



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

COMPOSICIÓN QUÍMICA Y CARACTERIZACIÓN
MOLECULAR DE ALGUNAS ESPECIES DE *Tagetes*

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

Presenta:

CHRISTIAN IVÁN ZAPATA MALDONADO

Bajo la supervisión de:

MIGUEL ÁNGEL SERRATO CRUZ

Chapingo, Estado de México, Diciembre del 2016.



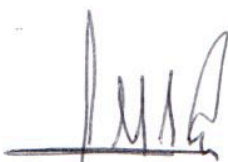
DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE
ALGUNAS ESPECIES DE *Tagetes***

Tesis realizada por **Christian Iván Zapata Maldonado** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobado por el mismo y aceptado como requisito parcial para obtener el grado de:

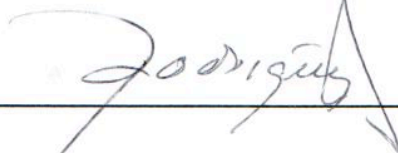
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

DIRECTOR:



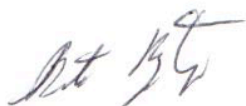
DR. MIGUEL ÁNGEL SERRATO CRUZ

ASESOR:



DR. JOSÉ LUIS RODRIGUEZ DE LA O

ASESOR:



DR. BENITO REYES TREJO

CONTENIDO

CONTENIDO	III
LISTA DE CUADROS	V
LISTA DE FIGURA.....	VI
1 DEDICATORIA	VII
AGRADECIMIENTO.....	VIII
DATOS BIOGRÁFICOS	IX
RESUMEN GENERAL	X
ABSTRACT	X
1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 OBJETIVOS.....	3
1.2 HIPÓTESIS.....	3
2 REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 LAS PLANTAS AROMÁTICAS	4
2.2 DISTRIBUCIÓN DE LAS PLANTAS AROMÁTICAS	5
2.3 BIODIVERSIDAD	7
2.4 VARIABILIDAD GENÉTICA Y FILOGENIA	7
2.5 SISTEMÁTICA MOLECULAR.....	7
2.6 MARCADORES MOLECULARES	8
2.7 ISSR	9
2.8 TAGETES.....	10
2.8.1 GÉNERO <i>TAGETES</i> COMO MODELO DE ESTUDIO	10
2.8.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	11
2.8.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DEL GÉNERO <i>TAGETES</i>	12
2.8.4 IMPORTANCIA HISTÓRICA DEL GÉNERO <i>TAGETES</i>	14
2.8.5 ACEITES ESENCIALES	16
2.8.6 COMPONENTES DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	17
2.9 DISTRIBUCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES EN LAS PLANTAS	18
2.9.1 ACEITES ESENCIALES Y SU FUNCIÓN	19
2.10 LITERATURA CITADA	22
3 CAPITULO	III.
COMPUESTOS QUÍMICOS DE ACEITE ESENCIAL DE ALGUNAS ESPECIES DE <i>TAGETES</i> DEL NORTE Y SUR DE AMÉRICA	30
3.1 RESUMEN.....	30
3.2 ABSTRACT	31
3.3 INTRODUCCIÓN.....	32
3.4 METODOLOGÍA	34
3.4.1 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO	34
3.4.2 EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL.....	35
3.4.3 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS QUÍMICOS	35
3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
3.6 CONCLUSIONES.....	46
3.7 LITERATURA CITADA	48

4 CAPITULO	IV.
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES DE <i>TAGETES</i> ORIGINARIAS DE SUDAMÉRICA.....	58
4.1 RESUMEN.....	58
4.2 ABSTRACT	59
4.3 INTRODUCCIÓN.....	60
4.4 MATERIALES Y MÉTODOS	61
4.4.1 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO	61
4.4.2 EXTRACCIÓN DE ADN	61
4.4.3 CUANTIFICACIÓN Y CALIDAD DEL ADN	62
4.4.4 PCR.....	62
4.4.5 ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO.	63
4.5 RESULTADOS	64
4.5.1 POLIMORFISMO ISSR.....	64
4.5.2 DIFERENCIAS DE GENOTIPOS, DIVERSIDAD GENÉTICA Y ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS	65
4.5.3 PCoA.....	66
4.5.4 AMOVA	68
4.6 DISCUSION.....	68
4.6.1 POLIMORFISMO ISSR EN <i>TAGETES</i>	68
4.7 CONCLUSIONES.....	74
4.8 LITERATURA CITADA	75

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del género <i>Tagetes</i> (SIIT 2012)	12
Cuadro 2. Características morfológicas de algunas especies del género <i>Tagetes</i> (Serrato, 2010; CONABIO, 2012).	13
Cuadro 3. Ejemplos de aplicaciones de los aceites esenciales en la medicina, medio ambiente, agricultura y alimentos.....	19
Cuadro 4. Reactivos para la PCR (para una reacción).....	62
Cuadro 5. Programa para PCR para marcadores moleculares ISSR.....	63
Cuadro 6. Lista de marcadores ISSR usados en el análisis, número de alelos y valores de PIC y MI obtenidos para cada primer.	64
Cuadro 7. Porcentaje de variación explicada por los 3 primeros ejes.	67
Cuadro 8 Resumen de AMOVA	68

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Esquema general de la biosíntesis de los metabolitos secundarios (Marcano y Hasegawa, 2002).	6
Figura 2. Fotografía de ejemplares del género <i>Tagetes</i> (CONABIO, 2012).	14
Figura 3. Composición química de <i>T. filifolia</i> . F y H, poblaciones.....	38
Figura 4. Composición química de <i>T. minuta</i> . B, E, I, poblaciones.	38
Figura 5. Composición química de <i>T. terniflora</i> . D, G, Te, poblaciones.	39
Figura 6. Composición química de <i>T. zypaquirensis</i> . A, J, L, Z, poblaciones.....	39
Figura 7. Composición química de <i>T. multiflora</i> . K, población.	40
Figura 8. Partes de <i>T. minuta</i> de las que se realizó la extracción de aceite esencial.	43
Figura 9. Cromatograma del aceite esencial de la parte alta de la planta de <i>T. minuta</i> (Tiempo eje X (min) vs abundancia eje Y).....	44
Figura 10. Cromatograma del aceite esencial de la parte media alta de la planta de <i>T. minuta</i> (tiempo eje X (min) vs abundancia eje Y).....	44
Figura 11. Cromatograma del aceite esencial de la planta completa de <i>T. minuta</i> (Tiempo eje X (min) vs abundancia eje Y).	45
Figura 12. Composición química del aceite esencial de diferentes partes (parte alta, parte media alta) y planta completa de <i>T. minuta</i>	46
Figura 13 Dendrograma de 15 accesiones de <i>Tagetes</i> obtenidos a partir de marcadores ISSR usando el coeficiente de Nei and Li/Dice y como método de agrupamiento UPGMA. Los números de los nodos indican el porcentaje obtenido.	66
Figura 14. Análisis de coordenadas principales de poblaciones de cinco especies de <i>Tagetes</i> con base en el análisis por marcadores ISSR.	67
Figura 15 Método de rede. Media joining de 15 accesiones de <i>Tagetes</i> obtenidos de por marcadores ISSR. F: <i>T. filifolia</i> , M: <i>T. minuta</i> , Mu: <i>T. multiflora</i> , T: <i>T. terniflora</i> y Z: <i>T. zypaquierensis</i>	71
Figura 16. Análisis de agrupacion de cinco especies de <i>Tagetes</i> usando SplitsTree. F: <i>T. filifolia</i> , M: <i>T. minuta</i> , Mu: <i>T. multiflora</i> , T: <i>T. terniflora</i> y Z: <i>T. zypaquierensis</i>	72
Figura 17. Análisis de agrupamiento de cinco especies de <i>Tagetes</i> usando SplitsTree. F: <i>T. filifolia</i> , M: <i>T. minuta</i> , Mu: <i>T. multiflora</i> , T: <i>T. terniflora</i> y Z: <i>T. zypaquierensis</i>	73

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia Hugo, Mari, Gaby y Sebas, que me han brindado su apoyo incondicional cada día de mi vida.

A mis amigos por compartir momentos especiales de amistad y aprendizaje durante todo el tiempo que hemos pasado juntos.

AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento especial a Dios por darme la vida, la salud, el trabajo y la fortaleza necesarios para salir adelante y llegar a culminar una etapa más de mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) que hizo posible mis estudios de Posgrado.

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Departamento de Fitotecnia, por brindarme la oportunidad de formar parte de su alumnado y por el apoyo otorgado para llevar a cabo esta investigación.

A mi comité asesor, por su valiosa dirección, paciencia, disponibilidad, responsabilidad, sobre todo por sus enseñanzas que contribuyeron a la culminación de este trabajo.

A mis amigos que al compartir ideales semejantes han contribuido para que se haga realidad el cumplimiento de una meta más.

A mis maestros y autoridades, por sus conocimientos impartidos durante el periodo académico.

Mil gracias a todos los que contribuyeron en la culminación de esta investigación.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales:

Nombre: Christian Iván Zapata Maldonado

Fecha de nacimiento: 21 de julio de 1987

Lugar de nacimiento: Buenos Aires-Argentina

Número de cedula de identidad: 171742946-6

Desarrollo académico:

Bachillerato en Bioquímica

Ingeniería en Biotecnología

Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola

RESUMEN

COMPOSICIÓN QUÍMICA Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ALGUNAS ESPECIES DE *Tagetes*

CHEMICAL COMPOSITION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF SOME SPECIES OF *Tagetes*

En el estudio de plantas aromáticas, como el caso de *Tagetes* (Asteraceae), los análisis del perfil químico de los aceites esenciales y del perfil molecular constituyen una información básica para la conservación y aprovechamiento de estos recursos naturales. La actividad biológica del aceite esencial de algunas especies de *Tagetes* contra plagas y enfermedades abre expectativas interesantes para el uso del taxón como fuente de bioplaguidas; sin embargo, aún se desconoce la composición química del aceite esencial de la mayoría de las especies de *Tagetes*, y por otra parte, es escasa la información molecular del taxón. Para avanzar en la caracterización de este recurso fitogenético, en el presente trabajo se describe la composición del aceite esencial y un perfil molecular básico por ISSR para variabilidad genética considerando cinco especies de Sudamérica y una de Norteamérica. Utilizando un procedimiento de GC/MS se determinaron los compuestos mayoritarios siguientes: anetol (66.9 %) y estragol (31.6 %) en *T. filifolia*; *trans*-tagetona (52.7 %) y 4-etil-4-metil-1-hexeno (25.5 %) en *T. terniflora*; *trans*-tagetona (33.9 %) y 4-etil-4-metil-1-hexeno (13.8 %) en *T. minuta*; *trans*-tagetona (17.9 %), 4-etil-4-metil-1-hexeno (39.7 %), ácido valérico (43.4 %) y verbenona (24.3 %) en *T. zypaquirensis*; *trans*-tagetona (30.9 %) y *trans*-ocimeno (25.6 %) en *T. multiflora*. El uso de marcadores ISSR en cinco especies de Sudamérica permitió detectar 194 bandas totales, de las cuales 193 bandas presentan 100 % de polimorfismo, indicando alta diversidad genética en el material estudiado.

Palabras clave: Asteraceae, caracterización química, aceites esenciales, variabilidad genética, ISSR, polimorfismo.

In the study of aromatic plants, such as the case of *Tagetes* (Asteraceae), analyzes of the chemical profile of essential oils and molecular profile are basic information for the conservation and use of these natural resources. The biological activity of the essential oil of some *Tagetes* species against pests and diseases opens interesting expectations for the use of the taxon as a source of bioplaguidas; However, the chemical composition of the essential oil of most species of *Tagetes* is still unknown, and on the other hand, the molecular information of the taxon is scarce. In order to progress in the characterization of this plant genetic resource, the present work describes the composition of the essential oil and a basic molecular profile by ISSR for genetic variability considering five species of South America and one of North America. Using a GC / MS procedure, the following major compounds were determined: anethole (66.9 %) and estragol (31.6 %) in *T. filifolia*; *Trans*-tagetone (52.7 %) and 4-ethyl-4-methyl-1-hexene (25.5 %) in *T. terniflora*; *Trans*-tagetone (33.9 %) and 4-ethyl-4-methyl-1-hexene (13.8 %) in *T. minuta*; *Trans*-tagetone (17.9 %), 4-ethyl-4-methyl-1-hexene (39.7 %), valeric acid (43.4 %) and verbenone (24.3 %) in *T. zypaquirensis*; *Trans*-tagetone (30.9 %) and *trans*-ocimeno (25.6 %) in *T. multiflora*. The use of ISSR markers in five species of South America allowed to detect 194 total bands, of which 193 bands present 100% polymorphism, indicating high genetic diversity in the studied material.

Keywords: Asteraceae, chemical characterization, essential oils, genetic variability, ISSR, polymorphism.

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

El género *Tagetes* (*Asteraceae*) se conforma de aproximadamente 53 especies distribuidas en el Continente Americano, la mayoría se localiza en México (List, 2015). Estas plantas tienen propiedades biológicas contra organismos dañinos a cultivos de importancia económica: bacterias, hongos, nematodos, insectos y malezas (Serrato Cruz y Quijano, 1993). Tales propiedades de *Tagetes* se deben a la presencia de metabolitos secundarios como alcoholes, éteres, ésteres, aldehídos, cetonas, flavonoides y tiofenos (Duke, 2009) que actúan como defensas químicas contra plagas y enfermedades. En forma natural, estos compuestos químicos pueden ser liberados por volatilización, exudados radiculares, lixiviación y por descomposición de residuos (Halbrendt, 1996). Mediante manipulación de la materia vegetal se ha logrado obtener sustancias vegetales como polvos, extractos (acuosos o con solventes) y aceites esenciales que se han evaluado por su efecto contra plagas. En el caso de algunas especies de *Tagetes*, los extractos vegetales presentan efectos antimicóticos, por ejemplo, extractos acuosos y polvos de hojas, flores y raíz de *T. erecta* tienen efecto fungicida contra *Drechslera oryzae*, *Pyricularia oryzae* y *Uromyces phaseoli* (Grainge y Ahmed, 1988). También se ha evidenciado el efecto de aceites de *T. patula* y *T. erecta* contra nematodos como *Rhотilenchus sanguineus*, *Phlebotomus duboscqi*, *Pratylenchus penetrans* y *Meloidogyne incognita* que afectan las cosechas de tomate y papa (Ploeg, 1999; Ploeg y Maris, 1999). No obstante las buenas referencias sobre el aceite de *Tagetes*, éstas principalmente se han obtenido usando las especies cultivadas *T. erecta* y *T. patula*, por lo tanto, es claro que son pocos los estudios sobre composición química de los aceites esenciales de la mayoría de las especies de *Tagetes* y poca la exploración de su efecto tóxico (Serrato-Cruz, 2014); es decir, en la perspectiva de estudio de estos recursos fitogenéticos para su aprovechamiento, su caracterización es necesaria.

En cuanto a caracterización molecular de *Tagetes*, los antecedentes son escasos, aunque la referencia de registro de una patente para hacer

transgenosis en el género para sobreexpresión de carotenoides o de metabolitos secundarios pone en duda si realmente no hay tal caracterización de este taxa; mientras no se publique al respecto, son pertinentes los estudios que se realicen, especialmente porque estos recursos naturales se encuentran en sus áreas de distribución, principalmente en América de donde el género es endémico, desde el sur de Estados Unidos hasta la Patagonia, en Sudamérica (Turner, 1996). Un reciente estudio sobre el perfil molecular de especies y poblaciones de *Tagetes*, importantes por su producción de aceites (Campos *et al.*, 2012), expone la primera aproximación de la diversidad molecular de varias especies, más de las que Lockerman *et al.* (2003) reportan, aunque hay que resaltar el trabajo que hicieron esos autores al analizar filogenéticamente 21 géneros de la tribu Tageteae (Asteraceae) donde se encuentra *Tagetes*, mediante secuencias de espaciadores transcritos internos (ITS) y secuencias del gen *ndhF*, y cuyos resultados solamente consideran seis especies del taxa en cuestión.

De las 56 especies de *Tagetes* distribuidas en América de forma natural (Soule, 1993), 32 se encuentran en América del Norte y 24 en América Sur, en un rango muy amplio de condiciones ambientales, especialmente en zonas de montaña con variantes de clima templado y transicional. La presencia en México de la mayor parte de taxones en México evidencia el origen evolutivo del género y de su diversidad (Serrato, 2014); no obstante, las escasas investigaciones sobre el análisis de regiones conservadas del ADN de algunos materiales de Sudamérica indican que el origen genético del género se encuentra en esa área (Fucks, 1965). En el trabajo de Lockerman *et al.* (2003) y en la base de datos del GenBank se reportan secuencias de bases mediante ITS que dan idea parcial sobre la filogenia del género, pero todavía no se tiene un resultado concluyente, sobre todo porque no se han incluido todos los taxones de *Tagetes* ni planteado hipótesis plausibles que guíen los trabajos sobre análisis molecular.

En general, el análisis molecular puede arrojar información para comprender la función de una proteína o determinar porqué una población es resistente a

una determinada enfermedad, o resolver un caso legal; o para establecer el árbol filogenético, y conocer las relaciones de parentesco que hay entre especies (Sunnucks, 2000). La caracterización molecular que se haga sobre *Tagetes* constituirá importante información para considerar aplicar mejoramiento genético convencional y para entender la filogenia del género.

Tomando en cuenta los antecedentes limitados sobre caracterización química molecular de *Tagetes*, especialmente las de condición ruderal, ya que es abundante la información sobre las especies cultivadas *T. erecta* y *T. patula*, en el presente trabajo, que expone dos investigaciones particulares (Capítulos III y IV), se proponen los objetivos e hipótesis siguientes.

1.1 Objetivos

Describir el contenido de compuestos químicos en el aceite esencial de especies de *Tagetes* originarios del norte y sur de América, con la finalidad de contribuir a la fitoquímica del género.

Caracterizar ejemplares del género *Tagetes*, basada en marcadores moleculares ISSR, y evaluar la variabilidad genética, con el fin de avanzar en la identificación de la diversidad del taxa y su conservación, y aportar ideas sobre el origen de estos recursos naturales americanos.

1.2 Hipótesis

Si se practica cromatografía de gases y espectrometría de masas para analizar el aceite esencial obtenido por hidrodestilación de especies de *Tagetes* originarias del norte y sur de América, se espera que su composición química varíe en relación con su origen geográfico.

Si se emplean las técnicas de marcado molecular ISSR en especies de algunos ejemplares de *tagetes* de Sudamérica se tendrá idea de su diversidad y relaciones genéticas.

REVISIÓN DE LITERATURA

1.3 Las plantas aromáticas

Las plantas aromáticas se han cultivado desde tiempos inmemoriales con fines farmacéuticos y culinarios (Mansaray, 2000; Dixon, 2001; Ottaway, 2001) por sus propiedades que otorgan algunos compuestos químicos obtenidos de diversas partes de la planta, tales como flores, hojas, tallos, semillas, raíces y frutos (Brenes y Roura, 2010; Negi, 2012). A estas plantas se les considera productos de gran interés social, cultural, culinario y medicinal (Fernández, 2006), ya que producen principios activos, los cuales propician cambios en el funcionamiento del organismo para aliviar síntomas de malestar o restablecer el equilibrio orgánico del mismo (Calixto, 2005). Sus compuestos, conocidos también como metabolitos secundarios, responden a condiciones ambientales de estrés o son una manifestación de la individualidad del organismo que los contiene y, generalmente, están relacionados con la interacción con otros organismos (función ecológica, no fisiológica), tales como la reproducción, la comunicación, la competencia y la protección contra la depredación y la infección (Gros, 1985; Marcano y Hasegawa, 2002). Además de que juegan un rol importante, no sólo en los sistemas de producción tradicionales, sino también en los mercados internacionales (Martínez, 2005), y más de dos tercios de las especies vegetales del mundo se originan en los países en vías de desarrollo (Kossmann, 1999).

Las familias botánicas Asteraceae (Compositae) y Lamiaceae son las más importantes por el número de representantes (Del Vitto y Petenatti, 2009); la primera abarca 1, 911 géneros y 32, 913 especies, y la segunda se compone de 245 géneros y 7, 886 especies (List, 2015). La familia Asteraceae es de interés como alimenticias, oleaginosas, ornamentales y medicinales, además de que incluye a numerosas malezas. Por su parte, la familia de las Lamiaceas poseen aceites esenciales, muy apreciadas como condimentos, licorerías y como medicinal y ornamental (Farias, 1994).

1.4 Distribución de las plantas aromáticas

La distribución de las plantas aromáticas está condicionada fundamentalmente, por factores ecológicos como el suelo, el clima (Cases, 2007), nutrición, disponibilidad de agua, cantidad e intensidad de luz. (Burbott y Loomis, 1967). Por lo que los metabolitos secundarios de las plantas pueden variar considerablemente a nivel intraespecífico dependiendo del genotipo y la localización geográfica (Muñoz *et al.*, 2007; González *et al.*, 2011).

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular (Sepúlveda *et al.*, 2003), que no intervienen directamente en los procesos de crecimiento y diferenciación, ni son esenciales en los metabolismos básicos de fotosíntesis y respiración de las plantas (Theis y Lerda, 2003). Estos compuestos pueden actuar como atrayentes en el caso de polinizadores o repelentes en situaciones de peligro (Ávalos y Pérez, 2009), pueden tener efecto biológico contra bacterias, hongos, ácaros, nematodos, e insectos de importancia económica y urbana (Koul *et al.*, 2008), o bien, pueden ser responsables de la acción farmacológica de las plantas sobre el organismo (FUNDAQUIM, 2005).

Las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario del carbono (Marcano y Hasegawa, 2002) (Figura 1).

