



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

ESTUDIO Y APROVECHAMIENTO DEL GÉNERO

***Tagetes* DEL ESTADO DE HIDALGO**

T E S I S

Que como requisito parcial

para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
VICARIA DE EXAMENES PROFESIONALES

P R E S E N T A:

M. BT. EDGAR LÓPEZ LÓPEZ

Bajo la supervisión de:

DR. MIGUEL ÁNGEL SERRATO CRUZ

Chapingo, Estado de México, Junio 2017

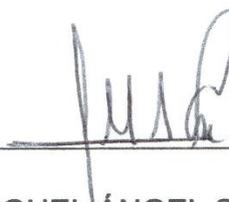


ESTUDIO Y APROVECHAMIENTO DEL GÉNERO *Tagetes* DEL ESTADO DE HIDALGO

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

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR:



DR. MIGUEL ÁNGEL SERRATO CRUZ

ASESOR:



DRA. MARGARITA GISELA PEÑA ORTEGA

ASESOR:



DRA. MARÍA TERESA BERYL COLINAS LEÓN

LECTOR EXTERNO:



DR. FRANCISCO DÍAZ CEDILLO

DEDICATORIA

A mis padres

Les dedico este trabajo por ser un pilar fundamental en todo lo que soy, por su esfuerzo y apoyo incondicional que me han brindado siempre y por creer en mí aún en los peores momentos.

Por sus consejos y valores que me han inculcado siempre y por la motivación constante que me ha permitido ser la persona que actualmente soy.

Pero más que nada, por su amor.

A mis hermanos

Gracias por estar conmigo y apoyarme siempre, por compartir experiencias únicas e inolvidables en la vida que sin duda hacen más placentero y agradable este camino.

Gracias por ser el motivo de siempre seguir adelante, les dedico este trabajo que en momentos también ayudaron a realizar.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) que hizo posible mis estudios de posgrado. Gracias por el apoyo brindado durante estos años pues sin su soporte habría sido difícil llevar a cabo este trabajo.

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

Al Dr. Juan, Rogelio, Angie y Montse, por ser un excelente apoyo durante todo el proceso de mi formación académica de este posgrado. Agradezco su paciencia y doy gracias por toda la ayuda brindada para sacar siempre adelante todo lo relacionado con este proyecto.

A mi comité, en especial a mi director, Dr. Miguel Ángel Serrato Cruz, por su valiosa dirección, disponibilidad, responsabilidad así como por sus enseñanzas y por su paciencia para esperar la culminación de este trabajo. Dra. Gisela Peña Ortega, gracias por su compromiso, disponibilidad y valiosas aportaciones, además de las enseñanzas en clases y por compartir sus conocimientos. Dra. Teresa Colinas León, gracias por su asesoramiento y por las contribuciones para la culminación de este trabajo. Gracias por su confianza y su enseñanza. Dr. Francisco Díaz, gracias por su apoyo en este proceso y por sus valiosas aportaciones.

A los técnicos del Laboratorio de Biotecnología Agrícola, M.C. Elisa Alvarado Cano y Q.F.B. Ricardo Gaspar Hernández por su apoyo incondicional en gran parte del trabajo experimental de este trabajo, pero aún más por su valiosa amistad y consejos.

A todos mis maestros que han sido una parte importante en este proceso, gracias por compartir sus conocimientos y experiencias.

Laura, gracias por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, sabes que gran parte de esto ha sido gracias a ti. Gracias por tu excelente amistad y por estar siempre para mí. Te quiero mucho.

A mis compañeros y amigos de Posgrado en Horticultura por compartir agradables momentos durante todo este proceso, por compartir experiencias y conocimientos.

Pris y Erick, gracias por entrar en mi vida en esta etapa tan importante para mí y por el apoyo que me han dado para poder culminarla.

Muchas gracias a todos los que contribuyeron a la culminación de este trabajo.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales:

Nombre: Edgar López López.

Fecha de nacimiento: 19 de diciembre de 1987.

Lugar de nacimiento: Atotonilco el Grande, Hidalgo, Méx.

Desarrollo académico:

Licenciatura en Ingeniería en Biotecnología (2005-2009), Universidad Politécnica de Pachuca, Pachuca de Soto, Hidalgo, Méx.

Maestría en Biotecnología (2009-2011), Universidad Politécnica de Pachuca, Pachuca de Soto, Hidalgo, Méx.

Doctorado en Ciencias en Horticultura (2013-2016), Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México, Méx.

CONTENIDO

CONTENIDO	vii
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
RESUMEN GENERAL	xv
ABSTRACT	xvi
OBJETIVOS	xvii
I. ANTECEDENTES GENERALES	1
1.1 REVISIÓN DE LITERATURA	1
1.1.1 Biodiversidad	1
1.1.2 Género <i>Tagetes</i> como modelo de estudio	1
1.1.3 Importancia agrícola del género <i>Tagetes</i>	4
1.1.4 Descripción del área de estudio	5
1.1.5 Problema de estudio	7
1.6 LITERATURA CITADA	7
CAPÍTULO II. ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL DE UNA POBLACIÓN DE <i>Tagetes lucida</i> DE HIDALGO, MÉXICO	11
2.1 RESUMEN	11
2.2 ABSTRACT	12
2.3 INTRODUCCIÓN	13

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
2.4.1 Material vegetal y procedencia	15
2.4.2 Extracción, rendimiento de aceite e identificación de compuestos	17
2.4.3 Evaluación de efectos antimicóticos	18
2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
2.5.1 Rendimiento de aceite esencial e identificación de compuestos	19
2.5.2 Evaluación de la actividad antimicótica.....	22
2.6 CONCLUSIONES	27
2.7 LITERATURA CITADA	27
CAPÍTULO III. COMPOSICIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE POBLACIONES DE <i>Tagetes</i> spp DE HIDALGO, MÉXICO	32
3.1 RESUMEN	32
3.2 ABSTRACT	33
3.3 INTRODUCCIÓN	34
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
3.4.1 Material vegetal y procedencia	36
3.4.2 Caracterización del medio ecológico de los sitios de colecta de las poblaciones.....	38
3.4.3 Extracción e identificación de compuestos	39
3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
3.5.1 Caracterización del medio ecológico de los sitios de colecta de las poblaciones.....	40
3.5.2 Identificación de compuestos del aceite esencial	41

