortscience*, 32: 1292.
- Hawer, W.S.; Ha, J.; Hwang, J.; Nam, Y. 1994. Effective separation and quantitative analysis of major heat principles in red pepper by capillary gas chromatography. *Food Chem.*, 63: 1314-1316
- Huang, X.F.; Xue, J.Y.; Jiang, A.Q.; Zhu, H.L.; 2013. Capsaicin and its analogues: structure-activity relationship study. *Current Medicinal Chemistry*, 20(21): 2661–2672.
- Ibiza, V.P.; Blanca, J.; Cañizares, J.; Nuez, F. 2011. Taxonomy and genetic diversity of domesticated *Capsicum* species in the Andean región. *Genetic Resources and Crop Evolution* 59: 1077-1088.
- Iwai, K.; Suzuki, T.; Fujiwake, H.; Oka, S. 1979. Simultaneous microdetermination of capsaicin and its four analogues by using high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 172(1): 303–311
- Kim, S.; Park, M.; Yeom, S.I.; et al., 2014. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Nat Genet.* 46(3):270-8.
- Kraft, K.H.; Brown, C.H.; Nabhan, G.P.; Luedeling, E.; Luna Ruiz, J.J.; Coppens d'Eeckenbrugge, G.; Hijmans, R.J.; Gepts, P. 2014. Multiple lines of evidence for the origin of domesticated chili pepper, *Capsicum annuum*, in Mexico. *Proc Natl Acad Sci.* 111(17): 6165–6170.
- Leete, E.; Loudon, M.C.L. 1968. Biosynthesis of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum frutescens*. *J. Am. Chem. Soc.* 90: 6837–6841.
- Lefebvre, V.; Palloix, A.; Rives, M. 1993. Nuclear RFLP between pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.). *Euphytica* 71: 189–199.
- Maillard, M.N.; Giampaoli, P.; Richard, H.M.J. 1997. Analysis of eleven capsaicinoids by reversed-phase high performance liquid chromatography. *FlaVour Fragrance J.* 12: 409-413.
- Mangelsdorf, P.C.; McNeish, R.S.; Willey, G.R. 1965. Origins of Middle American agriculture. *Natural Environment and Early Cultures*, ed West RC (Univ. of Texas Press, Austin, Texas), pp 427–445.
- Mori, K.; Sawada, H.; Nishiura, Y. 1976. Determination of pungent principles in *Capsicum* pepper. *J. Jpn. Soc. Food Sci.*

Technol., 23: 199-205.

- Nuez, F.; Gil, R.; Costa, J. 1996. *El cultivo de pimientos, chiles y ajíes*. Mundi-Prensa, Madrid. 607 p.
- Occhiuto, P.N.; Peralta, I.E.; Asprelli, P.D.; Galmarini, C.R. 2014. Characterization of Capsicum germplasm collected in northwestern Argentina based on morphological and quality traits. *AgriScientia*, 31(2):63-73
- Ohta, Y. 1962. Physiological and genetical studies on the pungency of Capsicum, IV. Secretory organs, receptacles and distribution of capsaicin in the Capsicum fruit. *Jpn. J. Breed.* 12, 43-47.
- Paran, I.; Aftergoot, E.; Shiffriss, C. 1998. Variation in Capsicum annum revealed by RAPD and AFLP markers. *Euphytica* 99: 167-173.
- Qin, C.; Yu, C.; Shen, Y.; Fang, X.; et al., 2014. Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into Capsicum domestication and specialization. *PNAS*. 111(14): 5135-5140,
- Ramos, P.J. 1979. Further study of the spectrophotometric determination of capsaicin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 62: 1168-1170.
- Reilly, C.A.; Crouch, D.J.; Yost, G.S. 2001. Quantitative analysis of capsaicinoids in fresh peppers, oleoresin capsicum and pepper spray products. *J Forensic Sci* 46:502-509.
- Rodríguez-Maza, M.; Garcés-Claver, A.; Park, S.W.; Kang, B.C.; Arnedo-Andres, M.S. 2012. A versatile PCR marker for pungency in Capsicum spp. *Mol Breed* 30:889-898.