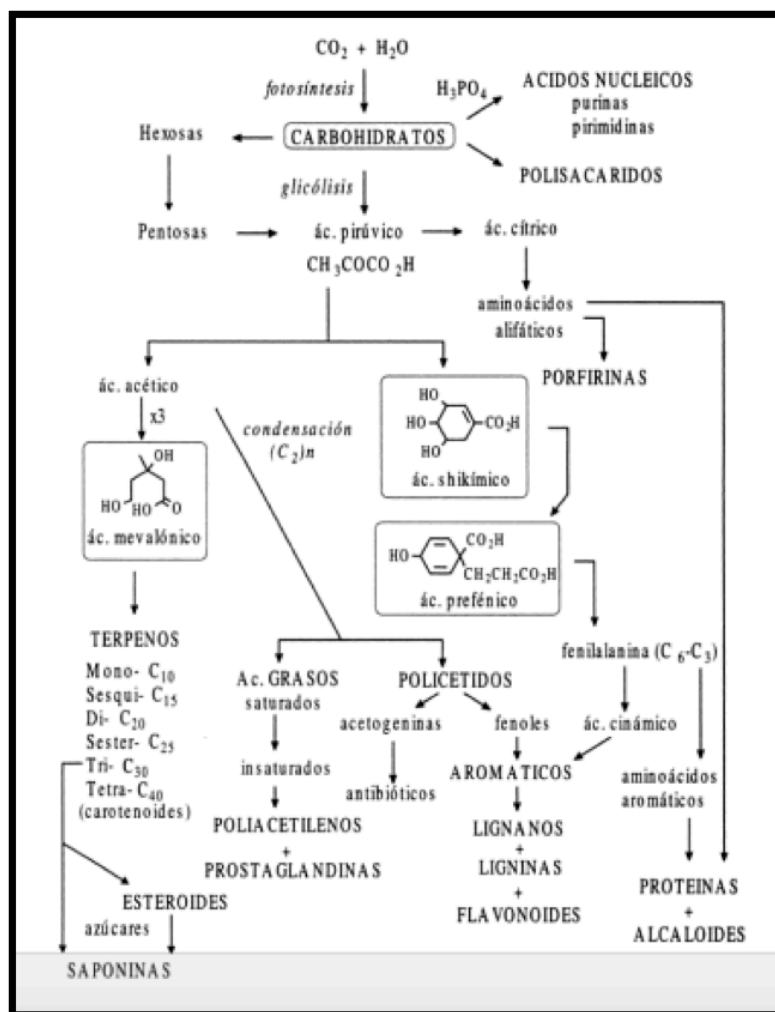


Figura 1. Esquema general de la biosíntesis de los metabolitos secundarios (Marcano y Hasegawa, 2002).

La Figura 1 ilustra la biosíntesis de los diversos metabolitos secundarios, donde se observa que los fragmentos pequeños se recombinan para generar grandes moléculas. Se observa cómo los metabolitos secundario se forman por distintas vías y cómo, siguiendo el criterio biogenético, una misma clase de compuestos por ejemplo los alcaloides, pueden tener varios orígenes” (Marcano y Hasegawa, 2002).

Actualmente se conocen aproximadamente 20,000 estructuras de metabolitos secundarios (MS) que, por su composición química, son clasificados en dos grupos principales: nitrogenados y no nitrogenados. Los MS que contienen nitrógeno incluyen a los alcaloides, aminoácidos no

protéicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos. Los MS no nitrogenados se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides (Sepúlveda *et al.*, 2003).

1.5 Biodiversidad

Según la Convención de Diversidad Biológica, la biodiversidad se define como la variabilidad que hay entre los organismos vivos incluyendo el medio en el que se originan el cual puede ser terrestre, marino o aéreo, así como los complejos ecológicos de los cuáles forman parte. La biodiversidad determina la forma en que las poblaciones de organismos vivos interactúan entre sí, con su ambiente, y la forma en que evolucionan y persisten a través del tiempo (Tilman *et al.*, 2006).

1.6 Variabilidad genética y filogenia

La variabilidad genética se refiere a las variaciones que hay entre el genoma de los organismos, individuos de una misma población o entre diferentes especies y son resultado de su interacción con el medio ambiente. Consisten en la sustitución, eliminación o adición de uno o más nucleótidos en su genoma. Dichas mutaciones pueden producir nuevos fenotipos en los individuos de una población y llevar a la formación de nuevas especies. El estudio de este tipo de mutaciones producidas a través del tiempo en la historia de las especies es conocido como filogenia, y su investigación produce una secuencia ramificada del cambio de caracteres en los organismos a través del tiempo, el cual se conoce como árbol filogenético (Sunnucks, 2000).

1.7 Sistemática molecular

La sistemática molecular trata de comprender el origen y diversificación de la vida a partir de la información contenida en la molécula del ADN. Este objetivo se construye en torno a dos postulados básicos, que la vida en la

tierra tiene un origen común y que los organismos contienen caracteres heredables potencialmente informativos de su historia evolutiva (Swofford y Olsen, 1990)

Las especies cuentan con un código evolutivo, que se refiere a las contingencias históricas y biológicas que han sufrido las entidades taxonómicas después de su origen común (Limpscom, 1998).

El estudio filogenético del código evolutivo presenta varios retos, pues el código evolutivo solo puede asociarse entre organismos taxonómicamente relacionados y el muestreo de material genético que se puede hacer es limitado, debido a la gran cantidad de organismos y poblaciones que existen en el planeta ya que no se puede acceder al material genético de organismos ya extintos. Para poder resolver estos inconvenientes, la sistemática molecular ha producido análisis bioestadísticos con los cuales se pueden asociar las diferencias genéticas de distintos organismos, con los eventos del código evolutivo y la divergencia de las especies. Además hace uso de técnicas que emplean marcadores moleculares con el objetivo de conseguir la estructura genética de las poblaciones, la delimitación de especies y la inferencia filogenética (Ornelas *et al.*, 2013).

1.8 Marcadores moleculares

Todos los organismos presentan características que pueden ser genotípicas o fenotípicas que permiten diferenciarlos y etiquetarlos. Dichas características reciben el nombre de marcadores. Desde el inicio de la agricultura y la domesticación de animales, los humanos han hecho uso de los caracteres morfológicos (características asociadas a la apariencia del organismo como son el tamaño de las hojas, forma de las flores, color del pelaje, número de dientes, entre otros.) para hacer una crianza selectiva de diferentes organismos con características más útiles para las actividades humanas, ya sea agricultura, ganadería, cacería, etc. También se ha hecho uso de marcadores bioquímicos como enzimas, metabolitos secundarios o

proteínas que son únicas en un tejido u organismo y pueden permitir la identificación de individuos. Sin embargo, el uso de los marcadores fenotípicos antes mencionados presenta algunos problemas ya que su expresión se ve muy influenciada por el entorno o por un estadio particular del desarrollo de un organismo, por lo cual pueden variar de acuerdo a la edad y efectos del medio ambiente (Novo *et al.*, 2012).

Debido a estos problemas, se empezó a utilizar marcadores moleculares en la identificación de organismos. Los marcadores moleculares son secuencias de nucleótidos al interior del genoma de un organismo, las cuales se repiten en todos los individuos de una especie y en todas las formas de vida, presentan suficientes variaciones entre individuos o grupos de individuos y permiten una clasificación coherente (Campos *et al.*, 2012)

1.9 ISSR

Las Secuencias Simples Iter Repetidas (ISSR en inglés) son secuencias cortas, de 2 a 10 pares de bases que se encuentran en serie y repetidas a lo largo de un genoma; son secuencias altamente variables en el número de las unidades que las integran, lo que hace que su análisis sea extremadamente útil en la búsqueda de polimorfismos. Los amplicones obtenidos pueden ser utilizados para la diferenciación de individuos y la identificación de variedades de una misma especie (Valadez y Kahl, 2000). Su uso también es muy importante en programas de conservación de especies en peligro de extinción, como la hierba Neera-Brahmi (*Bacopa monnieri*), la cual es una planta medicinal muy importante en India, y cuya sobre-explotación ha llevado a la necesidad de identificar adecuadamente los materiales silvestres que aún existen, mediante el uso de marcadores ISSR (Tripathi *et al.*, 2012). También se han usado para determinar la diversidad de la especie *Thuja sutchuenensis*, una conífera china de mucho valor por su madera y que fue redescubierta en 1999 tras pensarse extinta. Los análisis de microsatélites revelaron que la diversidad de esta especie en los pocos nichos donde sobrevive, es muy baja y por lo tanto, se encuentra

en peligro de extinción (Lui *et al.*, 2013).

1.10 Tagetes

La familia Asteraceae se distribuye en todo el mundo y ocupa el segundo lugar en dispersión después de la familia Gramineae (Strother, 1997). En México la familia Asteraceae forma uno de los principales centros de diversificación, las estimaciones indican que México incluye unos 362 géneros y 3 021 especies de la familia, de las cuales 65.9 % son especies endémicas (Villaseñor, 2003).

La tribu Tageteae es nativa de América, principalmente en hábitats xéricos, moderados y extremos. Las Sierras Madre Occidental y Oriental de México, desde el norte de Coahuila hasta Oaxaca, son las regiones de mayor distribución (Strother, 1997).

Para el género *Tagetes* se han referido alrededor de 53 especies distribuidas en el Continente Americano desde el suroeste de Estados Unidos hasta el sur de Argentina (List, 2015), y la mayoría de las cuáles se localizan en México (Turner, 1996). “Esta diversidad, ubica a México como “centro de origen y diversidad de *Tagetes* en el mundo, o al menos como un centro de radiación evolutiva del género (Serrato, 2010).

1.10.1 Género *Tagetes* como modelo de estudio

Las especies del género *Tagetes* se han estudiado por sus propiedades antagonistas, además de considerarlas como una alternativa potencial en el manejo de plagas y enfermedades en la agricultura (Zavaleta y Gómez, 1995), ya que varias especies de este género se consideran una fuente importante de compuestos insecticidas (Green *et al.*, 1991) y propiedades hipotensoras, espasmolíticos y anti inflamatorios y está adquiriendo importancia comercial debido a sus diversas actividades biológicas (Krishna *et al.*, 2005).

Varios investigadores (Jacobs *et al.*, 1995; Ploeg, 1999; Ploeg y Maris, 1999; Alexander y Waldenmaier, 2002; Irinyi, Lackner *et al.*, 2015; Sanches *et al.*, 2012) han realizado trabajos sobre el efecto biocida de algunas especies de *Tagetes* contra parásitos que afectan las cosechas de tomate y papa. Entre las especies ensayadas están *T. patula*, *T. minuta* y *T. erecta* las cuales reducen la presencia de nematodos.

También se han realizado trabajos de regeneración de tejidos en diferentes especies de *Tagetes* (Vanegas *et al.*, 2002; Yingchun *et al.*, 2011; Mohamed *et al.*, 1999), para permitir el desarrollo de materiales transgénicos que conduzcan a aumentar o mejorar la producción de luteína, un carotenoide que es utilizado como pigmento en la industria alimentaria (Peña *et al.*, 2004).

Los trabajos de caracterización molecular del género *Tagetes* son escasos. Un ejemplo es la caracterización molecular de 11 materiales híbridos del género *Tagetes* que fueron seleccionados por su capacidad de producción de aceites. Se empleó la técnica de RAPD usando iniciadores de la serie OPM, con lo cual pudieron establecer la correlación entre dichos materiales y las especies de origen de los híbridos (Campos *et al.*, 2012). También se ha realizado un trabajo de análisis filogenético de 21 géneros de la tribu Tageteae que se encuentra dentro de la familia Asteraceae y abarca al género *Tagetes*. En esa investigación se usaron secuencias de espaciadores transcritos internos (ITS) y secuencias del gen *ndhF* (Lockerman *et al.*, 2003).

1.10.2 Clasificación taxonómica y distribución geográfica

El género *Tagetes* se distribuye desde el suroeste de Estados Unidos hasta el sur de Argentina. En México se han encontrado 32 de las 56 especies hasta ahora descubiertas y se localizan en diferentes estados a lo largo del país. Diferentes autores han intentado clasificar las diferentes especies del género *Tagetes* basándose en el estudio de sus características

morfológicas, pero debido a que estas especies presentan marcadas similitudes, se ha dado pie a confusiones en su clasificación taxonómica, por lo cual existen diferentes nombres que son sinónimos de una misma especie o bien, algunos ejemplares, considerados especies independientes, ahora son reconocidos como miembros de la misma especie, un ejemplo es *T. tenuifolia* y *T. peduncularis* que se han nombrado como *T. lunulata* (Serrato, 2010). También está el caso de la incorporación de *Addenopapus persicaefolius* al género *Tagetes* con aporoyo de evidencia molecular (Loockerman *et al.*, 2003). Durante el periodo 2003-2009, se inicio el proyecto Red *Tagetes* del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos (SINAREFI) de la SAGARPA con el fin de recabar y analizar la información disponible sobre las especies del género *Tagetes* cuyo centro de origen y diversidad genética este en México. En el Cuadro 1 se muestra la clasificación taxonómica del género *Tagetes* obtenida del Sistema Integrado de Información Taxonómica (SIIT 2012).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del género *Tagetes* (SIIT 2012)

Reino	Plantae
Subreino	Viridaeplantae
Infrareino	Streptophyta
División	Tracheophyta
Subdivisión	Spermatophytina
Infradivisión	Angiospermae
Clase	Magnoliopsida
Superorden	Asteranae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Tribu	Tageteae
Género	Tagetes

1.10.3 Características morfológicas del género *Tagetes*

La morfología general de las plantas del género *Tagetes* distingue al taxa por tener hojas de tipo pinnado y tallos que crecen desde 1 cm hasta 2 m de altura dependiendo de la especie. Sus flores son de tipo ligulado con un tamaño que va de 1 a 2 cm y crecen alrededor de la planta en forma radial o

de disco con un diámetro de 4 a 6 cm. Las flores pueden presentar colores rojo, naranja, amarillo, y blanco (Serrato, 2010). En el cuadro 2, se muestran algunas de las características de algunos individuos del género *Tagetes* (Serrato, 2010; CONABIO, 2012), y en la Figura 2 se muestran fotografías de algunos ejemplares del género *Tagetes*, algunas pertenecen a CONABIO (2012) y otras tomadas en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, campus Aeropuerto (Campos *et al.*, 2012).

Cuadro 2. Características morfológicas de algunas especies del género *Tagetes* (Serrato, 2010; CONABIO, 2012).

Especie	Altura del tallo (cm)	No. De pétalos	Color de flores	Tamaño de flores (mm)	Color de cabezuelas	Germinación
<i>T. lululata</i>	10 a 80	20 a 35	Amarillas	7 a 10	Verdes	Anual/herbácea
<i>T. foetidissima</i>	20 a 80	4 a 8	Amarillo verdoso	5 a 6.5	Verdes	Anual/herbácea
<i>T. multiflora</i>	20	7 a 14	Amarillas	2 a 4	Moradas o amarillas	Anual/herbácea
<i>T. coronopifolia</i>	50	5 a 20	Amarillas	2 a 4	Moradas	Anual/herbácea
<i>T. linifolia</i>	20 a 40	40 a 60	Amarillo anaranjado y rojo	5 a 12	Verdes	Perenne/herbácea
<i>T. lemmoni</i>	30 a 100	30 a 60	Amarillas	10 a 15	Verdes	Perenne/herbácea
<i>T. stenophylla</i>	50 a 100	3 a 60	Amarillo rojizo	8 a 12	Radiales	Perenne/herbácea
<i>T. patula</i>	20 a 85, color morado	56 a 70	Rojo, naranja, amarillo	8 a 13	Verdes	Anual/herbácea
<i>T. persicaefolia</i>	10 a 200	7 a 8	Amarillas	8 a 12	Verdes	Anual/herbácea
<i>T. erecta</i>	40 a 60	40 a 90	Amarillo anaranjado	10 a 15	Verdes	Anual/herbácea
<i>T. moorei</i>	8 a 40	10 a 20	Amarillas	8 a 10	Verdes	Anual/herbácea
<i>T. parryi</i>	30 a 50	50 a 60	Amarillas	12 a 20	Verdes	Anual/herbácea
<i>T. minuta</i>	150	3 a 5	Amarillas	0.5 a 1	Verdes	Anual/herbácea
<i>T. terniflora</i>	160	3 a 5	Amarillas	0.5 a 1	Rojas o amarillas	Anual/herbácea
<i>T. lucida</i>	100	5 a 8	Amarillas	6 a 7	Verdes	Perenne/herbácea
<i>T. arenicola</i>	30 a 60	5 a 6	Amarillo anaranjado	6 a 7	Verdes	Anual/herbácea
<i>T. filifolia</i>	10 a 40	3 a 9	Amarillas	3 a 3.5	Verdes	Anual/herbácea
<i>T. micrantha</i>	10 a 50	4 a 10	Amarillas	3 a 3.5	Verde oscuro	Anual/herbácea
<i>T. subulata</i>	10 a 50, color púrpura	10 a 20	Amarillo anaranjado	7 a 10	Café o Negro	Anual/herbácea

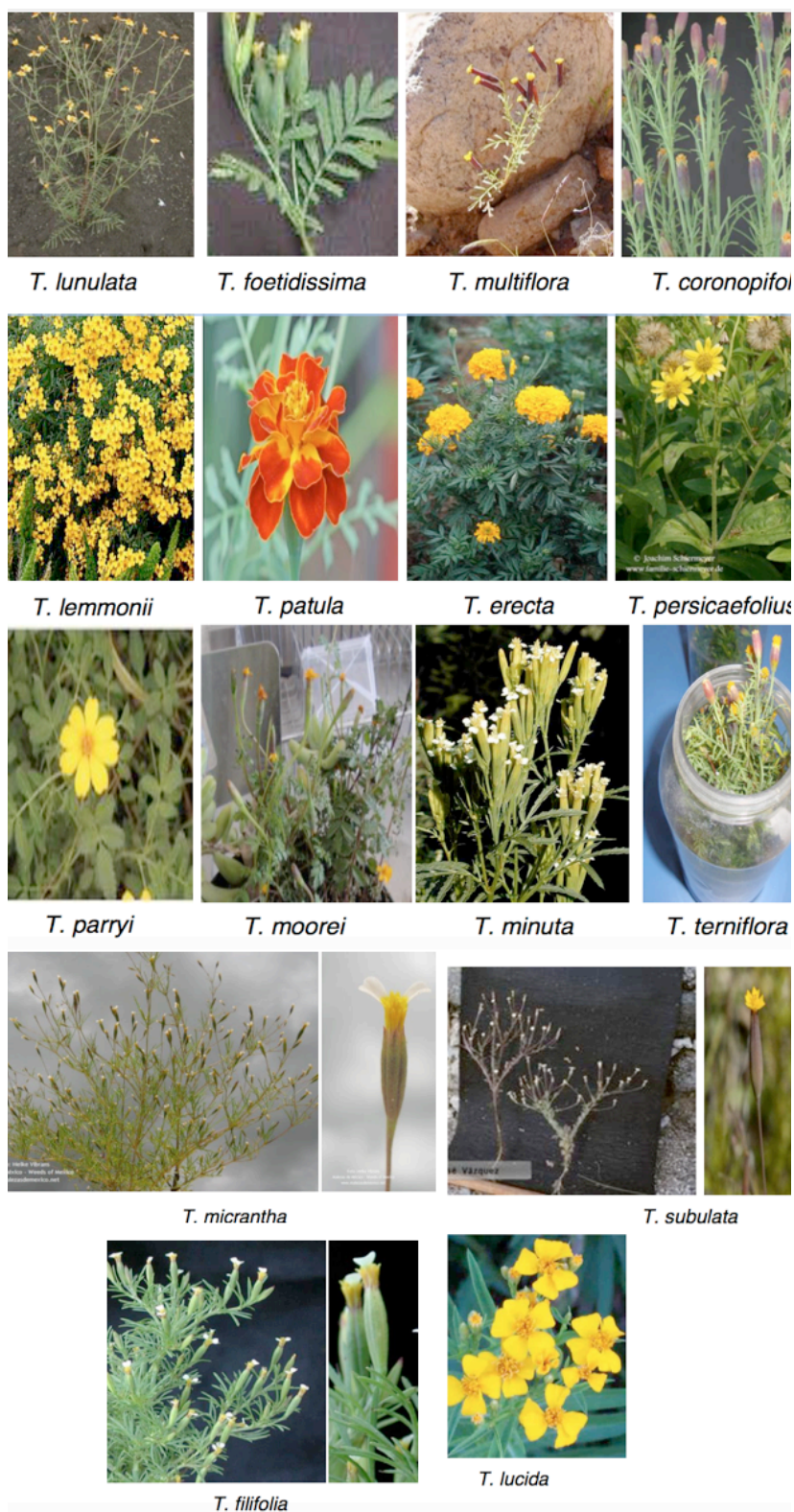


Figura 2. Fotografía de ejemplares del género *Tagetes* (CONABIO, 2012).

1.10.4 Importancia histórica del género *Tagetes*

Las plantas del género *Tagetes* se han utilizado desde la época prehispánica por los grupos mesoamericanos. Estos usos fueron descritos en el Códice

Florentino por fray Bernardino de Sahagún en el siglo XVI. Un ejemplo es *T. lúcida* conocida en náhuatl como Yauhtli, usada como aromatizante y ofrenda en las festividades del fuego y de la lluvia. También se utilizó como remedio medicinal para tratar la fiebre y las úlceras. Otro ejemplo es *T. tenuifolia* o *Tzitziquilitl* que fue empleada como hierba comestible. Los indígenas también emplearon *T. erecta* conocida como Cempoalxóchitl (flor de muerto), planta de ornato en los templos y casas durante las fiestas del sol y las fiestas de los muertos (Serrato, 2010).

En la actualidad, la flor de Cempoalxóchitl aún se usa en la medicina tradicional como antiparasitario, antiespasmódico y en el tratamiento del estómago, bazo, e hígado (Del Villar, 2007). Dado su alto contenido de carotenoides, en especial la luteína, las flores de Cempoalxóchitl se utilizan en la industria alimentaria como aditivo en el alimento de aves de corral, peces y crustáceos con el fin de mejorar la pigmentación de su piel y hacerlos más atractivos para su consumo (Peña *et al.*, 2004). Los carotenoides de Cempoalxóchitl y de otras variedades de *Tagetes* son de importancia medicinal y pueden emplear en el tratamiento de enfermedades humanas. Un ejemplo son las Xantofilas o el β -Caroteno (precursor de la vitamina-A), los cuales tienen actividad antioxidante y protegen del daño provocado por los radicales libres, responsables de varias enfermedades degenerativas como arteroesclerosis, artritis y carcinogénesis (Salinas y Pacheco, 2003).

Debido a que el uso de pesticidas en los cultivos presenta algunos problemas como son costo elevado, generación de resistencia por parte de las plagas además de un impacto nocivo en el ambiente, se están buscando alternativas que puedan evitar estos inconvenientes. Ejemplares del género *Tagetes* como *T. minuta*, *T. patula* y *T. erecta* contienen terpenos y tiofenos con capacidad acaricida y pesticida que pueden ser utilizados en cultivos de tomate y papa (Jacobs *et al.*, 1995; Ploeg, 1999; Ploeg y Maris, 1999; Alexander y Waldenmaier, 2002; Ireri *et al.*, 2010; Sanches *et al.*, 2012; García *et al.*, 2012) en forma de extracto o bien como un co-cultivo, con el fin de eliminar las plagas que dañan tales cosechas. *Tagetes minuta* se refiere

a menudo como una mala hierba. Cabrera (1971) afirma que "... Spegazzini menciona que esta planta es una maleza común de cultivo en el valle inferior del Río Negro ..." Spegazzini y Cabrera parecen no entender la perspectiva nativa de "malezas". Los agricultores ven las "malas hierbas" como una segunda cosecha. Muchos de los agricultores latinoamericanos que no practican la agricultura industrializada dejarán plantas voluntarias de *Tagetes minuta* en sus campos. Esta segunda cosecha es beneficiosa de varias maneras: primero, el crecimiento rápido de *T. minuta* rápidamente matiza otras especies de plantas que pueden ser de menor uso para el agricultor, segundo, puede ser cosechado para uso personal, o para la venta en los mercados de la ciudad, y tercero, se ha informado que ayuda a retener la humedad en el campo (Jimenez Osornio, 1991).