3.5.3 Comparación interespecífica de compuestos mayoritarios.....	48
3.5.4 Comparación interpoblacional de compuestos mayoritarios y ambiente.	49
3.6 CONCLUSIONES	54
3.7 BIBLIOGRAFÍA.....	55
CAPÍTULO IV. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE POBLACIONES DE <i>Tagetes</i> spp DE HIDALGO, MÉXICO.....	63
4.1 RESUMEN	63
4.2 ABSTRACT.....	64
4.3 INTRODUCCIÓN.....	65
4.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	68
4.4.1 Material vegetal y procedencia	68
4.4.2 Extracción de ADN.....	73
4.4.3 Determinación de la concentración de ADN	74
4.4.4 Análisis de ITS	75
4.4.5 Análisis de ISSR	75
4.4.6 Análisis de agrupamiento.....	77
4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
4.5.1 Análisis de ITS	77
4.5.2 Análisis de ISSR	81
4.6 CONCLUSIONES	86
4.7 BIBLIOGRAFÍA.....	87

CAPÍTULO V. CONTENIDO DE ADN EN POBLACIONES DE <i>Tagetes</i> spp. DE HIDALGO, MÉXICO MEDIANTE CITÓMETRO DE FLUJO.....	93
5.1 RESUMEN	93
5.2 ABSTRACT	94
5.3 INTRODUCCIÓN	95
5.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	98
5.4.1 Material vegetal y procedencia	98
5.4.2 Aislamiento de núcleos	101
5.4.3 Determinación del contenido de ADN	101
5.4.4 Análisis estadístico	102
5.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	103
5.6 CONCLUSIONES	107
5.7 BIBLIOGRAFÍA	108

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Distribución de especies del género <i>Tagetes</i> en México (Turner, 1996; Villareal, 2003).....	3
Cuadro 2. Biomasa de referencia y rendimiento de aceite esencial de plantas de la población de <i>T. lucida</i> de Atotonilco el Grande, Hidalgo.....	20
Cuadro 3. Composición química del aceite esencial de <i>T. lucida</i> de Atotonilco el Grande, Hidalgo.....	21
Cuadro 4. Comparación de medias del crecimiento micelial (diámetro) y porcentaje de reducción del crecimiento micelial (%) de <i>A. niger</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>P. janthinellum</i> y <i>R. solani</i> a 15 días de la siembra in vitro del inóculo expuesto a 0.1 y 1.0 % de aceite esencial.	24
Cuadro 5. Sitios de colección de tallos florales de poblaciones de <i>Tagetes</i> en el Estado de Hidalgo.....	37
Cuadro 6. Especies de <i>Tagetes</i> en distintos climas del Estado de Hidalgo.....	41
Cuadro 7. Porcentaje de abundancia relativa del aceite esencial de poblaciones in situ de <i>T. erecta</i> del Estado de Hidalgo.	42
Cuadro 8. Porcentaje de abundancia relativa de compuestos en el aceite esencial de algunas poblaciones in situ de <i>T. filifolia</i> y <i>T. micrantha</i> del Estado de Hidalgo.	43
Cuadro 9. Porcentaje de abundancia relativa de compuestos en el aceite esencial de algunas poblaciones in situ de <i>T. lucida</i> del Estado de Hidalgo.....	44
Cuadro 10. Composición química del aceite esencial de las poblaciones de <i>T. lunulata</i> del Estado de Hidalgo.	46
Cuadro 11. Porcentaje de abundancia relativa de aceite esencial de algunas poblaciones de <i>T. patula</i> del Estado de Hidalgo.	47

Cuadro 12. Compuestos mayoritarios en los aceites de las poblaciones <i>in situ</i> de <i>Tagetes</i> del Estado de Hidalgo.....	48
Cuadro 13. Comparación de compuestos mayoritarios del aceite de poblaciones en relación con su ambiente.	51
Cuadro 14. Sitios de colección de poblaciones de <i>Tagetes</i> en el Estado de Hidalgo.....	69
Cuadro 15. Secuencia de iniciadores seleccionados y temperatura de alineamiento la obtención de patrones ISSR en 179 poblaciones de <i>Tagetes</i> del Estado de Hidalgo.....	76
Cuadro 16. Número de bandas amplificadas con 9 iniciadores ISSR en 179 poblaciones de <i>Tagetes</i> pertenecientes al estado de Hidalgo.....	81
Cuadro 17. Poblaciones de <i>Tagetes</i> en el Estado de Hidalgo y sitios de recolección.....	99
Cuadro 18. Contenido de ADN nuclear en las poblaciones de <i>Tagetes</i> estudiadas.	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografías de plantas del género <i>Tagetes</i> . <i>T. lucida</i> (A), <i>T. erecta</i> (B), <i>T. lunulata</i> (C), <i>T. filifolia</i> (D), <i>T. patula</i> (E), <i>T. moorei</i> (F), (Fotografía: Edgar López López).....	2
Figura 2. Mapa climático del Estado de Hidalgo. Elaborado con base en INEGI (2007).	6
Figura 3. <i>T. lucida</i> en floración (Fotografía: Edgar López López).	16
Figura 4. Atotonilco el Grande, Hidalgo y punto de colecta de <i>T. lucida</i> . Escala 1:250 000.....	16
Figura 5. Cromatograma de los componentes del aceite esencial de <i>T. lucida</i>	22
Figura 6. Localización geográfica de los puntos de recolecta de las especies de <i>Tagetes</i> del Estado de Hidalgo. Escala 1: 250 000.	37
Figura 7. Mapa de la localización geográfica de los puntos de colecta de las especies de <i>Tagetes</i> y climas del Estado de Hidalgo. Escala 1: 250 000.	40
Figura 8. A Gel de agarosa 1 % que muestra la presencia de fragmentos ITS con un tamaño de entre 700 y 1000 pb. Marcador de peso molecular 1 Kb (1, 18); <i>T. erecta</i> : ER028 (2), ER046 (3), ER054 (4), ER064 (5), ER098 (6), ER105 (7); <i>T. filifolia</i> : FL001 (8), FL002 (9), FL003 (10), FL005 (11), FL006 (12); <i>T. lucida</i> : LC002 (13), LC006 (14), LC011 (15), LC013 (16), LC017 (17); <i>T. lunulata</i> : LN004 (19), LN005 (20), LN009 (21), LN010 (22), LN012 (23), LN014 (24); <i>T. micrantha</i> : MC001(25), MC002 (26), MC003 (27), MC004 (28), MC005 (29); <i>T. moorei</i> : MR001 (30); <i>T. patula</i> : PT001 (31); Muestra testigo <i>Tagetes</i> spp. (32); Muestra testigo <i>Fusarium oxysporum</i> (33); Control negativo (34).	78
Figura 9. Dendrograma de 29 poblaciones de <i>Tagetes</i> pertenecientes al Estado de Hidalgo obtenidos a partir de marcadores ITS mediante el método de agrupamiento del vecino cercano (Neighbor Joining).....	80

