



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA



**ESTUDIO FITOQUÍMICO Y MOLECULAR DE GENOTIPOS SILVESTRES Y
CULTIVADOS DE *Tagetes erecta* L.**

TESIS

Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

PRESENTA:

EDUARDO DANIEL RAMÍREZ ARVIZU



Bajo la supervisión de:

DRA. MARÍA DEL ROSARIO GARCÍA MATEOS

Chapingo, Estado de México, mayo 2026



ESTUDIO FITOQUÍMICO Y MOLECULAR DE GENOTIPOS SILVESTRES Y CULTIVADOS DE *Tagetes erecta* L.

Tesis realizada por **Eduardo Daniel Ramírez Arvizu** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

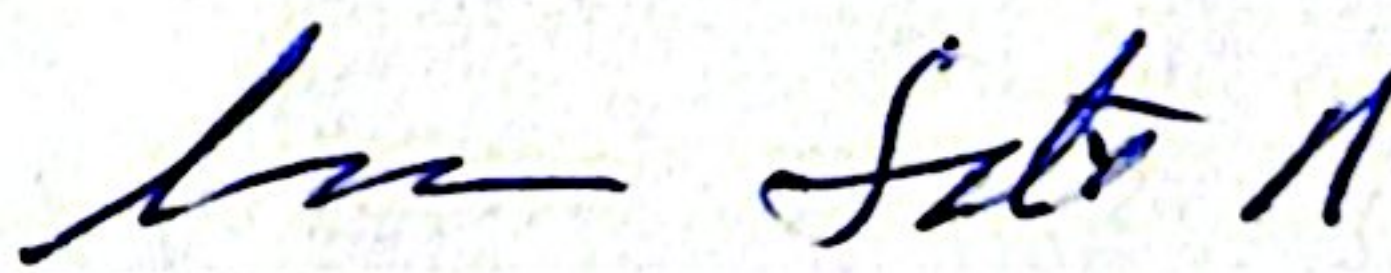
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

DIRECTORA:



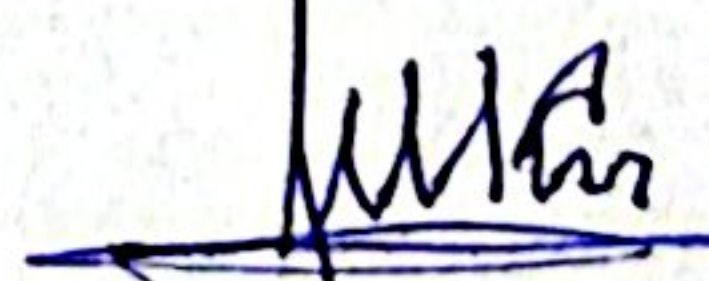
DRA. MARÍA DEL ROSARIO GARCÍA MATEOS

ASESOR:



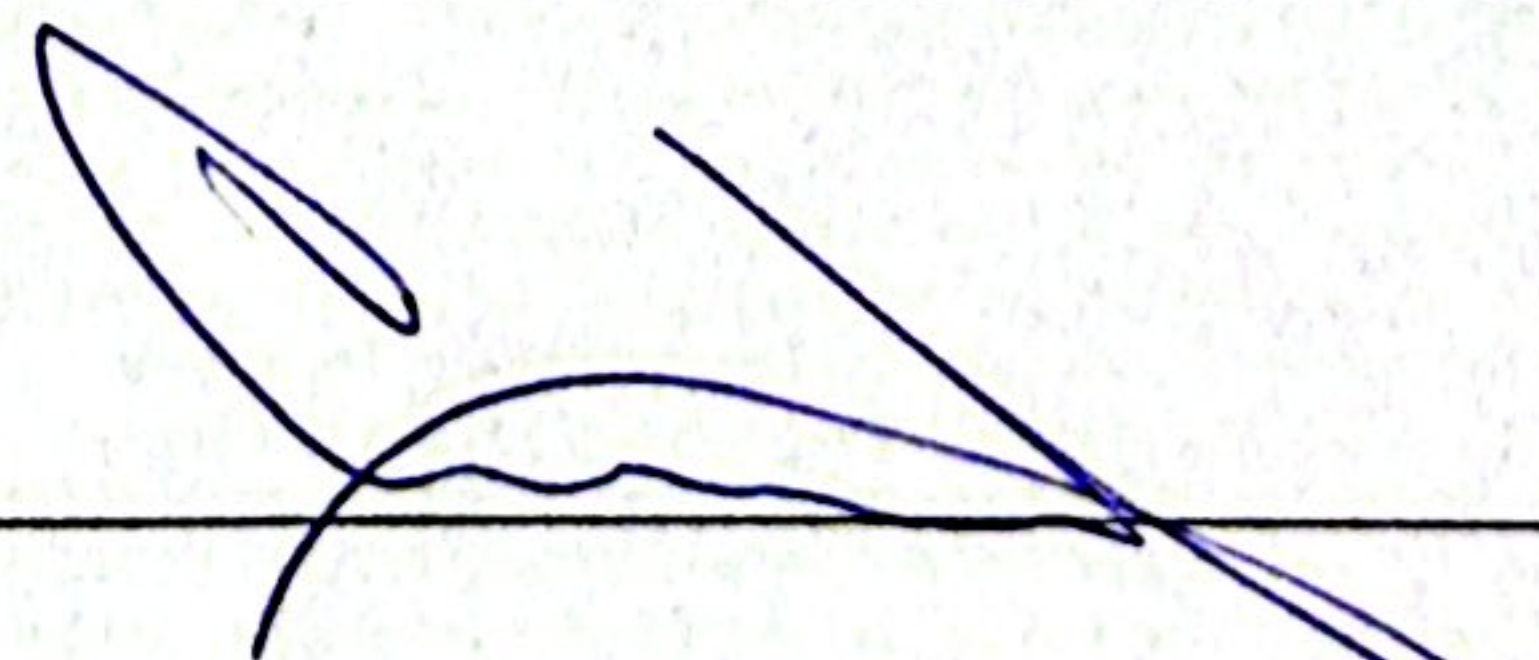
DR. RAMÓN MARCOS SOTO HERNÁNDEZ

ASESOR:



DR. MIGUEL ANGEL SERRATO CRUZ

ASESOR:



DR. CARLOS ALBERTO NÚÑEZ COLÍN

CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1.	Objetivos.....	2
1.1.1	Objetivo general.....	2
1.1.2	Objetivos particulares	3
2.	REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1.	Sistemática del género <i>Tagetes</i>	4
2.2.	Taxonomía y Morfología de <i>Tagetes</i>	5
2.3.	Filogenia de <i>Tagetes</i>	9
2.4.	Complejo Taxonómico Cempoalxóchitl: <i>Tagetes erecta</i> L.....	12
2.5.	Morfología y Distribución	14
2.6.	Filogenia y Domesticación.....	19
2.7.	Manejo y cultivo de <i>Tagetes</i>	21
2.8.	<i>Tagetes</i> como recurso fitoquímico.....	21
2.9.	<i>Tagetes</i> como recurso fitogenético.....	24
2.10.	PROBLEMA DE ESTUDIO	26
2.11.	LITERATURA CITADA.....	27
3.	PERFIL DE FLAVONOIDES EN GENOTIPOS SILVESTRES Y CULTIVADOS DE <i>Tagetes erecta</i> L. MEDIANTE ANÁLISIS HPLC	33
3.1.	RESUMEN GENERAL	33
3.2.	ABSTRACT	34
	FLAVONOID PROFILE IN WILD AND CULTIVATED GENOTYPES OF <i>Tagetes erecta</i> L. BY HPLC ANALYSIS	34
3.3.	Introducción	35

3.3.1	El género <i>Tagetes</i> : diversidad e importancia biológica.....	35
3.3.2	Actividad biológica y metabolitos secundarios en <i>Tagetes</i>	35
3.3.3	Composición química y metabolitos de interés	36
3.3.4	La variabilidad metabólica de <i>Tagetes</i> y sus distintos enfoques	36
3.3.5	Flavonoides: estructura, función y clasificación	36
3.3.6	Flavonoides en <i>Tagetes</i> y su valor quimiotaxonómico.....	38
3.3.7	Técnicas de análisis de metabolitos	38
3.4.	Materiales y métodos	40
3.4.1	Material Vegetal	40
3.4.2	Extracción de Flavonoides.....	41
3.4.3	Identificación de Flavonoides mediante HPLC.....	41
3.4.4	Análisis de los perfiles cromatográficos	42
3.5.	Resultados y discusión.....	43
3.5.1	Contenido total de flavonoides.....	43
3.5.2	Análisis del contenido total de flavonoides por promedios.....	48
3.5.3	Contenido total de flavonoides en unidades experimentales	56
3.6.	Conclusiones	65
3.7.	LITERATURA CITADA	66
4.	RELACIONES GENÉTICAS ENTRE GENOTIPOS SILVESTRES Y CULTIVADOS DE <i>Tagetes erecta</i> L. MEDIANTE MARCADORES ISSR.....	70
4.1.	RESUMEN GENERAL	70
	GENETIC RELATIONSHIP ANALYSIS BETWEEN CULTIVATED AND WILD CULTIVARS OF <i>Tagetes erecta</i> L. Using ISSR MARKERS.....	71
4.2.	ABSTRACT	71

4.3.	Introducción	72
4.3.1	Diversidad genética y recursos fitogenéticos	72
4.3.2	Bases de la diversidad genética y su importancia	72
4.3.3	Marcadores moleculares en el análisis de la diversidad genética 73	
4.3.4	Tipos de marcadores moleculares y su aplicación en <i>Tagetes</i> ..	74
4.4.	MATERIALES Y MÉTODOS	76
4.4.1	Material vegetal.....	76
4.4.2	Extracción de ADN.....	77
4.4.3	Cuantificación de ADN	78
4.4.4	Validación del ADN mediante iniciador 16S.....	79
4.4.5	Amplificación de marcadores ISSR.....	79
4.4.6	Análisis ISSR	80
4.5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	81
4.5.1	Amplificación de marcadores ISSR.....	81
4.5.2	Análisis de relaciones polimórficas	82
4.5.3	Variabilidad de <i>Tagetes</i> determinada a través de ISSR	88
4.5.4	Estructura genética de <i>Tagetes</i> y sus patrones de agrupamiento 89	
4.5.5	Caracterización y estimación de variabilidad entre especies de <i>Tagetes</i>	90
4.5.6	Implicaciones evolutivas, domesticación y mejoramiento	91
4.6.	CONCLUSIONES.....	93

4.7.	LITERATURA CITADA	94
5.	CONCLUSIONES GENERALES	97

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1 Especies del género <i>Tagetes</i> en México, adaptado de Turner (1996) y complementado con información de diversidad florística en México (Villaseñor, 2018).....	9
Cuadro 2 Distribución de especies del género <i>Tagetes</i> en México (Villareal, 2003, adaptado de Turner, 1996).	11
Cuadro 3 Genotipos Silvestres y Cultivados de <i>Tagetes</i>	40
Cuadro 4 Contenido total de flavonoides ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS) en los 18 genotipos analizados de <i>Tagetes</i>	43
Cuadro 5 Matriz de distancias de Mahalanobis entre grupos, basada en cuatro componentes canónicos (Clúster), generados en el análisis de agrupamiento jerárquico.	49
Cuadro 6 Coeficientes de la estructura canónica total del análisis de 12 flavonoides.....	50
Cuadro 7 Contenido total de flavonoides en las 54 muestras analizadas de <i>Tagetes</i> ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$).	58
Cuadro 8 Análisis de discriminación canónica de los tres grupos generados por a través de la Distancia de Mahalanobis para 54 individuos de <i>Tagetes</i>	59
Cuadro 9 Coeficientes de la estructura canónica total del análisis de 12 especies flavonoides.....	60
Cuadro 10 Comparación de medias de los valores canónicos (Can1, Can2 y Can3) entre genotipos de <i>Tagetes</i> mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)....	61
Cuadro 11 Genotipos Silvestres y Cultivados de <i>Tagetes</i>	77
Cuadro 12 Iniciadores ISSR seleccionados.	80
Cuadro 13 Parámetros de diversidad genética obtenidos mediante marcadores ISSR en genotipos de <i>Tagetes</i>	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Distribución geográfica del género <i>Tagetes</i> en América (Hinojosa y Schiavinato (2022), adaptado de Soule (1993).....	6
Figura 2 Inflorescencias de genotipos de <i>Tagetes erecta</i> L.....	15
Figura 3 Inflorescencias de genotipos de <i>Tagetes erecta</i> L.....	15
Figura 4 Inflorescencias de genotipos de <i>Tagetes heterocarpha</i> Rydb.	16
Figura 5 Inflorescencias de genotipos de <i>Tagetes remotiflora</i> Kunze.....	17
Figura 6 Inflorescencias de genotipos de <i>Tagetes erecta</i> L. (cultivada, derecha) y <i>Tagetes remotiflora</i> Kunze (silvestre, izquierda).	18
Figura 7 Estructura general del núcleo de flavano (Bohm y Stuessy, 2001)...	37
Figura 8 Contenido promedio de los flavonoides: miricetina, morina, hesperidina, rutina, apigenina, y catequina en tres genotipos de <i>Tagetes</i> : <i>T. remotiflora</i> , <i>T. heterocarpha</i> y <i>T. erecta</i> , respectivamente.....	46
Figura 9 Contenido promedio de los flavonoides: isorhamentina, floritizina, quercetina, kaempferol, naringenina y fletetina en tres genotipos de <i>Tagetes</i> : <i>T. remotiflora</i> , <i>T. heterocarpha</i> y <i>T. erecta</i> , respectivamente.....	47
Figura 10 Dendrograma de agrupamiento de 18 genotipos de <i>Tagetes</i> con base en la composición de flavonoides, utilizando la distancia de Mahalanobis.	49
Figura 11 Diagrama de la estructura canónica de los cuatro grupos generados.	52
Figura 12 Distancia de Mahalanobis de 18 genotipos de <i>Tagetes</i> analizados.	57
Figura 13 Proyección tridimensional de la estructura canónica de los cuatro grupos generados.	62
Figura 14 Proyección tridimensional de la estructura canónica de los cuatro grupos generados, indicados por genotipo.	63
Figura 15 Similitud entre 30 muestras agrupadas en nueve genotipos provenientes de tres poblaciones del género <i>Tagetes</i> : <i>Tagetes erecta</i> L., <i>Tagetes</i>	

<i>remotiflora</i> K. y <i>Tagetes heterocarpha</i> R. mediante 82 alelos ISSR a través de la distancia de Dice.....	84
Figura 16 Diagrama de Componentes Principales de los tres genotipos de <i>Tagetes</i> estudiados. 1 = <i>T. erecta</i> , 2 = <i>T. heterocarpha</i> , 3 = <i>T. remotiflora</i>	87

DECICATORIA

Este trabajo y la conclusión de los estudios de maestría quisiera dedicarla a mi, a pesar de todos los tropiezos, los inconvenientes y las dificultades, se logró finalmente. La culminación de este trabajo ha representado para mi más que sólo una tesis de posgrado, ha significado un proceso de evolución constante y es la prueba irrefutable que sin importar nada, siempre encontraré la manera de alcanzar mis metas y salir adelante. “Las complicaciones surgen, se consideran y superan”. Espero que al pasar los años pueda volver a leer esto y haber conseguido aun más logros.

A mis amigos, como una parte fundamental de mi desarrollo, por todos los momentos, los regaños, las fiestas, los llantos, los momentos de conexión y el cariño, eternamente agradecido de encontrarme rodeado de tanto cariño.

A mi familia, en los momentos de mayor oscuridad han servido para vislumbrar un ese punto de luz que ha alumbrado mi camino.

A mi sensei, por el cariño y el apoyo, que, aunque a veces yo mismo he perdido la confianza en mi mismo, siempre encuentra las palabras adecuadas para no dejarme vencer, demostrándome constantemente que, a pesar de todo, jamás deja de depositar su confianza en mi, estoy eternamente agradecido.

AGRADECIMIENTOS

A La Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (Secihti), que hizo posible mis estudios de posgrado. Gracias por el apoyo brindado durante estos años pues sin su soporte habría sido difícil llevar a cabo este trabajo.

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Departamento de Fitotecnia por abrirme sus puertas y por brindarme la oportunidad ser parte de esta institución, formar parte del alumnado y por el apoyo otorgado para llevar a cabo esta investigación.

A mi directora de tesis, la Dra. María del Rosario, por el apoyo brindado, por el conocimiento compartido y sobre todo por la paciencia, cada explicación, cada tiempo robado para pedir una opinión e incluso cada conversación a través de los pasillos los valoro infinitamente. Sin miedo a sonar barbero, sus clases (que tuve la oportunidad de tomarlas todas) fueron las más interesantes que recibí en el posgrado, en verdad que sí aprendí bastante, aunque no se note. Ha sido una fuente de inspiración desde que tuve el placer de conocerla, muchas gracias por aceptarme.

Al Dr. Marcos Soto, por aceptar ser parte de mi comité y recibirme en sus laboratorios, por la atención y amabilidad con la que siempre fui recibido, agradecimiento infinito y a todo el equipo de trabajo a su cargo, gracias por dejarme participar de una disciplina tan interesante.

Al Dr. Miguel Ángel, por el apoyo brindado y el constante interés por el avance de mi trabajo, por las tantas sesiones de retroalimentación personal que se ofreció llevar conmigo y todo el conocimiento compartido, de igual manera, agradecido infinitamente por la paciencia que me ha tenido, a pesar de que tardé en entender el sentido que llevaba mi investigación, siempre estuvo pendiente para resolver mis dudas, por más sencillas que fueran.

Al Dr. Carlos Colín, hay muchas cosas realmente por las cuales agradecer, pero procuro no perder la oportunidad de decirlas cada que tengo la oportunidad de verlo, que es más seguido que lo que al hígado le gustaría reconocer. Muchas gracias por el apoyo y siempre estar disponible para escucharme, todas las pláticas enriquecen no sólo mi conocimiento y gusto por la investigación, también he encontrado una guía cuando las cosas se han visto más difíciles de lo que realmente son. He encontrado un maestro, un profesor, pero más importante, un amigo, de igual manera también aquí siempre tendrá un amigo. Nuevamente, muchas gracias.

A mis amigos; como parte fundamental de mi crecimiento, muchas gracias por el apoyo, por escucharme y acompañarme en esta etapa de mi vida, hicieron mucho más agradable la vida con cada conversación, cada aventura y cada momento.

A mi compañero Miguel Bailón, muchas gracias por los consejos y el apoyo, muchas gracias por darme mucha visión, no sólo de lo que es el trabajo de investigación, también de mi paso por Chapingo y estar conmigo a cada paso, muchas gracias por enseñarme tantas cosas y darte el tiempo de explicarme cada duda, gracias por ser mi compañero de laboratorio, de prácticas y de aventuras, ha sido todo un placer.

A mi compañera Angélica Rodríguez por enseñarme el amor por las plantas que siempre demuestras, gracias también por todo el apoyo y los momentos de risas y las aventuras que tuvimos en toda la maestría, sin duda alguna tendrás aquí un amigo siempre.

A mis compañeras de Maestría: Isabel, Madga y Cecilia, fue un placer y honor vivir esta experiencia a su lado, gracias por las tardes estudiando juntos, gracias por el apoyo mutuo y no dejar que me diera por vencido en esos exámenes difíciles o en esas tareras que parecían imposibles, muchas gracias por todas las

risas y por dejarme compartir un poco de su vida, veo con muchas ansias un futuro en el que continuemos todo de lo que estuvimos hablando estos dos años.

Agradezco también a mi mentor del laboratorio de Marcadores Moleculares, el Licenciado Ricardo Gaspar por todo el conocimiento transmitido, por su amabilidad y disposición para todo lo que necesité durante mi paso por el laboratorio. Así mismo, agradecido infinitamente con el M. en C. Rubén San Miguel, del Laboratorio de Fitoquímica del Colegio de Postgraduados, muchas gracias por el apoyo y la buena disposición durante mi proceso de análisis fitoquímico, gracias por la paciencia y amabilidad con la que me ayudó en mi trabajo. También, gracias infinitas a la Dra. Liz del laboratorio de Fitoquímica de Chapingo, gracias por la disposición y la amabilidad en las prácticas del laboratorio, así como las enriquecedoras pláticas, es también una fuente de inspiración.

Al Colegio de Postgraduados, por abrirme las puertas y permitirme aprender muchas cosas en sus instalaciones, no sólo en mi proyecto, también al tomar clases, espero volver pronto.



DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales:

Nombre: Eduardo Daniel Ramírez Arvizu

Fecha de nacimiento: 30 de marzo de 1995.

Lugar de nacimiento: Celaya, Guanajuato, Méx.

Desarrollo académico:

El autor del presente trabajo, Eduardo Daniel Ramírez Arvizu, es Ingeniero en Biotecnología egresado de la Universidad de Guanajuato (periodo: 2015-2020), donde realizó estudios universitarios con orientación en la industria agrícola y desarrolló su trabajo de tesis enfocado en la diversidad genética del aguacate mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites (SSR) en el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en la ciudad de Celaya, Guanajuato.

Durante su formación académica ha adquirido experiencia en el manejo de técnicas de biología molecular, microbiología y análisis bioquímicos, así como en la caracterización de material biológico con fines de aprovechamiento agroindustrial. Asimismo, durante las actividades llevadas a cabo en las prácticas intermedias de la licenciatura, ha participado en proyectos de investigación relacionados con la evaluación de diversidad genética, diagnóstico molecular de enfermedades y análisis de datos biológicos, estas actividades fueron realizadas en el Laboratorio de Ingeniería Genética del Centro de Investigación Nacional y

Estudios Avanzados del Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN) Campus Irapuato, en el periodo de verano, 2018.

De manera complementaria, ha desarrollado actividades de investigación en instituciones como el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), donde participó en proyectos de caracterización bioquímica y molecular, así como en la aplicación de protocolos de laboratorio bajo estándares de calidad.

Su formación también incluye participación activa en eventos científicos y congresos académicos, donde ha presentado y difundido resultados preliminares de la presente investigación. De igual forma, participó en el taller de identificación de transgénicos en el marco del CINCA 2024 en la Universidad Autónoma Chapingo. Destaca su participación como ponente en el Congreso Internacional de Ciencias Agronómicas 2025, realizado en la Universidad Autónoma Chapingo, así como su intervención como ponente en reuniones científicas en 2022, donde presentó avances de su trabajo de tesis de licenciatura. Asimismo, ha participado en el Congreso Multidisciplinario de Ingenierías de la Universidad de Guanajuato (2016–2017), en el X Congreso Internacional de Ciencias Química, Ambiental y Biotecnología (Mazatlán, Sinaloa, 2016) y en el Congreso UPIBI del Instituto Politécnico Nacional (Ciudad de México, 2015).

RESUMEN GENERAL

ESTUDIO FITOQUÍMICO Y MOLECULAR DE GENOTIPOS SILVESTRES Y CULTIVADOS DE *Tagetes erecta* L.

México alberga una importante diversidad del género *Tagetes*, donde especies silvestres y cultivadas relacionadas con el cempasúchil (*Tagetes erecta* L.) coexisten; sin embargo, su delimitación y relaciones evolutivas aún no han sido completamente esclarecidas. Además de su importancia cultural y ornamental, estas especies destacan por su riqueza en metabolitos secundarios, particularmente flavonoides, y por su potencial como recurso fitogenético. No obstante, la variabilidad existente dentro del género y la limitada integración entre estudios moleculares y fitoquímicos han dificultado la comprensión de sus relaciones y proceso de domesticación. En este contexto, el objetivo fue analizar la diversidad de flavonoides y polimorfismos en materiales silvestres y cultivados relacionados con *Tagetes erecta* L. mediante HPLC y marcadores ISSR. Se identificaron doce flavonoides y variabilidad en su concentración y distribución, con mayor acumulación en *T. remotiflora*. El análisis de agrupamiento mostró patrones de similitud e individuos atípicos. De manera complementaria, los marcadores ISSR revelaron alto polimorfismo y considerable diversidad genética. Los agrupamientos no coincidieron completamente con la clasificación taxonómica, sugiriendo la influencia de distintos procesos biológicos en la diferenciación de los genotipos. En conjunto, los resultados indican que la diferenciación entre genotipos de *Tagetes* no es absoluta y que la variabilidad genética y fitoquímica están estrechamente relacionadas.

Palabras Clave: Flavonoides, HPLC, ISSR, diversidad genética, metabolitos secundarios, domesticación, variabilidad fitoquímica, especies silvestres, marcadores moleculares.

Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Eduardo Daniel Ramírez Arvizu

Directora: Dra. María del Rosario García Mateos

ABSTRACT

Phytochemical and Molecular Study of Wild and Cultivated Genotypes of *Tagetes erecta* L.

Mexico harbors significant diversity within the genus *Tagetes*, where wild and cultivated species related to marigold (*Tagetes erecta* L.) coexist; however, their delimitation and evolutionary relationships have not yet been fully clarified. In addition to their cultural and ornamental importance, these species are notable for their richness in secondary metabolites, particularly flavonoids, and for their potential as phytochemical resources. Nevertheless, the variability within the genus and the limited integration of molecular and phytochemical studies have hindered the understanding of their relationships and domestication process. In this context, the objective of this study was to analyze flavonoid and polymorphic diversity in wild and cultivated materials related to *Tagetes erecta* L. using HPLC and ISSR markers. Twelve flavonoids were identified, showing variability in their concentration and distribution, with greater accumulation in *T. remotiflora*. Cluster analysis revealed similarity patterns and atypical individuals. Additionally, ISSR markers showed high polymorphism and considerable genetic diversity. The resulting groupings did not completely correspond to the taxonomic classification, suggesting the influence of different biological processes involved in genotype differentiation. Overall, the results indicate that differentiation among *Tagetes* genotypes is not absolute and that genetic and phytochemical variability are closely related.

Key Words: Flavonoids, HPLC, ISSR, genetic diversity, secondary metabolites, domestication, phytochemical variability, wild species, molecular markers.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

México es reconocido como uno de los principales centros de domesticación vegetal a nivel mundial, debido a su elevada riqueza florística, la cual representa aproximadamente el 10 % de la biodiversidad vegetal del planeta; gran parte de estas especies poseen importancia alimentaria, ornamental, medicinal e industrial (Rzedowski, 2006). El cempoalxóchitl (*Tagetes* spp.) constituye un grupo de plantas aromáticas con inflorescencias tipo capítulo, de colores amarillo, anaranjado y rojo, que han sido utilizadas desde la época prehispánica principalmente con fines ceremoniales, aunque también con aplicaciones medicinales (Serrato-Cruz, 2014). En particular, el cempasúchil (*Tagetes erecta* L.) destaca por el uso de sus flores y su característico aroma durante la celebración del Día de Muertos en México, representando un símbolo de identidad cultural. Además, esta especie ha adquirido relevancia económica a nivel mundial debido al aprovechamiento de sus pigmentos florales, utilizados en la industria avícola y como fuente de luteína metabolito de interés en el ámbito médico (Barzana et al., 2002; Salehi et al., 2018).

No obstante, el proceso de domesticación que dio origen a *T. erecta* aún no se conoce con claridad. Se ha propuesto que algunos de sus posibles ancestros silvestres incluyen a *T. remotiflora*, *T. heterocarpha* y *T. jaliscensis*, especies con las cuales se han realizado cruzamientos tanto directos como recíprocos, evidenciando cierta cercanía genética entre estos taxones (Serrato-Cruz, 1999). En estos cruzamientos, *T. erecta* presenta dioecia funcional, con plantas masculinas y femeninas diferenciadas, lo que refleja una compleja dinámica reproductiva. Sin embargo, aunque estos estudios indican afinidad genética, aún no constituyen evidencia suficiente para explicar completamente el proceso evolutivo que condujo al origen de la especie (Serrato-Cruz, 2014). Este intercambio genético entre especies cultivadas y silvestres ha sido descrito como el “complejo cempoalxóchitl”, concepto propuesto por Martínez (1979) y retomado en estudios posteriores (Rzedowski, 2006) sobre la flora mexicana.

Desde el punto de vista taxonómico, existen discrepancias importantes en la delimitación de especies dentro del género. Turner (1996) propuso la existencia de aproximadamente 25 especies de *Tagetes* en México, integrando dentro de *T. erecta* a especies previamente reconocidas como independientes, tales como *T. patula*, *T. remotiflora*, *T. elongata* y *T. jaliscensis*, lo que implica su sinonimización. Este planteamiento ha generado cambios en la identificación de ejemplares de herbarios y ha contribuido a incrementar la incertidumbre sobre los ancestros silvestres del cempasúchil. No obstante, observaciones de campo sugieren que especies como *T. remotiflora* y *T. jaliscensis* se presentan como poblaciones ruderales, generalmente alejadas de zonas de cultivo de *T. erecta*, lo que podría indicar cierto grado de diferenciación ecológica, química y genética (Serrato-Cruz, 2014).

La coexistencia de diferencias fenotípicas entre estos genotipos con evidencia de flujo génico destaca la complejidad de su sistema. En este sentido, el uso de herramientas moleculares, como los marcadores ISSR, representa una alternativa eficaz para evaluar la proximidad genética entre genotipos, tal como se ha demostrado en otras especies (Kumar et al., 2009; Zietkiewicz et al., 1994). De manera complementaria, el análisis de metabolitos secundarios, particularmente flavonoides, puede contribuir a la diferenciación quimiotaxonómica entre genotipos, fortaleciendo la interpretación de relaciones evolutivas dentro del género (Agati et al., 2012; Emerenciano et al., 2001). Con base en lo anterior, el objetivo del presente estudio fue caracterizar, mediante marcadores ISSR y la identificación del perfil de flavonoides, muestras vegetales ruderales y cultivadas relacionadas con *Tagetes erecta*, de acuerdo con la clasificación taxonómica propuesta por Turner, con la finalidad de determinar si las formas ruderales comparten afinidad genética con la forma cultivada.