Tagetes minuta se cultiva comercialmente y se cosecha por sus aceites esenciales que se utilizan en la industria del sabor y el perfume como "Aceite de *Tagetes*". El aceite se usa en perfumes y como componente de sabor en la mayoría de los principales productos alimenticios, incluyendo bebidas de cola, bebidas alcohólicas, postres congelados de productos lácteos, caramelos, productos horneados, gelatinas, pudines, condimentos y condimentos. Brasil es uno de los principales productores de *T. minuta* para Tagetes Oil (Craveiro *et al.*, 1988).

1.10.5 Aceites esenciales

Para Tisserand y Young (2014), los aceites esenciales son mezclas de compuestos orgánicos volátiles, procedentes de una sola fuente botánica, y que contribuyen al sabor y fragancia de una planta. Para Greathed (2003) y González *et al.* (2011), los aceites esenciales son mezclas complejas de metabolitos secundarios, en la que la mayor parte la conforman componentes alifáticos de bajo peso molecular, como ácidos, alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas y ésteres; asimismo, fenilpropanos, terpenos y terpenoides.

No obstante las diferencias conceptuales, los aceites esenciales comparten características físicas, como el que son líquidos, volátiles, transparentes y rara vez coloreados, soluble en lípidos y soluble en disolventes orgánicos con una densidad generalmente más baja que la del agua. Estos pueden ser sintetizados por toda la planta o en órganos, es decir, brotes, flores, hojas, ramas, semillas, frutas, raíces, madera o corteza, y se almacenan en las células secretoras, cavidades, canales, las células epidérmicas (Bakkali *et al.*, 2008).

Conviene resaltar que desde la Edad Media los árabes ya obtenían aceites esenciales por vapor o hidrodestilación y que se conocían por sus propiedades antisépticas, es decir, bactericida, viricida y fungicida, además de sus propiedades medicinales y su fragancia (Bakkali *et al.*, 2008).

1.10.6 Componentes de los aceites esenciales

La composición de los aceites pueden variar con base en la constitución genética de la especie y las condiciones agronómicas en que se desarrollan las plantas (Krishna *et al.*, 2002; Sefidkon *et al.*, 2004), es decir, el clima, la composición del suelo, órgano de la planta, la edad y la etapa del ciclo vegetativo (Masotti *et al.*, 2003; Angioni *et al.*, 2006); o a la heredabilidad, entendiéndola como la proporción de variación fenotípica total que se deben a efectos genéticos son reflejadas en la descendencia (Pérez *et al.*, 2000), o la proporción de la varianza genética aditiva de la varianza fenotípica.

De manera general, los aceites esenciales pueden contener alrededor de 20 a 60 compuestos a diferentes concentraciones (Bakkali *et al.*, 2008). Son dos o tres los componentes principales que se caracterizan por encontrarse en concentraciones relativamente altas (20 a 70 %) en comparación con otros componentes presentes en cantidades traza (Pichersky *et al.*, 2006). El principal grupo está compuesto de terpenos y terpenoides y el otro por compuestos aromáticos y constituyentes alifáticos, todos caracterizados por un bajo peso molecular. Los terpenos se forman a partir del isopreno (unidad de cinco átomos de carbono). La biosíntesis de los terpenos consiste en la

síntesis del isopentenil difosfato (IPP) o isopreno activo, el IPP se isomeriza para formar dimetil alil pirofosfato, precursor de varias clases de terpenos.

En lo que respecta a los compuestos aromáticos derivados de fenilpropano se dan con menor frecuencia que los terpenos. La vía biosinética relativa a los terpenos y derivados de fenilpropanos generalmente están separados en las plantas, pero pueden coexistir en *algunas especies* (Bakkali et al., 2008).

1.11 Distribución de los aceites esenciales en las plantas

Los aceites esenciales se pueden encontrar localizados en distintos órganos de la planta; por ejemplo, en las raíces: *Santulum album*, *Valeriana officinalis* L., *Vetiveria zizanioides* y *Zingiber officinale*, especies con mayor cantidad de aceite esencial en ese órgano de la planta. Las especies *Pimpinella anisum*, *Foeniculum vulgare*, *Coriandrum sativum* y *Anethum graveolens* tienen alto contenido de aceite esencial en sus semillas y frutos. En las hojas, el aceite esencial es abundante en especies como *Mentha* spp., *Origanum* spp., *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Ocimum basilicum* y *Cymbopogon citratus*. En el leño, *Bulnesia sarmientoi* y en la corteza, *Cinamomum zeylanicum* tienen alto contenido de aceite esencial. Las especies *Lavandula* spp., *Cananga odorata*, *Jasminum officinale* L., *J. grandiflorum* L. y *Rosa* spp. presentan mayor contenido de aceite esencial en las flores (Ringuelet, 2013).

Los componentes en mayor concentración que se pueden encontrar en el aceite esencial de algunas de las especies ya mencionadas son carvacrol (30 %) y timol (27 %) en *Origanum compactum*; linalol (68 %) en *Coriandrum sativum*; α - y β - Tujona (57 %) y alcanfor (24 %) en *Artemisia herba-alba*; 1,8- cineol (50 %) en *Cinnamomum camphora*; α - felandreno (36 %) y limoneno (31 %) de la hoja y carvona (58 %) y limoneno (37 %) en semillas de *Anethum graveolens* y el mentol (59 %) y mentona (19 %) en *Mentha piperita*. Generalmente, estos componentes principales determinan las

propiedades biológicas de los aceites esenciales (Betts, 2001; Pichersky *et al.*, 2006).

1.11.1 Aceites esenciales y su función

En la naturaleza, los aceites esenciales desempeñan un papel importante en la protección de las plantas como antibacterianos, antivirales, antifúngicos, insecticidas y también contra los herbívoros al reducir su apetito por las mismas. También atraen algunos insectos para favorecer la polinización, o repeler a los indeseables (Bakkali *et al.*, 2008). La compleja composición de los aceites esenciales y la variedad de estructuras químicas de sus componentes son responsables de una amplia gama de actividades biológicas, muchas de las cuales son de interés creciente en los campos de la salud humana y animal. Particularmente, muchos aceites esenciales y sus componentes se han utilizado tradicionalmente por su actividad antimicrobiana (Cheng *et al.*, 2003) y por su actividad citotóxica que se debe principalmente a la presencia de fenoles, aldehídos y alcoholes (Bruni *et al.*, 2004; Sacchetti *et al.*, 2005). Los aceites esenciales o algunos de sus componentes son realmente eficaces contra una gran variedad de organismos incluyendo bacterias (Holley y Patel, 2005; Basile *et al.*, 2006; Schelz *et al.*, 2006; Kurtulmus *et al.*, 2009), hongos (Hammer *et al.*, 2002; Velluti *et al.*, 2003; Serrano *et al.*, 2005; Calvaleiro *et al.*, 2006; Pawar y Thaker, 2006; Soylu *et al.*, 2006), protozoarios (Monzote *et al.*, 2006), parásitos (Moon *et al.*, 2006; Priestley *et al.*, 2006), larvas (Hierro *et al.*, 2004; Pavela, 2005; Morais *et al.*, 2006), lombrices, insectos (Sim *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006; Chaiyasit *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2007) y nematodos (Piedra *et al.*, 2008; Andrés *et al.*, 2012; Ntalli y Caboni, 2012; Murga-Gutiérrez *et al.*, 2012).

En el Cuadro 3 se hace mención de la actividad biológica de los aceites esenciales de algunas especies de plantas y concentraciones ensayadas.

Cuadro 3. Ejemplos de aplicaciones de los aceites esenciales en la medicina, medio ambiente, agricultura y alimentos.

Especies componentes	o Organismos patógenos	Concentraciones	Fuente
<i>Sideritis italica</i>	<i>Helicobacter pylori</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Proteus vulgaris</i>	3.9–250 µg/mL	Basile et al. (2006)
Oregano	<i>Fusarium graminearum</i>	500,100 mg/kg	Velluti et al. (2004)
Cinnamon Lemongrass	Zearalenona, deoxinivalenol		
Clavo Palmarose	Producción (grano de maíz)		
<i>Juniperus communis</i>	<i>Aspergillus niger</i>	MIC (hoja) 0.08–10 µL/mL	Cavaleiro et al. (2006)
<i>Juniperus oxycedrus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MIC (baya) 0.32–20 µL/mL	
<i>Juniperus turbinata</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	MLC (hoja) 0.08–20 µL/mL	
	<i>Candida albicans</i>	MLC (baya) 0.32–20 µL/mL	
	<i>Candida krusei</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida parapsilosis</i> <i>Microsporum canis</i> <i>Microsporum gypseum</i> <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>Epidermophyton floccosum</i>		
<i>Origanum syriacum</i>	<i>Phytophthora infestans</i> (tomate, enfermedad tizón tardío)	0.4–2.0 µg/mL air 6.4, 12.8, 25.6, 51.2 µg/mL (fase de contacto)	Soylu et al. (2006)
<i>Thymbra spicata</i> , <i>Lavandula stoechas</i> <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Foeniculum vulgare</i> , <i>Chenopodium ambrosioides</i> <i>Lavandula angustifolia</i>	<i>Leishmania amazonensis</i> <i>Giardia duodenalis</i>	30 mg/kg ratones 0.1%, 1%	Monzote et al. (2006) Moon et al. (2006)
	<i>Trichomonas vaginalis</i> <i>Hexamita inflata</i> <i>Anisakis simplex</i> (larvae)		
Geraniol		3.12, 6.25, 12.50 µg/mL	Hierro et al. (2004)
Citral, Citronellol, Carvacrol, Eugenol, Cuminaldehyde			

Nepeta cataria, <i>Thuja occidentalis</i> , <i>Salvia sclarea</i> , <i>Thymus mastichina</i> , <i>Origanum majorana</i> , <i>Pogostemon cablin</i> , <i>Mentha pulegium</i> , <i>Mentha citrata</i> , <i>Origanum vulgare</i> <i>Origanum compactum</i> <i>Melissa officinalis</i> <i>Lavandula angustifolia</i> , etc.	<i>Spodoptera littoralis</i> (larvae)	LC50 10, 20 mL/m3 LD 0.05 µL/larvae	Pavela, 2005
<i>Croton nepetaefolius</i>	<i>Aedes aegypti</i> (larvae)	LC50 84 ppm	Morais et al. (2006)
<i>Croton argyrophyloides</i>		LC50 102 ppm	
<i>Croton sonderianus</i>		LC50 104 ppm	
<i>Croton zehntneri</i>		LC50 28 ppm	
44 aceites esenciales	<i>Cadra cautella</i> (Lepidoptera Pyralidae)	2.4, 4.7 mg/cm2 64.7 mg/L air	Sim et al. (2006)
<i>Apium graveolens</i> ,	<i>Aedes aegypti</i> (adult)	5.44–8.83 µg/mg	Chaiyasit et al. (2006)
<i>Carum carvi</i> , <i>Curcuma zedoaria</i> , <i>Piper longum</i> , <i>Illicium verum</i>			
11 aceites esenciales de los árboles de coníferas	<i>Coptotermes formosanus</i> (termita)	10 mg/g LC50 2.6 mg/g	Cheng et al. (2007)
<i>Eucalyptus globulus</i> ,	<i>Hessian fly</i> <i>Mayetiola destructor</i>	2, 4, 6, 10, 20 µL/L air	Lamiri et al. (2001)
<i>Tagetes patula</i>	<i>Meloidogyne arenaria</i> <i>M. hapla</i> <i>M. incognita</i> <i>M. Javanica</i>	Nodulación radicular	Piedra et al. (2008)
Aldehídos y cetonas	<i>Meloidogyne sp.</i>	Metabolitos secundarios	Ntalli y Caboni (2012)
<i>Tagetes minuta</i>	<i>M. incognita</i>	Enmienda orgánica al 20, 35 y 50 % al suelo de cultivo de plantas de <i>C. annuum</i> limita la nodulación radicular.	Murga-Gutiérrez et al. (2012)

MIC: Mínima Concentración Inhibitoria, LC: Concentración Letal, LD: Dosis Letal, MLC: Concentración Letal Mínima.

1.12 LITERATURA CITADA

- Alexander, S., y Waldenmaier, C. (2002). Suppression of *Pratylenchus penetrans* populations in potato and tomato using african marigolds. *Journal of nematology* , 34, 130-134.
- Andrés, M. F., González-Coloma, A., Sanz, J., Burillo, J., & Sainz, P. (2012). Nematicidal activity of essential oils: A review. *Phytochemistry Reviews*, 11(4), 371–390. <http://doi.org/10.1007/s11101-012-9263-3>
- Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., y Cabras, P. (2006). Chemical composition seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L- ssp- *stoechas* Essential Oils from Stem/Leaves and Flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 54 (12), 4364-4370.
- Ávalos , G., y Pérez Ueeia, C. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Series Fisiología Vegetal* , 2 (3), 119-145.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., y Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils. *A review Food and Chemical Toxicology* , 46 (2), 446-475.
- Basile, A., Senatore, F., Gargano, R., Sorbo, S., Del Pezzo, M., Lavitola, A., & Vuotto, M. L. (2006). Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis italica* (Miller) Greuter et Burdet essential oils. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(2), 240–248. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2006.03.019>
- Betts, T. (2001). Chemical characterization of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. *Journal of Chromatography* , 936 (1-2), 33-46.
- Brenes , A., y Roura, E. (2010). Essential oils in poultry nutrition; Main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology* , 158 (1-2), 1-14.
- Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., Dehesa, M., y otros. (2004). Chemical composition and biological activities of ishingon Essential oil a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam). *Food Chemistry* , 85 (3), 415-421.
- Burbott, A., y Loomis, W. (1967). *Effects of light and temperature on the monoterpenes of peppermint*. Plant Physiology.
- Cabrera, H. (2014). *Nacobbus aberrans* en cultivos hortícolas del centro del bajo, México: Distribución, abundancia y caracterización molecular. *Tesis de Doctorado* , 165.

- Calixto, J. B. (2005). Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. *Journal of Ethnopharmacology* , 100 (1-2), 131-134.
- Campos Guillen, J., Martínez Pastrana, X., Bernal Melo, J., Cruz Medina, J., Serrato Cruz, M., y Cruz Hernández, A. (2012). Análisis molecular del género *Tagetes* spp: análisis de materiales productores de aceite. *Red Tagetes SINAREFI*, 30-143 .
- Cases, C. M. (2007). Jornadas técnicas dedicadas a plantas: fomento y desarrollo de la producción y transformación. In: *Las Plantas Aromáticas y Medicinales: Descripción de las Especies Fundamentales* , 11-19.
- Chaiyasit, D., Choochote, W., Rattanachanpichai, E., Chaithong, U., Chaiwong, P., Jitpakdi, A., & Pitasawat, B. (2006). Essential oils as potential adulticides against two populations of *Aedes aegypti*, the laboratory and natural field strains, in Chiang Mai province, northern Thailand. *Parasitology Research*, 99(6), 715–721. <http://doi.org/10.1007/s00436-006-0232-x>
- Cheng, S.-S., Chang, H.-T., Wu, C.-L., & Chang, S.-T. (2007). Anti-termite activities of essential oils from coniferous trees against *Coptotermes formosanus*. *Bioresource Technology*, 98(2), 456–459. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.01.006>
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. CONABIO. México: 2012.
- Craveiro, C., Matos, M., Machado, L., y Alencar, J. (1988). Essential oils of *Tagetes minuta* from Brazil. *Perfum Flavor* , 13 (5), 35-36.
- Del Vitto, L., y Petenatti, E. M. (2009). Asteraceae of economic and environmental importance. First part. Morphological and taxonomic synopsis, environmental importance and plants of industrial value. *Multequina* , 18 (2) 87-115.
- Dixon, R. A. (2001). Natural products and planta disease resistance. *Nature Journal* , 411, 843-847.
- Duke, J. (2009). USDA. Recuperado el agosto de 2016, de Phytochemical and Ethnobotanical databases: <http://www.ars-grin.gov/duke/Plants.html>
- Fernández, A. (2006). Las plantas aromáticas y medicinales PAM, un potencial con gran necesidad de reorientación. *Estudios Agrosociales y Pesqueros*, 7, 177-214.
- FUNDAQUIM. (2005). Aportes para el desarrollo del sector de plantas medicinales y aromáticas en el Uruguay. *Red Propymed, URM. TEC, Fundasol, Cooperación Técnica Alemana (GTZ)(Eds.)*, 134

- García M, Matías J, Cavalcante J, Pires de Lima D, Da Silva R, Andreotti R. Chemical identification of *Tagetes minuta* Linnaeus (Asteraceae) essential oil and its acaricidal effect on ticks. *Rev Bras Parasitol.* 2012; 21: 405-411.
- González, G., Vázquez, G., Ruiz, L., y Vázquez, G. (2011). El género *Salvia* y sus aceites esenciales. 193-200. Texcoco, Estado de México, México: Colegio de Postgraduados y Benemérita Universidad de Puebla.
- Grainge, M., y Ahmed, S. (1988). *Handbook of Plants whith Pest control properties*. New York: Wiley.
- Greathead, H. (2003). Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proccedings of the Nutrition Society*, 62, 279-290.
- Green, M., Singer, J., Sutherlans, D., y Hibbern, C. (1991). Larvicidal activity of *Tagetes minuta* (marigold) towards *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 7 (2), 282-286.
- Gros, E. G. (1985). Introducción al estudio de los productos naturales. *Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico*, 146. Washington, D.C., EEUU.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (2002). In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(2), 195–199. <http://doi.org/10.1093/jac/dkf112>
- Holley, R. A., & Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22(4), 273–292. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2004.08.006>
- Irinyi, L., Lackner, M., De Hoog, S., y Meyer, W. (2015). DNA barcoding of fungi causing infections in humans and animals. *Fungal Biology*.
- Jacobs, J., Aroo, R., Koning, E., Klunder, A., Croes, A., y Wullems, G. (1995). Isolation and characterization of mutatsns of thiophene synthesis in *Tagetes erecta*. *Plant Physiol.*, 107, 807-814.
- Jimenez Osornio, J. J. (1991). Ethnoecology of *Chenopodium ambrosoides*. *Amer. J. Bot.*, 76 (6), 139.
- Kossmann, I. (1999). Recursos genéticos y derechos comunitarios. *Raíces*, 21 (10), 4-9.
- Koul, O., Walia, S., y Dhaliwal, G. (2008). Essential oils as green pesticides: Potential and constraints. *Biopesticides International*, 4 (1), 63-84.

- Krishna, A., Prajapati, V., Bhasney, S., Tripathi, A., y Kumar, S. (2005). Potential Toxicity of new genotypes of *Tagetes* (Asteraceae) species against stored grain insect pests. *International Journal of Tropical Insect Science*, 25 (2), 122-128.
- Kurtulmus, A., Fafal, T., Mert, T., Saglam, H., Kivcak, B., Ozturk, T., & Baser, K. H. C. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of three *Anthemis* species from Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*, 45(6), 900– 904.
- Lawrence, B. (1985). A review of the world production of essential oils. *Perfum Flavor*, 10 (5), 1-16.
- Limpscom, D. (1998). Basics of cladistics analysis. *George Washington University*, 1-75.
- List, T. P. (2015). *The Plant List*, Versión 1.1. Recuperado el Septiembre de 2015, de A working list of all plant species: <http://www.theplantlist.org/>
- Loockerman, D., Turner, B., y Jansen, R. (2003). Phylogenetic relationships within the Tageteae (Asteraceae) based on nuclear ribosomal ITS and chloroplast ndhF gene sequences. *Systematic Botany*, 28, 191-207.
- Lui, J., Shi, S., Chang, E., Yang, W., y Jiang, Z. (2013). Genetic diversity of the critically endangered *Thuja sutchuenensis* revealed by ISSR markers and the implications for conservation. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 14860-14871.
- Mansaray, M. (2000). Herbal remedies food or medicines. *Chemestry and Industry*, 20, 677-678.
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). Fitoquímica orgánica. *Universidad Central de Venezuela*, 537. Caracas, Venezuela.
- Martínez, G. J. (2005). Recolección y Comercialización de Plantas Medicinales en el Departamento Santa María. *Acta Farma Bonaerense*, 24 (4) , 575-584. Cordoba, Argentina.
- Masotti, V., Juteau, F., Bessière, J., & Viano, J. (2003). Seasonal and Phenological Variations of the Essential Oil from the Narrow Endemic Species *Artemisia molinieri* and Its Biological Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (24), 7115-7121.
- Mohamed M, Harris P, Henderson J. An efficient in vitro regeneration protocol for *Tagetes minuta*. *Plant cell, tissue and organ culture*. 1999; 55: 211-215.
- Monzote, L., Montalvo, A. M., Almanonni, S., Scull, R., Miranda, M., & Abreu, J. (2006). Activity of the Essential Oil from *Chenopodium ambrosioides* Grown in Cuba against *Leishmania amazonensis*. *Chemotherapy*, 52(3), 130–136. <http://doi.org/10.1159/000092858>

- Moon, T., Wilkinson, J. M., & Cavanagh, H. M. A. (2006). Antiparasitic activity of two *Lavandula* essential oils against *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Hexamita inflata*. *Parasitology Research*, 99(6), 722–728. <http://doi.org/10.1007/s00436-006-0234-8>
- Morais, S. M., Cavalcanti, E. S. B., Bertini, L. M., Oliveira, C. L. L., Rodrigues, J. R. B., & Cardoso, J. H. L. (2006). Larvicidal activity of essential oils from Brazilian croton species against *Aedes aegypti* L. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22(1), 161–164.
- Muñoz Bertomeu, J., Arrillaga, I., y Segura, J. (2007). Essential oil variation within and among natural population of *Lavandula latifolia* and its relation to their ecological areas. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35 (8), 479-488.
- Murga Gutiérrez, S., Alvarado Ibáñez, J., y Vera Obando , N. (2012). Efecto del follaje de *Tagetes minuta* sobre la nodulación radicular de *Meloidogyne incognita* en *Capsicum annum* in a greenhouse. *Peru-Biologia*, 19 (3), 257-260.
- Negi, P. S. (2012). Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, 156 (1), 7-17.
- Novo, M., Fernández, R., Fernández, D., Gutiérrez, M., & Cosín, D. (2012). Compilation of morphological and molecular data, a necessity for taxonomy: The case of *Hormogaster abbatissae* sp. *ZooKeys* , 242, 1-16.
- Ntalli, N. G., & Caboni, P. (2012). Botanical Nematicides: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(40), 9929–9940. <http://doi.org/10.1021/jf303107j>
- Ornelas, F., Sosa, V., Solits, D., Danza, J., González, C., Soltis, P., y otros. (2013). Comparative phylogeographic analyses illustrate the complex evolutionary history of threatened cloud forests of northern. *Mesoamerica*, 8, 1-11.
- Ottaway, P. B. (2001). The roots of a healthy diet. *Chemistry & Industry*, 22 (2), 42-44.
- Pavela, R. (2005). Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. *Fitoterapia*, 76(7-8), 691–696. <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.06.001>
- Park, I.-K., Choi, K.-S., Kim, D.-H., Choi, I.-H., Kim, L.-S., Bak, W.-C., & Shin, S.-C. (2006). Fumigant activity of plant essential oils and components from horseradish (*Armoracia rusticana*), anise (*Pimpinella anisum*) and garlic (*Allium sativum*) oils against *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae). *Pest Management Science*, 62(8), 723–728. <http://doi.org/10.1002/ps.1228>