- Rymal, K.S.; Cospser, R.D.; Smith, D.A. 1984. Injection-extraction procedure for rapid determination of relative pungency in fresh jalapeño peppers. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 67: 658-659.
- Scoville, W.L. 1912. Note on capsicums. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 1(5): 453-454.
- Smith, C.E. 1967. Plant remains. *The Prehistory of the Tehuacan Valley*, ed Byers DS (Univ of Texas Press, Austin, TX), pp 220-255.
- Smith, C.E. 1987. Current archaeological evidence for the beginning of American agriculture. *Studies in the Neolithic and Urban Revolutions, The V. Gordon Childe Colloquium*, ed Manzanilla L (British Archaeological Reports, Oxford, UK), pp 81-101.
- Stellari, G.M.; Mazourek, M.; Jahn, M.M. 2010. Contrasting modes for loss of pungency between cultivated and wild species of Capsicum. *Heredity* 104:460-471
- Stewart, C.; Kang, B.C.; Liu, K.; Mazourek, M.; Moore, S.L.; Yoo, E.Y.; Kim, B.D.; Paran, I.; Jahn, M.M. 2005. The Pun1 gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. - *Plant J.* 42: 675-688.
- Stewart, C.; Mazourek, M.; Stellari, G.M.; O'Connell, M.; Jahn, M. 2007. Genetic control of pungency in C. chinense via the Pun1 locus. - *J. exp. Bot.* 58: 979-991.
- Sukrasno, N.; Yeoman, M.M. 1993. Phenylpropanoid metabolism during growth and development of Capsicum frutescens fruits. *Phytochemistry*, 32: 839-844.
- Suzuki, T.; Fujiwake, H.; Iwai, K. 1980. Intracellular localization of capsaicin and its analogues in Capsicum fruit. I. Microscopic investigation of the structure of the placenta of Capsicum annum var. annum cv. Karayatsubusa. *Plant Cell Physiol.* 21: 839-853
- Suzuki, T.; Kawada, T.; Iwai, K. 1981. Biosynthesis of acyl moieties of capsaicin and its analogues from valine and leucine in Capsicum fruits. *Plant Cell Physiol.*, 22: 23-32.
- Tewksbury, J.J.; Nabhan, G. P. 2001 Seed dispersal: directed deterrence by capsaicin in chilies. *Nature* 412: 403 - 404.
- Todd, P.H.; Bensinger, M.G.; Biftu, T. 1977. Determination of pungency due to Capsicum by gas-liquid chromatography. *Journal of Food Science*, 42(3): 660-665,
- Trejo-Gonzalez, A.; Wild-Al Tamirano, C. 1973. A new method for the determination of capsaicin in Capsicum fruits. *J. Food Sci.*, 38: 342-344
- Villota-Cerón, D.; Bonilla-Betancourt, L.M.; Carmen-Carrillo, H.; Jaramillo-Vásquez, J.; García-Dávila, M.A. 2012. Caracterización morfológica de introducciones de Capsicum spp. existentes en el Banco de Germoplasma activo de Corpoica C.I. Palmira, Colombia. *Acta Agronómica*. 61(1):16-26
- Wyatt, LE; Eannetta, NT; Stellari, GM; Mazourek, M. 2012. Development and application of a suite of non-pungency markers for the Pun1 gene in pepper (Capsicum spp.). *Molecular Breeding*. 30(3): 1525-1529
- Zamski, E.; Shoham, O.; Palevitch, D.; Levy, A. 1987. Ultra-structure of capsaicinoid-secreting cells in pungent and non-pungent Red Pepper (Capsicum annum L.) cultivars. *Bot. Gaz.* 148: 1-6.
- Zewdie, Y.; Bosland, P.W. 2000a. Capsaicinoid inheritance in an interspecific hybridization of Capsicum annum x C. chinense. *J Am Soc Hort Sci* 125:448-453.
- Zewdie, Y.; Bosland, P.W. 2000b. Evaluation of genotype, environment, and genotype-by-environment interaction for capsaicinoids in Capsicum annum L. *Euphytica*, 111: 185-190.
- Zewdie, Y.; Bosland P.W. 2001. Capsaicinoid profiles are not good chemotaxonomic indicators for Capsicum species. *Biochem. Syst. Ecol.* 29:161-169.