1.1. Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Extraer y comparar cuantitativamente metabolitos flavonoides y material genético de genotipos silvestres y cultivados de *Tagetes erecta* L.

1.1.2 Objetivos particulares

Identificar el perfil y concentración de flavonoides en genotipos domesticados y silvestres relacionados con *Tagetes erecta* L. mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

Evaluar la diversidad genética de genotipos domesticados y silvestres relacionados con *Tagetes erecta* L. mediante marcadores ISSR.

Comparar los perfiles fitoquímicos presentes entre los diferentes genotipos de *Tagetes*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Sistemática del género *Tagetes*

Tagetes fue descrito por primera vez por Linneo (1753) mediante la identificación de tres especies: *Tagetes erecta* L., *Tagetes minuta* L. y *Tagetes patula* L.; a través de los años el número de especies reconocidas aumentó gracias a las contribuciones de diferentes autores, basando sus descripciones en especímenes de herbario enviados desde el continente americano, así como en plantas cultivadas en jardines botánicos europeos a partir de semillas recolectadas en diversas expediciones (Hinojosa & Schiavinato, 2022). La primera revisión taxonómica completa del género *Tagetes* fue realizada por Neher en 1966, quien concentró y ordenó en una monografía el conocimiento generado hasta ese momento, posteriormente, Soule (1993) realizó un análisis cladístico del género *Tagetes* basado en datos morfológicos y una revisión taxonómica, en la cual reconoció 55 especies, proponiendo además tres subgéneros: *Tagetes* subg. *Hydrotagetes*, *Tagetes* subg. *Iya* y *Tagetes* subg. *Tagetes* (Hinojosa & Schiavinato, 2022; Serrato-Cruz, 1999). Actualmente, la clasificación resultante de su investigación es una de las más aceptadas en la mayoría de investigaciones relacionadas con el género.

De manera simultánea, Billie L. Turner, en su obra: *The Comps of Mexico: Tageteae and Anthemideae* (1996), realizó una revisión sistemática del género que incluye conjuntos de especies endémicas de *Tagetes*, donde ciertas especies fueron consideradas parte de una misma entidad taxonómica, a las que denominó “complejos específicos”. Estos complejos han resultado difíciles de delimitar debido a la amplia variabilidad morfológica presente en el género, situación que se repite habitualmente en asteráceas, representando un desafío para diferenciar claramente entre especies y subespecies. Esto ha llevado a que algunas especies previamente descritas puedan ser equivalentes entre sí o requieran de una nueva revisión taxonómica —como las que componen el complejo cempoaxóchitl. Aunque la clasificación basada en caracteres morfológicos ha sido fundamental para el estudio del género, presenta ciertas

limitaciones. Por esta razón, diversos autores han señalado la necesidad de realizar estudios moleculares que permitan esclarecer con mayor precisión las relaciones filogenéticas dentro de *Tagetes* (Hinojosa & Schiavinato, 2022; Loockerman, 1996; Serrato-Cruz, 1999; Villareal, 2003;).

Desde la década de 1980, los análisis cladísticos basados en datos moleculares han aportado información valiosa sobre la filogenia y clasificación en distintos géneros de asteráceas (Bremer et al., 1992). En el caso de *Tagetes*, la mayoría de los estudios se ha basado en análisis morfológicos, citológicos y moleculares (Cicevan et al., 2022; Hinojosa et al., 2022; Loockerman et al., 2003; Namita et al., 2013; Soule, 1994). En estos trabajos, los caracteres morfológicos cualitativos y cuantitativos se han utilizado para identificar especies, evaluar sus relaciones y discriminar entre variedades y cultivares. Sin embargo, el número de caracteres útiles suele ser limitado, ya que muchos de ellos son multigénicos y su expresión puede estar influenciada por las condiciones ambientales (Zeng et al., 2010). Por otra parte, la caracterización cromosómica ha proporcionado información citogenética valiosa para el análisis discriminante y la identificación de polimorfismos (Hoshi et al., 2018). Sin embargo, estos estudios se han enfocado principalmente en cultivares, por lo que la información disponible acerca de la variabilidad presente en poblaciones silvestres es limitada.

2.2. Taxonomía y Morfología de *Tagetes*

Asteraceae es la segunda familia más grande de angiospermas y la de mayor diversidad biológica (Soule, 1993); a su vez, es la familia más grande de flora en México, su nombre alternativo: *Compositae*, antecede la propuesta Linneana en referencia a la disposición de la inflorescencia básica en la familia: un capítulo o cabezuela que asemeja una flor, pero que en realidad son varias flores insertas en una estructura parecida a un cáliz denominado involucre (Serrato-Cruz, 1999). Actualmente, la familia *Asteraceae* está dividida en 45 tribus, de las cuales 24 son nativas de México, cuenta con 417 géneros y 3,113 especies (Funk et al., 2009; Villaseñor, 2018). En México se han identificado siete tribus que registran más de 100 especies endémicas (*Heliantheae*, *Eupatorieae*, *Astereae*,

Senecioneae, *Coreopsideae*, *Millerieae* y *Tageteae*), que en conjunto incluyen 2,219 especies, representando 71 % de la riqueza total en el país (Villaseñor, 2018).

La tribu *Tageteae* incluye aproximadamente 216 especies distribuidas entre 16 y 23 géneros (Loockerman et al., 2003). Su centro de diversidad se encuentra en las tierras altas xéricas de México y Sudamérica, con algunas especies adventicias desarrolladas en Europa (Strother, 1977; Turner, 1996). El género *Tagetes* pertenece a la tribu *Tageteae* (Rzedowski, 1978); está constituido por aproximadamente 56 especies (Soule, 1993) distribuidas ampliamente en América desde el noreste de Estados Unidos hasta Argentina (Figura 1). México es considerado la zona de mayor diversidad, donde prosperan 35 especies del género, específicamente en el centro-sur, y convergen las grandes cordilleras del país. El género se caracteriza por sus flores fuertemente aromáticas, conocidas comúnmente como caléndulas o cempasúchiles; la alta diversidad del género es debida probablemente a la heterogeneidad climática donde se desarrolla (Neher, 1966; Serrato-Cruz et al., 2014; Soule, 1996).

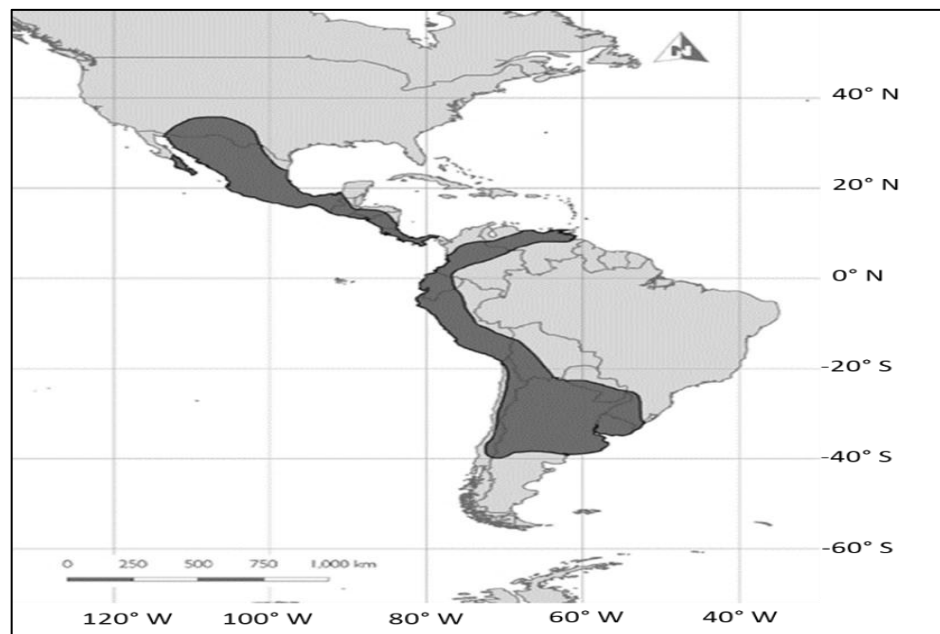


Figura 1 Distribución geográfica del género *Tagetes* en América (Hinojosa y Schiavinato (2022), adaptado de Soule (1993).

El género *Tagetes* está conformado por plantas anuales o perennes que presentan hojas opuestas en la porción inferior y alternas en la superior, simples o pinnadas, con lóbulos enteros, dentados o partidos, frecuentemente provistas de glándulas oleíferas; las inflorescencias son cabezuelas solitarias o agrupadas en cimbras, sostenidas por pedúnculos ligeramente ensanchados hacia el ápice; carecen de cálculo y poseen involucros cilíndricos, o campanulados, formados por brácteas dispuestas en una sola hilera, connatas parcial o casi totalmente, con dos o más hileras de glándulas (Villareal, 2003). El receptáculo es convexo a cónico y desnudo; las flores liguladas, son pistiladas y fértiles en el centro, con limbos cortos o bien desarrollados, de color amarillo, anaranjado, blanco o rojizo; las flores del disco son variables en número (1-21), generalmente amarillas, con estilo de ramas truncadas y los aquenios son lineares a oblanceolados, ligeramente comprimidos y de color negro, con vilano constituido por escamas cortas y truncadas, escamas largas y subuladas, aristas, o bien una combinación de estructuras, aunque rara vez ausente (Hinojosa & Schiavinato, 2022).

El género presenta variaciones morfológicas y anatómicas importantes y la mayoría de las especies de *Tagetes* tiene numerosas flores en el capítulo (Neher, 1966); usualmente uno o más de los verticilios en la periferia, se presentan en flores liguladas, por ello las cabezuelas o capítulos son de tipo radial (margaritas) y se observan en la mayoría de las especies, pocos taxa presentan capítulos discoidales, donde todas las flores son femeninas como *T. erecta* del tipo doble. Las flores externas son femeninas y las centrales son tubuladas hermafroditas o masculinas (Serrato-Cruz, 1999). Al comparar entre sí la anatomía foliar en distintas especies de *Tagetes*, se observaron variaciones en algunos de los atributos que contribuyen a diferenciarlas como entidades taxonómicas, confiriéndoles el valor de caracteres diagnósticos (Anaya-Gutiérrez et al., 2022).

El género prospera desde el nivel del mar hasta los 4500 metros de altitud; se desarrolla en una amplia variedad de suelos, desde arenosos hasta rocosos con buen drenaje, comúnmente en áreas rocosas con alta variación de temperaturas y presenta respuesta a fotoperiodo corto (Serrato-Cruz, 1999; Turner y Nesom,

1993). Debido a su amplia adaptación ecológica y abundancia en distintos ambientes, diversas especies del género han sido utilizadas por el ser humano desde tiempos antiguos. Los registros de su cultivo y uso extensivo por parte de las tribus indígenas de México y Sudamérica se remontan a antes de la época de la conquista; donde se tenía la creencia que estas flores aromáticas tenían propiedades mágicas, siendo utilizadas en diferentes contextos desde lo religioso hasta lo cotidiano (Neher, 1968). Estudios etnobotánicos corroboran la importancia de al menos 10% de las especies de *Tagetes* en diferentes aspectos tradicionales de la cultura mexicana (García-Sánchez et al. 2012; Pérez-Ortega et al. 2016; Serrato-Cruz 2014).

Se acepta generalmente que los principales cultivares del género son: *Tagetes erecta* L. y *Tagetes patula* L. que, una vez introducidos en el Nuevo Mundo, fueron domesticados, porque aparecen en los herbarios del siglo XVI con un nombre prelinneano para *T. erecta* como caléndula africana y *T. patula* como caléndula francesa (Kaplan, 1960). Cabe mencionar que, la delimitación de especies dentro del género *Tagetes* presenta diferencias entre autores. Mientras que Turner (1996) reconoció un mayor número de especies, incluyendo taxones descritos recientemente y variaciones geográficas, Soule (1993) adoptó un enfoque biosistemático más conservador, considerando principalmente especies con evidencia clara de diferenciación reproductiva y relaciones evolutivas definidas. En consecuencia, varias de las especies propuestas por Turner no son contempladas en el esquema de Soule, lo que refleja la complejidad taxonómica del género y la necesidad de integrar herramientas moleculares para su delimitación.

A continuación, se presenta en el Cuadro 1 el listado de especies del género *Tagetes* reportadas para México, con base en la revisión sistemática propuesta por Turner (1996) y considerando la información general sobre diversidad florística documentada por Villaseñor (2018). Este listado permite visualizar la riqueza específica del género en el país y constituye un referente para el análisis comparativo de los materiales evaluados en el presente estudio.

Cuadro 1 Especies del género *Tagetes* en México, adaptado de Turner (1996) y complementado con información de diversidad florística en México (Villaseñor, 2018).

No.	Especie	No.	Especie
1	<i>Tagetes erecta</i> L.	14	<i>Tagetes foeniculacea</i> Desf.
2	<i>Tagetes patula</i> L.	15	<i>Tagetes jaliscensis</i> Greenm.
3	<i>Tagetes tenuifolia</i> Cav.	16	<i>Tagetes remotiflora</i> Kunth
4	<i>Tagetes lucida</i> Cav.	17	<i>Tagetes heterocarpha</i> Rydb.
5	<i>Tagetes minuta</i> L.	18	<i>Tagetes parryi</i> A. Gray
6	<i>Tagetes filifolia</i> Lag.	19	<i>Tagetes stenophylla</i> B.L. Turner
7	<i>Tagetes micrantha</i> Cav.	20	<i>Tagetes arenicola</i> B.L. Turner
8	<i>Tagetes nelsonii</i> Greenm.	21	<i>Tagetes oaxacana</i> B.L. Turner
9	<i>Tagetes lemmonii</i> A. Gray	22	<i>Tagetes hartwegii</i> Greenm.
10	<i>Tagetes coronopifolia</i> Willd.	23	<i>Tagetes iltisiana</i> H. Rob.
11	<i>Tagetes elongata</i> Willd.	24	<i>Tagetes pringlei</i> S. Watson
12	<i>Tagetes lacera</i> Brandegees	25	<i>Tagetes subulata</i> Lag.
13	<i>Tagetes linifolia</i> Seaton		

2.3. Filogenia de *Tagetes*

Tagetes posee una notable diversidad específica y una amplia distribución geográfica, lo que ha despertado interés en el estudio de sus relaciones filogenéticas y su evolución dentro de la tribu *Tageteae*. Como se ha mencionado anteriormente, las primeras hipótesis sobre las relaciones filogenéticas del género se hicieron a partir de datos morfológicos; actualmente, existen pocos los estudios enfocados en el tema. El trabajo de Loockerman (1996) sobre el análisis de las relaciones filogenéticas presentes en la tribu *Tageteae*, se incluye al género *Tagetes*, considerado uno de los primeros estudios utilizando herramientas moleculares en la tribu. A partir de la comparación de secuencias ITS (Espaciador Transcrito Interno) de ADN ribosomal y del gen *ndhF* de ADN de cloroplasto, Loockerman generó el primer árbol filogenético de la tribu *Tageteae*.

Para el caso específico del género *Tagetes*, Hinojosa y Schiavinato (2022), analizaron secuencias ITS de aproximadamente la mitad de las especies conocidas del género, con el objetivo de reconstruir su filogenia y evaluar

relaciones entre especies, demostrando así que *Tagetes* es un género monofilético. A pesar del surgimiento de nuevos y mejores marcadores moleculares a finales del siglo pasado, resulta interesante señalar que entre 1990 y la primera década del siglo XXI, hubo algunos estudios moleculares específicos en *Tagetes*, lo que podría explicar que la mayoría de las investigaciones recientes todavía justifiquen el uso de marcadores moleculares (ISSR, RAPD, SSR) para estudiar diversidad y sus relaciones filogenéticas. En este contexto, conocer la distribución de especies a lo largo del territorio nacional resulta fundamental para comprender patrones de diversificación del género (Villaseñor et al., 2005). En el Cuadro 2 se presenta la distribución de algunas especies de *Tagetes* registradas en los diferentes estados de México, principalmente, *Tagetes erecta* L.

La mayoría de las especies del género se obtienen a través de actividades de recolección y son utilizadas en la medicina tradicional (Juarez-Rosete et al., 2013); donde las flores maceradas se emplean por sus propiedades antihelmínticas, aromáticas, digestivas y diuréticas para tratar diversos padecimientos (Lim, 2014). Distintas especies de *Tagetes* se han establecido en la horticultura debido a su alto valor ornamental y sus múltiples aplicaciones (Neher, 1968; Serrato-Cruz, 1999; Soule, 1993). En conjunto, la información disponible pone de manifiesto que, a pesar de los avances en herramientas moleculares, el conocimiento sobre la diversidad genética y distribución de las especies del género *Tagetes* aún presenta vacíos importantes. La amplia distribución geográfica en México, así como su relevancia en la medicina tradicional y la horticultura, resaltan la necesidad de estudios integrales que vinculen la diversidad genética, la variabilidad fitoquímica y los usos tradicionales. Este enfoque permitiría no solo comprender mejor los procesos de diversificación del género, sino también fortalecer su aprovechamiento sostenible y su valorización tanto a nivel científico como aplicado.

Cuadro 2 Distribución de especies del género *Tagetes* en México (Villareal, 2003, adaptado de Turner, 1996).

Región/Estados	Especies
Norte	
Sonora	<i>T. filifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. palmeri</i> , <i>T. lemmonii</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. erecta</i> .
Tamaulipas	<i>T. filifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. erecta</i> .
Sinaloa	<i>T. filifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. palmeri</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. erecta</i> .
Durango	<i>T. filifolia</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. pringlei</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. epapposa</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. elongata</i> , <i>T. remotiflora</i> , <i>T. erecta</i> .
Centro Sur	
San Luis Potosí	<i>T. erecta</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. parryi</i> , <i>T. tenuifolia</i> .
Guanajuato	<i>T. filifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. tenuifolia</i> , <i>T. pringlei</i> , <i>T. remotiflora</i> , <i>T. subulata</i> .
Nayarit	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. hartwegii</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. subulata</i> .
Jalisco	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. hartwegii</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. persicaefolius</i> , <i>T. pringlei</i> , <i>T. stenophylla</i> , <i>T. subulata</i> .
Michoacán	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. persicaefolius</i> , <i>T. pringlei</i> , <i>T. stenophylla</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. tenuifolia</i> , <i>T. remotiflora</i> , <i>T. triradiata</i> .
Guerrero	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. stenophylla</i> , <i>T. subulata</i> .
Oaxaca	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. oaxacana</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. tenuifolia</i> .
Puebla	<i>T. coronopifolia</i> , <i>T. erecta</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. linifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. triradiata</i> , <i>T. tenuifolia</i> .

México	<i>T. coronopifolia</i> , <i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. persicaefolius</i> , <i>T. pringlei</i> , <i>T. stenophylla</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. triradiata</i> , <i>T. tenuifolia</i> .
Morelos	<i>T. coronopifolia</i> , <i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. stenophylla</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. triradiata</i> , <i>T. tenuifolia</i> .
Hidalgo	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. persicaefolius</i> , <i>T. tenuifolia</i> .
Querétaro	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. moorei</i> , <i>T. tenuifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. pringlei</i> , <i>T. remotiflora</i> .
Sur Sureste	
Chiapas	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. nelsonii</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. tenuifolia</i> , <i>T. terniflora</i> .
Yucatán	<i>T. erecta</i> , <i>T. tenuifolia</i> .

2.4. Complejo Taxonómico Cempoalxóchitl: *Tagetes erecta* L.

En la antigüedad existían dos esquemas para la clasificación de las plantas, basados en su morfología y función, de acuerdo con el último criterio, las plantas ornamentales —vistosas y fragantes— se denominaban cempoalxóchitl, término que significaba “veinte flores” o “muchas flores”, según la traducción; la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta* L.) significa veinte flores en el idioma náhuatl (Popper, 1984; Serrato-Cruz, 1999). El cempasúchil es una planta milenaria conocida y cultivada ampliamente en el mundo, siendo apreciada por sus vibrantes colores y el característico aroma que desprenden sus flores, México constituye su centro de origen (Neher, 1968). Desde la antigüedad fue utilizada como una flor ritualística y en la medicina tradicional por los pueblos prehispánicos de México y América del Sur (Turner & Nesom, 1993). En México, su uso en ceremonias funerarias se confirma por la representación de inflorescencias de cempasúchil en una urna funeraria encontrada en el Valle de México, cuyo modelo indica prácticas de selección (Kaplan, 1960).

Actualmente, se reconoce a *Tagetes erecta* como parte de un complejo taxonómico de especies que comparten características similares; en su mayoría silvestres o en condición ruderal (Serrato-Cruz et al., 2014), se desconoce a ciencia cierta el aporte genético de los elementos silvestres a la forma cultivada actual. La clasificación del género *Tagetes* propuesta por Soule (1993) identificó distintos taxones como especies independientes; posteriormente, Turner (1996) propuso que algunos de estos corresponden a elementos silvestres que pueden agruparse con base a similitudes morfológicas, tal es el caso del grupo cempoalxóchitl (Serrato-Cruz et al., 2014). Dentro de este grupo se incluyen: *Tagetes erecta*, *T. patula*, *T. tenuifolia*, *T. jaliscensis*, *T. remotiflora* Kunze y *T. heterocarpha* Rydb; siendo *T. erecta* la forma más representativa y ampliamente cultivada (Neher, 1968). Resulta interesante señalar que el uso y cultivo de los elementos silvestres es limitado, por lo que la mayoría de sus atributos permanecen desconocidos.

El grupo cempoalxóchitl comprende plantas herbáceas anuales, de porte alto y hábito erecto, con tallos robustos, estriados y ramificados. Las hojas son alternas, pinnatisectas a pinnatífidas, de segmentos lanceolados a ovados con margen dentado y de olor característico. Las inflorescencias son capítulos solitarios o en cimas, generalmente globosos a semiglobosos, con abundantes flores liguladas (formas cultivadas), lo que les confiere un aspecto doble. Las lígulas son anchas y numerosas, habitualmente de colores amarillo a anaranjado intensos. Los capítulos se presentan sobre pedúnculos largos y firmes. Particularmente, *Tagetes erecta* presenta algunos caracteres distintivos que podrían reflejar un patrón de domesticación orientado al aumento del tamaño floral y la compactación del capítulo (Serrato-Cruz, 1999; Villareal, 2003; Serrato-Cruz, 2014).

En la actualidad, el cempasúchil se produce activamente en 20 municipios correspondientes a los estados de México, Puebla, Hidalgo, Guerrero, Michoacán, Tlaxcala, San Luis Potosí, Morelos, Oaxaca, Ciudad de México y Durango, principalmente (SADER, 2023). De acuerdo con los datos reportados

por la Secretaría del Medio Ambiente (SEDEMA), para el 2023 se registró un incremento de 465 % en la producción del cempasúchil, generando alrededor de 500 mdp, principalmente en el Estado de México y CDMX. Cabe destacar que, en las últimas décadas, el uso de flores comestibles ha aumentado en la gastronomía mundial (Mulík & Ozuna, 2020). Así mismo, el aumento en la producción de cempasúchil puede deberse, además de su uso en la conmemoración del día de muertos, a la reciente reinserción de sus flores a la gastronomía mexicana para añadir su fragancia y sabores a distintos alimentos y bebidas o bien como un elemento decorativo en los platillos.

En este contexto, el creciente interés y aprovechamiento del cempasúchil evidencian la necesidad de estudiar con mayor detalle la diversidad del grupo cempoalxóchitl, particularmente aquellas especies que aparentemente presentan un menor grado de domesticación y han sido poco exploradas, donde *Tagetes heterocarpha* Rydb. y *Tagetes remotiflora* Kunze resultan de particular interés, debido al limitado conocimiento disponible sobre ellas.

2.5. Morfología y Distribución

Tagetes erecta L. es una planta herbácea anual, comúnmente de 40 a 60 cm de altura llegando alcanzar 1.8 m; posee tallos erectos, estriados, ramificados en la porción superior; hojas pinnadas, de 4 a 12 cm de largo, frecuentemente con 5 a 15 folíolos lanceolados a elípticos, dentados; cabezuelas solitarias o agrupadas en cimas corimbosas terminales, pedúnculos clavados de 5 a 15 cm de largo; involucros campanulados de 12 a 18 mm; flores liguladas 5 a numerosas de 8 a 18 mm de largo y 6 a 10 mm de ancho, de colores amarillo-anaranjado (Figura 2 y 3); con 40 a 400 flores tubulares en el disco (Villarreal, 2003). Se encuentra ampliamente distribuida y naturalizada en diversas regiones templadas del mundo, con un intervalo altitudinal que va del nivel del mar hasta aproximadamente los 3000 m. En México, como especie cultivada, *T. erecta* se distribuye en un intervalo de 800 a 2300 m s.n.m., y su patrón de distribución responde tanto a la diversidad ambiental como a las prácticas culturales vinculadas a su manejo y cultivo (CONABIO, 2023).



Figura 2 Inflorescencias de diversos genotipos de *Tagetes erecta* L.



Figura 3 Inflorescencias de diversos genotipos de *Tagetes erecta* L.

Tagetes heterocarpha Rydb. (Figura 4) presenta una distribución más restringida, extendiéndose desde el norte de México hasta Costa Rica por la vertiente occidental, se desarrolla principalmente en pendientes rocosas y en asociación con bosques de pino-encino, entre 500 y 3500 m de altitud. En México, se ha registrado en Chihuahua, Sonora, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Estado de México,

Oaxaca y Chiapas; sin embargo, su presencia es limitada, ya que se concentra en uno o pocos sitios dentro de estas entidades (Neher, 1966).



Figura 4 Inflorescencias de algunos genotipos de *Tagetes heterocarpa* Rydb.

Tagetes remotiflora Kunze (Linnaea 20: 23, 1847) —conocida comúnmente como: cincollaga, flor de muerto amarillo, tiringe (lengua purépecha)— es una planta herbácea anual, de 10 a 70 cm de altura, con tallos erectos y ramificados, glabros. Presenta hojas pinnadas, con folíolos lineares a lanceolados y margen dentado, con glándulas diminutas. Las inflorescencias son cabezuelas solitarias o en cimas terminales, con flores liguladas amarillo-anaranjadas y flores del disco tubulares con tintes rojizos (Figura 5). Los frutos son aquenios lineares con vilano de escamas (Villareal, 2003).

Tagetes remotiflora se distribuye en el occidente-centro de México, específicamente en Durango, Guanajuato, Querétaro, Jalisco, Michoacán, Estado de México y Guerrero. Habita en claros de bosques de pino-encino, encino, mesófilos de montaña y selva baja caducifolia, así como en sitios perturbados. Se encuentra entre los 1800 y 3000 m s.n.m. y florece de agosto a enero. A menudo, se relaciona fuertemente con *T. erecta*, misma que algunos autores consideran como sinónimo debido a que la delimitación entre ambas especies no es clara en el grupo donde se localiza (Villareal, 2003).



Figura 5 Inflorescencias de diversos genotipos de *Tagetes remotiflora* Kunze.

La caracterización morfológica de *Tagetes erecta* se ha centrado principalmente en la identificación de cultivares comerciales con rasgos homogéneos, de interés para el ámbito comercial e industrial (Namita et al., 2013). No obstante, existen diversas variantes silvestres que con frecuencia se reconocen como especies distintas, tal es el caso de *T. heterocarpha* y *T. remotiflora*. Estudios basados en la estructura genética de *T. erecta*, han evidenciado una estrecha relación entre los materiales silvestres y los cultivados (Cicevan et al., 2022), lo que dificulta su delimitación taxonómica. Esta situación no solo ha generado debate sobre la circunscripción de la especie, sino también plantea interrogantes sobre el posible aporte genético de las formas silvestres en su origen y diversificación de las formas cultivadas (Figura 6). En este contexto, el estudio comparativo entre materiales silvestres y cultivados adquiere relevancia para comprender el grado de diferenciación y las bases que han guiado su proceso de domesticación.



Figura 6 Inflorescencias de algunos genotipos de *Tagetes erecta* L. (cultivada, derecha) y *Tagetes remotiflora* Kunze (silvestre, izquierda).

2.6. Filogenia y Domesticación

La filogenia del género *Tagetes* ha sido objeto de diversos estudios; sin embargo, las relaciones evolutivas entre sus especies, particularmente en *Tagetes erecta*, aún presentan incertidumbre debido a la complejidad citogenética y morfológica del grupo. En este contexto, se ha propuesto que *Tagetes patula* corresponde a una especie anfidiplóide originada a partir de *Tagetes erecta* y *Tagetes tenuifolia*, con base en la presencia de regiones cromosómicas compartidas, hipótesis respaldada por estudios de caracterización cromosómica, así como por evidencia morfológica y molecular obtenida a partir de ADNc (Hoshi et al., 2018; Kaplan, 1960).

A pesar de estos avances, el origen de *Tagetes erecta* no se conoce con certeza, particularmente en lo que respecta al papel que desempeñaron los materiales silvestres en su proceso de domesticación, no obstante, el análisis de poblaciones silvestres disponibles ha permitido identificar que existe cierta afinidad genética y morfológica con esta especie cultivada (Serrato-Cruz, 1999). En este sentido, la caracterización citogenética, mediante la determinación del nivel de ploidía a través de recuentos cromosómicos o la estimación del valor 2C (contenido total de ADN nuclear), ha resultado útil para distinguir entre especies afines y cultivares cercanos a *T. erecta* (Hoshi et al., 2018). Debido a las condiciones de poliploidía que presenta el género, diversas variedades de plantas triploides inter e intraespecíficas se crean a partir de progenitores de diploides y tetraploides con propósitos de mejoramiento y creación de nuevas variedades (Hoshi et al., 2018).