Figura 10. Patrones de bandeo de 179 poblaciones de *Tagetes* de Hidalgo. ISSR 3 (1), ISSR 5 (2), ISSR 6 (3), ISSR 7 (4), UBC 840 (5), LOL 12 (6), PI01 (7), PI02 (8), PI03 (9), Marcador de peso molecular 1 Kb (M), Blanco (M) y Testigo frijol (F). 82

Figura 11. Dendrograma de 179 accesiones de *Tagetes* a partir de marcadores ISSR usando el coeficiente de similitud de Dice y el método de agrupamiento UPGMA. *T. erecta* (A); *T. lunulata* (B); *T. patula* (C); *T. lucida* (D); *T. filifolia* (E); *T. moorei* (F); *T. micrantha* (G). 84

RESUMEN GENERAL

Tagetes es un recurso fitogenético aromático de México poco estudiado en su caracterización y evaluación toxicológica. En el presente estudio se caracterizó una colección de materiales del género *Tagetes* pertenecientes al Estado de Hidalgo, además de que una parte de ellas se evaluó por sus propiedades antimicóticas, para proporcionar una base teórica y apoyo técnico para la adecuada conservación y aplicación de los recursos genéticos existentes de este género. Parte de la caracterización fue la obtención del perfil químico de 53 poblaciones, para lo cual se extrajo aceite esencial mediante hidrodestilación y se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los compuestos mayoritarios en las poblaciones fueron: β -ocimeno, terpinoleno y verbenona en *T. erecta*; estragol, anetol, limoneno y β -cuvebena en *T. filifolia*; limoneno y β -cuvebena en *T. micrantha*; β -ocimeno, acetato de geranilo, estragol, metil eugenol y anetol en *T. lucida*; α -pineno, β -felandreno y limoneno en *T. lunulata*; α -pineno, terpinoleno, verbenona, cariofileno y β -farneseno en *T. patula*. La caracterización molecular se realizó para 29 accesiones representativas de *T. erecta*, *T. lunulata*, *T. filifolia*, *T. lucida* y *T. micrantha*, *T. moorei* y *T. patula* cuyo ADN genómico se amplificó con los iniciadores ITS1 e ITS4 confirmando la identidad independiente de esas especies; también se utilizaron iniciadores ISSR para analizar 179 accesiones de *Tagetes* resultando un total de 191 bandas identificadas y 99.5 % de polimorfismo, y el análisis de agrupamiento separó las accesiones en siete grupos, correspondientes a las diferentes especies. Se determinó el tamaño del genoma de 91 accesiones de siete especies mediante citómetro de flujo obteniendo una variación total del contenido de ADN de 2.33 a 5.57 pg. La actividad antimicótica *in vitro* del aceite esencial de una población de *T. lucida* se evaluó contra *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium janthinellum* y *Rhizoctonia solani* mediante la técnica de difusión en agar, realizando dos experimentos (a y b) ensayando 0, 0.1 y 1 % (a) y 0, 2 y 3 % (b) de aceite, detectando efectos fungistáticos y la mayor reducción (72 %) se logró contra *R. solani* aplicando 3 %.

Tesis de Doctorado en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: M. BT. Edgar López López

Director: Dr. Miguel Ángel Serrato Cruz.

ABSTRACT

Tagetes is an aromatical plant resource from Mexico that has been little studied on its characterization and toxicological evaluation. In the present study a collection of genotypes of the genus *Tagetes* from the state of Hidalgo was characterized, in addition part of them for their antimycotic properties, to provide a theoretical basis and technical support for their appropriate conservation and utilization of genetic resources of this genus. Part of the characterization was the obtention of the chemical profile of 53 populations for which essential oils were extracted by hydrodistillation and then analyzed by GC-ME. Major compounds in plant populations were: β -ocimene, terpinolene and verbenone in *T. erecta*; estragole, anethole, limonene and β -cuvabene in *T. filifolia*; limonene and β -cuvabene in *T. micrantha*; β -ocimene, geranil acetate, estragole, methyl eugenol and anethole in *T. lucida*; α -pinene, β -felandrene and limonene in *T. lunulata*; α -pinene, terpinolene, verbenone, cariofilene and β -farnesene in *T. patula*. Molecular characterization was performed for 29 representative accessions of *T. erecta*, *T. filifolia*, *T. lucida*, *T. lunulata*, *T. micrantha*, *T. moorei* and *T. patula* whose genomic DNA was amplified with ITS1 and ITS4 primers confirming the independent identity of these species; Also, ISSR primers were used to analyze 179 *Tagetes* accessions resulting in a total of 191 identified bands and 99.5% polymorphism, and the cluster analysis separated the accessions into seven groups corresponding to the different species. The genome size of 91 accessions of seven species was determined by flow cytometer obtaining a total variation of DNA content of 2.33 to 5.57 pg. The *in vitro* antimycotic activity of the essential oil of a *T. lucida* population was evaluated against *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium janthinellum* and *Rhizoctonia solani* using the agar diffusion technique, performing two experiments (a and b), testing 0, 0.1 and 1% (A) and 0, 2 and 3% (b) of oil, detecting fungistatic effects and the greater reduction (72%) was achieved against *R. solani* applying 3%.

Thesis, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: M. BT. Edgar López López

Advisor: Dr. Miguel Ángel Serrato Cruz.

OBJETIVOS

1. Evaluar *in vitro* el efecto toxicológico del aceite esencial de una población de *T. lucida* de Hidalgo contra los hongos fitopatógenos *Aspergillus niger*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y *Penicillium janthinellum*.
2. Caracterizar químicamente los aceites esenciales extraídos de materiales del Estado de Hidalgo con la finalidad de contribuir a la fitoquímica del género.
3. Caracterizar molecularmente germoplasma de *Tagetes* del Estado de Hidalgo mediante técnicas tipos ITS e ISSR para evaluar su variabilidad genética y avanzar en la investigación de la diversidad del taxa, su conservación, aprovechamiento y contribuir al entendimiento sobre el origen de estos recursos naturales.
4. Caracterizar citogenéticamente del tamaño del genoma de poblaciones de *Tagetes* de Hidalgo mediante la determinación el contenido de ADN nuclear por citometría de flujo para relacionar su variabilidad la sistemática, filogenia y evolución del taxa.