- Pawar, V. C., & Thaker, V. S. (2006). In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. *Mycoses*, 49(4), 316–323. <http://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2006.01241.x>
- Peña, M., Cortés, A., y Avila, E. (2004). Evaluación de tres niveles de pigmento de flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) sobre la pigmentación de la piel en pollos de engorda. *Téc Pecu Mex*, 42, 105-111.
- Pérez, G., Sahagún, C., & Peña, L. (2000). Estimación de varianza aditiva y heredabilidad en dos poblaciones de tomate de cáscara (*Physalis Ixocarpa Brot.*). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 23 (1), 49-57.
- Pichersky, E., Noel, J., y Dudareva, N. (2006). Biosynthesis of plant volátiles: Nature's diversity and ingenuity. *Science*, 311 (5762), 808-811.
- Piedra Buena, A., Díez-Rojo, M. Á., López-Pérez, J. A., Robertson, L., Escuer, M., & Bello, A. (2008). Screening of *Tagetes patula* L. on different populations of *Meloidogyne*. *Crop Protection*, 27(1), 96–100. <http://doi.org/10.1016/j.cropro.2007.04.011>
- Ploeg, A. (1999). Greenhouse studies on the effect of marigolds (*Tagetes* spp) on four *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology*, 31, 62-69.
- Ploeg, A., y Maris, P. (1999). Effect of temperature on suppression of *Meloidogyne incognita* by *Tagetes* cultivars. *Supplement to the Journal of Nematology*, 31 (709-714).
- Priestley, C. M., Burgess, I. F., & Williamson, E. M. (2006). Lethality of essential oil constituents towards the human louse, *Pediculus humanus*, and its eggs. *Fitoterapia*, 77(4), 303–309. <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.04.005>
- Ringuelet, J. (2013). Terpenoides. *Productos naturales vegetales*. 1, 151-190.
- Sanches, F., Figueira, G., Mendez, A., Rodrigues, B., Camargo, M., y Szabó, M. (2012). Acaricidal activity of ethanolic extract from aerial parts of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) against larvae and engorged adult females of *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors*, 5, 11.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Mandredini, S., Radice, M., y otros. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradiicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91 (4), 621-632.
- Salinas N, Pacheco E. Pigmentos carotenoides identificados y purificados en aceite de palma. *Agronomía Trop*. 2003; 53: 483-499.
- Schelz, Z., Molnar, J., & Hohmann, J. (2006). Antimicrobial and antiplasmodial activities of essential oils. *Fitoterapia*, 77(4), 279–285. <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.03.013>

- Sepúlveda Jiménez, G., Porta Ducoing, H., y Rocha Sosa, M. (2003). La participación de los emtabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21 (3), 355-363.
- Serrato Cruz, M. A. (2010). Información documental sobre el taxa *Tagetes* para dimensionar su centro de origen y diversidad genética en México. *Recopilación y análisis de la información existente de las especeies de las que México es centro de origen y diversidad genética*, 63.
- Serrato Cruz, M. A. (2014). El recurso Genético Cempoalxóchitl (*Tagetes spp*) de México (Diagnóstico). Universidad Autónoma Chapingo-SINAREFI-SNICS-SAGARPA, México.
- Serrato Cruz, M. Á., y Quijano, M. L. (1993). Usos de algunas especies de *Tagetes*: revisión bibliográfica (1984-1992). I International Symposium and II National Meeting of Sustainable Agriculture: Importance, and contribution of traditional agriculture (págs. 228-238). Puebla: CEICADAR.
- Serrato, M., Díaz, F., y Barajas, J. (2005). Seasonal influence on phenology and essential oil content of *Tagetes filifolia* Lag. *Annalen der Meteorologie*, 41 (1), 82-85.
- Sim, M.-J., Choi, D.-R., & Ahn, Y.-J. (2006). Vapor phase toxicity of plant essential oils to *Cadra cautella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*, 99(2), 593–598. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16686164
- Soule, J. A. (1996). Novel annual and perennial *Tagetes*. *In Progress in New Crops*, (ASHS Press ed.). Arlington, Virginia: J. Janick.
- Soylu, E. M., Soyulu, S., & Kurt, S. (2006). Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia*, 161(2), 119–128. <http://doi.org/10.1007/s11046-005-0206-z>
- Stoother, J. L. (1997). The Biology and Chemistry of Compositae, *Tagetes*-systematic review. *Academic Press*, 2, 769-783.
- Sunnucks, P. (2000). Efficient genetic markers for population biology *TREE*. 15 (199-203) .
- Swofford, D., y Olsen, G. (1990). Phylogeny reconstruction. *Molecular Systematics*, 411-501.
- Theis, N., y Lerdau, M. (2003). The evolution of function in plant secondary metabolites. *International Journal of Plant Sciences* , 164 (3), 93-102.
- Tilman, D., Reich, P., y Knops, J. (2006). Biodiversity and ecosystem stability in a decade long grassland experiment. *Nature*, 441, 629-632.

- Tisserand, R., y Young, R. (2014). Essential Oil, Safety. *Churchill*, 757.
- Tripathi, N., Chouhan, D., Saini, N., y Tiwari, S. (2012). Assessment of genetic variations among highly endangered medicinal plant *Bacopa monnieri* (L.) from Central India using RAPD and ISSR analysis. *Biotech*, 2, 323-336.
- Turner, B. (1996). The Comps of Mexico-A systematic account of the family Asteraceae. *Phytol Memoirs*, 6 (10), 1-93.
- Turner, B. L. (1996). The Comps of exico: A systematic account of the family Asteraceae. *Phytologia Memoirs*, 6 (10), 1-22, 43-93.
- Valadez, E., y Kahl, G. (2000). Huellas de ADN en genomas de plantas. *Mundi Prensa*, 39-86.
- Vanegas, P. E., Valdez Morales, M. E., Valverde, A., Cruz Hernández, O., y Paredes López, O. (2006). Particle bombardment, a method to gene transfer in marigold. *Plant Cell Tiss*, 84 (359-363).
- Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A. J., Egidio, J., & Marín, S. (2003). Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *International Journal of Food Microbiology*, 89(2-3), 145–154. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00116-8](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00116-8)
- Villaseñor, J. L. (2003). Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México. *Interciencia*, 28, 160-167.
- Yingchun Q, Yaomei Y, Manzhu B. Establishment of plant regeneration system from anther culture of *Tagetes patula*. *African journal of biotechnology*. 2011; 10 : 17332-17338.
- Zavaleta, M., y Gómez, R. (1995). Effect of *Tagetes erecta* L.- tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) intercropping on some tomato pest. *Fitopatología*, 30, 35-46.

CAPITULO III.
COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE ALGUNAS
ESPECIES DE *Tagetes* DEL NORTE Y SUR DE AMÉRICA

1.13 RESUMEN

La información sobre la composición química de algunas de las especies de *Tagetes* es escasa, situación que limita su aprovechamiento como bioplaguicida; por tal razón, para avanzar en la caracterización de este recurso fitogenético, en el presente trabajo se describe la composición del aceite esencial obtenido mediante hidrodestilación de algunas especies de *Tagetes*. Utilizando un procedimiento de CG/MS se determinaron los compuestos mayoritarios siguientes: anetol (66.9 %), estragol (31.6 %) y anis aldehído (1.5 %) en *T. filifolia*; *trans*-tagetona (52.7 %), 4-etil-4-metil-1-hexeno (25.5 %), verbenona (3.3 %), 1-verbenona (3 %), β -ocimeno (8.6 %), β -linalool (1.2 %) y *cis*-tagetona (6.2 %) en *T. terniflora*; *trans*-tagetona (33.9 %), 4-etil-4-metil-1-hexeno (13.8 %), cariofileno (3.1 %), β -ocimeno 16.9 %, *trans*-ocimeno (3.7 %), *cis*-tagetona (9.1 %), 1-verbenona (11.7 %) y verbenona (16.5 %) en *T. minuta*; *trans*-tagetona (17.9 %), *trans*-ocimeno (3.7 %), 1-verbenona (13.9 %), verbenona (24.3 %), pineno 2,3 epoxy (0.4 %) y 4-etil-4-metil-1-hexeno (39.7 %) en *T. zypaquirensis*; y *trans*-tagetona (30.9 %), *trans*-ocimeno (25.6 %) y ácido valérico (43.4 %) en *T. multiflora*.

Palabras clave: Metabolitos secundarios, caracterización química, quimiotipos.

1.14 ABSTRACT

Information on the chemical composition of some *Tagetes* species is scarce, a situation that limits their use as a biopesticide; For this reason, to advance in the characterization of this plant genetic resource, the present work describes the composition of essential oil obtained by hydrodistillation of some species of *Tagetes*. Using a GC / MS procedure the following major compounds were determined: anethole (66.9%), estragol (31.6%) and anis aldehyde (1.5%) in *T. filifolia*; Trans-tagetone (52.7%), 4-ethyl-4-methyl-1-hexene (25.5%), verbenone (3.3%), 1-verbenone (3%), β -ocimeno (8.6%), β -linalool 1.2%) and cis-tagetone (6.2%) in *T. terniflora*; Trans-ketamine (33.9%), 4-methyl-1-hexene (13.8%), caryophyllene (3.1%), β -ocimeno 16.9%), trans-ocimeno (3.7%), cis-tagetone (%), 1-verbenone (11.7%) and verbenone (16.5%) in *T. minuta*; (17.9%), trans-ocimeno (3.7%), 1-verbenone (13.9%), verbenone (24.3%), pinene 2,3 epoxy (0.4%) and 4-ethyl- Hexene (39.7%) in *T. zypaquirensis*; And trans-tagetone (30.9%), trans-ocimeno (25.6%) and valeric acid (43.4%) in *T. multiflora*.

Keywords: Secondary metabolites, chemical characterization, chemotypes.

1.15 INTRODUCCIÓN

Los productos de las plantas aromáticas y medicinales se han utilizado ampliamente desde tiempo atrás (Lahlou, 2004), siendo las familias Asteraceae, Apiaceae y Lamiaceae las más importantes desde el punto de vista de la producción de aceite esencial y su actividad biológica (Bernath, 2009). Para el caso de la familia Asteraceae representada por 1, 911 géneros y 32, 913 especies (List, 2015) se conoce que cuando menos, 400 de ellas pueden comportarse como arvenses o ruderales, sobre todo de los géneros *Simsia*, *Tithonia*, *Bidens*, *Viguiera*, *Tagetes*, *Eupatorium*, *Melampodium*, *Sclerocarpus*, *Tridax*, *Conyza*, *Ambrosia* y *Verbesina*; la actividad biológica de las plantas de esta familia botánica se debe a la presencia de compuestos activos característicos como alcaloides, monoterpenos, sesquiterpenos, lactonas, triterpenos, limonoides, aminas insaturadas, benzopiranos y terpenoides (Simmonds *et al.*, 1992). Sin embargo, las investigaciones en México sobre arvenses y ruderales, que también pueden ser plantas aromáticas con importante actividad biológica, han sido escasas (Toledo 1988; Rzedowski, 2006), entendiendo que las plantas en general representan una enorme reserva de compuestos biológicamente activos contra enfermedades (Balick y Cox, 1996) y plagas (Simmonds *et al.*, 1992; Stoll, 2000).

Dentro de la familia Asteraceae, está el género *Tagetes* que, junto con Asteraceae, aparecieron en el Continente Americano hace 65 millones de años (Turner, 1997). Hasta ahora se han referido 53 especies distribuidas en el Continente Americano desde el suroeste de Estados Unidos hasta el sur de Argentina (List, 2015), la mayoría de las cuales se localizan en México (Turner 1996); gran parte de ellas son aromáticas debido a la presencia de aceites esenciales en toda la planta (Poli *et al.*, 1995). La composición química del género *Tagetes* varía entre especies, diversidad química que está determinada genéticamente y modulada ambientalmente (Marotti *et al.*, 2004), además de que cada tipo de compuestos se acumula en órganos específicos de la planta (Piccaglia *et al.*, 1997), factor relacionado con la presencia y cantidad de

compuestos encontrados; otros factores como el hábitat de la planta (Karousou *et al.*, 2005), la etapa fenológica, la composición del suelo y la fertilización mineral influyen en el contenido de compuestos, aún entre plantas de la misma especie (Macías y Galindo, 2001). En los últimos años, muchas especies y quimiotipos del género *Tagetes* se han reevaluados como fuentes de diferentes clases de metabolitos secundarios biológicamente activos (Green *et al.*, 1993), numerosos trabajos hacen referencia a sus componentes fitoquímicos (Downum y Towers, 1983; Cáceres *et al.*, 1992; Hernández *et al.*, 2006) y recientemente en México varias especies de *Tagetes* están siendo objeto de investigaciones sobre conservación, caracterización y aprovechamiento, especialmente para el desarrollo de bioplaguicidas (Serrato, 2014).

Las especies de *Tagetes* presentan una gran variabilidad que no se ha estudiado ampliamente, se distribuyen en los lugares más diversos de la geografía de América, aspecto que tampoco se ha estudiado suficientemente (Serrato, 2014). Los trabajos que abordan la variabilidad de las especies aromáticas son pocos. Zygadlo *et al.* (1993) y Keita *et al.* (2000) reportan variaciones en la composición de aceite esencial de *T. minuta* asociada con la diversidad de hábitats de origen de las muestras y se ha confirmado la existencia de quimiotipos (Gil *et al.*, 2000). Serrato-Cruz *et al.* (2008) también reportan la existencia de quimiotipos en *T. filifolia*. Esta relación químico-ambiental se ha encontrado en otras especies como *Artemisia judaica* (Putievsky *et al.*, 1992) y en *Mentha haplocalyx* (Chou y Zhou, 1998).

En Mesoamérica se aprovecharon especies de *Tagetes* con fines medicinales, ornamentales y ceremoniales en la época prehispánica (Kaplan, 1960; Neher, 1968; Estrada, 1986; citados por Serrato, 1999). En países como Argentina, Chile, Perú, Bolivia y Colombia, a estas plantas todavía se les usa en la medicina tradicional o para preparar alimentos y dar sabor (*T. minuta* y *T. terniflora*) y aroma (Ulloa, 2006). En Ecuador, *Tagetes filifolia* y *T. terniflora* se usan como aditivos alimenticios (De la Torre *et al.*, 2008), también se usan para teñir prendas de vestir

como es el caso de *T. minuta* (color marron) y *T. filifolia* (color amarillo); y con anís (*T. filifolia*) se prepara una bebida alcohólica y se da sabor a la chicha y a la humita (Bertero *et al.*, 2009).

En la actualidad se busca obtener más aplicaciones de estas plantas por sus propiedades químicas. Específicamente se está trabajando con el aceite esencial y la parte acuosa de la destilación para aprovechar sus compuestos químicos como bactericidas (*T. patula*) (Wan *et al.*, 2015), antitripanosomal (*T. caracasana*, *T. zypaquirensis* y *T. heterocarpa*) (Escobar *et al.*, 2009); bioplaguicidas (*T. caracasana* y *T. zypaquirensis*) (Barrientos *et al.*, 2012) por su efecto biológico contra hongos y nemátodos (Tariq *et al.*, 2010).

Los bajos costos de producción del aceite esencial de esta especie (Serrato, 2003) y su origen orgánico, representan una opción económica y ecológica importante comparada con productos insecticidas de origen sintético, los cuales, además de ser fuente de contaminación ambiental y de daño a la salud humana, parcialmente son causa de que los sistemas de producción agrícolas sean incosteables, particularmente para agricultores de recursos económicos limitados.

En el presente capítulo se planteó el objetivo de identificar los compuestos químicos en el aceite esencial de especies de *Tagetes* originarios del norte y sur de América, con la finalidad de contribuir al conocimiento de la fitoquímica de este recurso natural y valorar posibles implicaciones en el desarrollo de nuevos productos sustentables en agricultura y medicina.

1.16 METODOLOGÍA

1.16.1 Recolección del material biológico

Los materiales del género *Tagetes* que se trabajaron, los proporcionó el Dr. Miguel Ángel Serrato Cruz, profesor-investigador de la Universidad Autónoma de

Chapingo. además de identificarlos de manera independiente a este trabajo. Las plantas de *T. minuta*, *T. terniflora*, *T. multiflora*, *T. zypaquirensis* y *T. filifolia* se establecieron en los invernaderos de Campo Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, y posteriormente se colectó para la extracción de aceites esenciales.

1.16.2 Extracción de aceite esencial

El tejido fresco de la parte aérea de la planta de cada uno de los materiales *T. minuta*, *T. filifolia*, *T. terniflora*, *T. multiflora* y *T. zypaquirensis*, por separado, se cortó en trozos de 3 cm y llevaron a destilación en un equipo Clevenger (Günther, 1948). El material picado (1 kg) se colocó en un matraz de bola de 5,000 mL de capacidad con 1.5 L de agua conectados en serie. El matraz se colocó sobre una fuente de calor, así, el vapor generado arrastró los compuestos solubles e insolubles y una vez condensado al pasar por el sistema de refrigeración por donde circulaba agua fría (medio refrigerante) ocurrió un proceso de condensación y originó la precipitación de pequeñas gotas líquidas que caían en un embudo de separación, quedando el aceite en la parte superior y el residuo acuoso en la parte inferior, ambos productos fueron almacenados en frascos ámbar. En el caso de *T. minuta* se extrajo aceite de diferentes órganos de la planta.

1.16.3 Determinación de compuestos químicos

La identificación de los componentes de las poblaciones de *Tagetes* se hizo por cromatografía de gases con detector de masas (Adams, 2001), mediante un cromatógrafo de gases CG 7890A (Agilent Technologies, USA) acoplado a un detector selectivo de masas 5975C Inert MSD con un detector triple eje (Agilent Technologies, USA), con ionización por impacto eléctrico (IE) de 70 eV. Se utilizó una columna HP-5ms® (California, USA), empacada con 5 % difenil-95 % dimetilpolisiloxano (30 m x 0.25 mm Ø x 0.25 µm). Las temperaturas del inyector y del detector se mantuvieron a 250 y 280 °C, respectivamente, y se alcanzaron a una velocidad de 10 °C min⁻¹. La temperatura del horno se inició en 70 °C, se mantuvo así 1 min y se programó para alcanzar las temperaturas y la velocidad

antes señaladas. La velocidad de flujo del gas acarreador (helio) se mantuvo a 1 mL min⁻¹. Muestras diluidas (1/100) se inyectaron en acetona (v/v) de 1 µL, manualmente en modo “Split” automático (para diluir), mediante un inyector 7683D (Agilent Technologies, USA).

Los datos de abundancia relativa se obtuvieron a partir del porcentaje de área de los picos cromatográficos. Se consideraron como compuestos mayoritarios aquellos con más de 5 % de abundancia relativa (Mora *et al.*, 2009) y elementos traza aquellos con menos de 5 % de abundancia relativa. El intervalo de masas detectado fue de 35 a 500 m/z. Para calcular los índices de Kovats se usaron como referencias los compuestos *n*-Alcanos, *n*-octano (C₈ H₁₈) y *n*-octadecano (C₁₈ H₃₈). La identificación de los componentes se realizó por comparación de los índices de retención relativa, más los espectros de masas comparados en la base de datos NIST 05 del sistema GC-MS (National Institute of Standard and Technology) y con los datos espectrales publicados por Adams, (2001).

1.17 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los tiempos de retención de las moléculas mayoritarias en el aceite esencial se presentaron desde 4.4 hasta 10.6 mins. Los compuestos mayoritarios en *T. filifolia* fueron: anetol (66.9 %), estragol (31.6 %) y anís aldehído (1.4 %). En *T. terniflora* se encontraron *trans*-tagetona (52.7 %), 4-etil-4-metil-1-hexeno (25.5 %), verbenona (3.3 %), 1-verbenona (3 %), β-ocimeno (8.6 %), β-linalool (1.1 %) y *cis*-tagetona (6.2 %). En *T. minuta* se identificaron *trans*-tagetona (33.9 %), 4-etil-4-metil-1-hexeno (13.8 %), cariofileno (3.1 %), β-ocimeno 16.9 %, *trans*-ocimeno (3.7 %), *cis*-tagetona (9.1%), 1-verbenona (11.69%) y verbenona (16.5 %). Para *T. zypaquirensis* estuvieron presentes *trans*-tagetona (17.8 %), *trans*-ocimeno (3.7 %), 1-verbenona (13.8 %), verbenona (24.3 %), pineno 2,3 epoxy (0.4 %) y 4-etil-4-metil-1-hexeno (39.6 %). Finalmente, en *T. multiflora* se detectaron *trans*-tagetona (30.9 %), *trans*-ocimeno (25.6 %) y ácido valérico (43.4 %). Los metabolitos secundarios en *T. filifolia*, anetol y estragol, corresponden a

fenilpropanoides, además anís aldehído, compuesto que no se había reportado para esta especie. En las otras especies los metabolitos encontrados se tratan de terpenos.

Los resultados obtenidos dan idea de la variabilidad interespecífica que existe en cuanto al tipo de compuesto químico y concentración asociados con el área geográfica en que habitan tales especies.

Los compuestos químicos mayoritarios presentes en las muestras analizadas previamente se han reportado. Anetol y estragol en *T. filifolia* (Maestri *et al.*, 1991); tagetona, dihidrotagetona, ocimeno y ocimenona en *T. terniflora*; tagetona y dihidrotagetona en *T. minuta* (Chamorro *et al.*, 2008); dihidrotagetona en *T. zypaquirensis* (Escobar *et al.*, 2009); y tagetona, ocimenona y tagetenona en *T. multiflora* (Pichette *et al.*, 2005). Cabe mencionar que para *T. minuta* y *T. zypaquierensis*, los compuestos dihidrotagetona fue extraído en etapa vegetativa de la planta, es decir antes de la floración, y en floración ya no se obtuvo este compuesto (Chamorro *et al.*, 2008; Escobar *et al.*, 2009).

Sobre la variabilidad de los aceites esenciales (Figuras 3, 4, 5 y 6) se observan varias tendencias: a) especificidad de moléculas y abundancia, según el taxón, por ejemplo, en *T. filifolia* el mayor porcentaje fue anetol y estragol (fenilpropanoides) y en *T. zypaquirensis* terpenos como *trans*-tagetona, verbenona, 1-verbenona, *trans*-ocimeno, pineno 2,3 epoxy y 4-etil-4-metil-1-hexeno (Figuras 3 y 6); b) compuestos que se presentan en una población de una especie, no se producen en otra como en *T. minuta* (*trans*-tagetona presente en la población B pero no en la población E; *trans*-ocimeno presente en E pero no en las poblaciones B e I; y cariofileno, presencia en I pero no en las otras dos) y *T. terniflora* (verbenona y 1-verbenona, presente en Te y no en poblaciones D y G) (Figuras 4 y 5). Para multiflora se observa la presencia de tres compuestos mayoritarios que son *trans*-tagetona (30.9%) y *trans*-ocimeno (25.6%), que corresponden a terpenos; y ácido valérico (43.4%), que corresponde a un ácido graso (Figura 7).