Entre las especies silvestres relacionadas, *Tagetes heterocarpha* y *Tagetes remotiflora* resultan particularmente relevantes, ya que, a pesar de presentar diferencias morfológicas evidentes con *Tagetes erecta*, muestran afinidad citogenética que permite el cruzamiento entre ellas en distintos grados (Serrato-Cruz, 1999). Asimismo, Neher (1966) observó que varias especies del género, en su mayoría anuales, presentan afinidad genética con distintos niveles de compatibilidad bajo entrecruzamiento. No obstante, estudios de hibridación

indican que, aunque es posible obtener híbridos interespecíficos en baja frecuencia, la generación F2 resulta inviable, lo que sugiere la presencia de barreras reproductivas de tipo pre o postcigótico; además, la viabilidad de los cruzamientos puede depender del papel que desempeñe *T. erecta* como progenitor en el cruce (Serrato-Cruz, 1999).

La capacidad de cruzamiento, junto con fenómenos como la infertilidad parcial y el emparejamiento cromosómico irregular, ha sido interpretada como resultado de diferencias estructurales entre genomas; en este sentido, estudios citológicos y morfológicos sugieren que distintas especies diploides de *Tagetes* pudieron haber dado origen a híbridos aloploidos (Towner, 1961). En relación con la ascendencia de *Tagetes erecta*, se ha planteado que las formas silvestres registradas en algunas regiones de México podrían corresponder tanto a poblaciones ancestrales como a individuos derivados del escape de cultivo (Neher, 1966). Asimismo, la afinidad en el cruzamiento entre *T. erecta* y *T. heterocarpa* ($2n = 2x = 24$), que produce progenie fértil con morfología intermedia, sugiere la posible existencia de un ancestro común, cuya divergencia y diferenciación morfológica pudieron haber sido favorecidas por procesos evolutivos en distintas regiones geográficas (Neher, 1966; Towner, 1961).

Desde una perspectiva de domesticación, diversas fuentes históricas y etnobotánicas indican que *Tagetes erecta* y *T. patula* han sido cultivadas en México desde épocas prehispánicas, como lo evidencian registros en el Códice Florentino y otras obras históricas (Kaplan, 1960; Neher, 1968; Serrato, 1999). Estos antecedentes, junto con estudios posteriores, sugieren que su domesticación implicó procesos de selección continua, el manejo simultáneo de formas silvestres y cultivadas, y la generación de una amplia diversidad de variantes. Este proceso, comparable al de otros cultivos mesoamericanos, refleja un profundo conocimiento agrícola que ha contribuido a la riqueza genética actual del grupo. En contraste con los programas de mejoramiento intensivo desarrollados en el extranjero, mientras que en México esta diversidad es resultado, en gran medida, de la domesticación tradicional.

2.7. Manejo y cultivo de *Tagetes*

El manejo agronómico de las especies del género *Tagetes* es un factor determinante para su adecuado desarrollo, ya que su crecimiento, floración y rendimiento están estrechamente relacionados con las condiciones ambientales y edáficas en las que se cultivan. Las especies del género *Tagetes* se desarrollan óptimamente en climas templados, con temperaturas entre 14.5 y 28.6 °C, mientras que temperaturas más elevadas afectan negativamente la floración. Además, presentan amplia adaptación edáfica; empero, su mejor desempeño se observa en suelos profundos, fértiles, bien drenados, con buena retención de humedad y pH cercano a 7.0–7.5, siendo los suelos franco-arenosos los más adecuados (Salehi et al., 2018). El cultivo puede establecerse mediante siembra directa o trasplante, con espaciamientos variables según el sistema de manejo. Durante las primeras etapas, las plántulas son susceptibles a la competencia con malezas, por lo que se requieren deshierbes iniciales. Prácticas como el despunte favorecen la ramificación y la producción de flores (Salehi et al., 2018)

El cultivo tolera periodos cortos de sequía y responde favorablemente a la fertilización balanceada, particularmente con nitrógeno, fósforo y potasio. Asimismo, puede verse afectado por diversas enfermedades fúngicas, bacterianas y virales, lo que requiere manejo fitosanitario adecuado. (Salehi, et al., 2018). En conjunto, estas condiciones de manejo influyen directamente en el desempeño fisiológico de las plantas y, por ende, en la acumulación de metabolitos secundarios, lo que destaca la importancia de considerar los factores agronómicos en estudios relacionados con la caracterización fitoquímica y el aprovechamiento de estas especies.

2.8. *Tagetes* como recurso fitoquímico

Las plantas producen metabolitos secundarios como defensa contra herbívoros, parásitos, bacterias y virus, y por lo tanto dependen de estos agentes como disuasorios bioquímicos para su supervivencia (Karwani & Sisodia, 2015). Estos metabolitos secundarios constituyen el valor intrínseco de una planta para su uso

medicinal, farmacéutico o industrial; en este sentido, los efectos medicinales beneficiosos de los materiales vegetales suelen resultar de la combinación de los productos secundarios presentes en la planta y sus componentes. Los métodos de preparación de los remedios tradicionales en los que se utilizan las plantas son conservados y transmitidos por los pueblos indígenas de generación en generación.

La mayoría de las especies del género *Tagetes* son aromáticas debido a la presencia de aceites esenciales en glándulas localizadas en sus raíces, hojas, tallos y cabezuelas; junto con otros compuestos químicos, estas sustancias están relacionadas con usos en medicina tradicional, además de ser pigmentantes, saborizantes, repelentes de insectos, insecticidas, nematocidas, acaricidas y fungicidas (Serrato-Cruz et al., 2014). A través de los años, se ha intentado descifrar los mecanismos de síntesis de los principios activos involucrados en la actividad biológica de las flores de *Tagetes*, así como la extensa gama de metabolitos secundarios que produce y sus potenciales aplicaciones, enfocadas principalmente en el uso de hojas y flores.

El cempasúchil es una planta con un importante papel cultural en México; sus llamativas flores son utilizadas cada año en las festividades del día de muertos. No obstante, estas flores también están dotadas de elementos con diversos usos debido a los fitoquímicos que poseen. Estudios realizados en los diferentes órganos de *T. erecta* han permitido aislar diversos componentes químicos, como flavonoides, carotenoides y compuestos fenólicos, para evaluar su potencial biológico (Burlec, et al., 2021; Dixit et al., 2013; Kaisoon et al., 2011; Rhama & Madhavan, 2011). Las hojas o lígulas del cempasúchil poseen grandes cantidades de luteína, una xantófila (carotenoide) que es uno de sus principales constituyentes con actividad antioxidante y pigmentante; ésta es utilizada en la industria agropecuaria para alimentar aves de corral con el objetivo de producir carne y yema de huevo con un color naranja más intenso (Karwani & Sisodia, 2015).

Entre las aplicaciones más destacadas del cempasúchil se encuentra su uso en la medicina tradicional, donde sus hojas machacadas funcionan contra hemorroides, problemas renales, dolores musculares, úlceras y heridas (Karwani & Sisodia, 2015). A su vez, se ha informado sobre su actividad antibacteriana utilizando extractos de flores, mostrando una actividad inhibitoria máxima contra *Klebsiella pneumoniae*, siendo el flavonoide patulitrina uno de los elementos responsables de esta actividad (Dasgupta, et al., 2012). Asimismo, exhibe una importante actividad antioxidante debido a la presencia de carotenoides y flavonoides, evidenciada mediante ensayos por el método FRAP, mostrando un mayor poder reductor que el estándar (ácido ascórbico) (Basavaraj et al., 2011). También se ha reportado que el uso de extractos hidroalcohólicos de *T. erecta* y *G. sylvestre* en geles de carbopol incrementa la curación de heridas por escisión y quemaduras, posiblemente debido a la sinergia entre ambos extractos (Lim, 2014).

Existen diversas vías biosintéticas y catabólicas complejas que intervienen en la síntesis de productos finales y subproductos identificados como metabolitos secundarios en los organismos vivos (Pasikanti et al., 2008). Actualmente, la determinación del perfil de sus componentes se ha convertido en una herramienta valiosa para el estudio de los cambios en sus metabolitos en respuesta a tratamientos o estados específicos en los sistemas biológicos (Breitling et al., 2013). Adicionalmente, el perfil de metabolitos ha sido utilizado como herramienta quimiotaxonómica, ya que la presencia, ausencia o abundancia relativa de metabolitos secundarios específicos puede reflejar diferencias genéticas y evolutivas entre taxones cercanos, permitiendo la comparación y diferenciación de especies y cultivares (Israilev & Seeligman, 1994).

En este sentido, estudios como el de Park et al. (2017), quienes analizaron la acumulación de carotenoides entre cultivares de *T. erecta* y *T. patula*, detectaron diferencias en compuestos como luteína y otros carotenoides mediante análisis multivariados (PCA, OPLS-DA). Por otro lado, *Tagetes remotiflora* es una

herbácea anual con distribución regional en México, de condición ruderal (Serrato-Cruz, 2014), con actividad antibacteriana (Rincón et al., 2012) y cuya composición química y propiedades contra hongos fitopatógenos aún no han sido totalmente exploradas.

2.9. *Tagetes* como recurso fitogenético

Los avances en biología molecular han proporcionado nuevos métodos de gran utilidad como los marcadores basados en ADN; se pueden utilizar diversas técnicas basadas en PCR para el análisis del genoma de una especie o población. Estos métodos han resultado ser relativamente rápidos y fáciles de usar, ya que revelan el polimorfismo presente y constituyen una herramienta eficiente para la investigación genética y el análisis de la diversidad de los organismos. En este sentido, los marcadores moleculares proporcionan una solución rápida y confiable para estimar la diversidad genética y la relación entre genotipos de cualquier organismo (Thormann et al., 1994), particularmente en programas de mejoramiento donde el éxito depende de la cantidad de variabilidad genética en el germoplasma y de las relaciones genéticas entre los rasgos deseables de los ejemplares estudiados.

La estimación de la diversidad genética es un paso esencial para cualquier programa de mejoramiento de cultivos, ya que los materiales genéticamente diversos ofrecen un amplio conjunto de genes (Jhang, 2010). El conocimiento de los caracteres morfológicos, o de los componentes bioquímicos útiles, y su variabilidad genética, podría respaldar nuevos programas de mejoramiento genético para diferentes especies de interés (Sestras, et al., 2009), como es el caso del cempasúchil (Cicevan et al., 2022). La variación genética y las relaciones entre genotipos son esenciales para clasificar y utilizar los recursos de germoplasma en el mejoramiento genético del cultivo (Kumar et al., 2019).

Asimismo, las tendencias en los programas modernos de fitomejoramiento pudieron haber contribuido a la vulnerabilidad genética de las especies cultivadas de *Tagetes*, por lo que resulta necesario diversificar el acervo genético de los nuevos cultivares, introduciendo materiales silvestres para reducir el riesgo de

crisis futuras (Cicevan et al., 2022). Mediante hibridación interespecífica, por ejemplo, entre *T. erecta* y *T. patula*, se pueden generar nuevos híbridos con un intenso efecto de heterosis y características ornamentales y comerciales superiores (Singh & Vishwakarma, 2020). De esta manera, el éxito de los programas de fitomejoramiento depende de la variación genética del germoplasma y de su uso eficiente (Patel et al., 2019).

Los marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) han demostrado ser útiles para identificar polimorfismos entre accesiones en diversos materiales, brindando un gran potencial para resolver relaciones intra e intergenómicas (Namita et al., 2013). Además, estos marcadores son eficaces para superar algunas limitaciones de otros sistemas, como la baja reproducibilidad de los RAPD, el alto costo de los AFLP y la necesidad de conocer secuencias flanqueantes en los SSR (Zietkiewick et al., 1994). Su alta reproducibilidad se atribuye al uso de cebadores largos y a las altas temperaturas de hibridación, lo que incrementa la rigurosidad del análisis (Reddy et al., 2002).

El cempasúchil (*Tagetes erecta*), al ser un cultivo de polinización cruzada, ofrece amplias posibilidades para su aprovechamiento mediante heterosis; sin embargo, también puede reproducirse por autopolinización, lo que conlleva problemas de endogamia que afectan el vigor de los tallos y el tamaño de las flores (Serrato-Cruz et al., 2000). Esta especie ha sido ampliamente estudiada a nivel genómico, ya que representa un importante acervo genético para entender su desarrollo y evolución.

El trabajo de clasificación de Neher en 1966 (citado por Serrato-Cruz, 1999) establece que *T. erecta* pertenece a un complejo de especies estrechamente relacionadas, debido a su similitud morfológica. Estas especies han sido objeto de intenso mejoramiento genético, sustentado en la alta diversidad genética que existe en México (Serrato-Cruz, 1999). Tomando en cuenta su cultivo tradicional y su uso desde épocas prehispánicas, se reconoce que esta especie ha evolucionado bajo un constante proceso de domesticación (Kaplan, 1960; Neher, 1966; Serrato-Cruz, 1999), lo que ha derivado en una marcada diferenciación

entre formas silvestres y cultivadas, generando interés en identificar los materiales silvestres que dieron origen a las formas actuales.

La alta diversidad de la especie y su proximidad con otros materiales dificultan los análisis de diversidad y la clasificación taxonómica, ya que los métodos tradicionales basados en caracteres morfológicos no han resuelto de forma concluyente su delimitación. Problemas como la identificación incorrecta de ejemplares, el uso de taxonomías desactualizadas y la imprecisión en los sitios de recolecta complican aún más su estudio (Villaseñor et al., 2005). En este sentido, los perfiles moleculares en distintas poblaciones representan una herramienta útil para superar estas limitaciones; no obstante, debido a la amplia distribución del género, es necesario ampliar el número de materiales analizados.

2.10. PROBLEMA DE ESTUDIO

Atendiendo a la diversidad biológica existente en *Tagetes erecta* y sus variantes silvestres, así como a las discrepancias en su clasificación y a los problemas taxonómicos y filogenéticos que existen en la especie, ha surgido la necesidad de ampliar el conocimiento sobre los procesos de domesticación que han contribuido a su diversificación. Estas observaciones motivaron a la realización del presente estudio, donde se evaluaron genotipos silvestres y cultivados provenientes de distintas regiones del país a través de la caracterización fitoquímica y molecular de sus componentes con el fin de estimar la diversidad presente dentro y entre estas poblaciones.

Cabe aclarar que, en los ejemplares obtenidos en los trabajos de recolecta para este estudio, no se tomó en cuenta la ascendencia de los materiales recolectados, por lo que pueden estar sujetos a entrecruzamientos naturales con otras variantes de *Tagetes*, lo que confiere un peso significativo a los resultados obtenidos y la cercanía entre algunos materiales en contraste de su lejanía con otros.

2.11. LITERATURA CITADA

- Anaya-Gutiérrez, E. J., Gutiérrez, J., Serrato-Cruz, M. A., & Vázquez-Sánchez, M. (2022). Anatomía foliar de nueve especies de *Tagetes* L. (Tageteae: Asteraceae). *Botanical Sciences*, 100 (3), 667-684. Doi:10.17129/botsci.2985
- Basavaraj, C. V., Karnakumar, B. V., Rajabhau, S., Shiramane, & Kamshetty, M. V. (2011). In vitro antioxidant activity studies of the flowers of *Tagetes erecta* L. (Compositae). *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(3), 223-229.
- Breitling, R., Cenicerós, A., Jankevics, A., & Takano, E. (2013). Metabolomics for secondary metabolite research. *Metabolites*, 3, 1076–1083.
- Bremer, K., Jansen, R. K., Karis, P. O., Kallersjö, M., Keeley, S. C., Kim, K.-J., & Wallace, R. S. (1992). A review of the phylogeny and classification of the Asteraceae. *Nordic Journal of Botany*, 12, 141-148.
- Burlec, A. F., Pecio, L., Kozachok, S., Mircea, C., Corciova, A., Verestiuc, L., Hancianu, M. (2021). Phytochemical Profile, Antioxidant Activity, and Cytotoxicity Assessment of *Tagetes erecta* L. Flowers. *Molecules*, 26(5), Article 1201. Doi:10.3390/molecules26051201
- Cicevan, R., Sestras, A., Plazas, M., Boscaiu, M., Vilanova, S., Gramazio, P., Sestras, R. (2022). Biological Traits and Genetic Relationships Amongst Cultivars of Three Species of *Tagetes* (Asteraceae). *Plants*, 11, Article 760. Doi:10.3390/plants11060760
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2023). México.
- Dasgupta, N., Shivendu, R., Proud, S., Rahul, J., Swati, M., & M.A. Arabi, M. S. (2012). Antibacterial Activity of Leaf Extract of Mexican Marigold (*Tagetes erecta*) Against Different Gram Positive and Gram Negative Bacterial Strains. *Journal of Pharmacy Research*, 5(8), 4201-4203.
- Dixit, P., Tripathi, S., & Verma, N. (2013). A brief study on marigold. *International Research Journal of Pharmacy*, 4, 43-48.
- Funk, V., Sussana, A., Stuessy, T., & Bayer, R. (2009). *Systematics, evolution and biogeography of the compositae*. International Association for Plant Taxonomy (IAPT).
- García-Sánchez, F., López-Villafranco, M. E.; Aguilar-Rodríguez, S.; Aguilar-Contreras, A. (2012). Etnobotánica y morfo-anatomía comparada de tres especies de *Tagetes* que se utilizan en Nicolás Romero, Estado de México. *Botanical Sciences*, 90(3), 221-232.
- Hinojosa-Espinosa, O., & Schiavinato, D. J. (2022). Phylogeny of marigolds (*Tagetes* L., Tageteae) based on ITS sequences. *Capitulum*, 2(8), 38-49. Doi:10.53875/capitulum.02.1.03

- Hoshi, Y., Paphrue, R., & Hironaka, K. (2018). Genome size determination and chromosome characterization of two marigold species (Asteraceae). *Cytologia*, 84(1), 37-42.
- Israilev, L. R., & Seeligman, P. (1994). Flavonoides como marcadores taxonómicos en dos especies de Tagetes. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 30(1-2), 95-96.
- Jhang, T. K. (2010). Efficiency of different marker systems for molecular characterization of subtropical carrot germplasm. *Journal of Agro Science*, 148, 171-81.
- Juárez-Rosete, C. R.; Aguilar-Castillo, J. A.; Juárez-Rosete, M. E.; Bugarín-Montoya, R.; Juárez-López, P.; Cruz Crespo, E. (2013). Hierbas aromáticas y medicinales en México: Tradición e Innovación. *Revista Bio Ciencias*, 2(3), 119-129.
- Kaisoon, O., Siriamornpun, S., Natthida, W., & Meeso, N. (2011). Phenolic compounds and antioxidant activities of edible flowers from Thailand. *Journal of Functional Foods*, 3(2), 88-99. Doi:10.1016/j.jff.2011.03.002
- Kaplan, L. (1960). Historical and Ethnobotanical Aspects of Domestication in Tagetes. *Economic Botany*, 14 (3), 200-202.
- Karwani, G., & Sisodia, S. S. (2015). Tagetes erecta plant: Review with significant pharmacological activities. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1180-1183.
- Kumar, A., Pratap, B., Gautam, D., Yadav, V., Gangadhara, K., Beer, K., Kumar, V. (2019). Variability, heritability and genetic advance studies in French marigold (*Tagetes patula* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8, 1046–1048.
- Lim, T. (2014). *Tagetes erecta*. In T. K. Lim (ed.), *Edible medicinal and non-medicinal plants*. (Vol. 7, pp. 432-447). Springer. Doi:10.1007/978-94-007-7395-0
- Loockerman, D. J. (1996). *Phylogenetic and molecular evolutionary studies of the Tageteae (Asteraceae)*. University of Texas at Austin.
- Loockerman, D. J., Turner, B. L., & Jansen, R. K. (2003). Phylogenetic relationships within the Tageteae (Asteraceae) based on nuclear ribosomal ITS and chloroplast ndhF gene sequences. *Systematic Botany*, 28(1), 191-207. Doi:10.1043/0363-6445-28.1.191
- Mulík, S., & Ozuna, C. (2020). Mexican edible flowers: Cultural background, traditional culinary uses, and potential health benefits . *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 21, 100235. Doi:100235 10.1016/j.ijgfs.2020.100235

- Namita, P. S., Sonah, H., Singh, P. K., & Sharma, T. R. (2013). Genetic diversity analysis of marigold (*Tagetes* sp) genotypes using RAPD and ISSR markers. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 83 (5), 484-490.
- Neher, R. T. (1966). *Monograph of the genus Tagetes (Compositae)*. [Doctoral dissertation]. Indiana University.
- Neher, R. T. (1968). The ethnobotany of *Tagetes* . *Economic Botany*, 22(4), 317-325.
- Park, Y. J., Park, S.-Y., Arasu, M. V., Naif, A. A.-D., Ahn, H.-g., Kim, J. K., & Park, S. U. (2017). Accumulation of carotenoids and metabolic profiling in different cultivars of *Tagetes* flowers. *Molecules*, 22(2), 313-327. Doi:10.3390/molecules22020313
- Pasikanti, K., Ho, P., & Chan, E. (2008). Gas chromatography/mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids. *Journal of Chromatography B*, 871, 202–211 .
- Patel, M., Chawla, S., Chavan, S., Shah, H., & Patil Sudha, D. (2019). Genetic variability, heritability and genetic advance studies in marigold (*Tagetes* spp.) under the South Gujarat region. *Electronic Journal of Plant Breeding*, 10, 272–276.
- Pérez-Ortega G.; González-Trujano, M.E.; Ángeles-López G. E.; Brindis, F.; Vibrans, H.; Reyes-Chilpa, R. (2016). *Tagetes lucida* Cav.: Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of its tranquilizing properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 181, 221-228. Doi: 2016 10.1016/j.jep.2016.01.040
- Popper, K. R. (1984). *The logic of scientific discovery*. Editorial Tecnos.
- Reddy, M. S. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128, 9-17.
- Rhama, S., & Madhavan, S. (2011). Antibacterial activity of the flavonoid-patulitrin isolated from the flowers of *Tagetes erecta* L. *International Journal of Pharmacological Technology Research*, 3(3), 1407-1409.
- Rzedowski, J. (1978). *Claves para la identificación de los géneros de la familia Compositae en México*. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí.
- Rzedowski, J. (2006). *Vegetación de México (1.^a ed. digital)*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).
- Salehi, B., Valussi, M., Morais-Braga, M. F., Carneiro, J. N., Leal, A. L., Coutinho, H. D., Carradori, S. (2018). *Tagetes* spp. essential oils and other extracts: Chemical characterization and biological activity. *Molecules*, 23(11), Article. 2847. Doi:10.3390/molecules23112847
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER). (2023). *Aumenta producción de flor de cempasúchil en temporada 2023 de Día de Muertos*. URL:

<https://www.gob.mx/agricultura%7Cpuebla/prensa/aumenta-produccion-de-flor-de-cempasuchil-en-temporada-2022-de-dia-de-muertos-318818>

Secretaría del Medio Ambiente (SEDEMA). (2023). *Reporta Sedema incremento del 465% en producción de cempasúchil*. Gobierno de la Ciudad de México. <https://www.sedema.cdmx.gob.mx/comunicacion/nota/reporta-sedema-incremento-del-465-en-produccion-de-cempasuchil>

Serrato-Cruz, M. A. (1999). *Variabilidad genética del cempoalxóchitl (Tagetes spp.)*. Colegio de Postgraduados.

Serrato-Cruz, M. A. (2014). *El recurso genético del cempoalxóchitl (Tagetes spp.) de México: Diagnóstico*. Texcoco, Estado de México: Universidad Autónoma Chapingo.

Serrato-Cruz, M. Á., Bautista-Relles, F., & Monroy-Sais, A. S. (2014). *Guía para conocer el germoplasma mexicano de cempoalxóchitl (Tagetes spp.)*. Universidad Autónoma Chapingo.

Serrato-Cruz, M. A., Miranda-Colín, S., Castillo-González, F., & García-Velásquez, A. (2000). Cruzamiento intraespecífico en el cempoalxóchitl (*Tagetes erecta* L.). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 23(1), 69–78.

Sestras, R., Pamfil, D., Ardelean, M., Botez, C., Sestras, A., Mitre, I., Mihalte, L. (2009). Use of phenotypic and MAS selection based on bulk segregant analysis to reveal the genetic variability induced by artificial hybridization in apple. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 37, 273-277.

Singh, D., & Vishwakarma, A. (2020). Heterosis breeding in marigold: An efficient tool towards crop improvement. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 1, 32-50.

Soule, J. A. (1993). *Biosystematics of Tagetes*. [Ph.D. thesis]. University of Texas, Austin.

Soule, J. A. (1994). Infrageneric systematics of *Tagetes*. In D. H. Beentje (Ed.), *Compositae: Systematics. Proceedings of the international compositae conference* (Vol. 1., pp. 435-443). Royal Botanic Gardens.

Soule, J. A. (1996). New crop potential in the genus *Tagetes*. In J. Janick (Ed.). *Progress in new crops: Third national symposium* (pp. 546–551). ASHS Press.

Strother, J. L. (1977). Tageteae: A systematic review. En V. H. Heywood, J. B. Harborne, & B. L. Turner (Eds.), *The biology and chemistry of the Compositae* (Vol. 2, pp. 769–783). Academic Press.

Thormann, C. E., Ferreira, M. E., Camargo, L. E., Tivang, J. G., & Osborn, T. C. (1994). Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theoretical and Applied Genetics*, 88, 973-980.

- Towner, J. W. (1961). Cytogenetic studies on the origin of *Tagetes patula* L. meiosis and morphology of diploid and allotetraploid *T. erecta* x *T. tenuifolia*. *American Journal of Botany*, 48(9), 743-751. Doi:10.1002/j.1537-2197.1961.tb11706.x
- Turner, B. L. (1996). The Comps of Mexico—A systematic account of the family Asteraceae, Vol. 6. Tageteae and Anthemideae. *Phytologia Memoirs*, 11, 1-96.
- Turner, B. L., & Nesom, G. L. (1993). Biological diversity of Mexico: origins and distribution. In B. L. Turner, & G. L. Nesom (Eds.), *Biogeography, diversity, and endangered or threatened status of Mexican Asteraceae* (pp. 559-575). Oxford University Press.
- Villareal, J. A. (2003). Familia Compositae. Tribu Tageteae. Flora del bajío y de regiones adyacentes. *Instituto de Ecología*, 113, 1-85.
- Villarreal, Q. J. (2003). Flora del Bajío y de regiones adyacentes. in Q. J. Villarreal (ed.), *Compositae. Tribu Tageteae* (Fascículo 113, pp. 49-73). Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío. Doi:10.21829/fb.200.2003.113.
- Villaseñor, J. L. (2018). Diversidad y distribución de la familia Asteraceae en Méxic. *Botanical Sciences*, 96(2), 332-358. Doi:10.17129/botsoci.1872
- Villaseñor, J. L., Maeda, P., Colín-López, J. J., & Ortiz, E. (2005). Estimación de la riqueza de especies de Asteraceae mediante extrapolación a partir de datos de presencia-ausencia. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 76, 5-18.
- Zeng, L., Zhao, L.-j., Sun, J., Zhao, Z.-g., & Yang, F. (2010). Analysis of genetic relatedness of genetic resources of *Tagetes* as revealed by ISSR. *Scientia Agricultura Sinica*, 43(1), 215-222. Doi:10.3864/j.issn.0578-1752.2010.01.026
- Zietkiewick, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20, 176–183. Doi:10.1006/geno.1994.1151

3. PERFIL DE FLAVONOIDES EN GENOTIPOS SILVESTRES Y CULTIVADOS DE *Tagetes erecta* L. MEDIANTE ANÁLISIS HPLC

3.1. RESUMEN GENERAL

El presente estudio evaluó la diversidad del perfil de flavonoides en 18 genotipos silvestres y cultivados de *Tagetes erecta*, *T. remotiflora* y *T. heterocarpha*, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD), con el objetivo de analizar la variación fitoquímica y su relación con la diferenciación entre genotipos. Se identificaron doce flavonoides en los extractos metanólicos de flores, destacando la hesperidina, la rutina y la morina como los compuestos de mayor concentración, mientras que otros como naringenina, floretina y floritzina presentaron valores bajos. El análisis de contenido total de flavonoides mostró una alta variabilidad entre genotipos, con el mayor número de flavonoides en *T. remotiflora*, lo que sugirió una mayor capacidad biosintética en esta especie. Los análisis multivariados, incluyendo agrupamiento jerárquico, distancia de Mahalanobis y análisis de discriminación canónica, permitieron identificar grupos diferenciados, así como individuos atípicos asociados a posibles procesos de deriva génica o introgresión. Los componentes canónicos indicaron que los flavonoides como isorhamnetina, morina, quercetina y naringenina fueron determinantes en la separación de los grupos. La proyección tridimensional mostró una clara diferenciación de *T. remotiflora*, mientras que *T. erecta* y *T. heterocarpha* presentaron mayor superposición, reflejando similitudes en sus perfiles metabólicos. En conjunto, los resultados evidenciaron que la variabilidad en flavonoides está influenciada por factores genéticos y ambientales, y respaldan el uso de estos compuestos como posibles marcadores quimiotaxonómicos para la caracterización y diferenciación del género *Tagetes*.