I. ANTECEDENTES GENERALES

1.1 REVISIÓN DE LITERATURA

1.1.1 Biodiversidad

La biodiversidad es definida como la variabilidad existente entre los organismos vivos incluyendo además el medio dentro del cual se originan, así como los complejos ecológicos de los cuáles forman parte (Price y Butler, 1977). La biodiversidad además es importante ya que determina la forma en que las poblaciones interactúan con su ambiente y con otras especies, cómo evolucionan y persiste a través del tiempo (Tilman *et al.*, 2006). Se ha estimado que en el mundo se encuentra entre los 5 y 30 millones de especies, no obstante es difícil evaluar la precisión de estas estimaciones (Hughes *et al.*, 1997).

En México, debido a su gran extensión territorial y heterogeneidad ambiental, se han generado multitud de especies y variedades de géneros, ubicándose como uno de los países con mayor diversidad de plantas, reptiles y mamíferos (Mittermeier y Goettsch, 1992; Guzmán, 2001).

1.1.2 Género *Tagetes* como modelo de estudio

El género *Tagetes* pertenece a la familia *Compositae* (*Asteracea*) y se conforma de aproximadamente 55 especies distintas, todas ellas distribuidas en el continente americano, la mayoría de las cuales se localizan en México (Serrato *et al.*, 2000). Abarcan desde el paralelo 16 hasta el 32 N con la distribución en México que se muestra en el Cuadro 1 (Turner, 1996; Villareal, 2003).

Botánicamente, son plantas herbáceas anuales y perennes de tamaños variados, desde los 25 cm hasta 1 m de altura, erectas, ramificadas, de hojas opuestas, oblongas de 5 a 15 cm de largo, con flores de colores amarillo, rojo e incluso naranja de 5 a 13 cm de alto y de frutos negros (Sabillón y Bustamante, 1996;

Dole y Wilkins, 1999). Las especies más representativas del género son: *T. lunulata*, *T. tenuifolia*, *T. patula* y *T. erecta*, siendo éstas últimas las más populares y mayormente estudiadas (Serrato *et al.*, 2000). Para el Estado de Hidalgo, se reportan especies *T. lucida*, *T. erecta*, *T. lunulata*, *T. filifolia*, *T. patula* y *T. moorei* como se muestra en la Figura 1 (Turner, 1996; Villareal, 2003).



Figura 1. Fotografías de plantas del género *Tagetes*. *T. lucida* (A), *T. erecta* (B), *T. lunulata* (C), *T. filifolia* (D), *T. patula* (E), *T. moorei* (F), (Fotografía: Edgar López López).

Cuadro 1. Distribución de especies del género *Tagetes* en México (Turner, 1996; Villareal, 2003).

Estados	Especies
Baja California	<i>T. filifolia</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. lacera</i> , <i>T. lunulata</i> .
Sonora	<i>T. filifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. palmeri</i> , <i>T. lemmonii</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. erecta</i> .
Chihuahua	<i>T. filifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. palmeri</i> , <i>T. pringlei</i> , <i>T. subulata</i> .
Coahuila	<i>T. coronopifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i> .
Nuevo León	<i>T. lucida</i> , <i>T. mulleri</i> , <i>T. micrantha</i> .
Tamaulipas	<i>T. filifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. erecta</i> .
Sinaloa	<i>T. filifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. palmeri</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. erecta</i> .
Durango	<i>T. filifolia</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. pringlei</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. epapposa</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. elongata</i> , <i>T. remotiflora</i> , <i>T. erecta</i> .
Zacatecas	<i>T. filifolia</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. lucida</i> .
San Luis Potosí	<i>T. erecta</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. parryi</i> , <i>T. tenuifolia</i> .
Aguascalientes	<i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. pringlei</i> .
Guanajuato	<i>T. filifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. tenuifolia</i> , <i>T. pringlei</i> , <i>T. remotiflora</i> , <i>T. subulata</i> .
Nayarit	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. hartwegii</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. subulata</i> .
Jalisco	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. hartwegii</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. persicaefolius</i> , <i>T. pringlei</i> , <i>T. stenophylla</i> , <i>T. subulata</i> .
Colima	<i>T. filifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. tenuifolia</i> .
Michoacán	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. persicaefolius</i> , <i>T. pringlei</i> , <i>T. stenophylla</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. tenuifolia</i> , <i>T. remotiflora</i> , <i>T. triradiata</i> .
Guerrero	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. stenophylla</i> , <i>T. subulata</i> .
Oaxaca	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. oaxacana</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. tenuifolia</i> .
Veracruz	<i>T. coronopifolia</i> , <i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. tenuifolia</i> .
Puebla	<i>T. coronopifolia</i> , <i>T. erecta</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. linifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. triradiata</i> , <i>T. tenuifolia</i> .
Tlaxcala	<i>T. coronopifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. linifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. tenuifolia</i> .
México	<i>T. coronopifolia</i> , <i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. persicaefolius</i> , <i>T. pringlei</i> , <i>T. stenophylla</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. triradiata</i> , <i>T. tenuifolia</i> .
Morelos	<i>T. coronopifolia</i> , <i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. stenophylla</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. triradiata</i> , <i>T. tenuifolia</i> .
Hidalgo	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. persicaefolius</i> , <i>T. tenuifolia</i> , <i>T. moorei</i> .
Querétaro	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. moorei</i> , <i>T. tenuifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. pringlei</i> , <i>T. remotiflora</i> .
Chiapas	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. nelsonii</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. tenuifolia</i> , <i>T. terniflora</i> .
Yucatán	<i>T. erecta</i> , <i>T. tenuifolia</i> .
Tabasco	<i>T. lucida</i> .

1.1.3 Importancia agrícola del género *Tagetes*

Estas plantas no sólo son conocidas por su belleza estética, sino también por sus múltiples beneficios que brindan al ser consideradas como plantas con características plaguicidas. Los compuestos alelopáticos que poseen pueden ser liberados por volatización, exudados radiculares, lixiviación desde las plantas o residuos y por descomposición de residuos; los compuestos que emana son generalmente metabolitos secundarios que actúan como defensa química ante enfermedades y parásitos (Halbrendt, 1996).