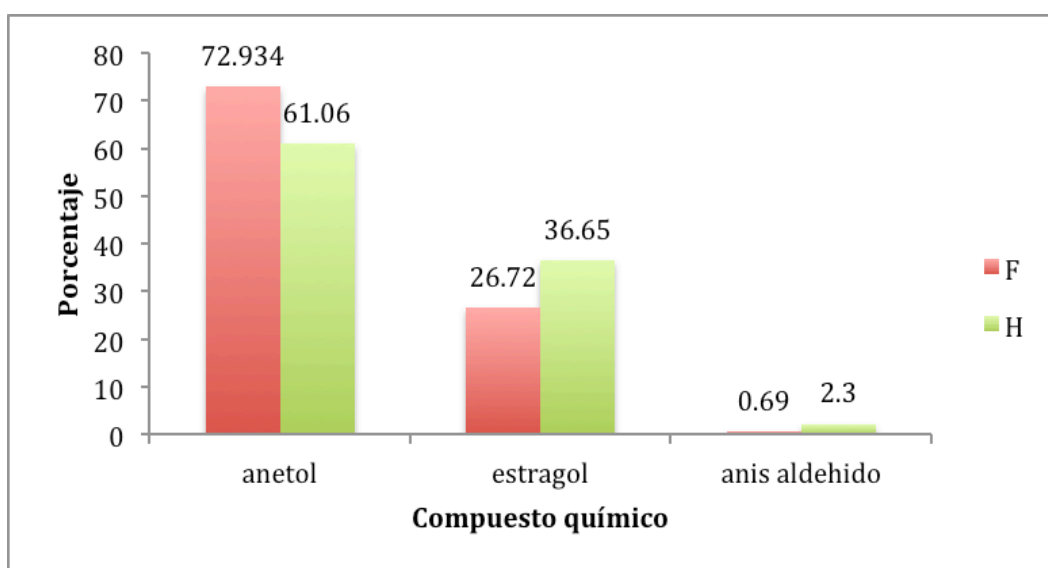


Figura 3. Composición química de *T. filifolia*. F y H, poblaciones.

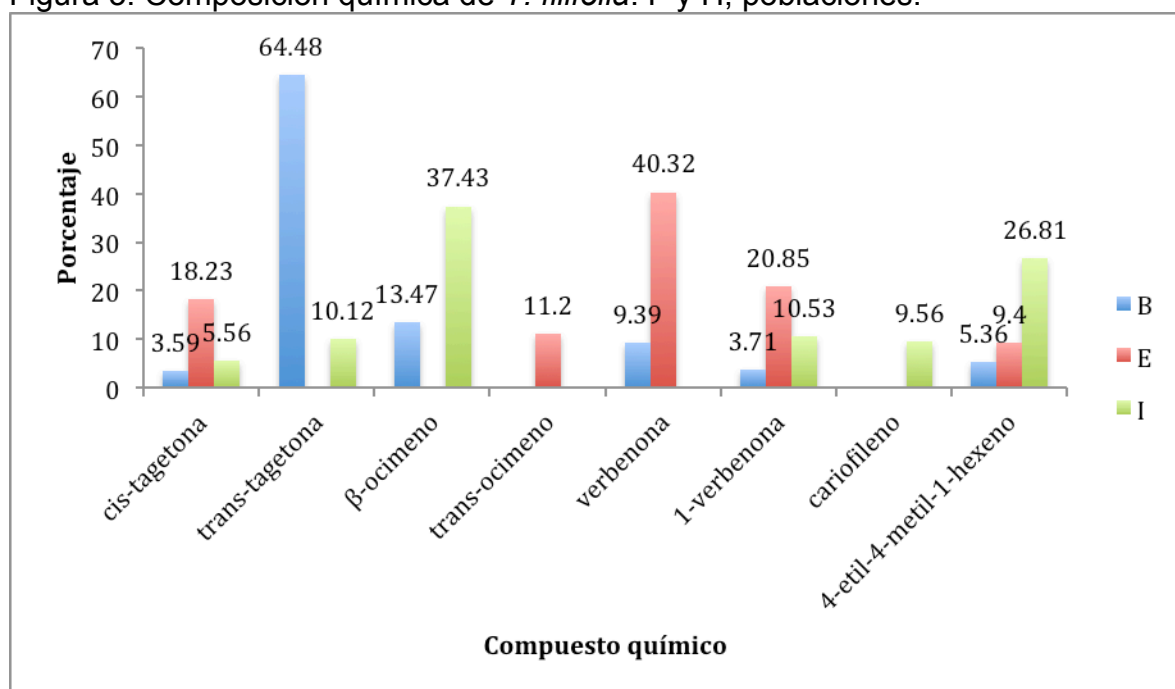


Figura 4. Composición química de *T. minuta*. B, E, I, poblaciones.

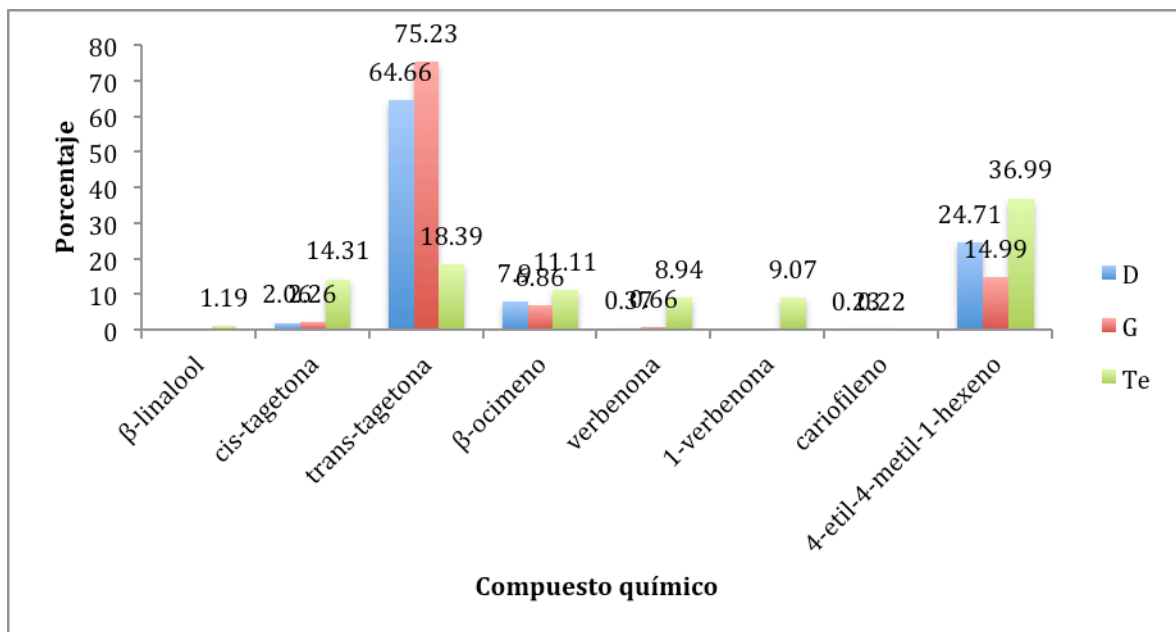


Figura 5. Composición química de *T. terniflora*. D, G, Te, poblaciones.

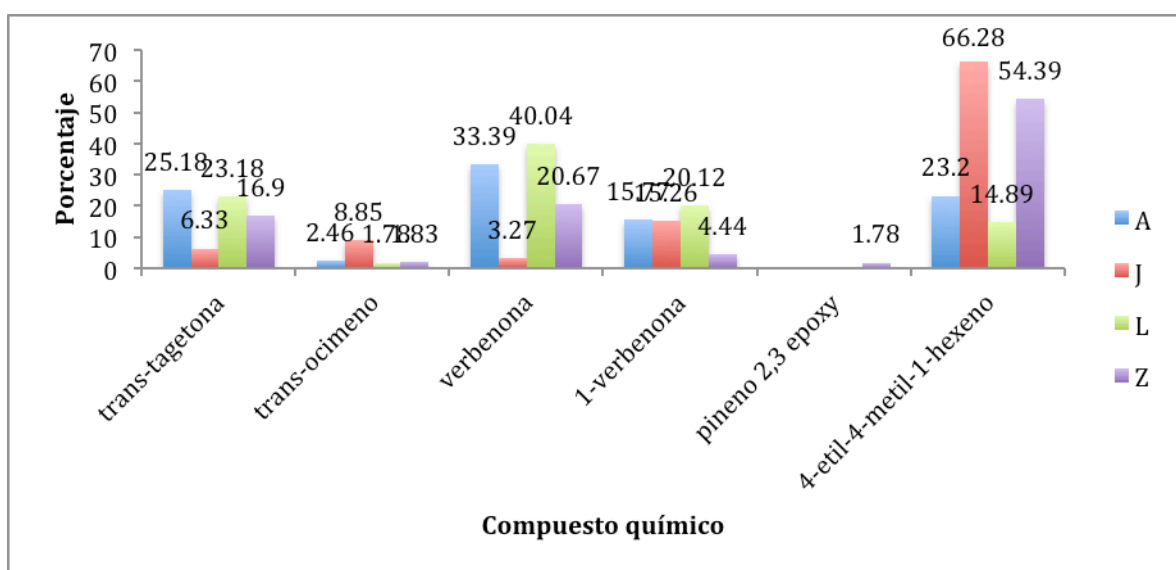


Figura 6. Composición química de *T. zypaquirensis*. A, J, L, Z, poblaciones.

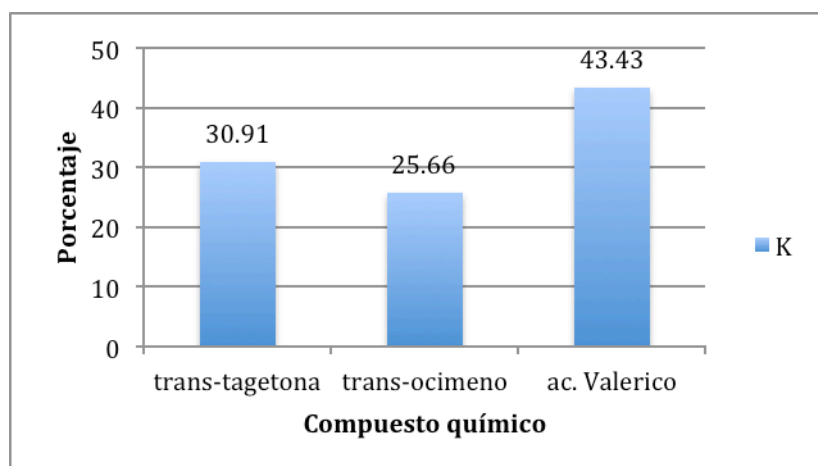


Figura 7. Composición química de *T. multiflora*. K, población.

Las tendencias antes presentadas se explican en otros trabajos (Giorgi *et al.*, 2005; Bandoni *et al.*, 2009; Sarvari, 2009; Mahzooni *et al.*, 2012; Mahzooni-Kachapi *et al.*, 2014), señalando que en diferentes especies destacan que el contenido de aceite esencial interactúa con la ubicación geográfica, aseverando que entre individuos de una misma especie, los componentes químicos, en algunos casos, varían en concentración y en otros desaparecen unos y aparecen otros a medida que varía la altitud en la que se desarrollan por ejemplo. En *T. filifolia* la variabilidad de compuestos en el aceite esencial está en función de las diferentes áreas fitogeográficas de Argentina (Maestri *et al.*, 1991).

Las diferencias presentadas en composición química, se pueden deber a varios factores, por lo que es casi imposible lograr dos aceites esenciales idénticos (Bandoni *et al.*, 2009). Como resultado del grado de sensibilidad analítica con que se trabaje, siempre se podrá encontrar alguna diferencia entre dos partidas de un mismo aceite esencial, por la época de cosecha, el año, el método de extracción, las condiciones de almacenamiento. De igual forma, variables como las condiciones geobotánicas, tipo de suelo, época de recolección y edad de la planta (Albado *et al.*, 2001; Contreras *et al.*, 2003; Bandoni *et al.*, 2009), entre otros.

Es lógico entonces pensar en la dependencia de la calidad de un aceite esencial con múltiples variables intrínsecas (genéticas, biosintéticas) (Salgueiro *et al.*, 2000) y extrínsecas (clima, suelo, radiación solar, requerimiento hídrico, momento de cosecha del material vegetal y fundamentalmente la técnica utilizada para su obtención) (Figueiredo *et al.*, 2008; Da Porto *et al.*, 2009).

Los compuestos encontrados corresponden al grupo químico de los monoterpenos (β -ocimeno, trans-tagetona y cis-tagetona), sesquiterpenos (cariofileno) (Maffei, 2010; Huang *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2012; Polo *et al.*, 2013; Lange y Ahkami, 2013;) y fenilpropanoides (anetol y estragol). Para el caso de los monoterpenos, se conoce que son las moléculas más representativas que constituyen el 90 % de los aceites esenciales (Bakkali *et al.*, 2008) y son productos típicos sintetizados en las hojas, mientras que los sesquiterpenos se encuentran presentes en las fragancias florales (Dudareva *et al.*, 2006).

Los monoterpenoides contenidos en los aceites esenciales en las plantas tienen funciones de adaptación al medio como protección contra organismos (Wink, 1988) o como importante atrayente de polinizadores (Fabiane *et al.*, 2007); además, tienen actividad antimicrobiana en *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (Bonikowski *et al.*, 2009), con efecto tóxico contra escarabajos (*Tribolium confusum* y *Dendroctonus rufipennis*) (Tunc y Erler, 2003; Wallin y Raffa, 2004), trips (*Frankliniella occidentalis*) (Janmaat *et al.*, 2002) y áfidos (Webster *et al.*, 2008), y efecto repelente contra mosquitos e insectos (Park *et al.*, 2003). En el caso de los sesquiterpenos pueden presentar actividad herbicida (Abdelgaleil *et al.*, 2009) e insecticida contra larvas y adultos (González *et al.*, 1993; Gonzalez-Coloma *et al.*, 1995; Miyazawa *et al.*, 2000). Monoterpenos y Sesquiterpenos pueden tener actividad biológica contra nematodos (Marotti *et al.*, 2010)

El β -pineno es otro compuesto no registrado en *Tagetes* que podría ser considerado un quimiotipo o raza química, del cual no se tiene antecedente sobre

posibles efectos biológicos, lo cual sugiere estudios sobre su actividad biológica. Ya se han citado α -thujeno y α -pineno para *Tagetes*, que contribuyen a las propiedades antimicrobianas del aceite contra *Artemia salina*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella thyphi* (Senatore *et al.*, 2004; De Feo *et al.*, 2005).

El compuesto β -ocimeno tiene propiedades anti-bióticas, anti-inflamatorias y anti-oxidantes, también tiene resistencia contra patógenos y protege a las plantas contra insectos plaga (Koul *et al.*, 2008; Adorjan y Buchbauer, 2010).

Los compuestos cariofileno, β -mirceno y linalool, presentan efecto insecticida contra larvas de mosquitos (Jaenson *et al.*, 2006) y también como nematocida (Duke, 2009). El β -cubebeno presenta actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* (Bezic *et al.*, 2005).

La presencia de tagetona es importante para realizar estudios de toxicidad; este compuesto ejerce efecto biológico contra plagas y enfermedades (Saavedra *et al.*, 2002; Stefanazzi *et al.*, 2006) y es un componente del aceite esencial de otras especies de *Tagetes* (Cropwatch, 2006). El metabolito tagetona pertenece a la serie de los monoterpenos no cíclicos que, junto con otros compuestos como la dehidrotagetona y la ocimenona registrados para *Tagetes* (Cropwatch, 2006) confieren el olor primario a la mayoría de las especies aromáticas de ese género cuando se frotan o rompen hojas, tallos o cabezuelas (Cropwatch, 2006).

El compuesto 4-etil-4-metil-1-hexeno y el ácido valérico son compuestos no reportados anteriormente para especies de *Tagetes*.

Sin duda alguna, los resultados sugieren ensayos toxicológicos contra diferentes organismos dada la amplia diversidad y variabilidad de metabolitos secundarios, así como estudios agronómicos para optimizar producción de biomasa asociada con rendimiento de aceite esencial.

En este estudio también se determinó la composición química del aceite esencial de *T. minuta* extraído de diferentes partes de las plantas establecidas en campo provenientes del Estado de Sonora (Figura 8).

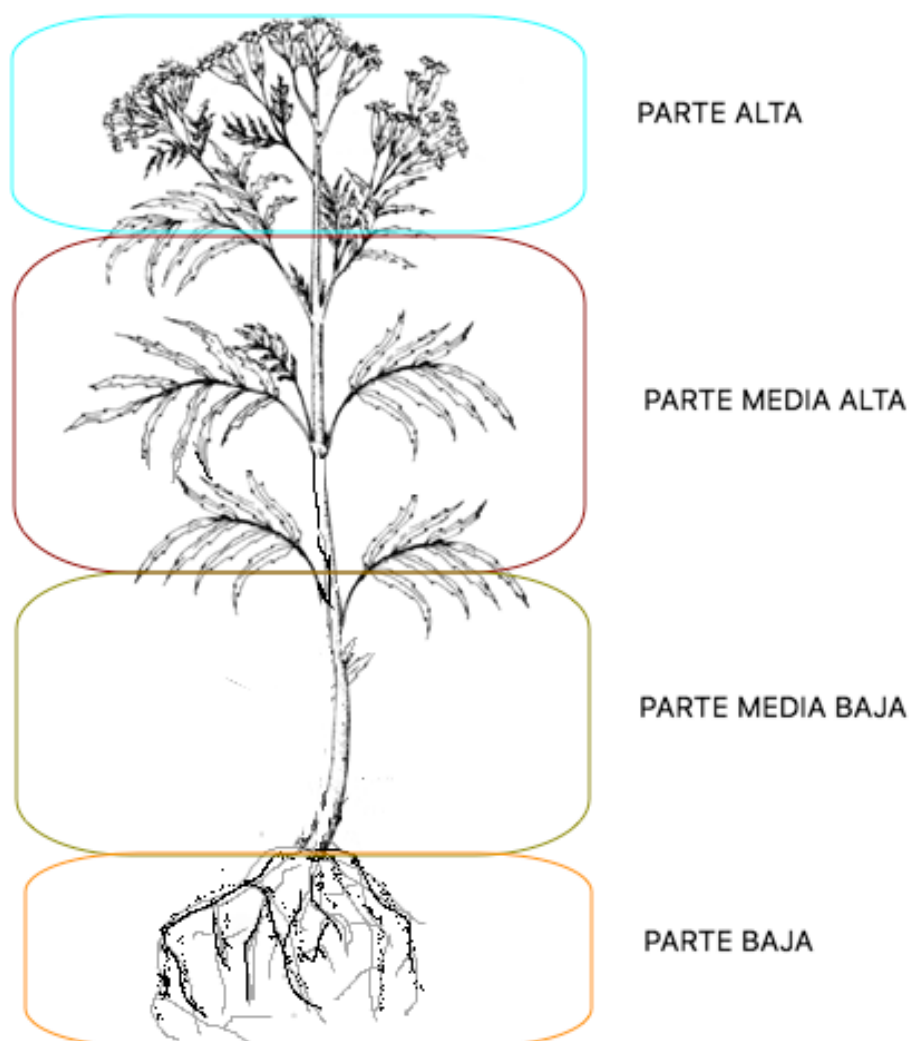


Figura 8. Partes de *T. minuta* de las que se realizó la extracción de aceite esencial.

En la parte aérea (cabezuelas) se identificaron seis compuestos (Figura 9), en tallo y hojas siete compuestos (Figura 10) y en la planta completa siete compuestos mayoritarios (Figura 11). De tallo y de raíz no se obtuvo aceite esencial.

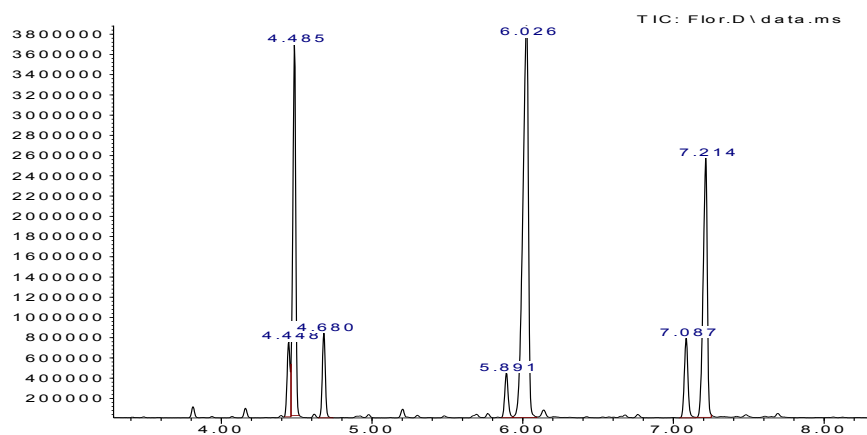


Figura 9. Cromatograma del aceite esencial de la parte alta de la planta de *T. minuta* (Tiempo eje X (min) vs abundancia eje Y).

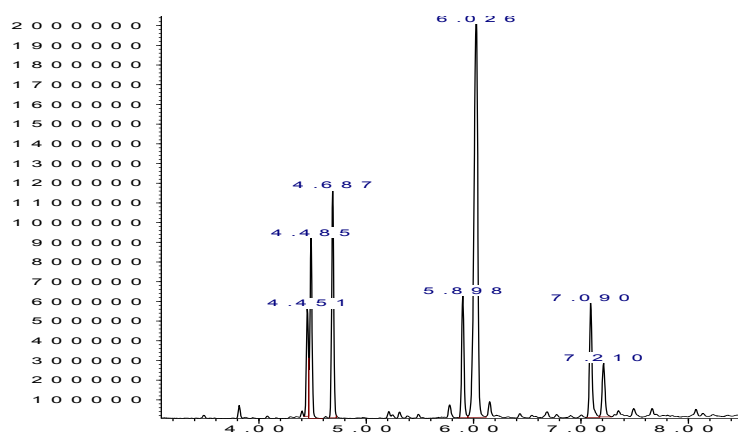


Figura 10. Cromatograma del aceite esencial de la parte media alta de la planta de *T. minuta* (tiempo eje X (min) vs abundancia eje Y).