Palabras clave: *Tagetes remotiflora* Kunze, *Tagetes heterocarpha* Rydb., HPLC, flavonoides, análisis multivariado.

Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Eduardo Daniel Ramírez Arvizu

Director de Tesis: Dra. María del Rosario García Mateos

3.2. ABSTRACT

FLAVONOID PROFILE IN WILD AND CULTIVATED GENOTYPES OF *Tagetes erecta* L. BY HPLC ANALYSIS

The present study evaluated the diversity of flavonoid profiles in 18 wild and cultivated genotypes of *Tagetes erecta*, *T. remotiflora*, and *T. heterocarpha* using high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD), aiming to analyze phytochemical variation and its relationship with genotype differentiation. Twelve flavonoids were identified in methanolic flower extracts, with hesperidin, rutin, and morin showing the highest concentrations, while compounds such as naringenin, phloretin, and phloridzin were present in lower amounts. The total flavonoid content analysis revealed considerable variability among genotypes, with the highest values observed in *T. remotiflora*, suggesting a greater biosynthetic capacity in this species. Multivariate analyses, including hierarchical clustering, Mahalanobis distance, and canonical discriminant analysis, allowed the identification of distinct groups as well as outlier individuals, potentially associated with genetic drift or introgression processes. Canonical components indicated that flavonoids such as isorhamnetin, morin, quercetin, and naringenin played a key role in group differentiation. The three-dimensional projection clearly separated *T. remotiflora*, whereas *T. erecta* and *T. heterocarpha* showed greater overlap, reflecting similarities in their metabolic profiles. Overall, the results demonstrate that flavonoid variability is influenced by genetic and environmental factors and support their use as chemotaxonomic markers for characterization and differentiation within the genus *Tagetes*.

Index words: *Tagetes remotiflora* Kunze, *Tagetes heterocarpha* Rydb., HPLC, flavonoids, multivariate analysis.

Thesis of Master of Science in Agricultural Biotechnology, Universidad Autónoma Chapingo
Author: Eduardo Daniel Ramírez Arvizu
Advisor: Dra. María del Rosario García Mateos

3.3. Introducción

3.3.1 El género *Tagetes*: diversidad e importancia biológica

El género *Tagetes* es el segundo género más grande de la tribu *Tageteae* (Soule, 1993; Panero, 2007); es cultivado ampliamente por su función ornamental, debido a su amplio periodo de floración (Acosta de la Luz et al., 2010). En México, *Tagetes* se distribuye en una amplia variedad de climas y suelos, principalmente en regiones montañosas donde predominan áreas de transición climática (Serrato-Cruz, 2014); estas situaciones le confieren al género una gran diversidad que suele ocasionar problemas de clasificación. La mayoría de las especies de *Tagetes* presentan características relevantes en horticultura, sus atributos como hábito de crecimiento y tolerancia ambiental, las convierten en cultivos con alto potencial para aprovechamiento (Soule, 1993). *Tagetes erecta* L. es la especie más ampliamente estudiada y cultivada del género (Barajas-Pérez et al., 2011). Además de su valor taxonómico, los atributos morfológicos de *T. erecta* y sus elementos silvestres, se asocian con propiedades funcionales y distintas implicaciones ecológicas (Zamudio et al., 2015).

3.3.2 Actividad biológica y metabolitos secundarios en *Tagetes*

Como parte de estas propiedades funcionales, la mayoría de las especies del género *Tagetes* han mostrado una importante actividad biológica frente a diversos organismos que afectan cultivos de interés agrícola, incluyendo bacterias, hongos, nemátodos, insectos y plantas arvenses (Serrato & Quijano, 1993). Particularmente, los extractos obtenidos de *Tagetes erecta* se caracterizan por la presencia de una amplia gama de compuestos (Marotti et al., 2004); se ha demostrado que sus extractos, obtenidos en su mayoría en las flores, ejercen múltiples acciones farmacológicas, como propiedades antibacterianas, antimicrobianas, antioxidantes, hepatoprotectoras y cicatrizantes (Park et al., 2017). Estos efectos se atribuyen a la producción de diversos metabolitos secundarios, los cuales actúan como mecanismos de defensa contra plagas y patógenos (Duke, 2008).

3.3.3 Composición química y metabolitos de interés

A través de los años, se ha identificado un gran número de metabolitos secundarios en *Tagetes*, incluyendo flavonoides, alcaloides, poliacetilenos, distintos tipos de terpenoides como carotenoides y aceites esenciales, además de ácidos grasos (Rodríguez & Mabry, 1975). De estos metabolitos, los carotenoides y flavonoides han sido identificados como los principales componentes bioactivos y los de mayor interés, los primeros forman parte de los pigmentos de la planta (Vasudevan et al., 1997). Particularmente, las flores de *T. erecta* son el órgano más rico en carotenoides y flavonoides (Hammoda, 2004). En las últimas décadas, la especie es reconocida como una fuente importante de estos compuestos, ampliamente utilizados en la industria agroalimentaria por su actividad antioxidante (Barzana et al., 2002).

3.3.4 La variabilidad metabólica de *Tagetes* y sus distintos enfoques

La síntesis de estos metabolitos suele ser dinámica y cambia en función de los factores genéticos, ambientales y el estado fisiológico en el que se desarrolla cada material. Como consecuencia de esta variabilidad, el conjunto de metabolitos secundarios en plantas representa un campo de estudio amplio y altamente diversificado (Pasikanti et al., 2008). De esta manera, resulta fundamental analizar la composición y variación de estos compuestos desde un enfoque integral, mediante el estudio de perfiles metabólicos que permitan comprender su dinámica como parte de un sistema biológico. El conocimiento de los perfiles metabólicos en plantas ofrece varios beneficios, como obtener más información sobre la biosíntesis de productos vegetales, además se considera una herramienta valiosa para el estudio de los cambios bioquímicos en respuesta a diferentes tratamientos o estados específicos (Weston et al., 2015).

3.3.5 Flavonoides: estructura, función y clasificación

Concretamente, el estudio de los flavonoides ha sido de gran importancia debido a su papel en la fisiología vegetal, como mecanismo de defensa, protección a estrés abiótico y en la pigmentación floral (Agati et al., 2012; Harborne & Williams,

2000). Los primeros estudios sobre flavonoides en *T. erecta* se enfocaron en identificar compuestos individuales mediante técnicas clásicas de aislamiento (Rodríguez & Mabry, 1975). Históricamente, los estudios en fitoquímica consistieron principalmente en el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios, sin profundizar en su función biológica. No obstante, este enfoque ha evolucionado hacia una perspectiva más integral, que busca comprender el papel funcional de estos compuestos dentro de los sistemas biológicos.

En este sentido, la diversidad funcional de los flavonoides está estrechamente relacionada con su estructura química, la cual determina sus propiedades y su actividad biológica (Tang et al., 2024). La estructura básica de los flavonoides está formada por 15 átomos de carbono dispuestos en dos anillos aromáticos conectados por una cadena lineal de tres átomos de carbono, esta estructura generalmente se presenta como un núcleo de flavano, representados por el sistema C6-C3-C6, denominados A, B y C (Figura 7). Los distintos tipos (o esqueletos) de flavonoides difieren en el nivel de oxidación y el patrón de sustitución del anillo C, mientras que las sustancias individuales dentro de una misma clase difieren en el patrón de sustitución de los anillos A y B. Entre los numerosos tipos de flavonoides, los de particular interés son las flavanonas, flavonas, flavonoles, antocianidinas, isoflavonas, chalconas, dihidrochalconas, dihidroflavonoles y auronas debido a la variedad de sustancias y la diversificación del patrón de sustitución (Bohm & Stuessy, 2001).

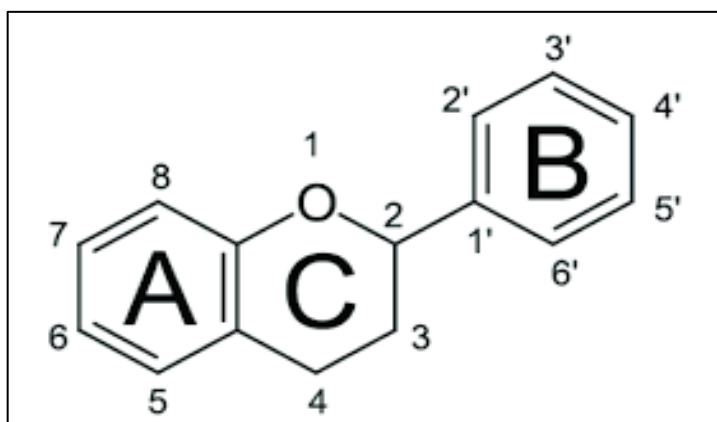


Figura 7 Estructura general del núcleo de flavano (Bohm & Stuessy, 2001).

Además de desempeñar funciones biológicas, los flavonoides pueden emplearse como marcadores quimiotaxonómicos (Harborne, 1998), debido a su amplia diversidad estructural, ya que muestran cierta coherencia con las clasificaciones establecidas a nivel infrafamiliar y en niveles jerárquicos inferiores (Crawford, 1978; Emerenciano et al., 2001). En la familia *Asteraceae*, los flavonoides han sido de gran valor sistemático, debido a su diversidad estructural y patrones de distribución en distintos niveles taxonómicos. Bohm y Stuessy (2001) señalaron que ciertos perfiles presentan consistencia a nivel tribal, lo que permite su uso como marcadores complementarios a caracteres morfológicos y la evidencia molecular, ya que reflejan posibles tendencias evolutivas en su biosíntesis.

3.3.6 Flavonoides en *Tagetes* y su valor quimiotaxonómico

En el género *Tagetes*, la diversidad en las estructuras y patrones de acumulación de los flavonoides también suele estar asociada con diferencias genéticas entre especies, lo que permite su uso en la delimitación taxonómica y el estudio de relaciones filogenéticas entre especies (Bohm & Stuessy, 2001; Harborne & Mabry, 1982). En contraste, en *Tagetes erecta* existe poca literatura enfocada en el uso de flavonoides con fines taxonómicos; sin embargo, se han desarrollado estudios basados en otros metabolitos, particularmente carotenoides, donde el análisis de su perfil y acumulación ha permitido evidenciar variaciones entre cultivares y destacar su utilidad en la caracterización química de la especie (Park et al., 2017). Si bien existen controversias sobre el uso de flavonoides para resolver problemas taxonómicos, se pueden considerar algunas inferencias al utilizar estos marcadores.

3.3.7 Técnicas de análisis de metabolitos

En los trabajos de identificación y caracterización de flavonoides y otros metabolitos secundarios se pueden distinguir algunas tecnologías, como la cromatografía, la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (EM) (Trethewey, 2004). Tanto los métodos de RMN como de EM proporcionan amplios datos estructurales y conformacionales para la elaboración de perfiles metabólicos completos (Beckonert et al., 2007). Diversas técnicas,

como la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), la cromatografía de gases-espectrometría de masas de tiempo de vuelo (GC-TOFMS) y la cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS), han ganado amplia aceptación como métodos estándar para el análisis de metabolitos (Park et al., 2017).

En este contexto, el uso de técnicas analíticas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ha demostrado ser una herramienta eficaz para la separación, identificación y cuantificación de compuestos fenólicos, particularmente flavonoides, debido a su alta sensibilidad, reproducibilidad y capacidad de resolución en mezclas complejas (Beckonert et al., 2007; Trethewey, 2004). Esta técnica permite obtener perfiles metabólicos detallados, lo que facilita la comparación entre distintos genotipos y la identificación de patrones químicos asociados a su variabilidad (Park et al., 2017). A pesar de los avances en el estudio fitoquímico del género *Tagetes*, los análisis comparativos que integran materiales silvestres y cultivados de origen mexicano son aún limitados, por lo que el presente trabajo representa una de las primeras contribuciones sobre el perfil de flavonoides en genotipos domesticados y silvestres de *Tagetes* en México.

El presente estudio tuvo como objetivo analizar las diferencias en el perfil de flavonoides presentes en las flores de 18 genotipos domesticados y silvestres de *Tagetes*, con la finalidad de aportar información sobre las relaciones intraespecíficas entre genotipos y generar inferencias respecto a su clasificación. La identificación y cuantificación del perfil de flavonoides se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplado a un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD).

3.4. Materiales y métodos

3.4.1 Material Vegetal

Aquenios recolectados de plantas de *Tagetes* de distintas localidades (Cuadro 3) en etapa fenológica de floración terminal se utilizaron para el presente estudio. El proceso de cultivo del material vegetal se realizó en el mes de junio de 2024 en el laboratorio de semillas y los invernaderos de la Universidad Autónoma Chapingo. Se colocaron semillas en cajas petri con agua destilada, adicionando dos mililitros de ácido giberélico (0.1 % p/v) con la finalidad de romper la latencia. Las semillas que germinaron fueron transplantadas a macetas de siete pulgadas con peatmoss; las plántulas fueron regadas hasta alcanzar la floración, los capítulos formados por cada planta fueron cortados y depositados en costales de tela pellón, debidamente etiquetados. Finalmente, los costales fueron sumergidos en nitrógeno líquido durante un minuto y almacenados a -20 °C en ultracongelador.

Cuadro 3 Genotipos Silvestres y Cultivados de *Tagetes*.

Nombre	Código	Especie	Sitio de colecta	Latitud	Longitud
1	eSPI1	<i>T. erecta</i>	San Pablo Ixayoc, Texcoco. Edo de Mex.	19.472856	-98.793309
4	eSPI2	<i>T. erecta</i>	San Pablo Ixayoc, Texcoco. Edo de Mex.	19.472856	-98.793309
Xochimilco	eXo	<i>T. erecta</i>	Tlahuac, Edo de Mex	19.239363	-99.001538
6	eHu	<i>T. erecta</i>	Huajuapán de león, Oaxaca	17.796239	-97.808244
5	rSPI	<i>T. remotiflora</i>	San Pablo Ixayoc, Texcoco. Edo de Mex.	19.472856	-98.793309
06 Oaxaca	rSFS06	<i>T. remotiflora</i>	San Francisco Sola, Oaxaca	16.504297	-96.951959
Rem Papel	rSFS	<i>T. remotiflora</i>	San Francisco Sola, Oaxaca	16.504297	-96.951959
Cacahuamilpa	hKK	<i>T. heterocarpa</i>	Cacahuamilpa, Guerrero	18.68257	-99.507098
C. del Águila	hCA	<i>T. heterocarpa</i>	Ajuchitlán del Progreso, Guerrero	18.2189	-100.42564

Nota. Los genotipos identificados como *Tagetes erecta* constituyen a los materiales cultivados y los genotipos identificados como *Tagetes remotiflora* y *Tagetes heterocarpa* constituyen a los materiales silvestres. Las coordenadas geográficas se expresan en grados decimales (°) bajo el sistema de referencia WGS84.

3.4.2 Extracción de Flavonoides

La extracción de flavonoides se realizó en el laboratorio de Fitoquímica del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo en el mes de marzo del 2025. Para la extracción se utilizó el método reportado por Aguiñiga-Sánchez (2017). Inicialmente, se extrajeron las lígulas de cada capítulo de las muestras que se analizarán. Se pesaron 0.5 g de material vegetal y se depositó en sobres pequeños de papel aluminio. La liofilización de las muestras se realizó utilizando un liofilizador de laboratorio (sistema de liofilización por congelación) tipo FD-18, marca U-Therm International. Una vez terminado el proceso, cada material fue molido en un tubo de fondo plano, utilizando un pistilo de cristal, formando un polvo fino.

El proceso de extracción se realizó por triplicado, a cada tubo se adicionaron 5 mL de metanol (99,8 %, ACS, Merck, Darmstadt, Alemania) por 24 h en refrigeración (-4 ± 2  C). Las muestras fueron sonicadas por 10 min con intervalos de paro de 5 min. Posteriormente, cada extracto se filtró mediante filtros de jeringa Whatman (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) de 0.5  m. Finalmente, los extractos fueron depositados en viales ámbar para lectura en cromatógrafo de 1.5 mL.

3.4.3 Identificación de Flavonoides mediante HPLC

La identificación de los flavonoides presentes en las lígulas se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD). Los análisis se llevaron a cabo en un sistema Agilent Technologies  1100, equipado con inyector automático modelo 1200 y detector de arreglo de diodos (DAD) 1100. La separación cromatográfica se efectuó en una columna Hewlett Packard Hypersil ODS (C18) de 5  m de tamaño de partícula (125   4.0 mm d.i.). La fase móvil consistió en un sistema binario compuesto por (A) agua acidificada a pH 2.5 con ácido trifluoroacético (TFA) y (B) acetonitrilo (ACN), empleando un programa de elución en gradiente. Las condiciones operativas fueron: flujo de 1.0 mL min⁻¹, temperatura de columna de 30  C, a un volumen de inyección variable y tiempo total de corrida de 25 min. La adquisición e integración de los cromatogramas se

realizó mediante el software ChemStation®. La identificación de los compuestos se efectuó por comparación de tiempos de retención y espectros UV-Vis con estándares analíticos de rutina, floridzina, miricetina, quercetina, naringenina, floretina, apigenina y galangina.

3.4.4 Análisis de los perfiles cromatográficos

Para reforzar la interpretación de los resultados, los datos se analizaron de dos formas; se realizó un análisis considerando los promedios por genotipo y otro analizando individualmente las repeticiones experimentales, con el fin de evaluar la consistencia de los patrones observados y la identificación de genotipos contrastantes en función de la composición de flavonoides observados. Finalmente, se efectuó un análisis de distancias de Mahalanobis entre grupos y distintas proyecciones de los genotipos en el espacio canónico.

Para ambos casos, el análisis del perfil de flavonoides de los 18 genotipos de *Tagetes* se llevó a cabo através de un análisis de agrupamiento jerárquico (cluster), para ello se utilizó como medida de disimilitud la distancia de Mahalanobis (1936), que calcula la disimilitud entre dos puntos, en un espacio multidimensional, considerando la correlación entre sus variables, para encontrar el número óptimo de grupos con base en la similitud observada entre ellos. Posteriormente, se aplicó un análisis de discriminación canónica (ADC), para reducir la dimensionalidad de los datos (Johnson & Wichern, 2007), a partir de este análisis, se evaluó la significancia de los componentes generados, mediante sus coeficientes de correlación. Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de los valores de proyección canónica, seguido de una prueba de comparación de medias de Tukey (HSD, $\alpha = 0.05$), con el fin de determinar diferencias significativas en el contenido de flavonoides entre los grupos formados. Todos los análisis fueron procesados mediante el programa SAS Version 9.1.

3.5. Resultados y discusión

3.5.1 Contenido total de flavonoides

El contenido total de flavonoides (Cuadro 4) se estimó mediante la suma de las concentraciones de los flavonoides individuales analizados, expresándose en mg/g de peso seco (PS). Se observaron diferencias importantes entre los genotipos evaluados, destacando rSFS06-04 con el mayor contenido total (1. mg·g⁻¹ PS), seguido de rSPI-01 (0.66 mg·g⁻¹ PS), rSPI-02 (0.61 mg·g⁻¹ PS) y eSPI-02 (0.53 mg·g⁻¹ PS). En contraste, los valores más bajos se registraron en hCA-01 (0.02 mg·g⁻¹ PS), hCA-06 (0.04 mg·g⁻¹ PS) y eHu-12 (0.04 mg·g⁻¹ PS), lo que evidencia una variabilidad significativa en la acumulación de flavonoides entre los materiales analizados.

Cuadro 4 Contenido total de flavonoides (mg·g⁻¹ de peso seco) en los 18 genotipos analizados de *Tagetes*.

No.	Muestra	mg·g ⁻¹	No.	Muestra	mg·g ⁻¹
1	rSFS06-17	0.29	10	hCA-01	0.02
2	rSFS06-04	1.33	11	hCA-06	0.04
3	rSFS06-08	0.20	12	rSFS-01	0.46
4	rSPI-01	0.66	13	rSFS-02	0.14
5	rSPI-02	0.61	14	eSPI-01	0.07
6	eSPI-08	0.27	15	eSPI-02	0.03
7	eSPI-02	0.53	16	eHu-12	0.04
8	hKK-06	0.18	17	eHu-09	0.06
9	hKK-12	0.18	18	eXo-01	0.43

Se identificaron doce flavonoides en los materiales analizados, caracterizados con base en sus tiempos de retención. Los tiempos de retención (min) registrados fueron: 9.13 para miricetina; 17.61 para kaempferol; 18.33 para isorhamnetina; 17.37 para apigenina; 6.09 para rutina; 11.28 para morina; 13.0 para quercetina; 2.56 para catequina; 8.26 para hesperidina; 9.0 para floritzina; 15.61 para naringenina y 16.25 para floretina.

A través de los valores promedio de la concentración obtenidos para cada flavonoide, se observó que hesperidina fue la mas abundante, alcanzando un

valor máximo de $0.673 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ en el genotipo rSFS06-04, seguida por la rutina, con valores de hasta $0.417 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, y la morina, que mostró concentraciones de hasta $0.257 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. En un nivel intermedio, compuestos como la quercetina (hasta $0.242 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) y la catequina (hasta $0.151 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) presentaron concentraciones relativamente altas y comparables entre sí en algunos genotipos. Por otro lado, flavonoides como el kaempferol (hasta $0.054 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$), la miricetina (hasta $0.0246 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) y la isorhamnetina (hasta $0.018 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) se encontraron en concentraciones moderadas. Finalmente, los compuestos con menor presencia fueron la naringenina (hasta $0.028 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$), la floretina (hasta $0.0289 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) y la floritzina (hasta $0.0093 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$), mientras que la apigenina mostró una baja presencia, identificada únicamente en algunos genotipos.

Los resultados obtenidos difieren parcialmente de lo reportado por Youssef et al. (2022), quienes identificaron a la apigenina como el principal flavonoide, seguida de la hesperidina en extractos metanólicos. En el presente estudio, aunque la hesperidina también destacó como uno de los compuestos más abundantes, la apigenina mostró una baja presencia en la mayoría de los genotipos analizados. Estas diferencias podrían atribuirse a la variabilidad genética de los materiales, las condiciones de cultivo, así como posibles diferencias en los métodos de extracción y análisis empleados. No obstante, la coincidencia en la importancia de la hesperidina sugiere que este compuesto podría desempeñar un papel relevante en el perfil fitoquímico del género *Tagetes*.

Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden parcialmente con lo reportado en otras especies del género *Tagetes*. En este sentido, en *T. gracilis* se han identificado flavonoides como quercetagetina 7-glucósido, quercetina 3-glucósido y quercetina 3-galactósido, mientras que en *T. multiflora* se ha determinado la presencia de quercetagetina, quercetagetina 7-glucósido, luteolina, luteolina 7-glucósido, quercetina 7-glucósido y quercetina 5-glucósido (Israilev & Seeligmann, 1994). Aunque en los estudios se ha indicado un número reducido de compuestos detectados en los patrones cromatográficos, el análisis comparativo revela afinidades químicas importantes entre las especies,

particularmente en relación con las agliconas predominantes (Israilev & Seeligmann, 1994). En concordancia con lo anterior, en los genotipos analizados en el presente trabajo se observó la presencia de flavonoides derivados de la quercetina, así como otros compuestos característicos del metabolismo flavonoide, lo que sugiere una conservación parcial del perfil fitoquímico dentro del género, no obstante, de la variabilidad observada en las concentraciones y composición específica entre materiales.

Las concentraciones promedio de seis flavonoides (Figura 8) mostraron una tendencia clara de mayor acumulación en los genotipos correspondientes a *Tagetes remotiflora*, en comparación con *T. erecta* y *T. heterocarpa*. Este comportamiento es particularmente evidente en compuestos como morina y rutina, los cuales alcanzaron valores considerablemente superiores dentro de los genotipos de *remotiflora*, mientras que la hesperidina presentó picos elevados en muestras específicas de este mismo grupo. Asimismo, flavonoides como miricetina y catequina, aunque en menores concentraciones absolutas, mantuvieron consistentemente valores más altos en *T. remotiflora* en relación con los otros genotipos.

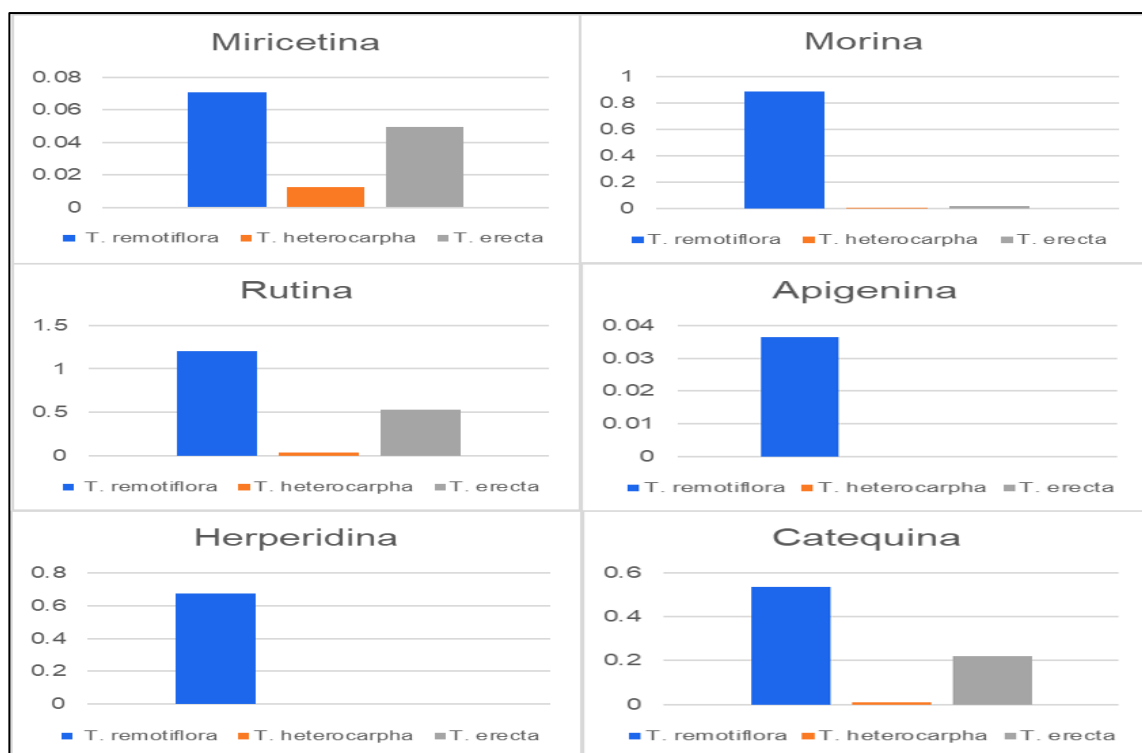


Figura 8 Contenido promedio de los flavonoides: miricetina, morina, hesperidina, rutina, apigenina, y catequina en tres genotipos de *Tagetes*: *T. remotiflora*, *T. heterocarpha* y *T. erecta*, respectivamente.

Este patrón sugiere una mayor capacidad biosintética de *T. remotiflora* para la producción de estos compuestos fenólicos, posiblemente asociada con diferencias genéticas entre especies o a mecanismos de adaptación fisiológica, como respuesta a factores de estrés ambiental. Dado que los flavonoides desempeñan funciones clave en la protección contra radiación UV, defensa antioxidante y respuesta a patógenos (Burlec et al., 2021); la mayor acumulación observada en *T. remotiflora* podría reflejar una estrategia metabólica diferencial que favorece su supervivencia en condiciones específicas, además de presentar una mayor acumulación de metabolitos secundarios debido a su naturaleza silvestre.

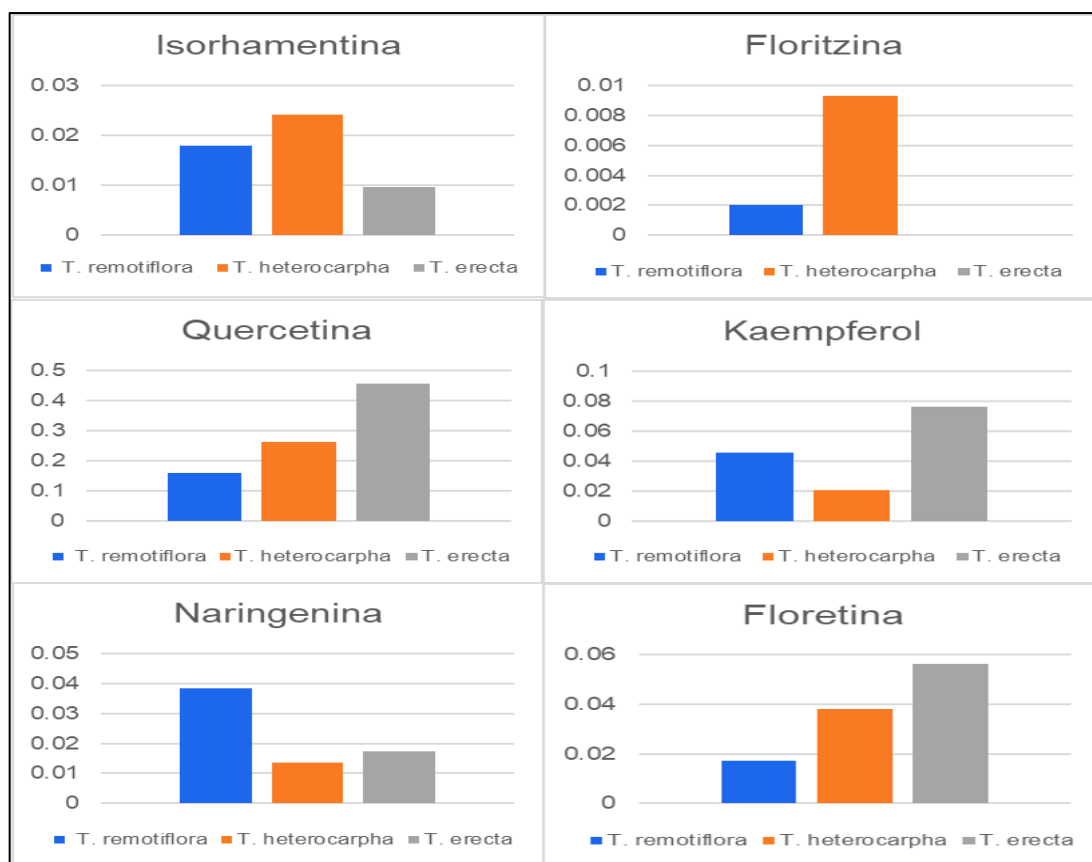


Figura 9 Contenido promedio de los flavonoides: isorhamnetina, florigizina, quercetina, kaempferol, naringenina y floretina en tres genotipos de *Tagetes*: *T. remotiflora*, *T. heterocarpha* y *T. erecta*, respectivamente.