Experimentos realizados para evaluar el efecto repelente de *Tagetes* spp. demuestran que no importa la forma cómo se lo utilice (fermentado, fresco, barrera) el efecto siempre ocurre, así lo demostraron Russo *et al.* (2005) al utilizar plantas completas de *Tagetes* spp. para repeler áfidos en lechuga; tal experimento consistió en evaluar el efecto de la planta como cultivo intercalado y en extracto natural, los datos demostraron que no existió diferencia estadística al usar una o la otra forma. Además, se ha demostrado que diversas especies de *Tagetes* presentan efecto fungicida y fungistático; por ejemplo, los extractos acuosos y polvos de hojas, flores y raíz de *T. erecta* tienen un efecto fungicida contra *Drechslera oryzae*, *Pyricularia oryzae* y *Uromyces phaseoli* (Grainge y Ahmed, 1988), mientras que extractos de hojas y flores de *T. patula* tiene efecto fungistático sobre *Monilia* spp. (Teodorescu *et al.*, 2009).

Estas plantas tienen además, propiedades biológicas y químicas en raíces, tallos, hojas y semillas contra organismos dañinos a cultivos de importancia económica: bacterias, hongos, nematodos, insectos y malezas (Serrato Cruz y Quijano, 1993). Estas propiedades se deben principalmente a la presencia de metabolitos secundarios tales como alcoholes, éteres, ésteres, aldehídos, cetonas, flavonoides, tiofenos, fenilpropanos, terpenos y terpenoides (Greathead, 2003) que actúan como defensas contra plagas y enfermedades (Duke, 2009) y contra diferentes organismos como hongos, ácaros, nematodos e insectos (Koul *et al.*, 2008).

Estos compuestos pueden ser liberados por diferentes medios como volatilización, exudados radiculares, lixiviación y por descomposición de residuos (Halbrendt, 1996). Gran parte de estos metabolitos son aceites esenciales y son el producto final del metabolismo secundario de estas plantas; se encuentran en diferentes partes de la planta como en hojas, tallos, corteza, flores, raíces y frutos (Koul *et al.*, 2008). Para el género *Tagetes* se han reportado al menos 126 metabolitos secundarios en sus aceites esenciales; por otra parte, el tipo de metabolito secundario y su cantidad en los aceites esenciales de *Tagetes* varían de acuerdo con la constitución genética de la especie o sus poblaciones y las condiciones en que se desarrollan las plantas (Krishna *et al.*, 2002; Sefidkon *et al.*, 2004), lo cual significa que para el aprovechamiento de este recurso natural, es necesaria la caracterización del perfil de aceites.

Por otra parte, debido a la amplia diversidad de germoplasma de *Tagetes*, asociada con procesos de domesticación y de evolución natural milenarios de los cuales no se tiene un estudio sistemático (Serrato, 2014) es de interés e importancia la caracterización molecular de este recurso ya que los trabajos sobre caracterización molecular de este género son escasos (Loockerman *et al.*, 2003), o al menos no se dispone de suficiente información al respecto para este recurso natural de México (Serrato *et al.*, 2014). De igual manera, sucede lo mismo respecto a la situación del contenido de ADN en estas plantas ya que no han sido suficientemente descritas, lo cual limita la información sobre sus relaciones genéticas y evolución (Towner, 1961; Strother, 1977; Serrato, 2014)

1.1.4 Descripción del área de estudio

El Estado de Hidalgo se encuentra ubicado en la región centro-oriental de México; colinda al norte con los estados de San Luis Potosí y Veracruz, al este con el Estado de Puebla, al sur con los estados de Tlaxcala y México y al oeste con el Estado de Querétaro (INEGI, 2007). Al centro y occidente del estado se localizan sierras de origen sedimentario e ígneo extrusivo o volcánico; hacia el centro y en toda la parte norte y este, pasa el Eje Neovolcánico; mientras que por las partes

norte y oriente pasa la Sierra Madre Oriental (INEGI, 2007). Cuenta además con dos zonas en la entidad la norte y nororiental, en donde se encuentra cerro Ojo de Agua con 2180 msnm y cerro Tepeco con 1840 msnm; también posee valles en los que se encuentra la altura más baja que es de 100 m (INEGI, 2007). En la parte central del estado, de noroeste-sureste se encuentra el cañón Metztitlán, importante zona destacada por la producción de hortalizas (Guzmán, 2008).

El clima del estado es variado debido a su posición geográfica, superficie y relieve, presentando el 39 % de este, clima seco y semiseco, el 33 % es templado subhúmedo, el 16 % cálido húmedo, el 6 % cálido subhúmedo y el restante 6 % templado húmedo (Figura 2), estos últimos se presentan en la zona de la huasteca. El clima seco y semiseco favorece el crecimiento de plantas cactáceas como el maguey pulquero, tuna y nopal. La temperatura media anual es de 16 °C mientras que la mínima del mes más frío, enero, es alrededor de 4 °C y la máxima se presenta en abril y mayo que en promedio es de 27 °C. La lluvia se presentan en verano, en los meses de junio a septiembre, la precipitación media del estado es de 800 mm anuales (INEGI, 2007).