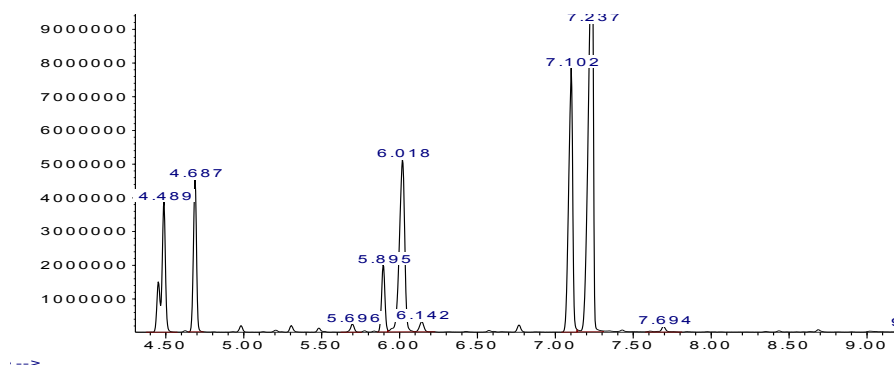


Figura 11. Cromatograma del aceite esencial de la planta completa de *T. minuta* (Tiempo eje X (min) vs abundancia eje Y).

El rendimiento de aceite esencial fue 1.4 % (de 2.2 kg de material vegetal fresco) en cabezuelas, 0.7 % en tallo-hoja (de 2.2 kg de material vegetal fresco) y 0.0004% de la planta completa (de 11 kg de material vegetal fresco). Los compuestos en cabezuelas (parte alta) fueron: *trans*-tagetona (43.5 %), β -ocimeno (21.4 %), 1-verbenona (21.3 %), verbenona (5.8 %), 4-etil-4metil-1-hexeno (5.1 %), y D-limoneno (3 %). En hoja-tallo (parte media alta) se encontraron los compuestos *tras*-tagetona (45.3 %), 4-etil-4metil-1-hexeno (14.3 %), β -ocimeno (11.8 %), 1-verbenona (8.9 %), *cis*-tagetona (8.8 %), D-limoneno (6.3 %) y verbenona (4.6 %). En la planta completa se hallaron: verbenona (45.2 %), verbenona (20 %), *trans*-tagetona (38.6 %), β -ocimeno (10.7 %), 4-etil-4metil-1-hexeno (9 %), y *cis*-tagetona (4.2 %). Los compuestos comunes fueron *trans*-tagetona, β -ocimeno, verbenona, 1-verbenona y 4-etil-4metil-1-hexeno pero en diferente concentración (Figura 12).

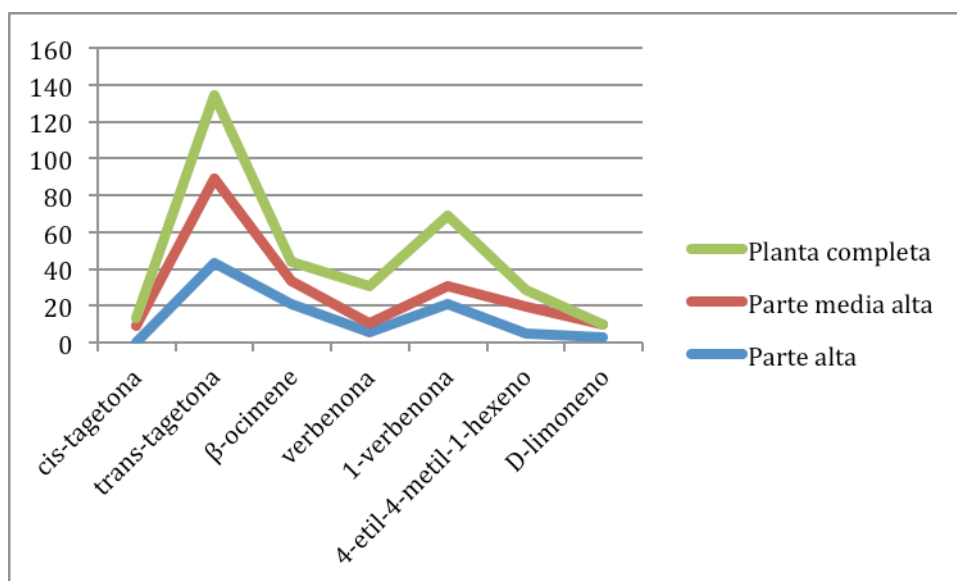


Figura 12. Composición química del aceite esencial de diferentes partes (parte alta, parte media alta) y planta completa de *T. minuta*.

Varios estudios sobre *T. minuta* muestran que hay variaciones en la composición de aceite esencial de acuerdo con el lugar de cosecha (Zygadlo *et al.*, 1993; Kéïta *et al.*, 2000), la etapa de crecimiento (Daghero *et al.*, 1996) y las diferentes partes de la planta (Weaver *et al.*, 1994). Estas consideraciones, en el transcurrir de millones de años de adaptación-evolución han originado quimiotipos dentro de la especie (Gil *et al.*, 2000). El control de calidad de los aceites esenciales debe tomar en cuenta esta información básica para el desarrollo de bioplaguicidas, toda vez que se vislumbren posibilidades de uso según evaluaciones toxicológicas contra plagas enfermedades.

1.18 CONCLUSIONES

En el aceite esencial de las especies de *Tagetes* se encontraron fenilpropanoides y terpenos con variabilidad en tipos de moléculas y abundancia en el ambiente en el que se evaluaron.

La producción de compuestos químicos de los aceites esenciales de *T. minuta* varían en cantidad y tipo de compuesto según la partes de la planta.

1.19 LITERATURA CITADA

- Abdelgaleil, M., Abdel-Razeek, N., y Soliman, S. (2009). Herbicidal activity of three sesquiterpene lactones on wild oat (*Avena fatua*) and their possible mode of action. *Weed Science*, 57(1), 6–9. <http://doi.org/10.1614/WS-08-093.1>
- Adams, R. P. (2001). Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadrupole. Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corp. Carol Stream, IL. p. 468-572.
- Adorjan, B., y Buchbauer, G. (2010). Biological properties of essential oils: An updated review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(6), 407–426. <http://doi.org/10.1002/ffj.2024>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., y Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils. *A review Food and Chemical Toxicology*, 46 (2), 446-475.
- Barrientos, J. C., Reina, M. L., y Chacón, M. I. (2012). Potencial económico de cuatro especies aromáticas promisorias para producir aceites esenciales en Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 6 (2), 225-237.
- Bernath, J. (2009). Aromatic plants. p. 329-352. In: Fuleky G. (ed.). Cultivated Plants, Primarily as Food Sources. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS). Volume Paris, France.
- Bertero, D., Mas, M. T., Verdú, A., y Trillo, C. (2009). Plantas andinas y sus usos tradicionales. *Revista Ciencia Hoy*, 19 (112).
- Bezic, N., Skocibusic, M., y Dunkic, V. (2005). Phytochemical composition and antimicrobial activity of. *Acta Botanica Croatia*, 64(2), 313–322.
- Cáceres, A., Jáuregui, E., López, B., y Logemann, H. (1992). Actividad Antifúngica de Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Cuadernos DIGI 7-92. Dirección General de Investigación- Unidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Chou, G. X. y Zhou, R. H. (1998). The variation and archetypes of the essential oil components in wild *Mentha haplocalyx* Briq. in China. *Journal of Plant Resources and Environment*, 7(3), 13-18.
- Daghero, J., y Mattea, M. (1996). Aceite Esencial de *Tagetes minuta* de la zona de Río Cuarto, cambios en la composición química en los distintos estadios de crecimiento. *X CONGRESO NACIONAL SAIPA*.
- De Feo, V., Della Porta, G., Urrunaga Soria, E., Urrunaga Soria, R., y Senatore, F. (1998). Composition of the essential oil of *Tagetes filifolia* Lag. *Flavour and Fragrance Journal*, 13(3), 145–147. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-](http://doi.org/10.1002/(SICI)1099-)

- Downum, K. R., y Towers, G. H. N. (1983). Analysis of thiophenes in the *Tagetes* (Asteraceae) by HPLC. *Journal of Natural Products*, 98–103. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D. a, y Orlova, I. (2006). Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25, 417– 440. <http://doi.org/10.1080/07352680600899973>
- Escobar, P., Viviana, L., Milena, S., Durán, C., y Stashenko, E. (2009). Composición química y actividad anti- tripanosomal de aceites esenciales obtenidos de *Tagetes* (Fam. Asteraceae), recolectados en Colombia. *Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales*, 280-286.
- Estrada, L. E. I. J., Hernández, X. E., Rojas, R. T., Engleman, E. M., y Casian, M. M. A. (1988). Códice Florentino: su información etnobotánica. *Agrociencia* 71, 275- 286.
- Figuero Soliz, N., Estevez Martini, T., y Giménez Turba, A. (1995). propiedades antibacterianas, antimicóticas e insecticidas de aceite esenciales de especies vegetales aromaticas nativas. *BIOFARBO*, 4, 51-62.
- García de León, S., y Mier, T. (2010). Visión general de la producción y aplicación de bioplaguicidas en México. *Sociedades Rurales, Producción Y Medio Ambiente*, 10(20), 37–63.
- Gil, A., Ghera, C., y Leicach, S. (2000). Essential oil yield and composition of *Tagetes minuta* accessions from Argentina. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(3), 261–274. [http://doi.org/10.1016/S0305-1978\(99\)00062-9](http://doi.org/10.1016/S0305-1978(99)00062-9)
- Gil, A., Ghera, M., y Leicach, S. (2000). *Biochemical Systematics and Ecology*, 28, 261.
- Giorgi, A., Bononi, M., Tateo, F., y Cocucci, M. (2005). Yarrow (*Achillea millefolium* L.) growth at different altitudes in Central Italian Alps: Biomass yield, oil, content and quality. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 11 (3), 47-58.
- González , D., Núñez, C., Villordo, E., Medina, G., y González, M. (2015). Genetic variability of Mexican serviceberry (*Malacomeles denticulata* [Kunth] Jones) obtained by inter simple sequence repeated or intermicrosatellites (ISSR) markers. *Multidisciplinary Scientific Journal* , 25 (4), 26-34.
- Green, M., Singer, J., Sutherlans, D., y Hibbern, C. (1991). Larvicidal activity of *Tagetes minuta* (marigold) towards *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 7 (2), 282-286.

- Gros, E. G. (1985). Introducción al estudio de los productos naturales. *Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico*. Washington, D.C., EEUU. 146
- Hernández, A. J. (2001). Respuesta de genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Nacobbus aberrans*. Tesis de Maestría. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Posgraduados. Montecillo. México. 75 p.
- Hernández, L., Sahagún, J., Rodríguez, J., Peña, M., y Rodríguez, L. (2014). Predicción de rendimiento de fruto de híbridos de tomate con huellas genómicas. *Revista Internacional de Botánica Experimental*, 83, 311-318.
- Hernández, T., Canales, M., Flores, C., García, A. M., Durán, A., y Avila, J. G. (2006). Antimicrobial Activity of *Tagetes lucida*. *Pharmaceutical Biology*, 44(1), 19–22. <http://doi.org/10.1080/13880200500509157>
- Huang, M., Sanchez-Moreiras, A. M., Abel, C., Sohrabi, R., Lee, S., Gershenzon, J., y Tholl, D. (2012). The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (E)- β -caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. *New Phytologist*, 193(4), 997–1008. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.04001.x>
- Jaenson, T. G. T., Pålsson, K., y Borg-Karlson, A.-K. (2006). Evaluation of Extracts and Oils of Mosquito (Diptera: Culicidae) Repellent Plants from Sweden and Guinea-Bissau. *Journal of Medical Entomology*, 43(1), 113–119. [http://doi.org/10.1603/0022-2585\(2006\)043\[0113:EOEAOO\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1603/0022-2585(2006)043[0113:EOEAOO]2.0.CO;2)
- Janmaat, A. F., Kogel, W. J. de, y Woltering, E. J. (2002). Enhanced fumigant toxicity of p-cymene against *Frankliniella occidentalis* by simultaneous application of elevated levels of carbon dioxide. *Pest Management Science*, 58(2), 167–173. <http://doi.org/10.1002/ps.432>
- Karousou, R., Koureas, D. N., y Kokkini, S. (2005). Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Phytochemistry*, 66(22), 2668–2673. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.09.020>
- Kéïta, S., Vincent, C., Schmit, P., Ramaswamy, S., y Bélanger, A. (2000). *Journal of Stored Products Research*, 36, 355.
- Lahlou, M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, 18(6), 435–448. <http://doi.org/10.1002/ptr.1465>
- Lange, B. M., y Ahkami, A. (2013). Metabolic engineering of plant monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes-current status and future opportunities. *Plant Biotechnology Journal*, 11(2), 169–196. <http://doi.org/10.1111/pbi.12022>

- List, T. P. (2015). *The Plant List*, 1.1. Recuperado el Septiembre de 2015, de A working list of all plant species: <http://www.theplantlist.org/>
- Loockerman, D., Turner, B., y Jansen, R. (2003). Phylogenetic relationships within the Tageteae (Asteraceae) based on nuclear ribosomal ITS and chloroplast ndhF gene sequences. *Systematic Botany*, 28, 191-207.
- Lui, J., Shi, S., Chang, E., Yang, W., y Jiang, Z. (2013). Genetic diversity of the critically endangered *Thuja sutchuenensis* revealed by ISSR markers and the implications for conservation. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 14860-14871.
- Macias, A. F., y Galindo, C. G. J. (2001). Terpenoides alelopáticos: estructura, actividad y aplicaciones. Pp. 137-161. In: Anaya, A. L., Espinoza, G. F. J., y Cruz, O. R. (Coords.). *Relaciones Químicas entre Organismos: Aspectos básicos y perspectivas*. Instituto de Ecología. Plaza Valdés S. A. de C. V. México. D. F.
- Maestri, D., Zygadlo, J., Grosso, N., Abburra, R., y Guzmán, C. (1991). Anales de Biología. *Composición química del aceite esencial de poblaciones argentinas de Tagetes filifolia Lag. (Compositae)*, Documento 17 (6), 133-137.
- Mahzooni, S., Mahdavi, M., Akbarzadeh, M., Roozbeh, N., y Rezazadeh, F. (2012). Comparison of chemical compositions of essence in *Stachys lavandulifolia* in three habitats in Mazandaran province. *Congress of Medicinal Plants Yasouj*, 262.
- Mahzooni, S., Mahdavi, M., Jouri, M., Akbarzadeh, M., y Roozbeh, N. (2014). The effects of altitude on chemical compositions and function of essential oils in *Stachys lavandulifolia* Vahl. *Int. J. Med. Arom. Plants*, 4 (2), 107-116.
- Mansaray, M. (2000). Herbal remedies food or medicines. *Chemistry and Industry*, 20, 677-678.
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). Fitoquímica orgánica. *Universidad Central de Venezuela*. Caracas, Venezuela. 537
- Marotti, I., Bonetti, A., Minelli, M., Catizone, P., y Dinelli, G. (2007). Characterization of some Italian Common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) landraces by RAPD, semi-random and ISSR molecular markers. *Department of Agroenvironmental Science and Technology, University of Bologna, Viale Fanin*, 54, 175-188.
- Martínez, G. J. (2005). Recolección y Comercialización de Plantas Medicinales en el Departamento Santa María. *Acta Farma Bonaerense*, 24 (4), 575-584. Córdoba, Argentina.

- Masotti, V., Juteau, F., Bessière, J., y Viano, J. (2003). Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its Biological Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (24), 7115-7121.
- Mato, J., Franco, L., y Fraga, M. (2012). Epigenética. *Revista Ciencias de la Salud*, 36.
- Mendoza, E., Ortega, L., Serrato, M., Villanueva, J., López, J., y Perez, R. (2014). Effects of *Tagetes coronopifolia* and *T. lemmonii* (Asteraceae) essential oils in nymphs of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Journal of Citrus Pathology*, 1.
- Miyazawa, M., Nakamura, Y., y Ishikawa, Y. (2000). Insecticidal Sesquiterpene from *Alpinia oxyphylla* against *Drosophila melanogaster*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3639–3641. <http://doi.org/10.1021/jf000325z>
- Mossi, A., Pauletti, G., Rota, L., Echeverrigaray, S., Barros, I., Oliveira, J., y otros. (2012). Effect of different liming levels on the biomass production and essential oil extraction yield of *Cunila galioides* Benth. *Documento 74* (4), 787-793.
- Muñoz Bertomeu, J., Arrillaga, I., y Segura, J. (2007). Essential oil variation within and among natural population of *Lavandula latifolia* and its relation to their ecological areas. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35 (8), 479-488.
- Murga Gutiérrez, S., Alvarado Ibáñez, J., y Vera Obando, N. (2012). Efecto del follaje de *Tagetes minuta* sobre la nodulación radicular de *Meloidogyne incognita* en *Capsicum annum* in a greenhouse. *Peru-Biologia*, 19 (3), 257-260.
- Nava-Pérez, E., García-Gutiérrez, C., Camacho-Báez, J. R., y Vázquez-Montoya, E. L. (2012). Bioplaguicidas: Una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai*, 8(3), 17–29.
- Negi, P. S. (2012). Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, 156 (1), 7-17.
- Neher R., T. 1966. Monograph of the genus *Tagetes* (Compositae). Ph. D. Dissertation. Indiana University. Bloomington, Indiana, USA. 306 p.
- Novo, M., Fernández, R., Fernández, D., Gutiérrez, M., y Cosín, D. (2012). Compilation of morphological and molecular data, a necessity for taxonomy: The case of *Hormogaster abbatissae* sp. *ZooKeys*, 242, 1-16.

- Nuñez, C., y Hernández, M. (2011). The Mexican Service berry (*Ameelanchier denticulata*): a Nex Potential Berry Fruit Crop from Semiarid Areas. *Acta Horticulturae* , 918, 917-924.
- Ornelas, F., Sosa, V., Solits, D., Danza, J., González, C., Soltis, P., y otros. (2013). Comparative phylogeographic analyses illustrate the complex evolutionary history of threatened cloud forests of northern. *Mesoamerica*, 8, 1-11.
- Ottaway, P. B. (2001). The roots of a healthy diet. *Chemistry y Industry* , 22 (2), 42-44.
- Park, I.-K., Choi, K.-S., Kim, D.-H., Choi, I.-H., Kim, L.-S., Bak, W.-C., y Shin, S.-C. (2006). Fumigant activity of plant essential oils and components from horseradish (*A Armoracia rusticana*), anise (*Pimpinella anisum*) and garlic (*Allium sativum*) oils against *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae). *Pest Management Science*, 62(8), 723–728. <http://doi.org/10.1002/ps.1228>
- Peña , M., Cortés, A., y Avila, E. (2004). Evaluación de tres niveles de pigmento de flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) sobre la pigmentación de la piel en pollos de engorda. *Téc Pecu Mex*, 42, 105-111.
- Pérez, G., Sahagún, C., y Peña, L. (2000). Estimación de varianza aditiva y heredabilidad en dos poblaciones de tomate de cáscara (*Physalis Ixocarpa* Brot.). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 23 (1), 49-57.
- Pérez, M., Navas, J., Pascual, M., y Castillo, P. (2003). Nematicidal activity of essential oils and amendements from Asteraceae against rott knot nematodes. *Plant Pathol* , 52, 395-401.
- Piccaglia, R., Marotti, M., Pesenti, M., Mattarelli, P., y Biavati, B. (1997). Chemical composition and antimicrobial cativity of *Tagetes erecta* and *Tagetes patula*, in *Essential Oils: Basic and Applied Research*, ed. By Franz CH. M. and Buchbauer, G. Allured Publishing, Carol Stream, IL. Pp. 49-51.
- Pichersky, E., Noel, J., y Dudareva, N. (2006). Biosynthesis of plant volátiles: Nature's diversity and ingenuity . *Science*, 311 (5762), 808-811.
- Pichette, A., Garneau, F., Collin, G., Jean, F., & Gagnon, H. (2005). Essential Oils from Bolivia. IV. Compositae: *Tagetes* aff. *maxima* Kuntze and *Tagetes multiflora* H.B.K. *J. Essent. Oil Res.*, 17, 27-28.
- Ploeg, A. (1999). Greenhouse studies on the effect of marigolds (*Tagetes* spp) on four *Meloidogyne* species. *Journal of nematology*, 31, 62-69.
- Ploeg, A., y Maris, P. (1999). Effect of temperature on suppression of *Meloidogyne incognita* by *Tagetes* cultivars. *Supplement to the journal of nematology*, 31 (709-714) .

- Ringuelet, J. (2013). Terpenoides. *Productos naturales vegetales*, 1, 151-190.
- Roberts, R., y Urbatsch, L. (2003). Molecular phytoeny of *Ericameria* (Asteraceae, Astereae) based on nuclear ribosomal 3'ETS and ITS sequence data. 52, 209-228.
- Rzedowski, J. (2006). Vegetación de México. Edición digital. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. 504 p.
- Saccetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Mandredini, S., Radice, M., y otros. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oil of different origin as functional antioxidants, antiradiicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91 (4), 621-632.
- Samah, S., De Teodoro, C., Serrato, M., y Valadez, E. (2015). Genetic Diversity, Genotype Discrimination and Population Structure of Mexican *Opuntia* sp., Determined by SSR Markers. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33 (3), 335-750.
- Sanches, F., Figueira, G., Mendez, A., Rodrigues, B., Camargo, M., y Szabó, M. (2012). Acaricidal activity of ethanolic extract from aerial parts of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) against larvae and engorged adult females of *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites y Vectors*, 5, 11.
- Savedra, N., Cosme, V., Viturro, C., Molina, C., y Molina, S. G. (2002). Ensayo Piloto de Extracción de Volátiles de *Tagetes terniflora* H.B.K. In *Congreso Regional de Ciencia y Tecnología NOA* (pp. 1–5). Catamarca: Secretaría de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Catamarca.
- Schoch, C., Seifert, K., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J., Levesque, C., y otros. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS*, 109, 6241-6246.
- Senatore, F., Napolitano, F., Mohamend, M., Harris, P., Mnkeni, P., y Henderson, J. (2004). Antibacterial activity of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) essential oil with different chemical composition. *Flavour Frag. J.*, 19, 574-578.
- Senatore, F., Oliviero, F., Scandolera, E., Tagliatela-Scafati, O., Roscigno, G., Zaccardelli, M., y De Falco, E. (2013). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of anethole-rich oil from leaves of selected varieties of fennel [*Foeniculum vulgare* Mill. ssp. *vulgare* var. *azoricum* (Mill.) Thell]. *Fitoterapia*, 90, 214–219. <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.07.021>
- Sepúlveda Jiménez, G., Porta Ducoing, H., y Rocha Sosa, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de fitopatología*, 21 (3), 355-363.
- Serrato Cruz, M. Á. (2010). Información documental sobre el *taxa Tagetes* para

- dimensionar su centro de origen y diversidad genética en México. In *Recopilación y análisis de la información existente de las especies de las que México es centro de origen y diversidad genética* (p. 63). México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Serrato Cruz, M. Á., y Quijano, M. L. (1993). Usos de algunas especies de Tagetes: revisión bibliográfica (1984-1992). *I International Symposium and II National Meeting of Sustainable Agriculture: Importance, and contribution of traditional agriculture* (págs. 228-238). Puebla: CEICADAR.
- Serrato Cruz, M. Á., Reyes Trejo, B., Ortega Arenas, L., Domingo Gómez, A., Gómez Sánchez, N., López Martínez, F., y Vallejo García, C. I. (2003). Anisillo (*Tagetes filifolia* Lag): recurso genetico mexicano para controlar la mosquita blanca (*Bemisia* sp y *Trialeurodes* sp.). *Revista Del Jardín Botánico Nacional*, 24(1-2), 65– 70.
- Serrato-Cruz, M. Á., Díaz-Cedillo, F., y Barajas-Pérez, J. S. (2008). Composición del aceite esencial en germoplasma de *Tagetes filifolia* Lag. de la región Centro-Sur de México. *Agrociencia*, 42, 277–285.
- Serrato, M., Díaz, F., y Barajas, J. (2005). Seasonal influence on phenology and essential oil content of *Tagetes filifolia* Lag. . *Annalen der Meteorologie* , 41 (1), 82-85.
- Serrato, M., Reyes, B., Ortega, L., Domingo, L., Gómez, N., López, E., y otros. (2003). Anisillo (*Tagetes filifolia* Lag.): recurso genético mexicano para controlar mosquita blanca (*Bemisia* sp. y *Trialeurodes* sp.) . *Revista del Jardín Boánico Nacional* , 24 (1-2), 67-70.
- Simmonds, M. S. J., Evans, H. C., y Blaney, W. M. (1992). Pesticides for the year 2000: mycochemicals and botanicals. Pp. 127-164. In: Kadir, A. A. S. A., Barlow, H. S. (Eds). *Pest management and the environment in 2000*. Malaysia, CAM International.
- Solis, R., La Rosa, R., y Olivera, J. (2011). In vitro propagation of *Carica papaya* var. PTM-331 from apical meristem. *Revista Perú Biol.* 18 (3), 343-347.
- Soule, J. 1993. Systematics of *Tagetes* (Asteraceae-Tageteae). Doctoral Thesis. The University of Texas, Austin. USA. 683 p.
- Stern, R., Andersen, R., Jameson, I., Kupper, F., Coffroth, M., Vaulot, D., y otros. (2012). Evaluating the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) as a candidate Dinoflagellate Barcode Marker. *PLOS One*, 7, 1-12.
- Stoll, G. (2000). *Natural Crop Protection in the Tropics: Letting Information Come to Life*. Margraf Verlag, Hohberg. 376 p.