El contenido promedio de los flavonoides restantes identificados, como isorhamnetina, florigizina, quercetina, kaempferol, naringenina y floretina (Figura 9) mostró variaciones entre los genotipos de *Tagetes remotiflora*, *T. heterocarpha* y *T. erecta*. En general, la quercetina y el kaempferol destacaron por presentar concentraciones relativamente mayores en comparación con los restantes metabolitos, particularmente en ciertos genotipos de *T. erecta* y *T. heterocarpha*. Asimismo, la isorhamnetina y la naringenina exhibieron valores intermedios y una distribución más homogénea entre especies. En contraste, la florigizina y la floretina se detectaron en bajas concentraciones en la mayoría de los genotipos analizados. Estas diferencias coinciden nuevamente con una variabilidad en la expresión metabólica de flavonoides entre especies, lo que podría estar relacionado con factores genéticos y adaptativos propios de cada grupo.

3.5.2 Análisis del contenido total de flavonoides por promedios

Inicialmente, se generó una matriz de datos con las concentraciones promedio de los 12 flavonoides identificados en las flores de los 18 genotipos de *Tagetes*. A partir de esta información, se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico, en el cual, mediante el cambio en el valor del estadístico pseudo- T^2 , se obtuvieron cuatro grupos.

A partir del análisis de agrupamiento, se generó un dendrograma (Figura 10), que permitió visualizar la similitud entre los genotipos evaluados. Los grupos se organizaron en dos conjuntos principales y dos individuos independientes (outliers), donde la distancia de similitud fue de 0.12. El primer grupo, formado por los materiales con mayor variabilidad interna, mostró una composición de flavonoides más diversa que incluye materiales de los tres genotipos estudiados, *T. erecta*, *T. remotiflora* y *T. heterocarpa*, mientras que el segundo presenta una agrupación más compacta, donde se aprecia que algunos individuos de *Tagetes remotiflora* se mantuvieron de manera independiente, lo que podría sugerir un perfil metabólico más diferenciado.

De manera complementaria, se identificó que, el grupo tres, estuvo conformado únicamente por el individuo eSPI02, mientras que el grupo cuatro incluyó exclusivamente al outlier hKK12, ambos se ubicaron alejados de los demás individuos de sus respectivos genotipos. Esta separación podría estar asociada a procesos de introgresión genética o a efectos de deriva génica, que han favorecido la conservación de variantes metabólicas particulares, relacionados con la biosíntesis de flavonoides. En este sentido, la deriva génica puede generar cambios aleatorios en la frecuencia de alelos y contribuir a la diferenciación de ciertos individuos dentro de una población, aun en ausencia de presión selectiva directa (Wright, 1931). Por lo tanto, la posición aislada de estos genotipos sugiere la presencia de características bioquímicas distintivas que podrían reflejar antecedentes evolutivos específicos o eventos de recombinación genética que influyen en su perfil fitoquímico.

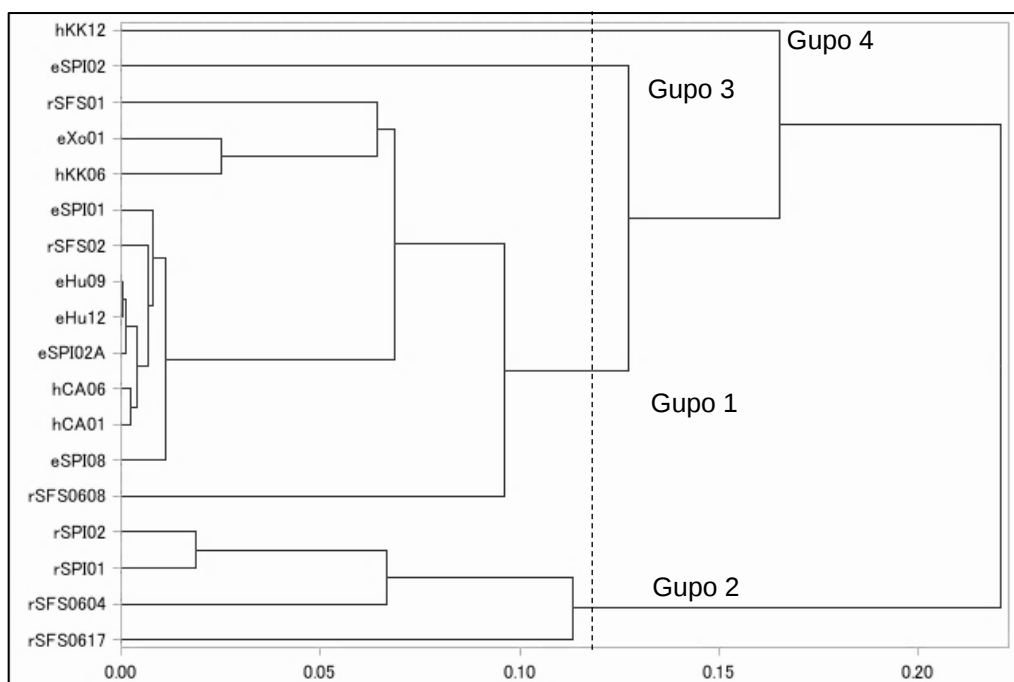


Figura 10 Dendrograma de agrupamiento de 18 genotipos de *Tagetes* con base en la composición de flavonoides, utilizando la distancia de Mahalanobis.

Posteriormente, se calculó una matriz de distancias entre los grupos formados utilizando la Distancia de Mahalanobis (Cuadro 5), para cuantificar el grado de disimilitud multivariada y complementar la interpretación de la estructura de agrupamiento. Los resultados mostraron que todas las distancias entre grupos fueron significativas ($p \leq 0.05$), de acuerdo con la prueba F, que indicó diferenciación entre los cuatro clústeres. Asimismo, se observó una variación considerable en la magnitud de las distancias, destacando una mayor separación del clúster cuatro respecto a los demás grupos, por lo tanto, este conjunto presentó el perfil de flavonoides más divergente en comparación con el resto.

Cuadro 5 Matriz de distancias de Mahalanobis entre grupos, basada en cuatro componentes canónicos (Clúster), generados en el análisis de agrupamiento jerárquico.

Clúster	1	2	3	4
1	0			
2	2830*	0		
3	1608*	6627*	0	
4	209686*	174361*	228046*	0

Nota. Las distancias se evaluaron mediante la prueba F; (*) indica diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Este análisis complementario facilitó la validación de los grupos obtenidos y permitió confirmar que los clústeres son diferentes de acuerdo con los perfiles de flavonoides que representan. Una vez que se estableció el número de grupos y sus diferencias significativas, se realizó un análisis de discriminación canónica (ADC), mediante el cual se identificaron los tres ejes o componentes canónicos que aportaron más información (Cuadro 6), la correlación para el primer componente fue la más alta. El análisis demostró que existen cuatro variables principales, definidas por los flavonoides más representativos, cada uno en su propio eje dentro de la estructura canónica total.

La variación entre los cuatro grupos generados fue evaluada mediante la prueba de comparación múltiple de Tukey ($\alpha = 0.05$), la cual confirmó que las diferencias resultaron ser estadísticamente significativas entre los grupos. El primer componente canónico (Can1) estuvo asociado con los flavonoides isorhamnetina y floridzina; el segundo (Can2), con morina; y el tercero (Can3), con kaempferol.

Cuadro 6 Coeficientes de la estructura canónica total del análisis de 12 flavonoides.

Variable	Can1	Can2	Can3
Miricetina	0.065751	0.612221	0.088573
Kaempferol	-0.046619	-0.449678	0.856399*
Isorhamnetina	0.938234*	0.026822	0.00822
Apigenina	-0.071652	0.018298	-0.082372
Rutina	-0.048835	0.575578	0.530812
Morina	0.036571	0.95495*	0.256901
Quercetina	0.221671	-0.392931	0.058927
Catequina	-0.140144	-0.212885	-0.040265
Hesperidina	0.019062	0.438056	0.120604
Floridzina	0.993745*	-0.079852	0.020195
Naringenina	0.100379	0.444199	0.101376
Floretina	-0.186731	-0.581524	0.555399

Nota. Los valores con asterisco (*) indican los coeficientes canónicos de mayor magnitud en cada componente (Can1, Can2 y Can3), correspondientes a las variables con mayor contribución a la discriminación entre grupos.

Los materiales que formaron el primer grupo están compuestos por cinco individuos de *Tagetes erecta*, colectados en las localidades de: Xochimilco, San Pablo Ixayoc, EdoMex. y Huajuapán de León, Oaxaca, conjuntamente, dos individuos de *Tagetes remotiflora*, provenientes de San Francisco Sola, Oaxaca

y tres individuos de *Tagetes heterocarpa*, provenientes de Santa Ana del Águila, municipio de Ajuchitlán y Cacahuamilpa, Guerrero. La formación de este grupo con individuos de distintos genotipos dentro de un mismo clúster podría deberse principalmente a la similitud en los perfiles que presentan, los cuales trascienden la delimitación taxonómica tradicional. Este patrón puede atribuirse, en primer lugar, a la conservación de rutas biosintéticas compartidas entre los tres genotipos de *Tagetes*, lo que da lugar a la producción de flavonoides estructuralmente similares entre ellos (Harborne & Mabry, 1982).

Asimismo, es posible que factores ambientales relativamente semejantes entre las localidades de origen —como altitud, radiación solar, tipo de suelo o condiciones de estrés— influyan de manera convergente en la expresión metabólica, favoreciendo la acumulación específica de algunos metabolitos (Close & McArthur, 2002; Treutter, 2005). Por otra parte, la existencia de perfiles fitoquímicos afines entre genotipos es debida propiamente a la proximidad genética o historia evolutiva que comparten (Bohm & Stuessy, 2001). En conjunto, estos elementos sugieren que la variación del perfil de flavonoides no sólo responde a la identidad específica, sino también a la interacción entre factores genéticos y ambientales, lo que explica la formación de grupos mixtos en el dendrograma.

De la misma forma se generó una gráfica tridimensional de la estructura canónica (Figura 11) que permitió observar de manera más clara las posiciones de los grupos en cada componente. Inicialmente, se observa que los grupos uno y dos presentan similitud en las concentraciones de kaempferol, isorhamnetina y floridzina; no obstante, su separación se debió a diferencias en la concentración de morina en el componente dos. Asimismo, se puede observar que, de los dos individuos outliers, el Genotipo eSPI-02 presenta diferencias marcadas en el contenido de morina con menor concentración, y una mayor concentración de kaempferol. Por otra parte, el outlier hKK-12 es el más alejado, debido a un mayor contenido de isorhamnetina y floridzina, pero con valores de morina similares a los presentados por el Genotipo eSPI-02. El gráfico proporcionó una proyección

clara de las relaciones entre los genotipos de *Tagetes*, basada en la variación multivariante de los 12 flavonoides.

En general, se observa una agrupación compacta de variables con correlaciones positivas, asociadas con la concentración de estos compuestos. La mayoría de los genotipos de *T. remotiflora* se agrupan estrechamente, formando un conjunto homogéneo, a diferencia de algunos genotipos de *T. erecta* y *T. heterocarpha*. Estos últimos tienden a ubicarse cerca del centro del Componente 3, sugiriendo perfiles promedio. Sin embargo, esta tendencia se ve contrastada por el Genotipo eSPI-02, que se posiciona en el extremo del Componente 2. Esto evidencia una variabilidad importante dentro de *T. erecta* (Cicevan et al., 2022). Resulta importante mencionar que estos hallazgos son los primeros reportados para los genotipos silvestres; *T. remotiflora* y *T. heterocarpha*.

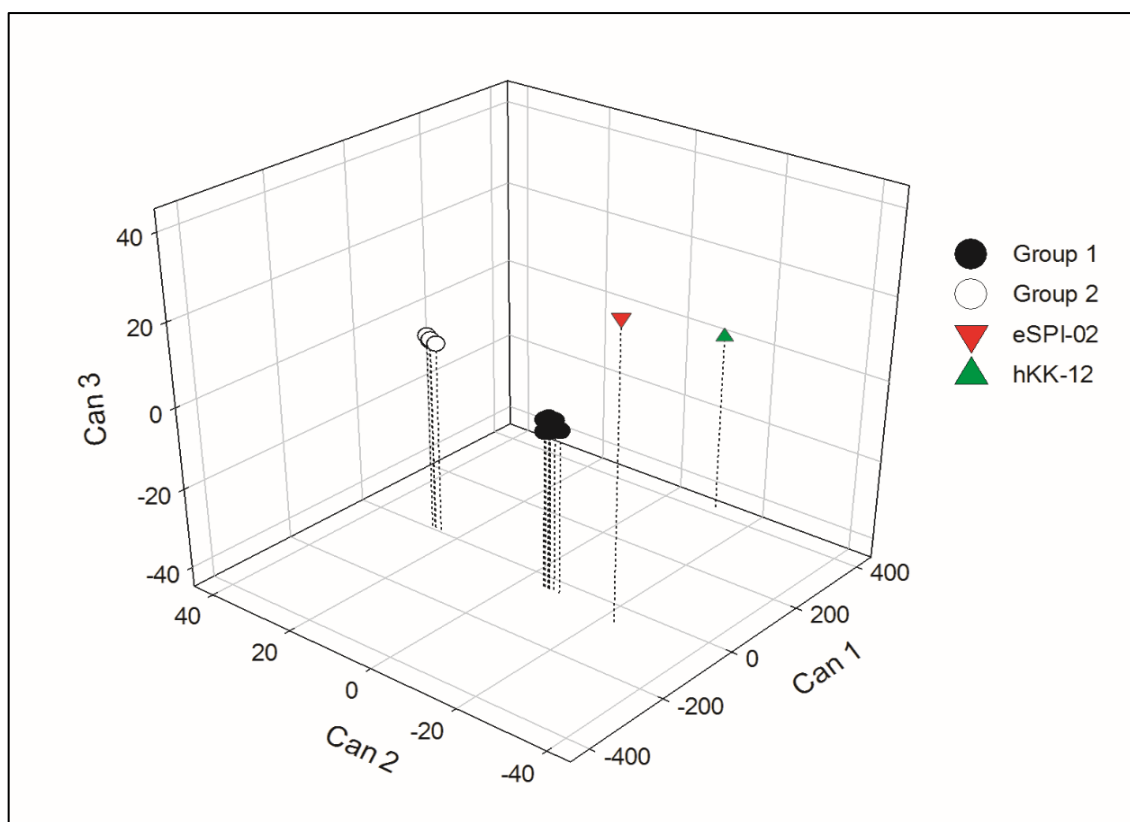


Figura 11 Diagrama de la estructura canónica de los cuatro grupos generados.

En los estudios realizados por Youssef (2022) y Rivas-García (2023) se reportó la presencia de flavonoides característicos de *Tagetes erecta*, principalmente del

tipo flavonoles, entre los que destacan kaempferol, isorhamnetina, quercetina y rutina, los cuales coinciden con los identificados en el presente trabajo, respaldando la consistencia de los resultados obtenidos. No obstante, ambos estudios presentaron un enfoque más limitado en relación con la diversidad de los flavonoides reportados, ya que el presente análisis evidenció un perfil más amplio, incluyendo compuestos como miricetina, morina, apigenina, catequina, hesperidina, floridzina, naringenina y florentina, de los cuales existe poca o nula información en la literatura para esta especie.

Por otra parte, Burlec et al. (2021) identificaron más de 50 compuestos en el extracto metanólico de *T. erecta*, pertenecientes a diferentes clases de metabolitos, como aminoácidos, derivados del ácido elágico, así como flavonoides, especialmente glucósidos de quercetagina, quercetina, kaempferol y patuletina, pero también sus agliconas (quercetina, kaempferol, patuletina, isorhamnetina y axillarina). Algunos de estos compuestos se han descrito previamente en la literatura para *T. erecta*, en particular la quercetagina y algunos de sus derivados: ácido sirínico, quercetina, kaempferol, ácido elágico y ácido gálico (Burlec et al., 2021). Sin embargo, hasta donde se sabe, este es el primer perfil de flavonoides de un extracto metanólico de flores de *T. erecta* utilizando a su vez, materiales silvestres.

Adicionalmente, se ha señalado que algunos compuestos, como la naringenina, pueden presentar una distribución diferencial en la planta, con mayor presencia en tallos y hojas, a diferencia de las flores (Youssef et al., 2022), lo que resalta la importancia del tipo de tejido; para futuros estudios se recomienda ampliar las fuentes de extracción de flavonoides en los genotipos analizados para generar información adicional. En conjunto, estas diferencias sugieren una mayor complejidad fitoquímica en los genotipos evaluados en el presente trabajo, posiblemente asociada con variaciones genéticas, condiciones ambientales y a la metodología analítica empleada, además de la naturaleza silvestre de los materiales.

Entre los flavonoides identificados en el presente estudio, destacan algunos que han sido ampliamente estudiados debido a sus múltiples aplicaciones biológicas y relevancia en la salud humana. En este sentido, la quercetina es reconocida como uno de los flavonoides más investigados a nivel mundial, debido a su potente actividad antioxidante, antiinflamatoria y anticancerígena, así como por su capacidad de modular el sistema inmune y su efecto potencial en la prevención de enfermedades cardiovasculares y metabólicas (Boots et al., 2008); además de presentar actividad como quelante de iones como Cu^{+2} o Fe^{+2} , ya que puede formar combinaciones estables debido a que en su estructura posee tres posibles sitios de quelación que le confieren su actividad antioxidante (Cherrak et al., 2016).

Por otra parte, la naringenina, perteneciente al grupo de las flavanonas, ha sido ampliamente estudiada por sus efectos hepatoprotectores, antioxidantes y antiinflamatorios, además de su capacidad para regular el metabolismo lipídico y glucídico, siendo relevante en el contexto de enfermedades como la diabetes y la obesidad (Mulvihill & Huff, 2012). Asimismo, la apigenina, una flavona de interés se caracteriza por sus propiedades antiinflamatorias, ansiolíticas y anticancerígenas, destacando su papel en la regulación del ciclo celular y la inducción de apoptosis en células tumorales (Shukla & Gupta, 2010). Finalmente, la catequina, perteneciente a los flavanoles, es ampliamente conocida por su fuerte actividad antioxidante y su presencia en alimentos como el té verde, donde ha sido asociada con beneficios cardiovasculares y efectos neuroprotectores (Khan & Mukhtar, 2013). En conjunto, estos compuestos evidencian la relevancia biológica y el potencial funcional del perfil de flavonoides identificado en los genotipos analizados.

Así mismo, el kaempferol presenta las mismas propiedades antioxidantes, antimicrobianas y anticancerígenas y ha sido asociado con la inhibición del crecimiento tumoral y la protección celular frente al estrés oxidativo (Calderón-Montaña et al., 2011). De manera general, los flavonoides son metabolitos con una notable capacidad para quelar iones metálicos prooxidantes; un gran número

de sus homologos pueden formar complejos estables con metales a través de sus grupos hidroxilo o incluso carbonilo, cuando están presentes (Burlec, et al., 2021). En este contexto, los extractos de plantas ricos en flavonoides representan una fuente importante de compuestos bioactivos, ya que su acción conjunta puede potenciar los efectos antioxidantes y protectores, lo que incrementa su valor en aplicaciones farmacéuticas. A su vez, el interés por sus conocer a profundidad sus aplicaciones nutraceuticas y en la prevención de enfermedades asociadas al estrés oxidativo ha aumentado en los últimos años.

Cabe mencionar que, la obtención de extractos de *Tagetes* requiere la aplicación de metodologías que permitan recuperar de manera eficiente estos compuestos bioactivos. La elección del método de extracción influye directamente en la composición, concentración y estabilidad de los flavonoides obtenidos en los extractos. Por ello, el uso de técnicas adecuadas no solo optimiza el rendimiento, sino también permite realizar análisis más precisos y confiables de los perfiles fitoquímicos obtenidos. En este contexto, diversos estudios han demostrado que los métodos de extracción aplicados en especies del género *Tagetes* son determinantes para la caracterización de estos compuestos fenólicos.

El método empleado en el presente estudio presenta similitudes con el reportado por Rivas-García et al. (2023), particularmente en el uso de material vegetal liofilizado y disolventes orgánicos; sin embargo, difiere en aspectos clave como el uso de metanol como disolvente, un periodo de extracción prolongado de 24 h en condiciones de refrigeración y la aplicación de sonicación. En contraste, en el trabajo antes mencionado, utilizaron una mezcla de etanol, agua y ácido fórmico, junto con homogenización mecánica y agitación a temperatura ambiente, condiciones que favorecen la acidificación del medio y pueden influir en la eficiencia de recuperación de ciertos metabolitos. Al margen de estas diferencias, ambos enfoques han demostrado ser adecuados para la extracción de flavonoides, aunque el método empleado en este estudio permitió su posterior análisis mediante HPLC, facilitando la identificación individual de compuestos y una caracterización más detallada del perfil fitoquímico.

De manera complementaria, se ha documentado que la eficacia en la extracción de polifenoles depende en gran medida de la polaridad de los disolventes utilizados, dado que estos compuestos presentan una amplia diversidad estructural. En general, disolventes polares como el metanol y el etanol han mostrado alta eficiencia para la recuperación de flavonoides, como lo evidenció Burlec et al. (2021), quienes lograron identificar hasta 57 compuestos individuales en extractos metanólicos de cempasúchil, mientras que el uso de mezclas etanol-agua redujo el número de compuestos detectados. Asimismo, Salehi et al. (2018) señalaron que ciertos flavonoides, como la quercetina y el carotenoide luteolina, suelen ser predominantes en pétalos de *T. erecta*.

Sin embargo, es importante considerar que la composición de metabolitos secundarios puede variar significativamente en función de factores como la parte de la planta de donde se obtiene el extracto, la etapa de desarrollo, la época de cosecha, el origen geográfico de los materiales que se utilizan por las condiciones edafoclimáticas. Aunque algunas especies como *T. patula* y *T. minuta* han sido ampliamente estudiadas por sus actividades antioxidantes, citotóxicas y antiinflamatorias, estas propiedades no han sido evaluadas en genotipos como *T. remotiflora* y *T. heterocarpha*, lo que destaca la importancia de continuar investigando sus perfiles fitoquímicos bajo metodologías de extracción adecuadas y comparables.

3.5.3 Contenido total de flavonoides en unidades experimentales

Se realizó el análisis del perfil de flavonoides de 54 muestras de *Tagetes*, considerando cada repetición como una unidad experimental independiente con el fin de evaluar su distribución desde otra perspectiva. Mediante la matriz de datos obtenidos a partir de los perfiles cromatográficos, se generó un dendrograma (Figura 12) utilizando la distancia de Mahalanobis, lo que permitió clasificar los materiales según la similitud de sus perfiles. Posteriormente, se realizó un análisis discriminante para validar los grupos obtenidos en el análisis clúster, considerando como unidad experimental cada genotipo. Finalmente,

estos grupos fueron utilizados como clases en el análisis de discriminación canónica.

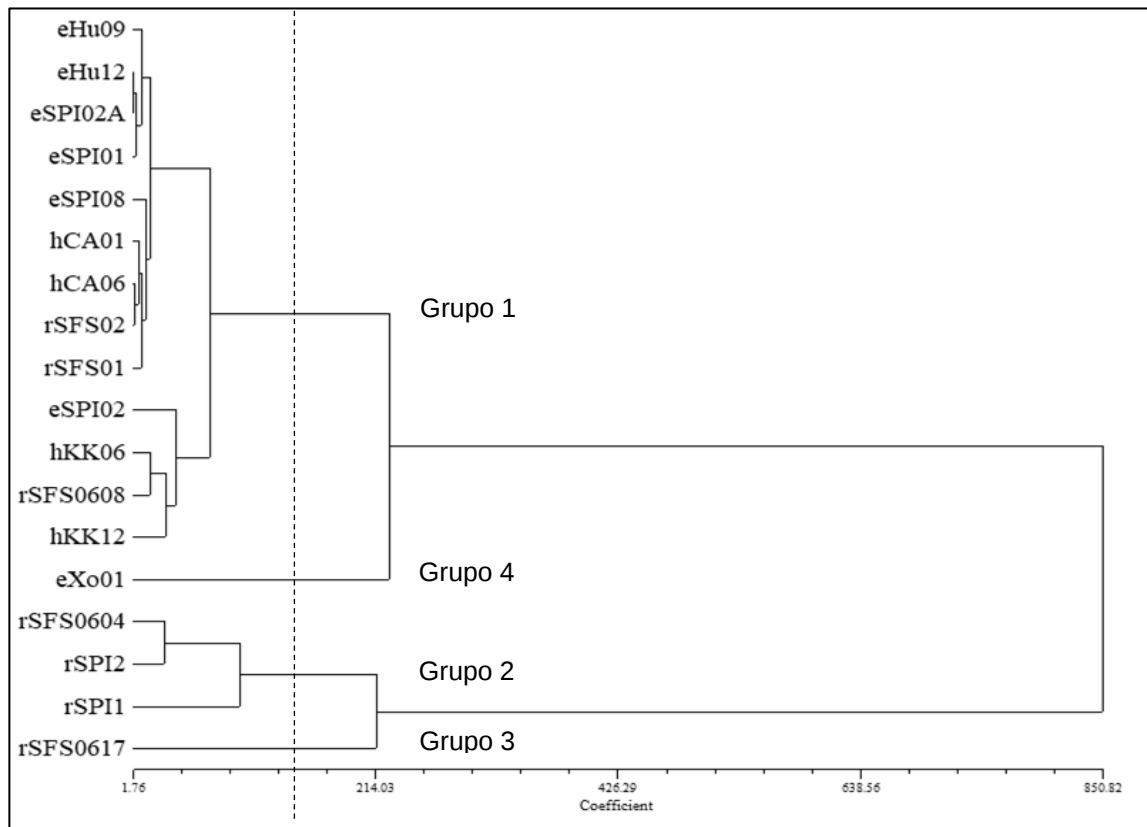


Figura 12 Distancia de Mahalanobis de 18 genotipos de *Tagetes* analizados.

Se observó la formación de cuatro grupos principales a una distancia de corte aproximada de 161.0. El grupo uno incluyó todos los individuos de *Tagetes erecta* (eHu; eSPI), con excepción de eXo01, que se separó formando el Grupo 3, posiblemente debido a su origen en Xochimilco, donde las condiciones ecológicas —o bien, de procesos de selección ancestrales— pudieron favorecer su diferenciación. En este mismo grupo también se agruparon los materiales de *T. heterocarpa* (hCA; hKK) y algunos de *T. remotiflora* (rSFS). El grupo dos consistió únicamente por individuos de *T. remotiflora* (rSPI y rSFS) provenientes del Estado de México y Oaxaca, lo que sugiere que, a pesar de la distancia geográfica, comparten similitudes genéticas. Finalmente, el grupo cuatro se integró por un solo individuo de *T. remotiflora*, aunque se comportó como atípico, porque mostró mayor cercanía con los materiales del Grupo 2.

Posteriormente, el proceso de análisis fue el mismo que el utilizado en el promedio de las concentraciones. Se calcularon estadísticos descriptivos utilizando los valores obtenidos en cada repetición. Los tiempos de retención (min) registrados en el sistema cromatográfico fueron los mismos: 9.13 para miricetina; 17.61 para kaempferol; 18.33 para isorhamnetina; 17.37 para apigenina; 6.09 para rutina; 11.28 para morina; 13.0 para quercetina; 2.56 para catequina; 8.26 para hesperidina; 9.0 para floridzina; 15.61 para naringenina y 16.25 para florentina. Por su parte, el contenido total de flavonoides (Cuadro 7) se determinó mediante la sumatoria de las concentraciones de cada uno de los compuestos cuantificados por HPLC, expresando los resultados en mg·g⁻¹ de peso seco (PS), lo que permitió integrar la contribución individual de cada repetición analizada.

Cuadro 7 Contenido total de flavonoides en las 54 muestras analizadas de *Tagetes* (mg·g⁻¹PS).