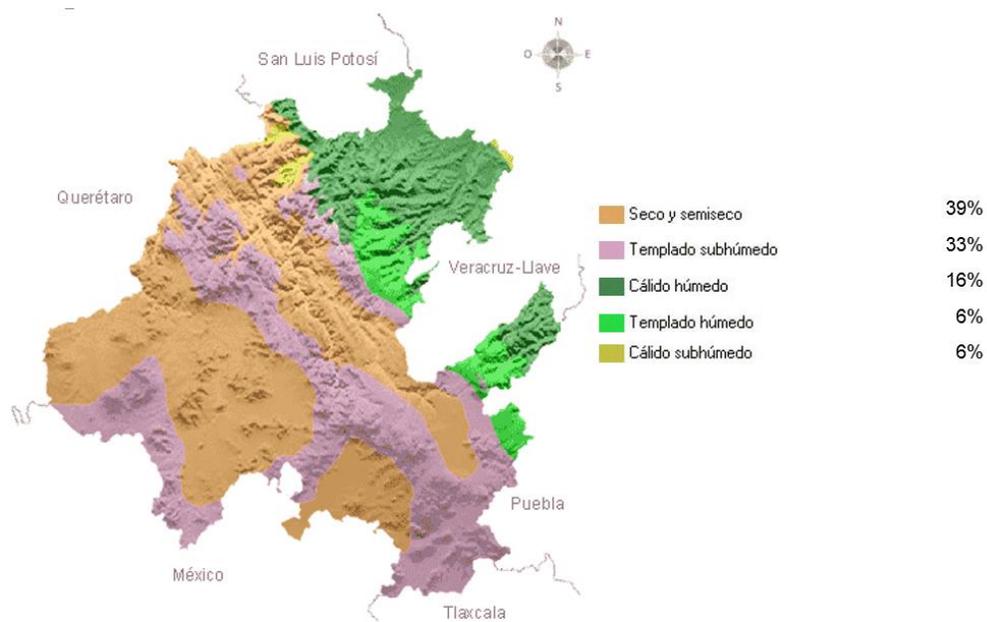


Figura 2. Mapa climático del Estado de Hidalgo. Elaborado con base en INEGI (2007).

Dentro de la vegetación que se puede encontrar en las sierras de Hidalgo se encuentran el abeto, pino, encino, oyamel, enebro, copal, caoba, palo de rosa, ébano, framboyán, mezquite, cafeto, nopal, agave, lechuguilla y damiana. En el valle de Tulancingo se encuentran árboles como el tejocote, pera, membrillo y manzano. En la comarca Minera se encuentran cactus, mezquite, maguey y nopal. En la cuenca de México existen nopales, yuca, mezquite y pirul. La vegetación del valle del Mezquital se encuentra formada por huizache, ahuehuate, nogal, biznaga, pirul, cardón, garambullo y otras plantas de clima seco (Fernández y Goyenechea, 2010).

1.1.5 Problema de estudio

Atendiendo a la diversidad ambiental del Estado de Hidalgo y el uso potencial del recurso fitogenético *Tagetes* para su aprovechamiento en problemáticas de sanidad vegetal en sistemas de producción agrícolas en la entidad, es necesaria la caracterización (química, molecular, citogenética, morfológica, anatómica, agronómica y otras) y evaluación (toxicológica, medicinal, etc.) de *Tagetes* de diferentes regiones de Hidalgo con la finalidad de aportar información básica sobre la fitoquímica, variabilidad genética y diversidad del taxa de este recurso natural para favorecer posibles acciones sobre su uso sustentable en agricultura, al mismo tiempo enriquecer la bases de datos del banco de germoplasma.

1.6 LITERATURA CITADA

Dole, J. M., & Wilkins, H. F. (1999). Floriculture: Principles and Species. *Prentice Hall Inc.* 533-535.

Duke, J. (2009). USDA Phytochemical and Ethnobotanical databases. <http://www.arsgrin.gov/duke/Plants.html>. (Consulta en septiembre de 2016).

- Fernández, L., & Goyenechea, I. (2010). Anfibios y reptiles del valle del Mezquital, Hidalgo, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 81(3),705-712.
- Grainge, M., & Ahmed, S. (1988). Handbook of plants with pest-control properties. John Wiley & Sons Limited, 470 p.
- Greathead, H. (2003). Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proc. Nutr. Soc.* 62: 279-290.
- Guzmán, M. S. (2001). Biodiversidad genética y caracterización nutrimental del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y su potencial para mejorar el frijol cultivado. Tesis de Doctorado. CINVESTAV. Irapuato, Guanajuato. 168.
- Halbrendt, J. M. (1996). Allelopathy in the management of plant parasitic nematodes, *Journal of Nematology*, 28:8-14.
- Hughes, J. B., Daily, G. C., & Ehrlich, P. R. (1997). Population diversity: its extent and extinction. *Science*, 278(5338), 689-692.
- INEGI, (2007). Anuario estadístico. Hidalgo. Tomos I, II. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Aguascalientes 1156 p.
- Koul, O., Walia, S. & Dhaliwal, G. S. (2008). Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopesticides International*. 4:63-84.
- Krishna, A., Mallavarapu G. R., Kumar S., & Ramesh S. (2002.) Volatile oil constituents of the capitula, leaves and shoots of *Tagetes patula* L. *J. Essent. Oil Res.* 14(6): 433-436.
- Loockerman, D. J., Turner, B. L., & Jansen, R. K. (2003). Phylogenetic relationships within the Tageteae (Asteraceae) based on nuclear ribosomal ITS and chloroplast ndhF gene sequences. *Systematic botany*, 28(1), 191-207.
- Mittermeier, R., & Goettsch, C. (1992). La importancia de la diversidad biológica de México. México ante los Retos de la Biodiversidad. Ed. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, 63-73.

- Price, M. L., & Butler, L. G. (1977). Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25(6), 1268-1273.
- Russo, S., Rodríguez, S. M., Delfino, S., & Badiola, M. (2005). Efecto de *Tagetes* spp. sobre dos áfidos plagas de *Lactuca sativa* (L.). *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 37(1), 117-123.
- Sabillón, A., & Bustamante, M. (1996). Guía fotográfica para la identificación de plantas con propiedades plaguicidas parte I. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Tegucigalpa Honduras). 110 p.
- Sefidkon, F., Salehyar, S., Mirza, M., & Dabiri, M. (2004). The essential oil of *Tagetes erecta* L. occurring in Iran. *Flavour and Fragrance Journal*, 19(6), 579-581.
- Serrato, M. A. & Quijano M. L. (1993). Usos de algunas especies de *Tagetes*: Revisión bibliográfica (1984-1992). In: Memorias I Simposio Internacional y II Reunión Nacional sobre Agricultura Sostenible: Importancia y Contribución de la Agricultura Tradicional. CEICADAR, Puebla. México. 228-238.
- Serrato, M. A., Hernández, R.M. & Savidan, Y. (2000). Contenido de ADN y nivel de ploidía en *Tagetes* spp utilizando citómetro de flujo. *Agrociencia*, 34:729-734.
- Serrato, M. A. (2014). El Recurso Genético Cempoalxóchitl (*Tagetes* spp) de México (Diagnóstico). Universidad Autónoma Chapingo- SINAREFI-SNICS-SAGARPA. 182 p.
- Strother, J. L. (1977). *Tagetes*-systematic review. In: The Biology and Chemistry of the Compositae. Heywood, V. H., J. B. Harborne, and B. O. Turner (eds.). Academic Press. New York. USA. 769-783.
- Tilman, D., Reich, P. B., & Knops, J. M. H. (2006). Biodiversity and ecosystem stability in a decade-long grassland experiment. *Nature*, 441(7093), 629-632.