- Stoother, J. L. (1997). The Biology and Chemistry of Compositae, Tagetes-systematic review. *Academic Press*, 2, 769-783.
- Sunnucks, P. (2000). Efficient genetic markers for population biology *TREE*. 15, 199-203
- Susanna, A., Garnatje, T., y García, N. (1999). Molecular phylogeny of Cheirolophus (Asteraceae: Cardueae-Centaureinae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Pl Syst. Evol.* 214, 147-160.
- Swofford, D., y Olsen, G. (1990). Phylogeny reconstruction. *Molecular Systematics*, 411-501.
- Tariq, R., Naqvi, S., Choudhary, M., y Abbas, A. (2010). Importance and implementation of essential oil of Pakistanian Acorus calamus Linn., as a biopesticide. (J. Bot, Ed.) 42, 2043-2050.
- Terblanche, F., y Coronelius, G. (2000). A literature survey of the antifungal activity of essential oil constituents. *Essential Oil Bearing Plants*, 3 (3), 139-156.
- Theis, N., y Lerchau, M. (2003). The evolution of function in plant secondary metabolites. *International journal of Plant Sciences*, 164 (3), 93-102.
- Tilman, D., Reich, P., y Knops, J. (2006). Biodiversity and ecosystem stability in a decade long grassland experiment. *Nature*, 441, 629-632.
- Tisserand, R., y Young, R. (2014). Essential Oil, Safety. *Churchill*, 757.
- Toledo, V. (1988). La diversidad biológica de México. *Ciencia y Desarrollo*, 14, 17-30.
- Tripathi, N., Chouhan, D., Saini, N., y Tiwari, S. (2012). Assessment of genetic variations among highly endangered medicinal plant Bacopa monnieri (L.) from Central India using RAPD and ISSR analysis. *Biotech*, 2, 323-336.
- Tunc, I., y Erler, F. (2003). Repellency and repellent stability of essential oil constituents against *Tribolium confusum*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 110(4), 394-400.
- Turner, B. (1996). The Comps of Mexico-A systematic account of the family Asteraceae. *Phytol Memoirs*, 6 (10), 1-93.
- Turner, B. L. (1996). The Comps of exico: A systematic account of the family Asteraceae. *Phytologia Memoirs*, 6 (10), 1-22, 43-93.
- Ulloa, C. (2006). Aromas y sabores andinos. (M. Moraes, L. Kvist, B. Ollgard, y H. Balslev, Edits.) *Bótanica Económica de los Andes Centrales*.

- Valadez, E., y Kahl, G. (2000). Huellas de ADN en genomas de plantas. *Mundi Prensa*, 39-86.
- Vanegas, P. E., Valdez Morales, M. E., Valverde, A., Cruz Hernández, O., y Paredes López, O. (2006). Particle bombardment, a method to gene transfer in marigold. *Plant Cell Tiss*, 84 (359-363) .
- Vargaz Ponce, O., Zizumbo Villarreal, D., y Colunga García Marín, P. (2007). In situ diversity and maintenance of traditional agave landraces used in spirits production in West-Central Mexico. *Biodivers Conserv*, 16, 1653-1667.
- Vasudevan, P., Kashyap, S., y Sharma, S. (1997). *Bioresource Technology*, 62, 29.
- Villaseñor, J. L. (2003). Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México. *Interciencia*, 28, 160-167.
- Wallin, K. F., y Raffa, K. (2004). Feedback between individual host selection behavior and population dynamics in an eruptive herbivore. *Ecological Monographs*, 74, 101-116.
- Weaver, D., Wells, C., Dankel, F., Bertsch, W., Sing, S., y Sirharan, S. (1994). *Econ. Entomol.* 87, 1718.
- Webster, B., Bruce, T., Dufour, S., Birkemeyer, C., Birkett, M., Hardie, J., y Pickett, J. (2008). Identification of volatile compounds used in host location by the black bean aphid, *Aphis fabae*. *Journal of Chemical Ecology*, 34(9), 1153–1161. <http://doi.org/10.1007/s10886-008-9510-7>
- Zavaleta, M., y Gómez, R. (1995). Effect of *Tagetes erecta* L.- tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) intercropping on some tomato pest. *Fitopatología*, 30, 35-46.
- Zygadlo, J., Maestri, D., y Ariza, L. (1993). Composición química por parte de las plantas. *Journal of Essential Oil Research*, 51, 85.

CAPITULO IV.
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES DE *Tagetes*
ORIGINARIAS DE SUDAMÉRICA

1.20 RESUMEN

Diez iniciadores ISSR se utilizaron en poblaciones de *Tagetes filifolia*, *T. terniflora*, *T. minuta*, *T. zypaquirensis* y *T. multiflora*. El objetivo del análisis fue evaluar el polimorfismo entre genotipos y caracterizarlos. Los iniciadores ISSR permitieron elaborar dendrogramas que señalan la relación de parentesco entre los ejemplares analizados a través de bandas conservadas, así como mutaciones de bandas variables que podrían ser causadas por factores medio-ambientales, además el polimorfismo seguramente causado por mutaciones o posible hibridación. En las cinco especies *Tagetes* de Sudamérica se detectaron 194 bandas totales, de las cuales 193 bandas presentan 100 % de polimorfismo, indicando alta diversidad genética en el material estudiado. Además la estadística PhiPT para diversidad genética, se observa un 55 % de variación entre las especies de *Tagetes minuta*, *T. filifolia*, *T. terniflora* y *T. zypaquirensis*; y un 45 % de variación entre poblaciones de la misma especie.

Palabras clave: *Variabilidad genética, perfil molecular, ISSR, polimorfismo.*

1.21 ABSTRACT

Ten ISSR primers were used in populations of *Tagetes filifolia*, *T. terniflora*, *T. minuta*, *T. zypaquirensis* and *T. multiflora*. The objective of the analysis was to evaluate the polymorphism between genotypes and to characterize them. The ISSR initiators allowed to elaborate dendrograms that indicate the relation of kinship between the analyzed individuals through conserved bands, as well as mutations of variable bands that could be caused by environmental factors, besides the polymorphism probably caused by mutations or possible hybridization. In the five *Tagetes* species of South America, 194 total bands were detected, of which 193 bands presented 100% polymorphism, indicating high genetic diversity in the studied material. In addition to the PhiPT statistics for genetic diversity, there is a 55% variation between the species of *Tagetes minuta*, *T. filifolia*, *T. terniflora* and *T. zypaquirensis*; And 45% variation among populations of the same species.

Keywords: genetic variability, molecular profile, ISSR, polymorphism.

1.22 INTRODUCCIÓN

Especies nativas de *Tagetes* de *Sudamérica* están distribuidas a lo largo de la Cordillera de los Andes, entre los 2000-3500 msnm, a diferencia de las especies introducidas y domesticadas como son *T. erecta* y *T. patula* que abarcan un rango de distribución de 0-3000 msnm, lo que corresponde a Regiones Costa, Sierra, Amazónica e Insular (Tropicos, 2015). Muchas de las especies de *Tagetes* son un recurso etnobotánico, el cual tiene usos ancestrales que hasta la actualidad se los aplica a nivel local en comunidades indígenas de la región Andina. Los *Tagetes filifolia* y *T. terniflora* se usan como aditivos alimenticios (De la Torre *et al.*, 2008). *T. minuta* (color marron) y *T. filifolia* (color amarillo) se usan para teñir prendas de vestir; pero también los usos de este género se expanden a bebidas alcohólicas por ejemplo una de ellas se prepara con anís (*T. filifolia*) y se da sabor a la chicha y a la humita (Bertero *et al.*, 2009).

Para que los materiales genéticos puedan ser intercambiados, e incluso conservados en un banco de germoplasma, es necesaria su correcta clasificación e identificación, con el propósito de evitar duplicados el momento de la selección de un material determinado, así como para mantener un rango adecuado de diversidad genética, ya que el principal objetivo de la conservación es dar un uso adecuado y oportuno del recurso fitogenético.

Los métodos biotecnológicos como los marcadores moleculares, pueden ser de gran ayuda para un manejo adecuado de esta biodiversidad (Castillo, 1996). La variabilidad en caracteres morfológicos es el procedimiento clásico para evaluar la diversidad genética; en muchas especies vegetales, especialmente en cultivos anuales, ha sido la herramienta principal usada por los fitomejoradores. Sin embargo, con la tecnología de marcadores moleculares se ha desarrollado una nueva alternativa para que los recursos genéticos puedan evaluarse y caracterizarse al nivel de su ADN (Lanaud y Lebot, 1995).

Existe escasa información referente a caracterización molecular de especies de *Tagetes* para la conservación de este recurso etnobotánico.

1.23 MATERIALES Y MÉTODOS

1.23.1 Recolección del material biológico

Los materiales del género *Tagetes* que se trabajaron, los proporcionó el Dr. Miguel Ángel Serrato Cruz, profesor-investigador de la Universidad Autónoma de Chapingo, además de identificarlos de manera independiente a este trabajo. Las plantas de *T. minuta*, *T. terniflora*, *T. multiflora*, *T. zypaquirensis* y *T. filifolia* se establecieron en los invernaderos del Campo Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, y posteriormente se colectó para la extracción de ADN.

1.23.2 Extracción de ADN

El material vegetal se lavó con alcohol 70 %, se escurrió en papel secante y se pesaron 0.6 g. La muestra se molió en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un fino polvo. Con una espátula se transfirió al microtubo que contenía el amortiguador precalentado y se mezcló.

Se colocaron los tubos en el termoblok a 65 °C durante 20 min, luego se retiraron y se añadieron 200 uL de acetato de potasio 5 M, se centrifugó a 12000 g, durante 20 min.

Transcurrido los 20 mins se transfirió a otro microtubo de 1.5 mL y se agregó un volumen del doble de la muestra de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó por 2 mins y posteriormente se centrifugó a 12,000 xg durante 5 mins. La fase acuosa (superior), se colocó en otro microtubo y se agregaron 500 µL de isopropanol frío, y se dejó reposar a -20°C durante 30-60 mins. Después se centrifugó a 8,000 xg por 5 mins, se decantó el sobrenadante cuidadosamente para no perder el precipitado y se escurrió sobre una toalla sanitaria para luego

disolver la pastilla en 700 μL de TE. Se dejó toda la noche a 4 $^{\circ}\text{C}$ para que se disolvieran los ácidos nucleicos.

Al día siguiente se agregó 8 μL de RNasa a 250 ug mL^{-1} , para eliminar el ARN, luego 70 μL de acetato de sodio 3 M y 700 μL de isopropanol frío y se agitó por inversión hasta que se obtuvo el precipitado de ADN y se colocó a -20 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 mins.

Luego se centrifugó a 8,000 $\times g$ durante 10 mins, se decantó cuidando de no perder el ADN, se agregaron 500 μL de etanol al 70 % (grado reactivo). Posteriormente se centrifugó a 8,000 $\times g$ durante 10 mins. Finalmente se decantó y escurrió sobre una toalla sanita, y se disolvió en 50-100 μL de TE.

1.23.3 Cuantificación y calidad del ADN

La cuantificación del ADN se realizó usando el NanoDrop, donde se colocaron 2 μL del ADN extraído y se determinó la relación 260/280 para evaluar la pureza de la muestra y la concentración de ADN en $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$.

1.23.4 PCR

Para la PCR se preparó la mezcla de reacción siguiente (Cuadro 5):

Cuadro 4. Reactivos para la PCR (para una reacción).

Reactivos	[Inicial]	[Final]	1 Reaccion (1x, 25 μL)
Agua	-	-	5.2 μL
Mexcla de dNTP's	500 $\mu\text{M c/u}$	200 μM	10.0
Amortiguador	10x	1x	2.5
MgCl_2	50 mM	3.0 mM	1.5
Iniciador	10 $\text{ng}/\mu\text{L}$	30 ng	3.0
ADN <i>Taq</i> pol.	5 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	1.5 U/reacción	0.3
ADN	10 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	25 ng	2.5

*Para 17 muestras

Las muestras se amplificaron usando el programa ISSR establecido previamente en el termociclador (Cuadro 6):

Cuadro 5. Programa para PCR para marcadores moleculares ISSR.

	T °C	Tiempo	Ciclos
Pre-desnaturalización:	93	1 min	1
Desnaturalización	93	20 seg	40
Alineamiento	*	1 min	
Extensión	72	20 seg	
Extensión final	72	6 min	1
Enfriamiento	10	∞	-

La temperatura (T_m°) de alineamiento varía dependiendo del iniciador (Cuadro 6).

1.23.5 Análisis de agrupamiento.

La matriz que se realizó a partir de las bandas obtenidas de la amplificación se fundamenta en la ausencia y presencia de los fragmentos amplificados (bandas), donde el valor 1 se utiliza como variable para registrar la presencia y el valor 0 para registrar la ausencia. La ausencia de bandas significa que dichos microsatélites son recesivos y por alguna modificación en su secuencia, no fueron amplificadas.

Una vez que se generó la matriz de datos, el archivo se cargó en el programa FreeTree y mediante un análisis de Neighbor Joining, se construyó un dendograma que muestra las relaciones de parentesco de los materiales analizados (Schliep, 2011).

Las bandas de cada marcador de ISSR se registraron como caracteres cualitativos para su presencia (1) o ausencia (0) y se creó una matriz binaria. También se calcularon el número de alelos y el número de alelos únicos (alelos con una frecuencia inferior al 5%) para cada locus. Se utilizó Power Marker 3.25 (Liu y Muse 2005) para determinar el valor de contenido de información de polimorfismo promedio (PIC) para cada par de cebadores, y el índice de marcador (MI) se

calculó como: $MI = \text{no. De los alelos} \times PIC$.

La similitud genética entre accesiones se calculó sobre la base del coeficiente de datos utilizando el subprograma SIMQUAL NTSY Spc 2.21o (Rohlf 2002). El análisis de clúster se realizó utilizando el método de la media aritmética del grupo de pares no ponderado (UPGMA) en el subprograma NTSYSpc SAHN. El análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la matriz de similitud genética se realizó utilizando GenAlEx 6.501 (Peakall y Smouse 2012). PCoA se utilizó para visualizar distancias genéticas entre accesiones y especies.

1.24 RESULTADOS

1.24.1 Polimorfismo ISSR

De los diez marcadores de ISSR analizados en el presente estudio, nueve loci generaron productos de amplificación reproducibles, claros y distintos, y todos los loci polimórficos. Mientras tanto, el marcador (UBC 840) mostró bajo porcentaje de polimorfismo y bajo número de bandas. Un total de 194 bandas se detectaron, de las cuales 193 presentaron 100 % de polimorfismo. Los valores medios de PIC variaron de 0.279 (PI01) a 0.337 (LOL2), con un promedio de 0.2314 para todos los loci analizados. Los valores de MI para ISSR loci varió de 3.908 (PI01) a 7.745 (LOL2), con un promedio de 6.740 (Cuadro 7).

Cuadro 6. Lista de marcadores ISSR usados en el análisis, número de alelos y valores de PIC y MI obtenidos para cada primer.

Iniciador	Secuencia	T _m ^o	NBT	NB P	%P	RP	PIC	MI
ISSR 3^a	(GA) ₈ CTC	58	22	22	100	11.714	0.334	7.347
ISSR 5^a	(AC) ₈ CTA	56	20	20	100	8.714	0.313	6.255
ISSR 6^a	(AC) ₈ CTG	58	21	21	100	8.286	0.289	6.061
ISSR 7^a	(AG) ₈ CTG	58	24	23	95.8	11.571	0.328	7.540
UBC 848	(CA) ₈ AGG	54	21	21	100	10.286	0.332	6.980
LOL 2^c	(CT) ₈ GC	56	23	23	100	11.571	0.337	7.745
PI01^d	(CA) ₆ AGCT	48	14	14	100	5.857	0.279	3.908
PI02^d	(CA) ₆ AGG	48	22	22	100	11.286	0.331	7.276

PI03^d	AGCT(GACA) ₃	48	27	27	100	10.286	0.280	7.551
	Total	194	193	99				

^a Bojinov and Danailov (2009)

^b González-Guzmán *et al.* (2009)

^c Marotti *et al.* (2007)

^d Vargas-Ponce (2007)

1.24.2 Diferencias de Genotipos, diversidad genética y análisis de conglomerados

Los nueve loci ISSR amplificaron diferente número de alelos que oscilaron entre 20 a 27, con un promedio de 23.5 por accesión. El coeficiente estimado entre las accesiones varió de 0,097 (las accesiones más distanciadas fueron *T. filifolia* 2 y *T. minuta* 3 a 0.8; y las accesiones más similares fueron *T. zypaquirensis* 3 y 4), lo que indica una alta diversidad genética en el material estudiado, y estas relaciones se apoyaron con el análisis de conglomerados (Figura 13).

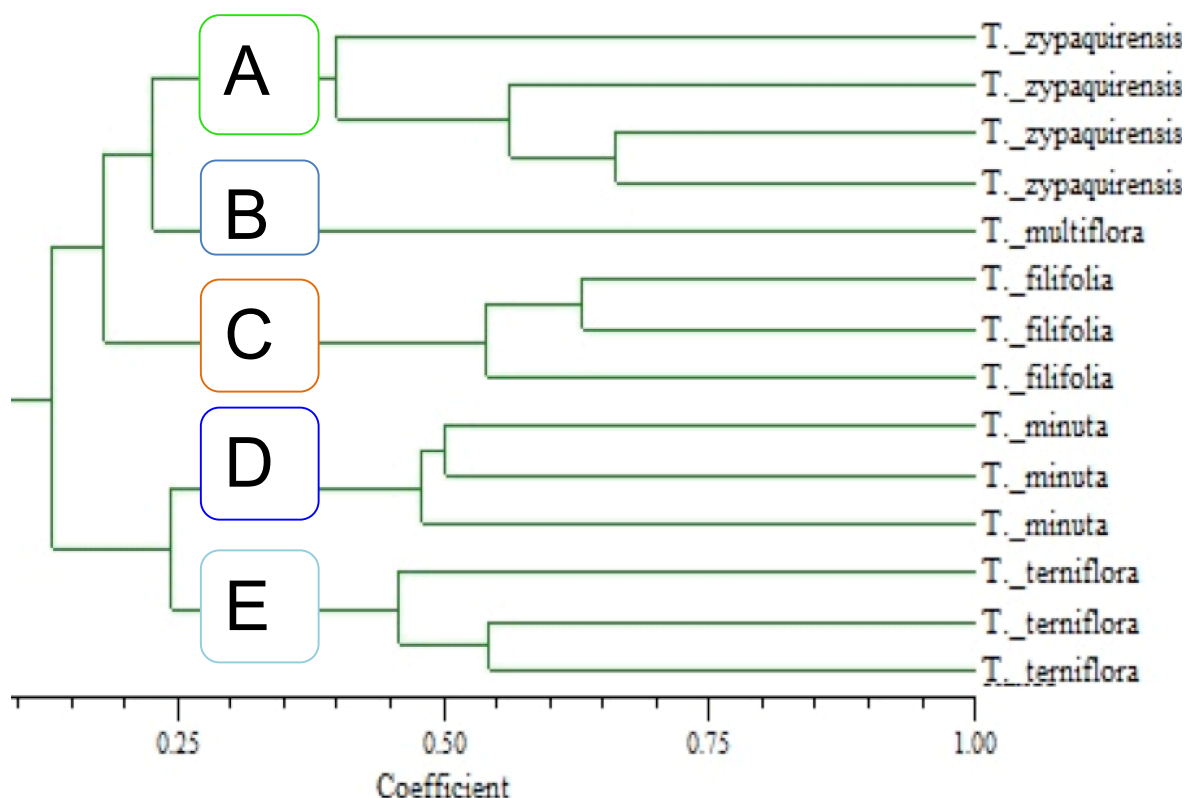


Figura 13 Dendrograma de 15 accesiones de *Tagetes* obtenidos a partir de marcadores ISSR usando el coeficiente de Nei and Li/Dice y como método de agrupamiento UPGMA. Los números de los nodos indican el porcentaje obtenido.

El dendrograma UPGMA permitió apreciar cinco grupos relacionados A, B, C, D y E (Figura 13); y un grupo externo (outgroup). El criterio para realizar el corte del Dendrograma y clasificar los clados fue biológico, de esta manera se separa claramente las especies de *T. zypaquirensis* (grupo A), *T. multiflora* (grupo B), *T. filifolia* (grupo C), *T. minuta* (grupo D), y *T. terniflora* (grupo E).

1.24.3 PCoA

El análisis multivariado PCoA (Cuadro 7; Figura 14) se utilizó con la finalidad de confirmar el resultado anterior (Figura 13). En el Cuadro 7 se aprecia que PCoA reveló que en los ejes 1 y 2 hay un porcentaje de variabilidad acumulada del 68.79% y en los tres un porcentaje de variabilidad acumulada del 81.41%. Además, el grado de diferenciación genética entre las diferentes especies

representadas con más de una adhesión se cuantificó con el análisis PCoA.