No.	Muestra	mg·g ⁻¹	No.	Muestra	mg·g ⁻¹	No.	Muestra	mg·g ⁻¹
1	rSFS06-171	0.296	19	eSPI-021	0.885	37	rSFS-021	0.231
2	rSFS06-172	0.302	20	eSPI-022	0.568	38	rSFS-022	0.079
3	rSFS06-173	0.277	21	eSPI-023	0.131	39	rSFS-023	0.101
4	rSFS06-041	2.224	22	hKK-061	0.247	40	eSPI-011	0.069
5	rSFS06-042	0.634	23	hKK-062	0.162	41	eSPI-012	0.064
6	rSFS06-043	1.143	24	hKK-063	0.126	42	eSPI-013	0.064
7	rSFS06-081	0.175	25	hKK-121	0.301	43	eSPI-021	0.027
8	rSFS06-082	0.156	26	hKK-122	0.100	44	eSPI-022	0.041
9	rSFS06-083	0.257	27	hKK-123	0.142	45	eSPI-023	0.032
10	rSPI-11	0.595	28	hCA-011	0.027	46	eHu-121	0.047
11	rSPI-12	0.757	29	hCA-012	0.019	47	eHu-122	0.037
12	rSPI-13	0.636	30	hCA-013	0.020	48	eHu-123	0.043
13	rSPI-21	0.775	31	hCA-061	0.046	49	eHu-091	0.074
14	rSPI-22	0.351	32	hCA-062	0.038	50	eHu-092	0.040
15	rSPI-23	0.691	33	hCA-063	0.044	51	eHu-093	0.065
16	eSPI-081	0.648	34	rSFS-011	0.036	52	eXo-011	0.253
17	eSPI-082	0.120	35	rSFS-012	1.245	53	eXo-012	0.284
18	eSPI-083	0.056	36	rSFS-013	0.087	54	eXo-013	0.745

Se generó una matriz de datos con las concentraciones de flavonoides de las 54 muestras de *Tagetes*. A partir de esta información, se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico, donde mediante el cambio en el valor del estadístico pseudo- T^2 , se determinó que el número más adecuado de grupos fue tres, en contraste con el análisis previo en el que se habían identificado cuatro grupos. Con base en esta información, se evaluó la separación de grupos mediante un análisis multivariado con base en la distancia de Mahalanobis, para cuantificar el grado de disimilitud y sustentar la interpretación de la estructura de agrupamiento.

Posteriormente, se llevó a cabo un análisis de discriminación canónica (Cuadro 8), en el cual se obtuvieron tres componentes asociados a los grupos definidos. Los eigenvalores y la proporción de varianza explicada indican que el primer componente explicó el 82.45 % de la variación total, el segundo el 10.84 % y el tercero el 3.89 %, acumulando en conjunto el 97.18 % de la variación. La significancia de estos componentes fue evaluada mediante pruebas F ($Pr > F$), mostrando diferencias altamente significativas entre los grupos ($p < 0.0001$), lo que confirmó una clara diferenciación multivariada entre ellos.

Cuadro 8 Análisis de discriminación canónica de los tres grupos generados por a través de la Distancia de Mahalanobis para 54 individuos de *Tagetes*.

Clúster	Eigenvalor	Proporción	Acumulativo	Pr > F
1	208.3764	0.8245	0.8245	<.0001
2	27.3946	0.1084	0.9329	<.0001
3	9.8421	0.0389	0.9718	<.0001

Nota. Las distancias se evaluaron mediante la prueba F; * indica que el Eigenvalor fue significativamente diferente de 0 ($p \leq 0.05$).

Este análisis complementario, permitió validar la consistencia de los grupos obtenidos y confirmar que los clústeres difieren en función de sus perfiles de flavonoides. Una vez definido el número y la diferenciación entre grupos, se llevó a cabo un análisis de discriminación canónica (ADC), con el objetivo de identificar las variables que contribuyen en mayor medida a dicha separación.

A partir de este análisis, se obtuvieron tres componentes canónicos (Can1, Can2 y Can3), que describen la estructura multivariada de los datos. Los coeficientes canónicos (Cuadro 9) indicaron la contribución de cada flavonoide en los ejes de discriminación. En este sentido, el primer componente canónico (Can1) estuvo fuertemente asociado con morina, mostrando el coeficiente más alto (0.98), complementando el análisis anterior, los resultados sugieren que este compuesto presenta una alta capacidad para discriminar entre grupos. El segundo componente (Can2) estuvo principalmente determinado por quercetina (0.85), mientras que el tercer componente (Can3) estuvo asociado, de manera predominante con naringenina (-0.79). En conjunto, el análisis confirmó que los perfiles químicos de los grupos están bien definidos y que las diferencias observadas presentaron un sustento multivariado sólido.

Cuadro 9 Coeficientes de la estructura canónica total del análisis de 12 especies flavonoides.

Variable	Can1	Can2	Can3
Miricetina	0.495872	0.014732	0.476544
Kaempferol	-0.152858	0.054712	0.105036
Isorhamentina	0.062241	0.131719	-0.142567
Apigenina	-0.023717	0.190239	0.081901
Rutina	0.479315	0.041619	0.535117
Morina	0.983861*	0.123648	0.048446
Quercetina	-0.429349	0.850256*	-0.124313
Catequina	-0.121366	-0.033278	-0.034133
Hesperidina	0.197376	0.011812	0.225540
Floritzina	-0.049679	0.158993	0.074496
Naringenina	0.48307	0.006176	-0.788947*
Floretina	-0.313912	0.100029	0.001909

Nota. Los valores con asterisco (*) indican los coeficientes canónicos de mayor magnitud en cada componente (Can1, Can2 y Can3), correspondientes a las variables con mayor contribución a la discriminación entre grupos.

Aunque el análisis inicial se realizó considerando 54 muestras como unidades experimentales, para el análisis de discriminación canónica y la comparación múltiple de medias se utilizaron los valores promedio por genotipo. Este enfoque permitió reducir la variabilidad y enfatizar las diferencias entre genotipos, facilitando la interpretación de los patrones multivariados asociados con los perfiles de flavonoides. Así mismo, se realizó una prueba de comparación

múltiple de Tukey ($\alpha = 0.05$) (Cuadro 10), sobre los valores de los componentes canónicos, con el fin de identificar diferencias significativas entre los genotipos, los resultados mostraron una clara diferenciación entre materiales.

En el primer componente (Can1), se observó una separación marcada, donde genotipos como rSFS06-17 y rSPI-01 presentaron los valores más altos, difiriendo significativamente de materiales como eXo-01, que mostraron el valor más bajo. En el segundo componente (Can2), los individuos del Genotipo eXo-01 destacaron significativamente del resto al presentar el valor más alto, indicando una fuerte diferenciación en este eje. Por su parte, en el tercer componente (Can3), se observaron diferencias adicionales entre genotipos, destacando rSFS06-04 y rSPI-01 con valores superiores.

Cuadro 10 Comparación de medias de los valores canónicos (Can1, Can2 y Can3) entre genotipos de *Tagetes* mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Muestra	Can1	Can2	Can3	Muestra	Can1	Can2	Can3
rSFS06-17	26.68 a	-0.57 ef	-8.36 e	hCA-01	-4.25 cd	-4.44 g	-1.3 d
rSFS06-04	16.9 b	0.36 de	4.01 a	hCA-06	-3.78 c	-3.62 fg	0.93 bcd
	c						
	d						
rSFS06-08	-6.65 e	5.9 b	0.42 cd	rSFS-01	-4.68 cde	-4.82 g	-0.35 cd
rSPI-01	25.55 a	1.53 cde	3.82 ab	rSFS-02	-3.95 cd	-2.94 fg	0.5 cd
rSPI-02	16.87 b	2.34 cde	2.34 abc	eSPI-01	-6.66 cde	-3.1 fg	0.21 cd
	c						
	d						
eSPI-08	-5.26 e	-4.38 g	1.47 abcd	eSPI-02A	-5.91 cde	-2.79 fg	-0.03 cd
eSPI-02	-7.57 ef	0.66 de	0.9 bcd	eHu-12	-6.06 cde	-2.77 fg	-1.21 d
	d						
hKK-06	-6.96 e	3.73 bc	-0.78 d	eHu-09	-6.9 de	-0.69 ef	-1.3 d
					-		
hKK-12	-7.31 ef	3.3 bcd	0.21 cd	eXo-01	10.06 f	12.29 a	-1.48 d

Nota. Medias con la misma letra dentro de cada columna no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

La clasificación del análisis discriminante muestra que, de un total de 54 observaciones, varias fueron clasificadas correctamente en su grupo original, como eHu09, eSPI01, eXo01 y rSFS02, con un 100% de acierto. No obstante, algunos grupos como eSPI02, eSPI08 o rSFS01 presentaron variaciones de clasificación, con observaciones clasificadas en otros bloques. Esto sugiere que, aunque el modelo tiene buen poder discriminante en general, hay cierta

superposición entre algunos grupos. El análisis se realizó bajo probabilidades a priori iguales para todos los grupos (0.05556).

La proyección tridimensional de los tres componentes canónicos (Figura 13) permitió visualizar de manera más clara la agrupación de las muestras, distinguiéndose cuatro grupos principales. El Grupo 1 concentró la mayoría de los materiales con valores cercanos en los tres ejes canónicos, mientras que los Grupos 2 y 3 (constituidos por materiales de *Tagetes remotiflora*) presentaron una separación más marcada, principalmente influenciada por los componentes Can1 y Can3. Asimismo, el Grupo 4 (constituido por *Tagetes erecta* provenientes del área de Xochimilco) agrupó un conjunto reducido de muestras con comportamiento diferenciado, particularmente en Can2. Esta distribución confirmó la existencia de similitudes y diferencias en los perfiles de flavonoides, lo cual sustenta la clasificación observada en la proyección canónica.

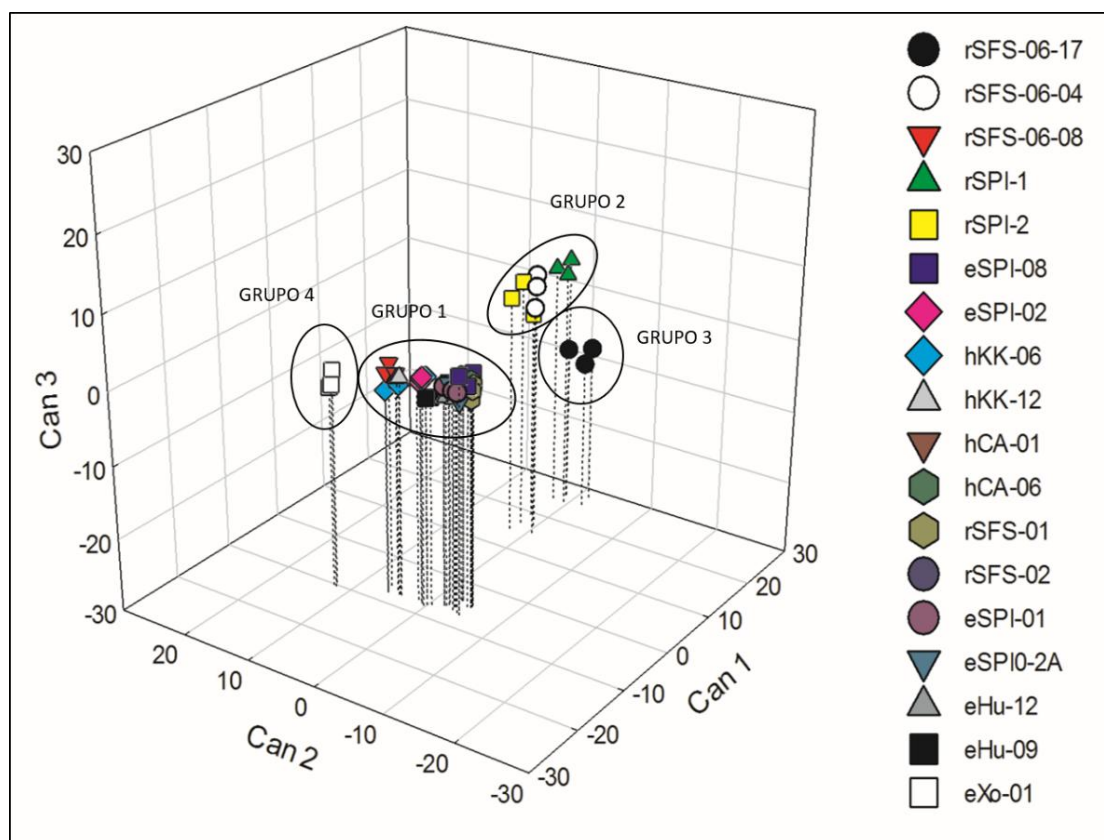


Figura 13 Proyección tridimensional de la estructura canónica de los cuatro grupos generados.

El Grupo 1 concentró la mayor cantidad de muestras, en su mayoría de *T. erecta*; todas las muestras analizadas de *T. heterocarpha* y algunas de *T. remotiflora*, en una región cercana al origen, con valores relativamente bajos y similares en los tres componentes, lo que indicó poca diferenciación interna en sus concentraciones de flavonoides. En contraste, el Grupo 2 se separa marcadamente hacia valores positivos de Can3 y parcialmente de Can1, evidenciando que la quercetina fue el componente principal responsable de su diferenciación, esta situación se repitió en el Grupo 4, donde los valores de morina y floritzina se mantuvieron poco variables. El Grupo 3 presentó una separación intermedia, desplazándose principalmente a lo largo de Can1 en valores positivos, con menor influencia de Can2 y Can3, lo que indicó que la morina fue el factor dominante en su agrupación. En conjunto, la distribución de los grupos reflejó que cada componente canónico contribuyó de manera diferencial a la estructuración de las muestras, permitiendo una clara discriminación entre los conjuntos formados.

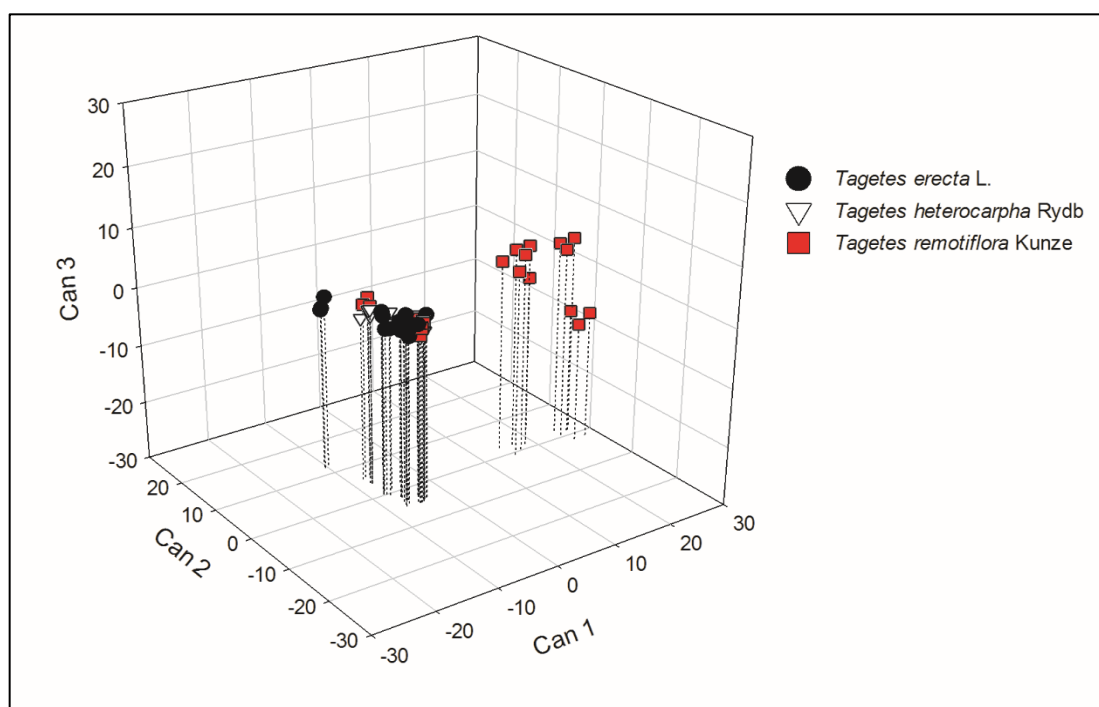


Figura 14 Proyección tridimensional de la estructura canónica de los cuatro grupos generados, indicados por genotipo.

Así mismo, se generó la misma proyección, indicando únicamente el genotipo (Figura 14) para visualizar de mejor manera aquellas muestras que se agruparon entre genotipos y las que formaron grupos con genotipos diferentes. La proyección por genotipo de *Tagetes* mostró un patrón de separación consistente con la agrupación previamente observada en la proyección tridimensional general. En este caso, el análisis de flavonoides permitió visualizar de mejor manera a las muestras de *T. remotiflora*, las cuales se agrupan de forma más definida y se separan claramente del resto, principalmente a lo largo de Can1 y Can3, indicando que estos componentes son los que mayor peso tienen en su diferenciación. En contraste, las muestras de *T. erecta* y *T. heterocarpha* presentan una mayor superposición entre sí, concentrándose en una región más compacta del espacio canónico, lo que refleja perfiles de flavonoides más similares, esta similitud podría deberse probablemente a que existe una mayor cercanía genética entre estos materiales.

No obstante, aunque existe una tendencia de agrupación por genotipo, no todas las muestras se integran completamente dentro de su grupo correspondiente, observándose cierta dispersión interna que sugiere variabilidad intraespecífica en la composición de flavonoides. En conjunto, estos resultados confirman que, si bien la separación es evidente —particularmente para *T. remotiflora*—, la diferenciación entre genotipos no es absoluta. Esta variación en los patrones de agrupación podría explicarse, en parte, por procesos evolutivos como la deriva génica, la cual provoca cambios aleatorios en la frecuencia de alelos dentro de las poblaciones, especialmente en aquellas de tamaño reducido o con cierto grado de aislamiento (Wright, 1931, citado por: Cicevan et al., 2022). En este sentido, la separación observada en *T. remotiflora* podría estar asociada con diferencias en su estructura genética, derivadas de procesos históricos de aislamiento o reducción poblacional, lo que se traduce en variaciones de la biosíntesis de flavonoides.

Por tanto, las diferencias en los perfiles químicos no solo reflejan condiciones ambientales o metodológicas, sino que pueden estar determinadas

principalmente por el estado genético de las plantas, lo que refuerza la importancia de considerar la variabilidad genética intrapoblacional como un factor clave en la interpretación de los resultados fitoquímicos obtenidos en el presente estudio. En este sentido, la variación en los caracteres fitoquímicos adquiere relevancia no solo desde una perspectiva funcional, sino también taxonómica, ya que estos compuestos pueden ser útiles en el estudio de la clasificación de las especies y contribuir a la delimitación e identificación de taxones poco estudiados dentro del género, incluso en estado vegetativo (Anaya-Gutiérrez et al., 2022).

3.6. Conclusiones

Doce flavonoides con tres gradientes de expresión se encontraron en los genotipos silvestres y domesticados. Los análisis multivariados indicaron que un grupo de genotipos tipo silvestre *T. remotiflora* fue diferente de los grupos domesticado *T. erecta* y silvestre *T. heterocarpha*, que resultaron más parecidos, destacando cuatro flavonoides de valor quimiotaxonómico. En este sentido, las diferencias observadas en los perfiles de acumulación de flavonoides sugieren una posible relación entre la variabilidad genética y la expresión diferencial de metabolitos secundarios entre especies del género *Tagetes*.

A diferencia de muchos estudios fitoquímicos previos, donde generalmente se emplean variedades comerciales con cierto grado de homogeneidad genética, el uso de múltiples genotipos silvestres y cultivados permitió evidenciar una mayor variabilidad metabólica entre los materiales evaluados. Asimismo, la integración de análisis fitoquímicos y moleculares aportó evidencia que respalda el posible valor de compuestos como quercetina, kaempferol, morina e isorhamnetina como marcadores químicos útiles en estudios de diferenciación intraespecífica e interespecífica dentro del género.

3.7. LITERATURA CITADA

- Acosta de la Luz, L., Hechevarría-Sosa, I., & Rodríguez-Ferradá, C. (2010). Estudios preliminares para el establecimiento del cultivo de *Tagetes lucida* Cav. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 15(1), 38-45.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., & Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*, 196, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.07.014>
- Aguiñiga-Sánchez, I., Cadena-Íñiguez, J., Santiago-Osorio, E., Gómez-García, G., Mendoza-Núñez, V. M., Rosado-Pérez, J., Ruíz-Ramos, M., Cisneros-Solano, V. M., & Ledesma-Martínez, E. (2017). Chemical analyses and *in vitro* and *in vivo* toxicity of fruit methanol extract of *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*. *Journal of Medicinal Food*, 20(8), 1–9.
- Anaya-Gutiérrez, E. J., Gutiérrez, J., Serrato-Cruz, M. A., & Vázquez-Sánchez, M. (2022). Anatomía foliar de nueve especies de *Tagetes* L. (*Tageteae*: *Asteraceae*). *Botanical Sciences*, 100(3), 667–684. <https://doi.org/10.17129/botsci.2985>
- Barajas-Pérez, J. S., Montes-Belmont, R., Castrejón-Ayala, F., Flores-Moctezuma, H. E., & Serrato-Cruz, M. Á. (2011). Propiedades antifúngicas en especies del género *Tagetes*. *Revista Mexicana de Micología*, 34, 85–91.
- Barzana, E. R., Santamaría, R. I., García-Correa, O., García, F., Ridaura-Sanz, V. E., & López-Munguía, A. (2002). Enzyme-mediated solvent extraction of carotenoids from marigold flower (*Tagetes erecta*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4491–4496. <https://doi.org/10.1021/jf025550q>
- Beckonert, O., Keun, H., Ebbels, T., Bundy, J., Holmes, E., Lindon, J., & Nicholson, J. (2007). Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature Protocols*, 2(11), 2692–2703. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.376>
- Bohm, B. A., & Stuessy, T. F. (2001). *Flavonoids of the sunflower family (Asteraceae)*. Springer-Verlag.
- Boots, A. W., Haenen, G. R., & Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, 585(2–3), 325–337.
- Burlec, A. F., Pecio, L., Kozachok, S., Mircea, C., Corciova, A., Verestiuc, L., ... Hancianu, M. (2021). Phytochemical profile, antioxidant activity, and cytotoxicity assessment of *Tagetes erecta* L. flowers. *Molecules*, 26(5), 1201. <https://doi.org/10.3390/molecules26051201>
- Calderón-Montaña, J. M., Burgos-Morón, E., Pérez-Guerrero, C., & López-Lázaro, M. (2011). A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11(4), 298–344.

- Cherrak, S. A., Mokhtari-Soulmane, N., Berroukeche, F., Bensenane, B., Cherbonnel, A., Merzouk, H., & Elhabiri, M. (2016). In vitro antioxidant versus metal ion chelating properties of flavonoids: A structure–activity investigation. *PLoS ONE*, 11(10), e0165575. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165575>
- Cicevan, R., Sestras, A., Plazas, M., Boscaiu, M., Vilanova, S., Gramazio, P., ... Sestras, R. (2022). Biological traits and genetic relationships amongst cultivars of three species of *Tagetes* (Asteraceae). *Plants*, 11, 760. <https://doi.org/10.3390/plants11060760>
- Close, D. C., & McArthur, C. (2002). Rethinking the role of many plant phenolics—Protection from photodamage not herbivores? *Oikos*, 99(1), 166–172. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2002.990117.x>
- Crawford, D. J. (1978). Plant speciation and patterns of diversity in Asteraceae. *Botanical Review*, 44(1), 1–25.
- Duke, J. A. (2008). *Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants*. Florida, USA: CRC Press.
- Emerenciano, V. P., Militão, J. S., Campos, C. C., Romoff, P., Kaplan, M. A., Zambon, M., & Brant, A. J. (2001). Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(9), 947–957. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(01\)00033-3](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(01)00033-3)
- Hammoda, H. M. (2004). Flavonoids from the flowers of *Tagetes erecta* L. *Molecules*, 9(7), 475–480. <https://doi.org/10.3390/90700475>
- Harborne, J. B. (1998). *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis* (3rd ed.). Springer.
- Harborne, J. B., & Mabry, T. J. (1982). *The flavonoids: Advances in research*. Chapman & Hall.
- Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481–504. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00235-1)
- Khan, N., & Mukhtar, H. (2013). Tea and health: Studies in humans. *Current Pharmaceutical Design*, 19(34), 6141–6147.
- Mahalanobis, P. C. (1936). On the generalized distance in statistics. *Proceedings of the National Institute of Sciences of India*, 2, 49–55.
- Mulvihill, E. E., & Huff, M. W. (2012). Naringenin metabolism and cardiovascular disease risk reduction. *Current Opinion in Lipidology*, 23(1), 33–40.
- Panero, J. (2007). Tribe Tageteae. En J. W. Kadereit & C. Jeffrey (Eds.), *The families and genera of vascular plants* (Vol. 8, pp. 420–431). Springer.
- Park, Y. J., Park, S.-Y., Arasu, M. V., Naif, A. A.-D., Ahn, H.-G., Kim, J. K., & Park, S. U. (2017). Accumulation of carotenoids and metabolic profiling in different

cultivars of *Tagetes* flowers. *Molecules*, 22(2), 313. <https://doi.org/10.3390/molecules22020313>

Pasikanti, K., Ho, P., & Chan, E. (2008). Gas chromatography/mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids. *Journal of Chromatography B*, 871, 202–211.

Rivas-García, L., Crespo-Antolín, L., Forbes-Hernández, T. Y., Romero-Márquez, J. M., Navarro-Hortal, M. D., Arredondo, M., ... Sánchez-González, C. (2023). Bioactive properties of *Tagetes erecta* edible flowers: Polyphenol and antioxidant characterization and therapeutic activity against ovarian tumoral cells and *Caenorhabditis elegans* tauopathy. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(1), 280. <https://doi.org/10.3390/ijms25010280>

Rodríguez, E., & Mabry, T. J. (1975). Tageteae—Chemical review. In V. H. Heywood, J. B. Harborne, & B. L. Turner (Eds.), *The biology and chemistry of the Compositae* (Vol. 2, pp. 785–797). Academic Press.

Salehi, B., Valussi, M., Morais-Braga, M. F., Carneiro, J. N., Leal, A. L., Coutinho, H. D., ... Carradori, S. (2018). *Tagetes* spp. essential oils and other extracts: Chemical characterization and biological activity. *Molecules*, 23(11), 2847. <https://doi.org/10.3390/molecules23112847>

Serrato, C. M., & Quijano, A. M. (1993). Usos de algunas especies de *Tagetes*: Revisión bibliográfica (1984-1992) . *Memorias del I Simposio Internacional y II Reunión Nacional sobre Agricultura Sostenible: Importancia y contribución de la agricultura sostenible: Importancia y contribución de la agricultura tradicional* (págs. 228-238). CEICADAR-Puebla: Colegio de Postgraduados.

Serrato-Cruz, M. A. (2014). *El recurso genético del cempoalxóchitl (Tagetes spp.) de México: Diagnóstico*. Texcoco, Estado de México: Universidad Autónoma Chapingo.

Shukla, S., & Gupta, S. (2010). Apigenin: A promising molecule for cancer prevention. *Pharmacological Research*, 59(4), 301–309.

Soule, J. A. (1993). *Biosystematics of Tagetes* (Doctoral dissertation, University of Texas at Austin).

Tang, S., Wang, B., Liu, X., Xi, W., Yue, Y., Tan, X., ... Huang, L. (2024). Structural insights and biological activities of flavonoids: Implications for novel applications. *Food Frontiers*, 6, 218–247. <https://doi.org/10.1002/fft2.494>

Trethewey, R. N. (2004). Metabolite profiling as an aid to metabolic engineering in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(2), 196–201. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.01.003>

Treutter, D. (2005). Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biology*, 7(6), 581–591. <https://doi.org/10.1055/s-2005-873009>

Vasudevan, P., Kashyap, S., & Sharma, S. (1997). *Tagetes*: A multipurpose plant. *Bioresource Technology*, 62(1–2), 29–35. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00101-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00101-4)

Weston, L. A., Skoneczny, D. W., A., P., & Weidenhamer, J. D. (2015). Metabolic profiling: An overview—New approaches for the detection and functional analysis of biologically active secondary plant products. *Journal of Allelochemical Interactions*, 115–27.

Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16(2), 97–159.

Youssef, H. A., Ali, S. M., Sanad, M. I., & Dawood, D. H. (2022). Chemical investigation of flavonoid, phenolic acids composition and antioxidant activity of Mexican marigold (*Tagetes erecta* L.) flowers. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16, 4763–4773. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01549>

Zamudio, J. E., Herrera Collazos, E. E., Maldonado Ocampo, J. A., & DoNascimento, C. (2015). Protocolo para la medición de rasgos funcionales en peces dulceacuícolas. En C. Salgado-Negret (Eds.), *La ecología funcional como aproximación al estudio, manejo y conservación de la biodiversidad: Protocolos y aplicaciones* (pp. 181–182). Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.

4. RELACIONES GENÉTICAS ENTRE GENOTIPOS SILVESTRES Y CULTIVADOS DE *Tagetes erecta* L. MEDIANTE MARCADORES ISSR

4.1. RESUMEN GENERAL

Se caracterizaron genotipos de *Tagetes erecta*, (DOMESTICADO), *T. remotiflora* y *T. heterocarpha* (SILVESTRES) mediante marcadores ISSR. A partir de la amplificación de seis iniciadores ISSR, se generaron 82 loci polimórficos, evidenciando un 100 % de polimorfismo, lo que indica una alta diversidad genética entre los genotipos evaluados. El análisis de agrupamiento mediante el coeficiente de Dice y el método UPGMA permitió identificar cinco grupos principales, mostrando una tendencia de asociación entre *T. erecta* y *T. heterocarpha*, mientras que *T. remotiflora* presentó una diferenciación genética más marcada. Así mismo, *T. erecta* presentó una mayor dispersión en distintos agrupamientos e individuos aislados, lo que sugiere una elevada variabilidad intraespecífica. Este comportamiento fue consistente con el alto nivel de polimorfismo detectado, donde se obtuvieron 82 fragmentos polimórficos y un porcentaje de polimorfismo del 100 %, además de valores promedio de PIC y poder de discriminación de 0.31 y 3.73, respectivamente. Los resultados también fueron consistentes con el análisis de componentes principales, donde *T. erecta* mostró una distribución más amplia dentro del espacio multivariado. En contraste, distintos genotipos de *T. remotiflora* se concentraron en agrupamientos más compactos y exclusivos, lo que sugiere un menor grado de variación genética intraespecífica en comparación con *T. erecta*, lo que podría estar relacionado con una menor influencia de procesos de flujo génico o introgresión entre poblaciones.