- Towner, J. W. (1961). Cytogenetic studies on the origin of *Tagetes patula*. I. Meiosis and morphology of diploid and allotetraploid *T. erecta* X *T. tenuifolia*. *American Journal of Botany*, 743-751.
- Turner, B. L. (1996). The Comps of Mexico. A systematic account of the family Asteraceae. Vol. 6. *Tageteae* and *Anthemideae*. The University of Texas. Plant Resources Center. Austin, Texas, 10:1-93.
- Villareal, J. A. (2003). Familia *Compositae*. Tribu *Tageteae*. Flora del bajío y de regiones adyacentes. Instituto de ecología, 113:1-85.

CAPÍTULO II.
ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL DE UNA POBLACIÓN
DE *Tagetes lucida* DE HIDALGO, MÉXICO

2.1 RESUMEN

La especie *T. lucida* conocida como ‘pericón’, es un recurso natural de México cuyo aceite esencial tiene propiedades antimicóticas, aunque no en todos los hongos fitopatógenos se ha explorado el efecto que puede ocasionar esta sustancia vegetal. De una población recolectada en Atotonilco el Grande, Hidalgo, México se obtuvo aceite esencial por hidrodestilación con rendimiento de 0.2 %; mediante la técnica CG-EM se identificaron ocho componentes diferentes en el aceite, pero los abundantes fueron: estragol (48 %) y anetol (35 %). También se evaluó la actividad antimicótica *in vitro* del aceite esencial contra *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium janthinellum* y *Rhizoctonia solani* mediante la técnica de difusión en agar, realizando dos experimentos: el primero ensayando concentraciones de 0, 0.1 y 1 %, y en el segundo 0, 2 y 3 %. La concentración de 1 % redujo el crecimiento micelial en 46 % para *F. oxysporum*, 39 % en *R. solani*, 21 % en *A. niger* y 16 % en *P. janthinellum*; sin embargo, en concentraciones altas de aceite, como el 3 %, solamente en *R. solani* se obtuvo la mayor la reducción del micelio (72 %).

Palabras clave: *Tagetes lucida*, aceite esencial, actividad antimicótica, composición química.

ESSENTIAL OIL ANTIFUNGAL ACTIVITY OF A *Tagetes lucida* POPULATION FROM HIDALGO, MEXICO

2.2 ABSTRACT

T. lucida species locally named as 'pericon', is a natural resource of Mexico whose essential oil has antifungal properties, but not all pathogenic fungi have been bioassayed with this plant substance. From a plant sample collected at Atotonilco el Grande, Hidalgo province, Mexico, essential oil was obtained by hydro-distillation with a yield of 0.2 %; its composition was determined by gas chromatography-mass spectrometry identifying eight different components in the oil but the most important were estragole (48 %) and anethole (35 %). Also antifungal activity *in vitro* against *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium janthinellum* and *Rhizoctonia solani* was evaluated using agar diffusion technique and carrying out two experiments: the first one tested 0, 0.1 and 1 % oil concentrations, while the second one used 0, 2 and 3 %. At concentration of 1 % of essential oil mycelial growth was reduced in 46 % for *F. oxysporum*, 39 % in *R. solani*, 21 % in *A. niger* and 16 % in *P. janthinellum*; however at high oil concentrations like 3 % greater mycelial reduction (72 %) only occurred in *R. solani*.

Index words: *Tagetes lucida*, essential oil, antifungal activity, chemical composition.

2.3 INTRODUCCIÓN

El género *Tagetes* (Asteraceae) se conforma de aproximadamente 56 especies distribuidas en el Continente Americano, la mayoría se localiza en México (Soule, 1996). Estas plantas tienen propiedades biológicas contra organismos dañinos a cultivos de importancia económica: bacterias, hongos, nematodos, insectos y malezas (Serrato y Quijano, 1993). Tales propiedades de *Tagetes* se deben a la presencia de metabolitos secundarios como alcoholes, éteres, ésteres, aldehídos, cetonas, flavonoides y tiofenos que actúan como defensas químicas contra plagas y enfermedades (Duke, 2008). En forma natural, estos compuestos químicos pueden ser liberados por volatilización, exudados radiculares, lixiviación y por descomposición de residuos (Halbrendt, 1996). Mediante manejo de material 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 hongos. En el caso de algunas especies de *Tagetes*, los extractos vegetales presentan efectos antimicóticos, por ejemplo, extractos acuosos, polvos de hojas, flores y raíces de *T. erecta* tienen efecto fungicida contra *Drechslera oryzae*, *Pyricularia oryzae* y *Uromyces phaseoli* (Grainge y Ahmed, 1988), y extractos de hojas y flores de *T. patula* son fungistáticos en *Monilia* spp. (Teodorescu *et al.*, 2009); no obstante, son pocos los estudios toxicológicos al respecto, particularmente bioensayos con aceites esenciales (Serrato *et al.*, 2007).

Entre algunos hongos fitopatógenos de importancia económica, por el daño que causan a diversos cultivos, se encuentran: *Fusarium oxysporum* (Deuteromiceto), causante de enfermedad en cultivos como sorgo (*Sorghum bicolor*), maíz (*Zea mays*) y alfalfa (*Medicago sativa*) en sus diferentes etapas fenológicas, así como en árboles frutales y forestales (Singh *et al.*, 2007); *Penicillium* spp. (Ascomiceto) causa pudriciones en postcosecha de granos básicos (Lemmen, 1999); *Aspergillus* spp. (Ascomiceto) en condiciones de alta humedad en postcosecha produce moho en hortalizas como lechuga, jitomate y acelgas (Raper, 1965) y

Rhizoctonia solani (Basidiomiceto) provoca la pudrición de semillas en postcosecha de numerosas especies hortícolas (Anderson, 1982).