Cuadro 7. Porcentaje de variación explicada por los 3 primeros ejes.

Ejes	1	2	3
%	42.09	26.70	12.62
Cum %	42.09	68.79	81.41

En el diagrama de coordenadas principales (Figura 14) se aprecia la distribución de las accesiones en un plano de dos ejes, según el criterio de la variabilidad existente entre ellos. Este análisis se realizó para fortalecer el resultado ya obtenido con el dendrograma (Figura 13). La especie multiflora no se incluyó en el diagrama de coordenadas principales ya que el programa no acepta poblaciones con un solo individuo para el análisis.

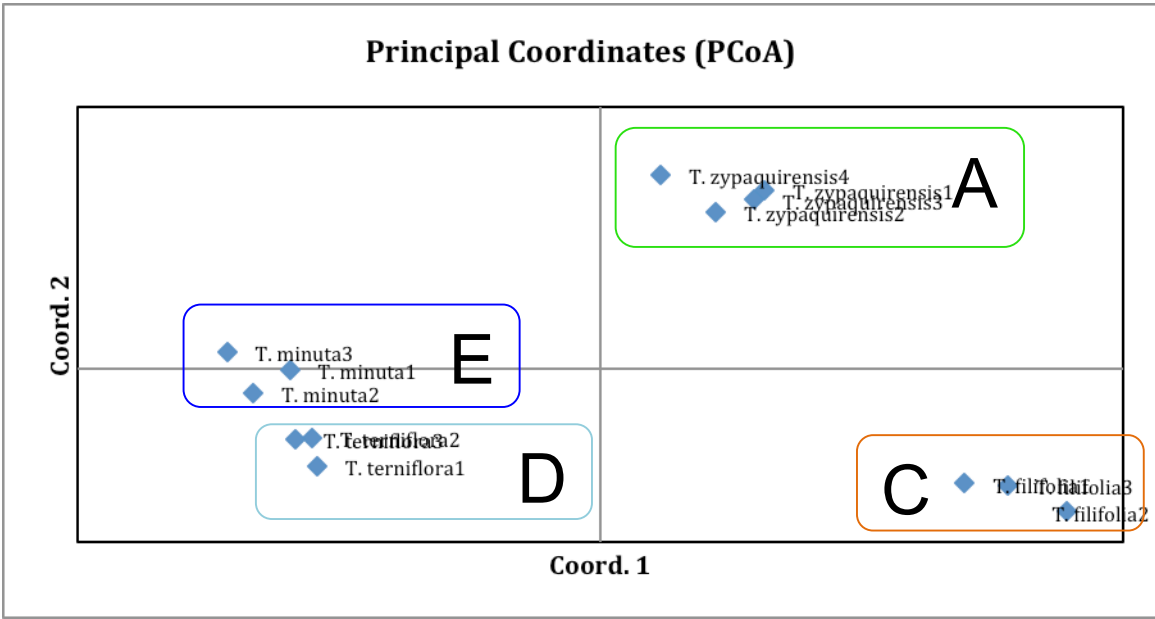


Figura 14. Análisis de coordenadas principales de poblaciones de cinco especies de *Tagetes* con base en el análisis por marcadores ISSR.

Los resultados mostraron que las especies *T. zypaquirensis* y *T. filifolia* se distancian de las especies restantes (Figura 14). Las especies de *T. minuta* y *T. terniflora*, por el contrario, se mantienen separadas pero con una relación muy estrecha como se observa también en la Figura 13. Estas se distribuyeron

alrededor del centro de la gráfica con separación clara y mostraron una constitución genómica común entre poblaciones, pero diferente respecto a las otras especies. Estos resultados confirman la idea de la necesidad de revisar los límites entre las especies de *Tagetes*.

1.24.4 AMOVA

En el Cuadro 8 de la estadística AMOVA para diversidad genética, se observa la que existe un 55% de variación entre poblaciones (diversidad genética), y un 45% de variación genética dentro de una misma población.

Cuadro 8 Resumen de AMOVA

Source	df	SS	MS	Est. Var.	%
Among Pops	3	244.045	81.348	20.144	55%
Within Pops	9	146.417	16.269	16.269	45%
Total	12	390.462		36.412	100%

Stat	Value	P(rand >= data)
PhiPT	0.553	0.001

Además, ya que $\Phi_{IPT} > 0$ (Cuadro 8) se acepta la hipótesis alternativa (existe variación genética), y se puede aseverar que hay diferencia genética entre las poblaciones y entre las especies.

1.25 DISCUSION

1.25.1 Polimorfismo ISSR en *Tagetes*

En relación con el al número de individuos seleccionado para realizar este trabajo, se tomaron en cuenta varios factores. En primer lugar, Nei (1978) indica que el número de individuos a ser utilizados para estimar distancia genética puede ser muy bajo, incluso menor que diez si el número de *loci* es mayor de 50. Este autor estima que en la construcción de un dendrograma a partir de las distancias

genéticas para un grupo de especies, un solo individuo puede ser suficiente en la obtención de la topología correcta del mismo si los niveles de heterocigosidad son bajos.

Hollingsworth y Ennos (2004) indican que cuando existen altos niveles de diferenciación entre poblaciones (por ejemplo $F_{st} \geq 0.15$), un número de loci de 50 es suficiente para confiar en la resolución de los agrupamientos que resulten del estudio. En este caso, el valor de F_{st} fue de 0.55 (Cuadro 8) con 194 loci en total.

En el presente estudio, la diversidad genética de tres accesiones por especies de *Tagetes* se analizó sobre la base de 10 marcadores de ISSR. Nueve de los diez cebadores evaluados inicialmente, amplificaron fragmentos con éxito en todos los genotipos, mostrando un alto grado de polimorfismo entre las poblaciones y las especies analizadas.

En otros cultivos y frutales como membrillo cimarron, tomate, agave y frijol, los ISSR han sido bastante exitosos con fines de diferenciación, llegando a reportarse hasta un promedio de polimorfismo de 85 % (Marotti *et al.*, 2007; Dávila *et al.*, 2007; Gonzáles *et al.*, 2014; Núñez *et al.*, 2015).

Entre los trabajos realizados en caracterización molecular para *Tagetes*, analizaron 12 accesiones de *T. patula* y 2 de *T. erecta* utilizando 10 marcadores ISSR, los cuales dieron un total de 145 bandas de las cuales 138 fueron polimórficas (Qi, Ning, & Bao, 2007); en otro trabajo también se analizaron accesiones de *T. patula* y *T. erecta*, en ese caso fueron 15 accesiones donde se evaluaron 20 primers RAPDS y 12 ISSR, obteniendo porcentajes de polimorfismo de hasta 83% y 90% de polimorfismos respectivamente para estas especies (Banyal, 2013). Marcadores ISSR se evaluaron en algunas especies de *Tagetes* de México en el Laboratorio de Molecular del Departamenteo de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, dando como resultado 100% de polimorfismo (datos sin publicar), por lo que se consideraron para analizar accesiones de

Tagetes de Sudamérica. Los iniciadores evidenciaron alto porcentaje de polimorfismo, pero el iniciador UBC840, que detectó muy bajo polimorfismo, se descartó debido a la falta de amplificación. Esto se puede deberse a divergencias entre las especies de *Tagetes* analizadas en este estudio y las evaluadas anteriormente (Samah *et al.*, 2015). En tomate se observó que los iniciadores en cuya secuencia incluyen adenina (A) en combinación con guanina (G) y/o citosina (C) (GA, AG, CA, AC y AGC) generan el mayor número de bandas polimórficas. Por esta razón, los iniciadores ISSR, previamente reportados por Bojinov y Danailov (2009), dieron mejores resultados que los de University of British Columbia (Hernández *et al.*, 2014) al igual que como ocurrió con *Tagetes* en este estudio.

Los valores medios de CFP y MI son un reflejo de la diversidad alélica entre los genotipos analizados. Teniendo en cuenta ambos valores de MI y el número de alelos, los nueve iniciadores se pueden considerar informativos porque mostraron MI valores superiores a 3 y generaron más de 12 alelos por locus (Cuadro 6).

Es de destacar que los mismos 10 marcadores ISSR se usaron para analizar una accesión de cacahuete (*Arachis hypogaea*) como grupo externo. Nueve de estos marcadores de ISSR (excepto UBC848) amplificaron en *Arachis hypogaea*, un máximo de tres y mínimo de una banda.

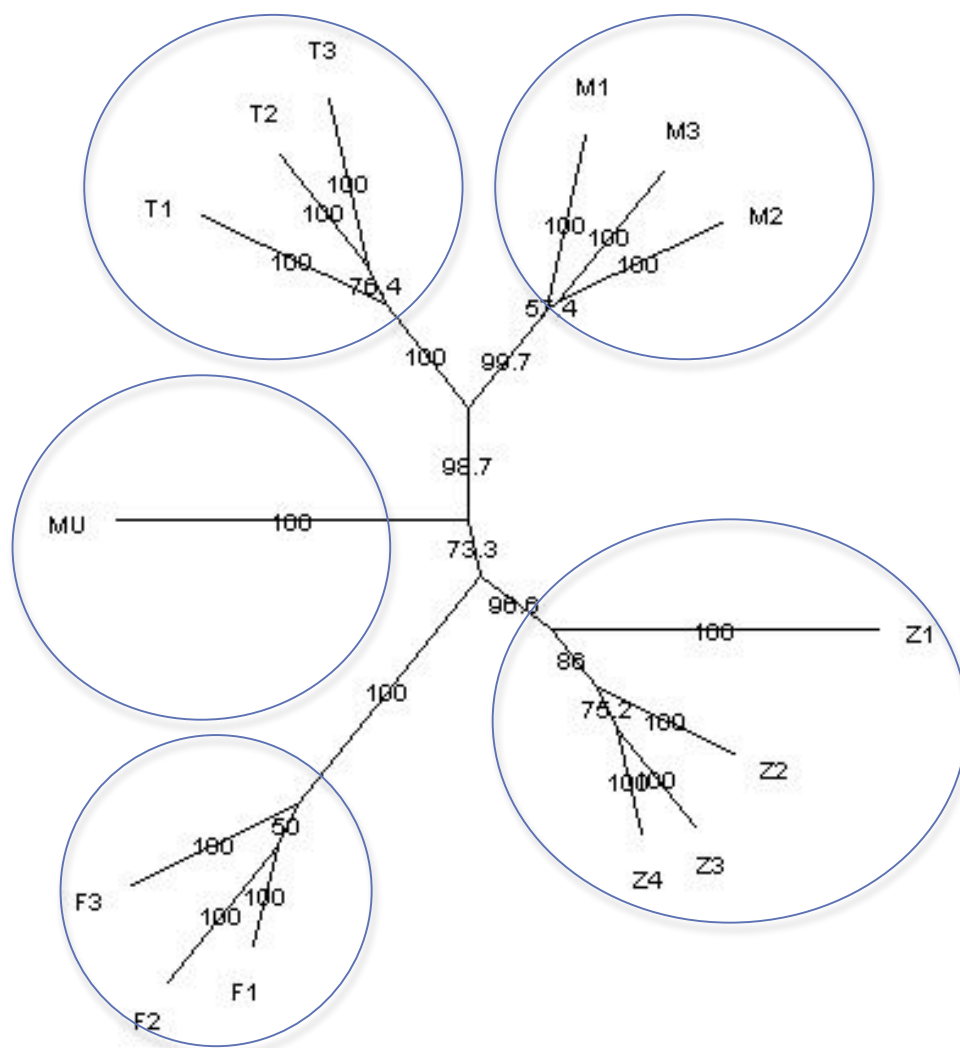


Figura 15 Método de red. Media joining de 15 accesiones de *Tagetes* obtenidos de por marcadores ISSR. F: *T. filifolia*, M: *T. minuta*, Mu: *T. multiflora*, T: *T. terniflora* y Z: *T. zypaquierensis*.

El análisis de redes (Figura 15) reveló una distribución lineal, además, agrupó de forma más distribuida a las especies, de tal manera que se puede apreciar a *T. multiflora* como una especie independiente o no tan cercana a *T. zypaquierensis* (porcentaje de agrupación, 73.3 %) como ya se había detectado en la Figura 13. Además, logró corroborar una relación cercana entre *T. minuta* y *T. terniflora* en el análisis de conglomerados y en coordenadas principales, mostrando en el análisis de red un porcentaje de agrupación del 98.7 %.

Las relaciones evolutivas suelen representarse mediante árboles filogenéticos, basados en un modelo de evolución dominada por las mutaciones, recombinaciones y eventos de especiación. Por lo que los modelos más realistas deben tener en cuenta también de la génesis de genes, los eventos de pérdida y duplicación, la hibridación, la transferencia horizontal de genes y la recombinación. Por la razón mencionada, el modelo de red y análisis de agrupación (Figura 16) tienen un papel importante que desempeñar.

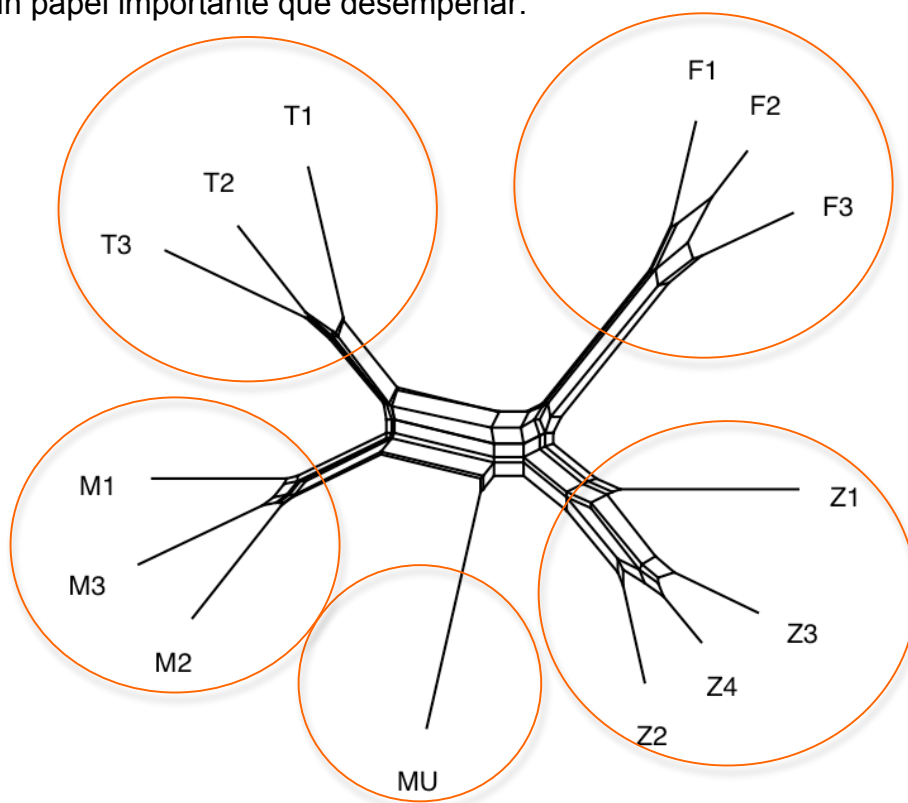


Figura 16. Análisis de agrupación de cinco especies de *Tagetes* usando SplitsTree. F: *T. filifolia*, M: *T. minuta*, Mu: *T. multiflora*, T: *T. terniflora* y Z: *T. zypaquierensis*.

En la Figura 16 se aprecia de mejor manera la distribución de las especies para inferencias filogenéticas. El efecto combinado de error de muestreo y error sistemático hace que la filogenia sea una ciencia incierta, y este modelo puede permitir la representación y la cuantificación de la incertidumbre.

La presencia de combinaciones de líneas en ciertas zonas indican la poca distancia genética entre individuos, por lo que se puede decir que entre los individuos de la especie *T. filifolia* existe poca distancia genética a diferencia de las demás.

Algunos programas bioestadísticos proporcionan información más certera en análisis filogenético si se trabaja con regiones conservadas de ADN, sin embargo, permiten analizar datos de marcadores moleculares para generar hipótesis aproximadas acerca de cómo fue el desarrollo filogenético de las mismas. A partir de este razonamiento, se puede proponer algunas hipótesis: 1) que *T. filifolia* y *T. terniflora* son especies muy alejadas evolutivamente (Figura 17); 2) que *T. terniflora* y *T. minuta* están muy relacionadas o tienen poca diferencia evolutiva y; 3) que se puede considerar a *T. multiflora* como ancestro común de estas dos especies (Figura 16).

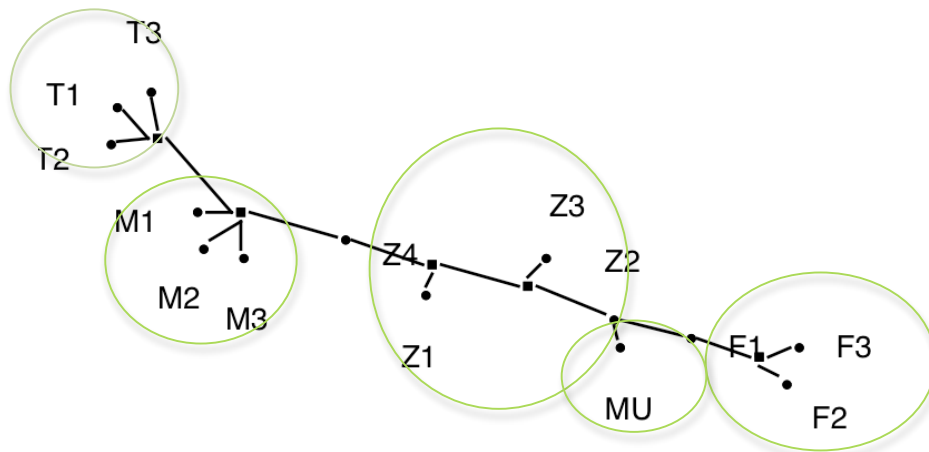


Figura 17. Análisis de agrupamiento de cinco especies de *Tagetes* usando SplitsTree. F: *T. filifolia*, M: *T. minuta*, Mu: *T. multiflora*, T: *T. terniflora* y Z: *T. zypaquierensis*.

Este estudio representa el primer informe sobre la diversidad y estructura genética en algunas especies de *Tagetes* provenientes de Sudamérica analizadas por marcadores ISSR. La congruencia de los patrones obtenidos con análisis bayesiano, redes y multivariada sugiere que los agrupamientos obtenidos son razonablemente fiables, y permite realizar hipótesis que en trabajos posteriores se

podrían resolver al hacer análisis de las regiones conservadas del ADN como se mencionó anteriormente.

En general, los presentes resultados confirman la utilidad de los marcadores ISSR para la caracterización y análisis de la diversidad genética de las accesiones de *Tagetes* provenientes de Sudamérica.

Claramente, estos resultados mejoran el conocimiento sobre la diversidad de *Tagetes* en regiones de Sudamérica y la información obtenida es útil para el manejo exitoso de germoplasma y su conservación.

1.26 CONCLUSIONES

De acuerdo a nuestro estudio, hay un alto grado de diversidad y variabilidad genética.

El uso de marcadores ISSR permitió elaborar dendrogramas que señalan las relaciones de diversidad y variabilidad genética inter e intraespecíficas de las poblaciones analizadas. Además, permiten proponer hipótesis preliminares sobre posibles ancestros para esas especies mediante el uso de herramientas bioinformáticas para análisis filogenético.

1.27 LITERATURA CITADA

- Castillo, T. (1996). La biotecnología en la conservación y usos de la agrobioidiversidad. *INIAP*, 6, 5-17.
- Banyal, N., Panwar, S., Sonah, H., & Sharma, T. (2013). Genetic diversity analysis of marigold (*Tagetes* sp) genotypes using RAPD and ISSR markers. *Journal of Agricultural Sciences*, 83 (5), 484-490.
- Bertero, D., Mas, M. T., Verdú, A., y Trillo, C. (2009). Plantas andinas y sus usos tradicionales. *Revista Ciencia Hoy*, 19 (112).
- Bojinov, B. M., y Danailov, Z. P. (2009). Applicability of ISSRs for genotype in a tomato breeding collection. *Acta Horticulturae*, 830, 63-70.
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., y Balslev, H. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. (Herbario QCA, y Herbario AAU, Edits.) Quito, Ecuador: Aarhus.
- González, D., Núñez, C., Villordo, E., Medina, G., y González, M. (2015). Genetic variability of Mexican serviceberry (*Malacomeles denticulata* [Kunth] Jones) obtained by inter simple sequence repeated or intermicrosatellites (ISSR) markers. *Multidisciplinary Scientific Journal*, 25 (4), 26-34.
- Hernández, L., Sahagún, J., Rodríguez, J., Peña, M., y Rodríguez, L. (2014). Predicción de rendimiento de fruto de híbridos de tomate con huellas genómicas. *Revista Internacional de Botánica Experimental*, 83, 311-318.
- Hollingsworth, P., y Ennos, R. (2004). Neighbour joining trees dominant markers and population genetic structure. *Heredity*, 92, 490-498.
- Liu K, Muse SV (2005) PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics* 21:2128–2129. doi:[10.1093/bioinformatics/bti282](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti282)
- Marotti, I., Bonetti, A., Minelli, M., Catizone, P., y Dinelli, G. (2007). Characterization of some Italian Common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) landraces by RAPD, semirandom and ISSR molecular markers. *Department of Agroenvironmental Science and Technology, University of Bologna, Viale Fanin*, 54, 175-188.
- Nei, M. (1978). Estimation of Average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583-590.
- Núñez, C., y Hernández, M. (2011). The Mexican Service berry (*Ameelanchier denticulata*): a Next Potential Berry Fruit Crop from Semiarid Areas. *Acta Horticulturae*, 918, 917-924.

- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28:2537–2539. doi:[10.1093/bioinformatics/bts460](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460)
- Qi, Y., Ning, G., & Bao, M. (2007). Evaluation of genetic relationships of *Tagetes patula* inbred lines using ISSR markers and morphological traits. *Agris*, 40 (6), 1236-1241.
- Rohlf FJ (2002) NTSYS-PC, numerical taxonomy system for the PC, ExeterSoftware, Ver. 2.2. Exeter Software, Setauket
- Samah, S., De Teodoro , C., Serrato, M., y Valadez, E. (2015). Genetic Diversity, Genotype Discrimination and Population Structure of Mexican *Opuntia* sp., Determined by SSR Markers. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33 (3), 335-750.
- Schliep K. Phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*. 2011; 27:592-593.
- Serrato Cruz, M. A. (1999). Variabilidad genética del Cempoalxóchitl. México: Colegio de Postgraduados.
- Tropicos. (2015). *Missouri Botanical Garden. Catalogue of vascular plants of Ecuador*. From <http://tropicos.org/Name/40009619?projectid=2>
- Vargaz Ponce, O., Zizumbo Villarreal, D., y Colunga García Marín, P. (2007). In situ diversity and maintenance of traditional agave landraces used in spirits production in West-Central Mexico. *Biodivers Conserv*, 16, 1653-1667.