Palabras clave: ISSR, diversidad genética, polimorfismo, análisis multivariado, marcadores moleculares, recursos fitogenéticos

Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Eduardo Daniel Ramírez Arvizu

Director de Tesis: Dra. María del Rosario García Mateos

GENETIC RELATIONSHIP ANALYSIS BETWEEN CULTIVATED AND WILD CULTIVARS OF *Tagetes erecta* L. Using ISSR MARKERS

4.2. ABSTRACT

Genotypes of *Tagetes erecta* (domesticated), *T. remotiflora*, and *T. heterocarpha* (wild) were characterized using ISSR markers. From the amplification of six ISSR primers, 82 polymorphic loci were generated, revealing 100 % polymorphism, which indicates high genetic diversity among the evaluated genotypes. Cluster analysis based on the Dice coefficient and the UPGMA method identified five main groups, showing a tendency of association between *T. erecta* and *T. heterocarpha*, whereas *T. remotiflora* exhibited more marked genetic differentiation. Likewise, *T. erecta* showed greater dispersion across different clusters and isolated individuals, suggesting high intraspecific variability. This behavior was consistent with the high level of polymorphism detected, where 82 polymorphic fragments and a polymorphism percentage of 100 % were obtained, in addition to average PIC and discriminatory power values of 0.31 and 3.73, respectively. The results were also consistent with the principal component analysis, in which *T. erecta* displayed a broader distribution within the multivariate space. In contrast, different genotypes of *T. remotiflora* were concentrated in more compact and exclusive clusters, suggesting a lower degree of intraspecific genetic variation compared to *T. erecta*, which could be related to a lower influence of gene flow or introgression processes among populations.

Index words: genetic diversity, polimorfism, multivariate analysis, molecular markers, plant genetic resources

Thesis of Master of Science in Agricultural Biotechnology, Universidad Autónoma Chapingo
Author: Eduardo Daniel Ramírez Arvizu
Advisor: Dra. María del Rosario García Mateos

4.3. Introducción

4.3.1 Diversidad genética y recursos fitogenéticos

La flora de México ofrece una amplia diversidad de especies debido a la extensa gama de ambientes que caracterizan al país; las diferentes condiciones climatológicas ubican a México como un importante centro de evolución de linajes vegetales (Rzedowski, 2006). El conocimiento de la biodiversidad vegetal es esencial para el desarrollo sostenible de diversas actividades humanas; de este modo, los recursos fitogenéticos se encuentran entre los esenciales del mundo. En los últimos años se han desarrollado métodos que permiten la conservación y caracterización de estos recursos a nivel *in situ* (Rao & Hodgkin, 2002). En este contexto, la notable diversidad de formas de crecimiento, la variabilidad morfológica, la amplia distribución geográfica y, sobre todo, la diversidad taxonómica, han dificultado la identificación precisa de especies, incluso para especialistas (Villaseñor, 2018).

4.3.2 Bases de la diversidad genética y su importancia

En el pasado, la identificación y caracterización en plantas estuvo basada en la evaluación fenotípica de caracteres morfológicos, resultando ser demasiado limitada para permitir una discriminación genotípica precisa; en este sentido, se han propuesto otros procedimientos además del enfoque morfológico (Mor et al., 2008). Actualmente, el uso de marcadores moleculares supone un método de identificación rápido y confiable para el análisis de diversidad en diferentes poblaciones y su conservación (Kumar et al., 2009). Con base en lo anterior, se reconoce que los cultivos actuales derivan de parientes silvestres que desarrollaron mecanismos de defensa, tolerancia y resistencia para sobrevivir en ambientes variables; por ello, las poblaciones nativas constituyen una fuente valiosa de germoplasma para el mejoramiento genético de especies cultivadas (Hoyt, 1992).

En contraste con la variabilidad presente en las poblaciones silvestres, los sistemas agrícolas modernos han favorecido la uniformidad genética en los cultivares, los cuales suelen derivar de un número limitado de líneas élite

empleadas en la generación de múltiples variedades. Esta situación ha conducido a una reducción progresiva de la base genética de los cultivos —junto con su cultivo extensivo—, ha incrementado la vulnerabilidad genética de numerosas especies agrícolas, en algunos casos con consecuencias significativas (Rao & Hodgkin, 2002). De manera paralela, la tendencia en las últimas décadas ha estado orientada hacia la liberación y el uso generalizado de cultivares mejorados, tanto en cultivos principales como secundarios.

Como alternativa en el estudio integral de las plantas y sus recursos, los marcadores moleculares poseen características ideales para evaluar la diversidad genética a nivel de ADN, no afectada por las variaciones ambientales, que permiten analizar relaciones entre accesiones basándose en la estimación de la similitud genética (Mor et al., 2008). La diversidad genética resulta de las diferencias heredables entre individuos y puede manifestarse en variaciones en la secuencia de ADN, en características bioquímicas, en propiedades fisiológicas o en caracteres morfológicos. Esta diversidad está determinada por el número de alelos presentes en las poblaciones, su distribución y el efecto que tienen sobre el desempeño de los organismos.

La variación que sustenta la diversidad genética se origina a partir de procesos como la mutación y la recombinación, mientras que la selección, la deriva genética y el flujo génico actúan sobre los alelos para modificar su frecuencia en las poblaciones (Rao & Hodgkin, 2002). En flores, en particular las de *Tagetes*, se ha investigado muy poco la diversidad genética presente en poblaciones nativas y el enfoque de estos análisis ha sido reservado para estudiar cultivares utilizados como líneas élite (Mor et al., 2008). Debido a esto, resulta conveniente el estudio y la gestión de los recursos fitogenéticos de *Tagetes* que se encuentran disponibles en el país.

4.3.3 Marcadores moleculares en el análisis de la diversidad genética

El uso de marcadores moleculares ha representado una herramienta fundamental para el análisis de la diversidad genética, la identificación de

genotipos y la determinación de relaciones filogenéticas en plantas (Namita et al., 2013). En el género *Tagetes*, la aplicación de diferentes tipos de marcadores moleculares ha permitido caracterizar la variabilidad genética a distintos niveles (Loockerman et al., 2003; Cicevan et al., 2022), contribuyendo al entendimiento de su estructura genética y evolución. Estos estudios han sido complementados con la información morfológica disponible y han permitido recrear la historia evolutiva del género (Namita et al., 2013; Singh & Vishwakarma, 2020). Para el caso de *Tagetes erecta*, el uso de marcadores moleculares para estimar el nivel de cercanía genética entre las variedades cultivadas y sus homólogos silvestres supone el primer paso para establecer programas de conservación y mejoramiento más eficaces.

4.3.4 Tipos de marcadores moleculares y su aplicación en *Tagetes*

Los marcadores moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han sido ampliamente utilizados en estudios de diversidad genética en *Tagetes*. Entre ellos, los marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) han permitido detectar altos niveles de polimorfismo en diferentes genotipos y especies, evidenciando una considerable variabilidad genética dentro del género (Shahzadi et al., 2016). La mayoría de los estudios para evaluar la fiabilidad de los marcadores RAPD en la estimación de la relación intervarietal y específica han mostrado resultados comparables a los obtenidos mediante marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Srivastava et al., 2007). Sin embargo, este tipo de marcadores (RAPD y RFLP), presentan limitaciones relacionadas con su reproducibilidad y la dependencia de condiciones experimentales específicas, así como la necesidad de grandes cantidades de ADN de alta calidad y procedimientos relativamente laboriosos y costosos (Thormann et al., 1994).

En este contexto, los marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) han surgido como una alternativa eficiente para el análisis de diversidad genética. Estos marcadores se basan en la amplificación de regiones del ADN localizadas entre secuencias repetitivas simples (microsatélites), lo que permite detectar

variaciones en diferentes regiones del genoma sin necesidad de información previa de la secuencia (Zietkiewicz et al., 1994). Una de las principales ventajas de los ISSR es su alta reproducibilidad, atribuida al uso de primers más largos y a condiciones de amplificación más estrictas en comparación con los marcadores RAPD (Panwar et al., 2018).

Por otra parte, los marcadores SSR (Simple Sequence Repeats), también conocidos como microsatélites, han sido utilizados para el análisis de diversidad genética en *Tagetes*, mostrando una alta capacidad de discriminación entre variedades comerciales y poblaciones locales, así como una adecuada resolución en la identificación de estructuras genéticas (Sukhuman et al., 2014). Sin embargo, su aplicación requiere información previa del genoma para el diseño de primers específicos, lo que limita su uso en especies con menor información genética disponible.

Adicionalmente, el uso de marcadores específicos de secuencia (STS) ha permitido evaluar la variabilidad genética asociada con genes de interés, como aquellos involucrados en la biosíntesis de compuestos secundarios. En *Tagetes*, se han utilizado marcadores STS relacionados con genes como el de la síntesis de limoneno, mostrando altos niveles de polimorfismo y proporcionando información relevante sobre la variabilidad genética funcional (Shahzadi et al., 2016). El uso combinado de diferentes sistemas de marcadores moleculares, como RAPD, ISSR y SSR, ha demostrado mejorar la resolución en los análisis de diversidad genética, permitiendo una caracterización más completa de las relaciones entre genotipos (Namita et al., 2013). Sin embargo, la elección del tipo de marcador depende de los objetivos del estudio, así como de la disponibilidad de información genética y recursos técnicos.

Los marcadores ISSR representan una herramienta adecuada para el análisis de relaciones genéticas entre especies del género *Tagetes*, debido a su capacidad para detectar polimorfismos a nivel del genoma completo, su alta reproducibilidad y su eficiencia en la discriminación de genotipos (Namita et al., 2013). Su aplicación permite evaluar la variabilidad genética entre materiales cultivados y

genotipos silvestres, facilitando la identificación de patrones de agrupamiento y sus relaciones genéticas. Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivo analizar los perfiles polimórficos generados mediante marcadores ISSR en genotipos cultivados de *Tagetes erecta* y materiales silvestres de *T. remotiflora* y *T. heterocarpha*, para comparar su variabilidad genética y evaluar las relaciones existentes entre ellos. A partir de estos análisis, se buscó identificar patrones de diversidad que permitieran inferir sobre estructura genética y la cercanía entre los genotipos estudiados.

4.4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.4.1 Material vegetal

La presente investigación se realizó con nueve genotipos de tres poblaciones de *Tagetes*; cuatro genotipos de *Tagetes erecta* L.; tres de *Tagetes remotiflora* K. y dos de *Tagetes heterocarpha* R.; se usaron aquenios de capítulos recolectados de distintas localidades (Cuadro 11) en etapa fenológica de floración terminal. El proceso de cultivo del material vegetal se realizó en el mes de junio del 2024 en el laboratorio de semillas y los invernaderos de la Universidad Autónoma Chapingo.

Un promedio de 50 aquenios se sembró en cajas petri con agua destilada, adicionando 2 mL de ácido giberélico (0.1 % p/v), debido a que las semillas presentaron problemas de latencia; el proceso se realizó en condiciones de oscuridad para promover la germinación. Los aquenios que germinaron fueron transplantados a macetas de siete pulgadas con peatmoss, se mantuvieron con riego constante y en condiciones de invernadero hasta alcanzar su desarrollo. Cortes de 2-3 hojas por planta se realizaron y se depositaron en costales de tela, debidamente etiquetados. Las muestras se mantuvieron en ultracongelación (-20 °C) para su procesamiento.

Cuadro 11 Genotipos Silvestres y Cultivados de *Tagetes*.

Nombre	Código	Genotipo	Colecta (Lugar, Fecha)	Latitud	Longitud
1	eSPI1	<i>erecta</i>	San Pablo Ixayoc, Texcoco. Edo de Mex.	19.472856	-98.793309
4	eSPI2	<i>erecta</i>	San Pablo Ixayoc, Texcoco. Edo de Mex.	19.472856	-98.793309
Xochimilco	eXo	<i>erecta</i>	Tlahuac, Edo de Mex	19.239363	-99.001538
6	eHu	<i>erecta</i>	Huajuapán de león, Oaxaca	17.796239	-97.808244
5	rSPI	<i>remotiflora</i>	San Pablo Ixayoc, Texcoco. Edo de Mex.	19.472856	-98.793309
06 Oaxaca	rSFS06	<i>remotiflora</i>	San Francisco Sola, Oaxaca	16.504297	-96.951959
Rem Papel	rSFS	<i>remotiflora</i>	San Francisco Sola, Oaxaca	16.504297	-96.951959
Cacahuamilpa	hKK	<i>heterocarpha</i>	Cacahuamilpa, Guerrero	18.68257	-99.507098
C. del Águila	hCA	<i>heterocarpha</i>	Ajuchitlán del Progreso, Guerrero	18.2189	-100.42564

Nota. Los genotipos identificados como *Tagetes erecta* constituyen a los materiales cultivados y los genotipos identificados como *Tagetes remotiflora* y *Tagetes heterocarpha* constituyen a los materiales silvestres. Las coordenadas geográficas se expresan en grados decimales (°) bajo el sistema de referencia WGS84.

4.4.2 Extracción de ADN

El proceso de extracción del material genético se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Autónoma Chapingo. El tejido vegetal utilizado para la extracción de ADN consistió en hojas jóvenes, conservadas bajo condiciones para permitir preservar la integridad del material genético.

El ADN se extrajo a partir de 3-5 plantas de *Tagetes* por recolecta, utilizando el método CTAB propuesto por Doyle-Doyle (1990), con algunas modificaciones. Las hojas recolectadas se lavaron con alcohol a 70 % y se dejaron escurrir en papel secante. Se pesaron 0.2 g de cada muestra y se maceraron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, posteriormente, se adicionó 1 mL de amortiguador de extracción (2 % CTAB, 100 mM de Tris pH 8, 1.4 M de cloruro de sodio, 20 mM de EDTA pH 8 y 0.1 % de β -mercapto etanol). Cada muestra se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se agitó por inversión hasta homogeneizar. La suspensión se incubó a 65 °C durante 30 min, posteriormente se adicionaron 10 μ L de ARNasa y se incubó a 36 °C por 30 min. Cada tubo se centrifugó a 15,000 rpm por 10 min. El sobrenadante se extrajo, se colocó en un

tubo nuevo y se agregó un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v), mezclando por inversión durante 2 min, enseguida la muestra se centrifugó a 15,000 rpm por 10 min.

Posteriormente, se recolectó nuevamente la fase acuosa, se transfirió a un tubo nuevo y se adicionaron 600 µL de isopropanol frío agitando por inversión durante 2 min, cada muestra se colocó en refrigeración durante 10 min y posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se descartó, se recuperó la pastilla formada al fondo del tubo y se resuspendió en 500 µL de agua destilada estéril, enseguida se le adicionaron 800 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), la mezcla se agitó y centrifugó a 12,000 rpm por 10 min. La fase acuosa se colocó en un tubo nuevo, se adicionaron 25 µL de acetato de sodio 3 M, pH 5.2 y 800 µL de etanol absoluto. La mezcla se llevó a refrigeración por 10 min y después se centrifugó a 12,000 por 10 min. Finalmente, el ADN se resuspendió en el buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0).

4.4.3 Cuantificación de ADN

Las muestras se cuantificaron mediante un espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop Lite para determinar su absorbancia, concentración y calidad en el intervalo de 260–280 nm. El promedio de pureza de las muestras, evaluado mediante la relación 260/280, osciló entre 1.8 y 2.0, lo que indicó una calidad adecuada del ADN para los análisis posteriores. La concentración inicial del ADN varió entre 560 y 1300 ng µL⁻¹. Con base en estos valores, las muestras se diluyeron con buffer TE hasta un volumen final de 500 µL y una concentración estandarizada de 50 ng µL⁻¹. Para verificar los cálculos de concentración se empleó la relación propuesta por Sambrook et al. (1989):

$$(Abs_{260})(50 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1})(Factor \text{ de dilución}) = Conc. \text{ ADN } (ng \mu\text{L}^{-1})$$

donde: 50 ng µL⁻¹ corresponde al factor de conversión para ADN genómico y el factor de dilución se calculó a partir del volumen de ADN y buffer TE utilizados en la estandarización de las muestras.

4.4.4 Validación del ADN mediante iniciador 16S

El iniciador 16S está dirigido a un gen de la subunidad ribosomal presente de manera universal en bacterias, fue utilizado como control para evaluar la integridad y amplificabilidad del ADN extraído. Se preparó una mezcla de reacción de PCR con un volumen final de 25 μL (2.5 μL de ADN, 6.2 μL de H_2O , 2.5 μL de buffer, 10 μL de dNTP's, 1 μL de iniciador 16S1, 1 μL de iniciador 16S2, 1.5 μL de MgCl_2 y 0.3 μL de Taq polimerasa).

La amplificación del gen 16S se llevó a cabo bajo el siguiente perfil térmico: desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min, para la separación de las cadenas de ADN; seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, alineamiento a 55 °C por 30 s, para la hibridación de los iniciadores, y extensión a 72 °C durante 1 min, para la síntesis de nuevas cadenas de ADN. Finalmente, se realizó una extensión final a 72 °C por 5 min, con el fin de completar la elongación de los fragmentos amplificados.

Los resultados obtenidos con el iniciador 16S fueron satisfactorios, confirmando que el ADN era apto para los análisis posteriores.

4.4.5 Amplificación de marcadores ISSR

Materiales de los tres genotipos de *Tagetes* se caracterizaron, utilizando distintos marcadores ISSR. Los iniciadores utilizados se sintetizaron por Invitrogen® y se disolvieron en agua grado biología molecular (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water 10 x 500 mL) a una concentración de 10 $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$. Distintos iniciadores ISSR se usaron, pero solo seis (Cuadro 12) produjeron amplificación de bandas en la mayoría de las muestras.

Cuadro 12 Iniciadores ISSR seleccionados.

Iniciador	Secuencia (5' - 3')	Ta °C	Referencia
ISSR 4	(AG) ₈ CTC	57	Bojinov y Danailov, 2009
ISSR 5	(AC) ₈ CTA	57	Bojinov y Danailov, 2009
ISSR 32	(TG) ₇ G	57	Bojinov y Danailov, 2009
LOL 08	(GT) ₆ CC	57	Bojinov y Danailov, 2009
LOL 12	(GTG) ₃ GC	57	Bojinov y Danailov, 2009
PI03	AGCT(GACA) ₃	57	Vargas et al., 2011

Nota. Ta representa la temperatura de alineamiento a la que se estableció cada iniciador.

Se preparó una mezcla de reacción de PCR con un volumen final de 50 µL (5 µL de ADN genómico, 13.7 µL de H₂O, 5 µL de buffer, 20 µL de dNTP's, 3 µL de iniciador ISSR, 3 µL de MgCl₂ y 0.3 µL de Taq polimerasa). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Thermo Scientific™ Applied Biosystems™ modelo Veriti™ HID), iniciando con un ciclo de pre-desnaturalización a 93 °C por un min, seguido de 40 ciclos con los siguientes segmentos: 20 seg a 93 °C, 1 min a 57 °C, y 20 seg a 72 °C; el último ciclo (extensión final) ocurrió a 72 °C durante 6 min. Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa ultrapura (Invitrogen No. 16500-500) al 2 % en TAE 1X. La separación se realizó a 100 voltios por 1 h. La tinción de los geles se realizó utilizando bromuro de etidio (0.5 µg mL⁻¹) por 15 min, se observaron y documentaron en un fotodocumentador de la marca: DigiDoc-it Imaging system (UVP).

4.4.6 Análisis ISSR

Las imágenes obtenidas a partir de los geles de electroforesis se analizaron mediante un conteo de bandas visibles y reproducibles generadas por cada iniciador ISSR en los genotipos evaluados. Con la información obtenida se construyó una matriz binaria de ausencia/presencia, asignando el valor de “1” a la presencia de una banda y “0” a su ausencia. A partir de esta matriz se estimaron distintos parámetros de diversidad genética, incluyendo el número total de bandas amplificadas (TB), número de bandas polimórficas (BP), bandas únicas (BU), bandas monomórficas (BM), porcentaje de polimorfismo [P(%)], índice de contenido polimórfico (PIC) y poder de discriminación del iniciador (PBM). Estos parámetros permitieron evaluar la capacidad de amplificación y

discriminación de cada iniciador ISSR, así como el nivel de variabilidad genética presente entre los genotipos de *Tagetes* analizados.

Posteriormente, la matriz binaria conformada por 82 fragmentos polimórficos se analizó mediante el programa Sistema de Análisis Multivariado y Taxonómico Numérico (NTSYSpc v.2.20f), utilizando el coeficiente de similitud de Dice y el método de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Con los valores de similitud obtenidos se generó un dendrograma para evaluar las relaciones genéticas entre los genotipos. La estabilidad de los agrupamientos obtenidos se evaluó mediante el método Jackknife, utilizando el programa FreeTree versión 0.9.1.50.

De manera complementaria, la matriz binaria de ausencia/presencia se utilizó para realizar un análisis de componentes principales (ACP) mediante el programa NTSYSpc v.2.20f. Para ello, se calculó una matriz de similitud utilizando el coeficiente Phi, el cual permitió estimar la asociación entre los genotipos a partir de los fragmentos ISSR obtenidos. Posteriormente, los valores derivados de esta matriz se emplearon para generar una proyección multivariada de los genotipos en componentes principales, con el propósito de visualizar la distribución de la variabilidad genética y las relaciones existentes entre los materiales evaluados.

4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.5.1 Amplificación de marcadores ISSR

A partir de los perfiles de amplificación generados con los iniciadores ISSR, se construyó una matriz binaria de presencia y ausencia de fragmentos, la cual estuvo conformada por 82 loci polimórficos presentes en los tres genotipos de *Tagetes*. El análisis de la matriz permitió identificar una amplia variación en los patrones de bandas entre los genotipos, evidenciando diferencias en la composición de las secuencias de los materiales estudiados. Con el fin de evaluar la eficiencia de los iniciadores ISSR utilizados, se calcularon distintos parámetros de diversidad genética, resultados se presentan en el Cuadro 13.

Cuadro 13 Parámetros de diversidad genética obtenidos mediante marcadores ISSR en genotipos de *Tagetes*.

INICIADOR	Sec (5'-3')	TB	BP	BU	BM	P(%)	PIC ¹	PBM
ISSR4	(AG) ₈ CTC	8	8	1	0	100	0.29	3.13
ISSR5	(AC) ₈ CTA	17	17	2	0	100	0.34	5.25
LOL-08	(GT) ₆ CC	15	15	2	0	100	0.31	4.27
LOL-12	(GTG) ₃ GC	18	18	5	0	100	0.23	3.46
PI-03	AGCT(GACA) ₃	13	13	1	0	100	0.3	3.08
MESL-03	(TG) ₇ G	11	11	0	0	100	0.36	3.17
MEDIA		1.367	1.367	1.83	0	100	0.31	3.73

Nota. TB = número total de bandas amplificadas; BP = número de bandas polimórficas; BU = número de bandas únicas por iniciador; BM = número de bandas monomórficas; P(%) = porcentaje de polimorfismo; PIC = índice de contenido polimórfico; PBM = poder de discriminación del iniciador. La fila "Media" representa el valor promedio de cada parámetro.

Se observó que la mayoría de los loci presentaron variación entre los genotipos, lo que confirmó un alto nivel de polimorfismo en el conjunto de datos. Asimismo, la distribución heterogénea de los fragmentos, así como la presencia de combinaciones únicas de bandas en diferentes genotipos, reflejaron un elevado grado de diversidad genética. Algunos loci mostraron patrones compartidos entre grupos de genotipos, mientras que otros se presentaron de manera más restringida, lo que contribuye a la diferenciación entre materiales. La información contenida en la matriz binaria constituye la base para el cálculo de similitud genética que permitió el posterior análisis de agrupamiento, para establecer las relaciones genéticas entre los genotipos evaluados.

4.5.2 Análisis de relaciones polimórficas

Treinta muestras agrupadas en nueve genotipos provenientes de tres poblaciones de *Tagetes* se evaluaron: cuatro genotipos de *Tagetes erecta* (15 muestras), tres de *Tagetes remotiflora* (6 muestras) y dos de *Tagetes heterocarpha* (9 muestras). A partir de los resultados obtenidos del análisis de diversidad genética, se generó un dendrograma mediante el método de agrupamiento UPGMA, basado en el coeficiente de similitud de Dice (Figura 15), que permitió visualizar las relaciones entre los genotipos de *Tagetes* analizados. La delimitación de los grupos se estableció a un coeficiente de similitud de 0.52,

se identificaron cinco grupos principales, que reflejaron distintos niveles de similitud en los patrones polimórficos entre los materiales evaluados.

La estabilidad de los agrupamientos obtenidos en el dendrograma fue evaluada mediante el método Jackknife, el cual permite estimar la consistencia de los clústeres generados a partir de la matriz de similitud. Los valores obtenidos reflejaron un nivel adecuado de soporte para los grupos identificados, lo que respalda la confiabilidad de las relaciones genéticas observadas entre los genotipos.

El primer grupo incluyó a los genotipos eHu-1, eHu-3, eHu-4, eHu-5, eHu-8, hKK-3, hKK-4, eHu-7, eSPI-1, eSPI-2, eSPI-3 y eSPI-4, conformando el clúster más amplio, lo que sugiere una alta afinidad genética entre estos individuos. En este grupo predominaron genotipos correspondientes a *T. erecta*, aunque también se incorporaron algunos genotipos de *T. heterocarpha*, lo que indicó la existencia de similitud genética entre materiales cultivados y algunos genotipos silvestres. El segundo grupo estuvo integrado por los genotipos rSFS-4, rSFS-5, rSFS-6 y rSFS-7, corresponden exclusivamente a *T. remotiflora*, evidenciando una agrupación bien definida y una alta homogeneidad genética dentro de esta especie.

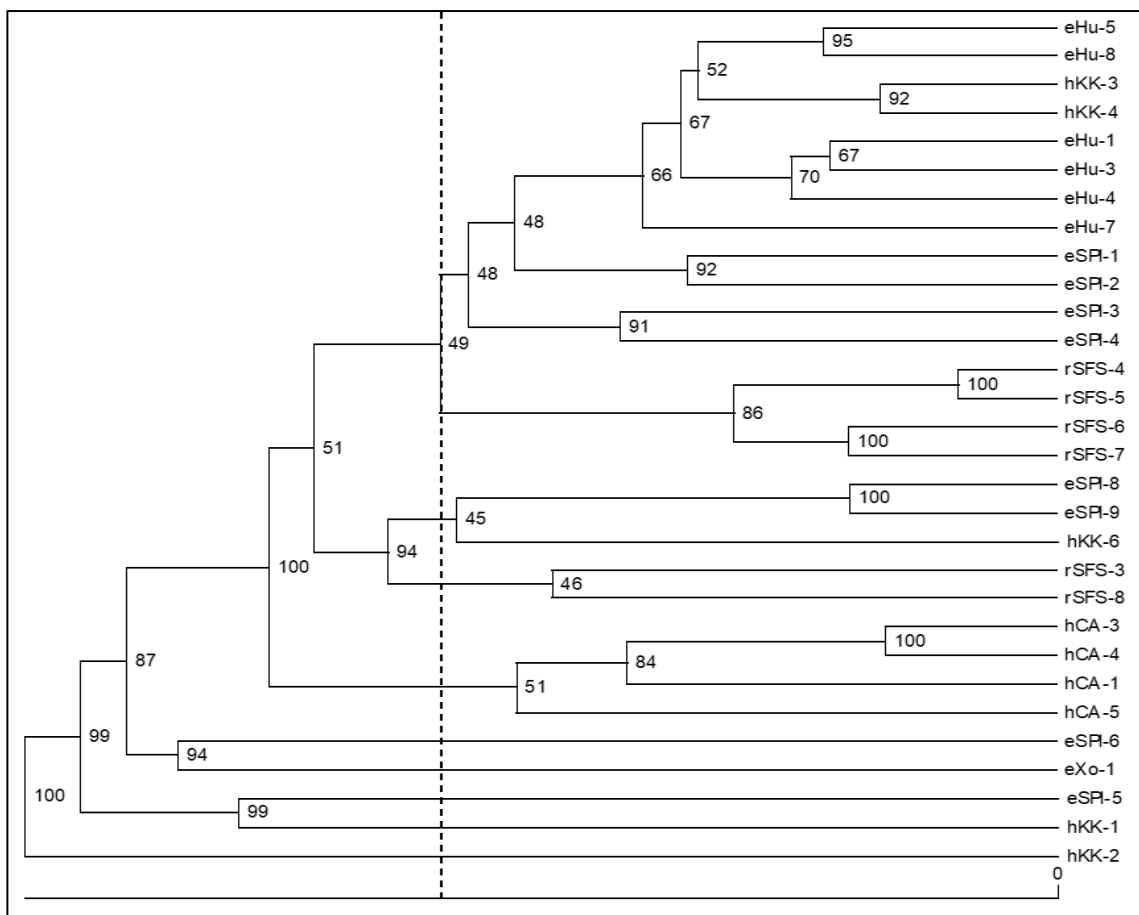


Figura 15 Similitud entre 30 muestras agrupadas en nueve genotipos provenientes de tres poblaciones del género *Tagetes*: *Tagetes erecta* L., *Tagetes remotiflora* K. y *Tagetes heterocarpha* R. mediante 82 alelos ISSR a través de la distancia de Dice.

La conformación del primer grupo, donde agrupan exclusivamente genotipos de *T. erecta* y *T. heterocarpha*, evidencia una estrecha relación genética entre ambas especies. Este patrón de agrupamiento concuerda con lo reportado por Serrato-Cruz (1999), quien documenta una alta compatibilidad reproductiva entre estos taxones, caracterizada por cruzamientos exitosos en ambos sentidos, producción de semillas viables y ausencia de barreras de esterilidad, lo que sugiere una afinidad genética significativa. De manera complementaria, estudios moleculares han señalado niveles elevados de similitud genética entre genotipos de estas especies, con valores cercanos a 92 % (Ruíz-González, 2025), lo que respalda la proximidad observada en el dendrograma.

Por otro lado, la agrupación conjunta de *T. erecta* y *T. heterocarpha* podría atribuirse a la presencia de regiones genómicas conservadas y a posibles eventos de intercambio genético entre poblaciones, resulta importante considerar que los patrones de similitud podrían estar influenciados por el contexto ecológico en el que se desarrollaron los materiales recolectados, derivados de procesos de hibridación interespecífica o flujo génico. Este comportamiento es congruente con lo descrito para la familia *Asteraceae*, donde fenómenos como la introgresión, la poliploidía y los cortos periodos de divergencia evolutiva contribuyen a la complejidad en la delimitación taxonómica de sus especies (Palazzesi, 2022). En consecuencia, los resultados obtenidos sugieren que la diferenciación genética entre estos taxones es relativa y no absoluta, lo que se refleja en su agrupamiento dentro de un mismo clúster en el análisis de similitud genética.

Cabe mencionar que, las recolectas se realizaron en ambientes donde coexisten diversas especies de *Tagetes*, lo que incrementa la probabilidad de entrecruzamientos naturales. Esta coexistencia espacial puede favorecer procesos de flujo génico e hibridación interespecífica, dando lugar a genotipos con combinaciones genéticas compartidas (Abbott et al., 2013; Rieseberg & Carney, 1998), lo que podría explicar parcialmente la proximidad genética observada entre algunos materiales en el dendrograma.

Así mismo, el tercer grupo comprendió a los genotipos eSPI-8, eSPI-9 y hKK-6, en el que se observó la asociación de genotipos de *T. erecta* con un representante de *T. heterocarpha*, lo que sugiere una afinidad genética intermedia entre materiales, a su vez, sustenta la idea de que estos genotipos poseen regiones conservadas que evidencian una mayor cercanía entre ambos. Por otra parte, el cuarto grupo incluyó a los genotipos rSFS-3 y rSFS-8, ambos pertenecientes a *T. remotiflora*, reforzando la tendencia de esta especie a formar agrupamientos propios. Finalmente, el quinto grupo estuvo conformado por los genotipos hCA-1, hCA-3, hCA-4 y hCA-5, correspondientes a *T. heterocarpha*, los cuales fueron recolectados en las faldas del Cerro del águila en el poblado de Santa Ana del Águila, municipio de Ajuchitlán, Guerrero; lo que indica una

clara diferenciación genética, esta diferencia podría deberse al estado de aislamiento geográfico en el que se desarrollaron los materiales.

En contraste con el patrón observado en el Grupo 1, los genotipos correspondientes a *Tagetes remotiflora* tendieron a agruparse en clústeres independientes, lo que sugiere una mayor divergencia genética respecto a *T. erecta* y *T. heterocarpha*. Este comportamiento es consistente con lo reportado en estudios previos, donde se ha observado una menor compatibilidad reproductiva entre *T. remotiflora* y otras especies del género, manifestada en una baja producción de semillas y la presencia de barreras postcigóticas (Serrato-Cruz, 1999).

La formación de grupos propios para *T. remotiflora* podría estar asociada a un mayor grado de aislamiento genético, así como a una menor influencia de procesos de flujo génico en comparación con los otros genotipos analizados. Esto sugiere que, a pesar de compartir hábitats con otras especies del género, *T. remotiflora* mantiene una identidad genética más definida, lo que se refleja en su separación dentro del dendrograma; es preciso mencionar que, durante el periodo de desarrollo de las plantas, la estructura morfológica silvestre de *T. remotiflora* siempre fue muy evidente. En este sentido, los resultados obtenidos indicaron que este genotipo presenta un nivel de divergencia genética mayor, que contribuyó a su diferenciación dentro del conjunto de genotipos evaluados.

Adicionalmente, se generó un diagrama a partir del Análisis de Componentes Principales (ACP) (Figura 16), con el propósito de complementar la interpretación de las relaciones genéticas entre los genotipos evaluados. La representación gráfica derivada del análisis permitió visualizar la distribución de los genotipos e identificar patrones de asociación y separación entre los todos materiales dentro del espacio multivariado, consistente con los patrones observados en el dendrograma basado en el coeficiente de Dice. Los individuos correspondientes a *Tagetes erecta* (1) se distribuyeron principalmente hacia la región derecha del diagrama, formando agrupamientos relativamente cercanos entre sí, aunque con cierta dispersión interna, lo que refleja una considerable variabilidad polimórfica

intraespecífica. Este comportamiento coincide con la formación de varios subgrupos observados en el dendrograma, así como con la presencia de los individuos del mismo genotípico que resultaron ser atípicos (outliers).

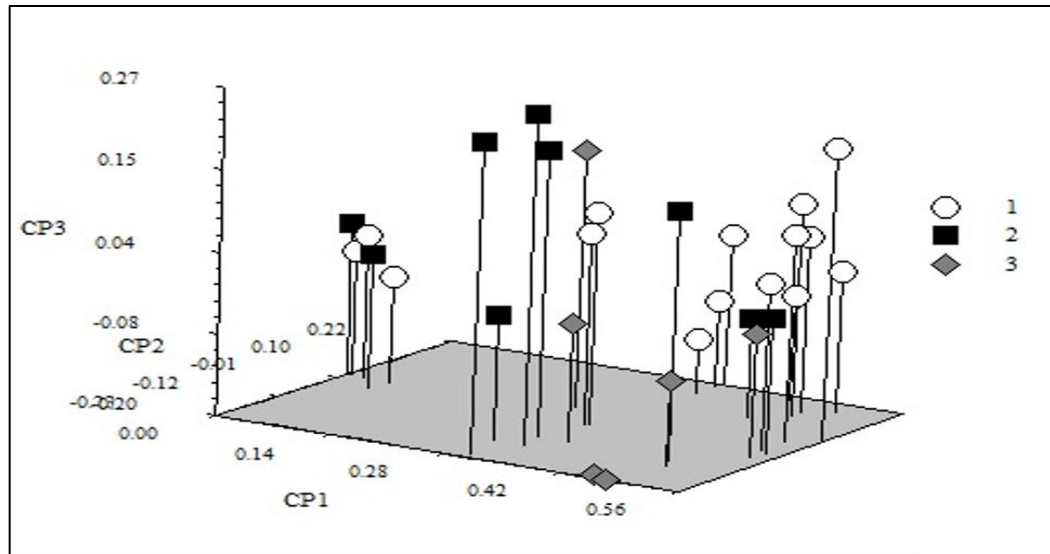


Figura 16 Diagrama de Componentes Principales de los tres genotipos de *Tagetes* estudiados. 1 = *T. erecta*, 2 = *T. heterocarpha*, 3 = *T. remotiflora*

Por otra parte, la mayoría de los genotipos de *Tagetes heterocarpha* (2) mostraron una tendencia a posicionarse próximos a algunos individuos de *T. erecta*, particularmente en los valores intermedios de los componentes 1 y 2, lo que respalda la estrecha relación genética observada entre ambas especies en el análisis de agrupamiento. Sin embargo, algunos individuos de *T. heterocarpha* se localizaron de manera más dispersa, lo cual podría sugerir que, a pesar de su cercanía geográfica, existe una clara diferenciación entre los miembros de estas poblaciones, debida posiblemente al flujo genético entre individuos.

La formación de grupos propios para *T. remotiflora* podría estar asociada con un mayor grado de aislamiento genético, así como a una menor influencia de procesos de flujo génico en comparación con los otros genotipos analizadas. Esto sugiere que, aunque *T. remotiflora* comparta hábitats con otras especies del género, *T. remotiflora* esta especie mantiene una identidad genética más definida, lo que se refleja en su separación dentro del dendrograma; es preciso mencionar que, durante el periodo de desarrollo de las plantas, la estructura

morfológica silvestre de *T. remotiflora* siempre fue muy evidente. En este sentido, los resultados obtenidos indican que este genotipo presenta un nivel de divergencia genética mayor, lo cual contribuye a su diferenciación dentro del conjunto de genotipos evaluados.

4.5.3 Variabilidad de *Tagetes* determinada a través de ISSR

Los patrones de agrupamiento observados en el dendrograma reflejan la variabilidad presente entre genotipos, la formación de los distintos grupos y subgrupos, directamente relacionada con las diferencias en los perfiles de amplificación, es decir, con la presencia o ausencia de bandas generadas por cada iniciador. En este sentido, la capacidad de los marcadores ISSR para detectar polimorfismos a lo largo del genoma permitió discriminar entre los genotipos y establecer relaciones de similitud polimórfica (Kumar et al., 2019), por lo tanto, los resultados obtenidos en el análisis de agrupamiento no solo reflejan la organización genética de los materiales evaluados, sino también la eficiencia de los marcadores empleados para capturar dicha variabilidad.

Los iniciadores ISSR utilizados en el presente estudio mostraron un alto nivel de eficiencia en la detección de polimorfismo, registrando 100 % de bandas polimórficas en todos los casos. El número de bandas amplificadas por iniciador osciló entre 8 y 18, lo que indicó una adecuada cobertura del genoma y una buena capacidad de amplificación. La ausencia de bandas monomórficas refleja un alto nivel de variabilidad genética entre los genotipos evaluados. Por otra parte, los valores del índice de contenido polimórfico (PIC) variaron entre 0.23 y 0.36, con un promedio de 0.31, lo que sugiere que los marcadores presentan un nivel moderado a alto de información genética. Asimismo, los valores del índice de diversidad (PBM) indicaron un adecuado poder de discriminación entre los genotipos. En conjunto, estos resultados confirman la utilidad de los marcadores ISSR para el análisis de diversidad genética en el género *Tagetes*.

El alto nivel de polimorfismo encontrado en los materiales analizados en el presente estudio refleja la gran diversidad existente en el país, los materiales silvestres suponen una fuente desconocida de atributos de interés

agroalimentario. Diversos estudios han demostrado la efectividad de los marcadores ISSR en el análisis de diversidad genética en *Tagetes*. Investigaciones realizadas en colecciones de germoplasma han reportado porcentajes de polimorfismo que oscilan entre 40 y 100 %, lo que permite una adecuada discriminación entre genotipos y una clasificación consistente con la taxonomía tradicional (Namita et al., 2013; Zeng et al., 2010). Asimismo, los análisis de agrupamiento basados en ISSR han permitido diferenciar especies y variedades, evidenciando su utilidad en estudios de relaciones genéticas (Panwar et al., 2018).

4.5.4 Estructura genética de *Tagetes* y sus patrones de agrupamiento

A partir de los resultados obtenidos del análisis de diversidad genética, se evidenció la existencia de una estructura genética definida entre los genotipos evaluados, en la cual se observa una clara tendencia de asociación entre *Tagetes erecta* y *T. heterocarpha*, mientras que *T. remotiflora* presenta una diferenciación más marcada. Este patrón sugiere que las especies del género no constituyen unidades completamente aisladas, sino que existe una continuidad genética entre algunos taxones, consistente con lo reportado en estudios previos donde los agrupamientos no reflejan estrictamente los límites taxonómicos tradicionales (Civevan et al., 2022).

La proximidad genética observada entre especies puede explicarse por la dinámica evolutiva del género *Tagetes*, en la que se han documentado procesos de hibridación interespecífica, introgresión y poliploidía. En particular, se ha señalado que especies como *T. patula* tienen un origen híbrido derivado de cruzamientos entre *T. erecta* y otras especies relacionadas, lo que evidencia la capacidad de intercambio genético dentro del género (García-Sánchez et al., 2019). Asimismo, la presencia de diferentes niveles de ploidía y la formación de progenies con combinaciones cromosómicas variables refuerzan la idea de una evolución reticulada, donde los eventos de recombinación han contribuido a la diversidad genética actual (Panero et al., 2008).

Este comportamiento no es exclusivo del género *Tagetes*, sino que responde a una complejidad evolutiva más amplia dentro de la familia *Asteraceae*. En este sentido, Bremer (1992), mediante un análisis cladístico que incluyó 27 tribus y subtribus y 47 caracteres filogenéticamente informativos, entre ellos la inversión del ADN cloroplástico, reportó la existencia de múltiples árboles igualmente parsimoniosos con un índice de consistencia de 0.54, lo que refleja un grado considerable de homoplasia. Además, observó incongruencias entre los árboles derivados de datos morfológicos y de ADN cloroplástico; sin embargo, ambos enfoques coincidieron en respaldar la relación de grupo hermano entre *Mutisieae-Barnadesiinae* y el resto de la familia. Estos resultados ponen de manifiesto la dificultad para resolver completamente las relaciones filogenéticas en *Asteraceae* y sugieren que la falta de separación clara entre algunos genotipos de *Tagetes* observada en el presente estudio podría estar asociada a esta complejidad evolutiva.

Por otra parte, la dispersión observada entre los genotipos de *T. erecta* dentro del dendrograma indica una alta variabilidad genética intraespecífica. Este comportamiento coincide con lo reportado en estudios de caracterización de germoplasma, donde se ha documentado una amplia variación fenotípica y genética dentro de la especie, atribuida tanto a procesos de domesticación como a la incorporación de material genético diverso en los sistemas de cultivo (Patel et al., 2019). De igual manera, la variabilidad morfológica observada en poblaciones naturales y cultivadas, particularmente en caracteres florales, respalda la existencia de una base genética amplia dentro de la especie (Galicia-Fuentes, 1995).

4.5.5 Caracterización y estimación de variabilidad entre especies de *Tagetes*

El uso de marcadores ISSR en el presente estudio permitió detectar un alto nivel de polimorfismo (100 %), lo que demostró su elevada capacidad para identificar variación genética entre los genotipos evaluados. Este resultado es congruente con la naturaleza de los marcadores ISSR, los cuales amplifican regiones

intermicrosatélites distribuidas a lo largo del genoma, permitiendo la detección de múltiples loci sin requerir información previa de secuencia (Zietkiewicz et al., 1994). En este sentido, el alto porcentaje de polimorfismo observado en el presente estudio sugiere la existencia de una diversidad genética considerable, particularmente asociada a la inclusión de genotipos silvestres y cultivados.

Resultados similares han sido reportados en estudios previos en el género *Tagetes*, donde los marcadores ISSR han permitido identificar altos niveles de variabilidad genética y una resolución adecuada en la diferenciación de genotipos, aunque con patrones de agrupamiento que no siempre reflejan una separación clara entre especies (Civevan et al., 2022). Este comportamiento coincide con lo observado en el presente trabajo, donde se detectaron agrupamientos mixtos y una diferenciación parcial entre especies.

En contraste, estudios que han empleado marcadores SSR han reportado un número limitado de alelos por locus y valores de contenido polimórfico moderados, generalmente alrededor de 0.40, lo que indica una capacidad de resolución más específica pero menos amplia en comparación con los ISSR (Civevan et al., 2022). Mientras que los SSR permiten detectar variación a nivel alélico debido a su naturaleza codominante, los ISSR presentan la ventaja de explorar múltiples regiones del genoma simultáneamente, lo que se refleja en el alto nivel de polimorfismo observado en este estudio.

Adicionalmente, otros sistemas de marcadores como RAPD han mostrado porcentajes de polimorfismo elevados en el género (Banyal et al., 2013; Mor et al., 2008), lo que confirma la existencia de una base genética diversa en *Tagetes*; sin embargo, estos marcadores presentan limitaciones en reproducibilidad y resolución, lo que resalta la utilidad de los ISSR como una herramienta robusta para estudios de diversidad genética (Srivastava et al., 2007).

4.5.6 Implicaciones evolutivas, domesticación y mejoramiento

Los resultados obtenidos adquieren especial relevancia al considerar que en este estudio se evaluaron de manera conjunta genotipos cultivados de *T. erecta* y especies silvestres relacionadas. Esta integración permitió ampliar el

entendimiento de las relaciones genéticas dentro del género y mostró que las especies silvestres han contribuido a la conformación genética de los materiales cultivados. En este contexto, la diversidad genética representa la base fundamental para los procesos evolutivos y de domesticación, al proporcionar la variación necesaria para la selección natural y artificial (Rao & Hodgkin, 2002).

La evidencia de afinidad genética entre especies y la falta de una separación estricta en los agrupamientos respaldan la hipótesis de que la domesticación de *T. erecta* pudo haber involucrado procesos de hibridación e introgresión con poblaciones silvestres. Este fenómeno ha sido documentado en diversos cultivos, donde la incorporación de genes provenientes de especies silvestres ha contribuido a aumentar la variabilidad genética y la adaptabilidad de los cultivares (Rao & Hodgkin, 2002).

Por lo tanto, la variabilidad genética detectada en este estudio representa un recurso valioso en programas de mejoramiento genético, porque permitirá identificar genotipos divergentes que pueden ser utilizados en cruzamientos dirigidos para la obtención de híbridos con alto potencial heterótico. La existencia de variabilidad genética significativa, junto con altos niveles de heredabilidad reportados para diversos caracteres agronómicos en *Tagetes*, sugiere que es posible realizar una selección eficiente para mejorar características de interés (Kumar et al., 2019).

En conjunto, los resultados obtenidos confirman que el género *Tagetes* presenta una estructura genética compleja, caracterizada por altos niveles de variabilidad intra e interespecífica, así como por relaciones genéticas que reflejan procesos evolutivos dinámicos. El uso de marcadores ISSR permitió detectar de manera eficiente esta variabilidad, mostrando un alto poder de discriminación y confirmando su utilidad como herramienta para estudios de diversidad genética.

Finalmente, este trabajo representa uno de los primeros esfuerzos en integrar el análisis de genotipos cultivados de *T. erecta* con especies silvestres relacionadas, lo que contribuye significativamente al entendimiento de las relaciones genéticas dentro del género. Asimismo, los resultados obtenidos

proporcionan una base sólida para futuros estudios orientados a la conservación, caracterización y mejoramiento genético de *Tagetes*, así como para el aprovechamiento de la diversidad genética existente en poblaciones silvestres.

4.6. CONCLUSIONES

La técnica molecular ISSR permitió detectar una amplia diversidad genética entre los genotipos silvestres (*T. remotiflora* y *T. heterocarpha*) y domesticados (*T. erecta*) evaluados en el presente estudio. La amplificación obtenida con los iniciadores ISSR generó un alto nivel de polimorfismo, lo que evidenció una considerable variabilidad genética entre los materiales analizados. En particular, destacó la elevada variabilidad intraespecífica observada en *T. erecta* y *T. heterocarpha*, reflejada en la dispersión de sus genotipos dentro de distintos agrupamientos y en el análisis de componentes principales. Este comportamiento sugiere la existencia de diferencias genéticas importantes entre materiales pertenecientes a la misma especie, posiblemente asociadas a procesos de domesticación, flujo génico e intercambio genético entre poblaciones.

En contraste, varios genotipos de *T. remotiflora* mostraron una tendencia a formar agrupamientos más compactos y homogéneos, indicando una menor variabilidad genética intraespecífica en comparación con *T. erecta* y *T. heterocarpha*. Esta diferenciación podría estar relacionada con un mayor aislamiento genético o una menor influencia de procesos de introgresión genética. En general, los genotipos de *T. erecta* y *T. heterocarpha* presentaron una mayor proximidad genética entre sí, mientras que *T. remotiflora* mostró una separación más marcada, lo que sugiere una diferenciación genética más definida dentro de este taxón. Estos resultados evidencian que las relaciones genéticas dentro del género *Tagetes* son complejas y que la delimitación entre algunos taxones no es absoluta.

4.7. LITERATURA CITADA

- Abbott, R., Albach, D., Ansell, S., Arntzen, J. W., Baird, S. J., Bierne, N., & Zinner, D. (2013). Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, 26(2), 229–246. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02599.x>
- Banyal, N., Panwar, S., Sonah, H., Singh, K. P., & Sharma, T. R. (2013). Genetic diversity analysis of marigold (*Tagetes* sp.) genotypes using RAPD and ISSR markers. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 83(5), 484–490.
- Bremer, K., Jansen, R. K., Karis, P. O., Källersjö, M., Keeley, S. C., Kim, K.-J., & Wallace, R. S. (1992). A review of the phylogeny and classification of the Asteraceae. *Nordic Journal of Botany*, 12, 141–148.
- Cicevan, R., Sestras, A., Plazas, M., Boscaiu, M., Vilanova, S., Gramazio, P., & Sestras, R. (2022). Biological traits and genetic relationships amongst cultivars of three species of *Tagetes* (Asteraceae). *Plants*, 11, 760. <https://doi.org/10.3390/plants11060760>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(1), 13–15.
- García-Sánchez, F., López-Villafranco, M. E., Aguilar-Rodríguez, S., & Aguilar-Contreras, A. (2012). Etnobotánica y morfo-anatomía comparada de tres especies de *Tagetes* utilizadas en Nicolás Romero, Estado de México. *Botanical Sciences*, 90(3), 221–232.
- Hoyt, E. (1992). *Conserving the wild relatives of crops*. Addison-Wesley Iberoamericana.
- Kumar, A., Pratap, B., Gautam, D., Yadav, V., Gangadhara, K., Beer, K., & Kumar, V. (2019). Variability, heritability and genetic advance studies in French marigold (*Tagetes patula* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8, 1046–1048.
- Kumar, P., Gupta, V., Misra, A., Modi, D., & Pandey, B. (2009). Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics*, 2(4), 141–162.
- Mor, V. S., Deswal, D. P., Mann, A., Dahiya, B. S., & Beniwal, B. S. (2008). Characterization of marigold (*Tagetes* spp.) genotypes using SDS-PAGE and RAPD markers. *Seed Science and Technology*, 36(3), 757–766. <https://doi.org/10.15258/sst.2008.36.3.25>
- Namita, P. S., Sonah, H., Singh, P. K., & Sharma, T. R. (2013). Genetic diversity analysis of marigold (*Tagetes* sp.) genotypes using RAPD and ISSR markers. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 83(5), 484–490.
- Palazzesi, L., & Barreda, V. (2022). Fossil history and evolution of the family Asteraceae. *Biological Reviews*, 97(3), 1031–1053.

- Panero, J. (2007). Tribe Tageteae. En J. Kadereit & C. Jeffrey (Eds.), *The families and genera of vascular plants* (Vol. 8, pp. 420–431). Springer.
- Panwar, S., Singh, K. P., Namita, N., Janakiram, T., Sonah, H., & Sharma, T. R. (2018). DNA fingerprinting in African marigold (*Tagetes erecta* L.) genotypes using ISSR and URP markers. *Indian Journal of Horticulture*, 75(1), 105–110.
- Patel, M., Chawla, S., Chavan, S., Shah, H., & Patil, S. D. (2019). Genetic variability, heritability and genetic advance studies in marigold (*Tagetes* spp.) under South Gujarat conditions. *Electronic Journal of Plant Breeding*, 10, 272–276.
- Rao, V. R., & Hodgkin, T. (2002). Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68, 1–19.
- Rieseberg, L. H., & Carney, S. E. (1998). Plant hybridization. *New Phytologist*, 140(4), 599–624.
- Ruíz-González, M. Á., Solano-Vidal, R., Valadez-Moctezuma, E., & Serrato-Cruz, M. Á. (2025). Destilados y aceite homeopático de *Tagetes remotiflora*: efecto en *Botrytis cinerea*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 16(2). <https://doi.org/10.29312/remexca.v16i2.3494>
- Rzedowski, J. (2006). *Vegetación de México* (1.^a ed. digital). CONABIO.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Serrato-Cruz, M. A. (1999). *Variabilidad genética del cempoalxóchitl (Tagetes spp.)*. Colegio de Postgraduados.
- Shahzadi, I., Ahmad, S., & Iqbal, M. (2016). Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Tagetes* species. *Journal of Medicinal Plants Research*, 10(21), 300–307.
- Srivastava, R., Shukla, S., & Kumar, S. (2007). Genetic diversity analysis in *Tagetes* using RAPD markers. *Indian Journal of Biotechnology*, 6, 525–529.
- Sukhman, S., Singh, K. P., & Rani, N. (2014). Genetic variability and character association studies in marigold (*Tagetes erecta* L.). *African Journal of Agricultural Research*, 9(20), 1550–1556.
- Thormann, C. E., Ferreira, M. E., Camargo, L. E., Tivang, J. G., & Osborn, T. C. (1994). Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theoretical and Applied Genetics*, 88, 973–980.
- Villaseñor, J. L. (2018). Diversidad y distribución de la familia Asteraceae en México. *Botanical Sciences*, 96(2), 332–358. <https://doi.org/10.17129/botsoci.1872>
- Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16(2), 97–159.

Zeng, L., Zhao, L.-J., Sun, J., Zhao, Z.-G., & Yang, F. (2010). Analysis of genetic relatedness of *Tagetes* genetic resources as revealed by ISSR. *Scientia Agricultura Sinica*, 43(1), 215–222. <https://doi.org/10.3864/j.issn.0578-1752.2010.01.026>

Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20, 176–183. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151>

5. CONCLUSIONES GENERALES

Las conclusiones del presente estudio evidenciaron que los genotipos silvestres y cultivados del género *Tagetes* presentan una amplia diversidad tanto fitoquímica como genética, reflejada en la variación de perfiles de flavonoides y en el alto nivel de polimorfismo detectado mediante marcadores ISSR. El análisis por HPLC permitió identificar doce flavonoides con distintos gradientes de acumulación entre los genotipos evaluados, destacando a *T. remotiflora* por presentar una mayor acumulación y diversidad de compuestos, lo que sugiere una elevada capacidad biosintética dentro de esta especie. Asimismo, flavonoides como quercetina, kaempferol, isorhamnetina, morina y hesperidina mostraron patrones diferenciales entre grupos, indicando su posible utilidad como marcadores quimiotaxonómicos en estudios de diferenciación intraespecífica e interespecífica dentro del género *Tagetes*.

Los análisis multivariados realizados a partir de los perfiles fitoquímicos mostraron una clara diferenciación de *T. remotiflora*, mientras que *T. erecta* y *T. heterocarpha* presentaron una mayor superposición metabólica, sugiriendo afinidades entre ambas especies. De manera complementaria, el análisis molecular mediante marcadores ISSR confirmó la existencia de una elevada diversidad genética entre los genotipos estudiados, al generar 82 loci polimórficos y un porcentaje de polimorfismo del 100 %. Los patrones de agrupamiento obtenidos mediante UPGMA y el análisis de componentes principales evidenciaron nuevamente una mayor proximidad genética entre *T. erecta* y *T. heterocarpha*, mientras que *T. remotiflora* mostró una diferenciación genética más marcada.

Asimismo, *T. erecta* presentó una mayor dispersión en los análisis de agrupamiento y en el espacio multivariado, reflejando una elevada variabilidad intraespecífica. En contraste, varios genotipos de *T. remotiflora* se concentraron en agrupamientos más compactos y homogéneos, sugiriendo una menor variación genética intraespecífica en comparación con *T. erecta*. En conjunto, estos resultados indican que la diferenciación entre especies dentro del género

Tagetes no es absoluta y que las relaciones entre algunos taxones podrían estar influenciadas por procesos de flujo génico, hibridación e introgresión, favorecidos por la coexistencia de materiales silvestres y cultivados en ambientes compartidos. Estos patrones también sugieren la posible contribución de especies silvestres relacionadas en la conformación genética de *T. erecta* durante su proceso de domesticación.

Los valores promedio de PIC y poder de discriminación confirmaron la eficiencia de los marcadores ISSR para detectar variabilidad genética y discriminar entre genotipos de *Tagetes*. Sin embargo, aunque los ISSR demostraron ser herramientas útiles para estudios de diversidad genética, relaciones filogenéticas y caracterización de recursos fitogenéticos, los resultados sugieren la necesidad de incorporar metodologías de mayor resolución que permitan profundizar en el análisis de regiones genómicas específicas y confirmar con mayor precisión las relaciones evolutivas observadas entre los genotipos evaluados.

En conjunto, el enfoque integrador empleado en este estudio, combinando análisis fitoquímicos y moleculares, permitió establecer relaciones entre la variabilidad genética y la expresión diferencial de metabolitos secundarios, aportando información relevante para el entendimiento de la estructura evolutiva, taxonómica y fitoquímica del género *Tagetes*. Además, los resultados destacan la importancia de los genotipos silvestres como reservorios de diversidad genética y metabólica, así como su potencial en programas de conservación y mejoramiento genético. Finalmente, se propone ampliar futuros estudios mediante la incorporación de un mayor número de genotipos, poblaciones y enfoques complementarios que incluyan análisis agronómicos, moleculares y metabolómicos, con la finalidad de profundizar en el conocimiento, así como el aprovechamiento sostenible de este importante recurso fitogenético mexicano.