Como parte del control de estos hongos, se ha recurrido al empleo de sustancias de origen vegetal, entre ellas, los aceites esenciales de cebolla (*Allium cepa*) o de ajo (*Allium sativum*) que, aplicados *in vitro* contra *A. niger*, *F. oxysporum* y *Penicillium cyclopium* no ocasionan daños aparentes en el primero, pero en los demás, hay actividad fungistática (Benkeblia, 2004). Contra los mismos hongos, el aceite esencial de orégano (*Origanum syriacum*) también produce fuerte acción inhibitoria (Daouk *et al.*, 1995). Hasta ahora no se ha evaluado el efecto del aceite esencial de *Tagetes* contra estos hongos, aunque se tienen resultados sobre otros géneros; por ejemplo, el aceite de *T. patula* usado contra *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum* en condiciones *in vitro* inhibe por completo el crecimiento de micelio a dosis de 10 $\mu\text{L mL}^{-1}$ y 1.25 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente (Romagnoli *et al.*, 2005); el aceite esencial de hojas de *T. erecta* en 2.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ inhibe completamente el crecimiento de *Pythium aphanidermatum* (Kishore *et al.*, 1991) y los aceites de *T. minuta* y *T. filifolia* tienen actividad antifúngica contra *Sclerotium cepivorum*, *Colletotrichum coccodes* y *Alternaria solani* inhibiendo el crecimiento micelial (Zygadlo *et al.*, 1994). Considerando que más del 50 % de las especies de *Tagetes* se distribuyen en México, la realización de estudios sobre posible actividad biológica contra organismos dañinos en agricultura pueden resultar valiosos (Serrato, 2014).

La especie *Tagetes lucida* Cav., conocida como ‘pericón’, se encuentra distribuida en los principales sistemas montañosos de México en climas templado y transicional (Turner, 1996); es una planta herbácea, perenne, de hasta 1 m de altura, con fuerte olor a anís al estrujarse (Villarreal, 2003). El extracto metanólico de esta planta inhibe el crecimiento de bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. y *Shigella* sp., así como el de hongos del género *Fusarium* debido a la acción de los componentes dimetoxi-fenólicos presentes en el extracto, como la escoparona (6,7-dimetoxicoumarina) responsable de alta inhibición de crecimiento de *Fusarium* en dosis de hasta 250 $\mu\text{g/mL}$ (Céspedes *et al.*, 2006).

Otros estudios, como el de Barajas *et al.* (2011), muestran la actividad fungitóxicas que tiene el aceite de *T. lucida* contra los hongos *Monilina fructicola* y *Sclerotium rolfsii* a concentraciones 0.1 y 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$, reduciendo la producción de esclerocios. En el aceite esencial de *T. lucida* se ha determinado la presencia de metil eugenol (Bicchi *et al.*, 1997) y de metil cavicol o estragol (Marotti *et al.*, 2004), compuestos a los que se atribuye diferentes características con potencial de ser explotados como insecticida o bactericida, y en general, como plaguicida botánico (Koul, 2008). No obstante, se desconoce sobre la variabilidad del contenido de aceites esenciales de poblaciones de *T. lucida* de México (Serrato *et al.*, 2007) y son escasos los trabajos sobre sus propiedades antimicóticas. La caracterización del perfil de aceite esencial de poblaciones de *T. lucida* y su evaluación toxicológica contra hongos fitopatógenos de importancia económica como *F. oxysporum*, *P. janthinellum*, *A. niger* y *R. solani* es un paso necesario para el aprovechamiento de recursos naturales locales en estrategias de control orgánico para la producción agrícola. En el Estado de Hidalgo se distribuyen ocho especies de *Tagetes* y por las características climáticas de la entidad, la presencia de *T. lucida* es importante (Serrato, 2014). En el presente trabajo se determinó el contenido de aceite esencial de *T. lucida* proveniente de una población de Atotonilco, Hidalgo, México y se evaluó su actividad biológica *in vitro* contra los hongos antes referidos.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1 Material vegetal y procedencia

El 26 de octubre de 2014 se recolectó la parte aérea de plantas de *T. lucida* (Figura 3) en etapa fenológica de floración terminal en la localidad de Tiltepec (coordenadas 20° 18' 47" N y 98° 40' 58" O y 2000 msnm), perteneciente a la población de Atotonilco el Grande, Hidalgo (Figura 4), de clima predominante templado semifrío C(E)(f) (INEGI, 2000). Las semillas acondicionadas se

ingresaron al Banco de Germoplasma Salvador Miranda Colín de la Universidad Autónoma Chapingo con código de acceso ELL-001-2016; también se ingresaron ejemplares herborizados al Herbario CHAP perteneciente a la División de Ciencias Forestales de la UACH (voucher 67732). Los tallos florales se cortaron en trozos de 4 a 5 cm utilizando cuchillo de cocina. Desde la recolecta del material hasta la realización de la destilación transcurrieron alrededor de dos horas.



Figura 3. *T. lucida* en floración (Fotografía: Edgar López López).

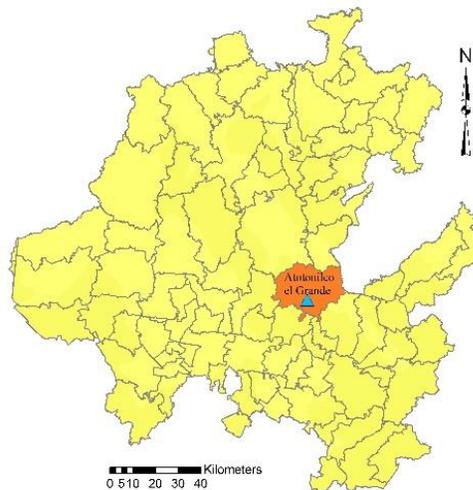


Figura 4. Atotonilco el Grande, Hidalgo y punto de colecta de *T. lucida*. Escala 1:250 000

2.4.2 Extracción, rendimiento de aceite e identificación de compuestos

La extracción del aceite esencial se llevó a cabo mediante hidrodestilación en dos modalidades: a nivel laboratorio en un destilador de cristal modelo italiano de 6 L de capacidad y a nivel piloto mediante destilador de acero inoxidable con capacidad de 50 Kg. Para realizar la extracción (repetición) a nivel laboratorio, se utilizó 1.5 kg de material vegetal para una destilación y se hicieron cuatro repeticiones, el periodo de la destilación fue de 45 min. Para la extracción a nivel piloto se utilizaron 46 kg de material fresco; el tiempo de hidrodestilación fue de 3 h a partir de la precipitación. Del destilado se obtuvieron dos fases (acuosa y aceitosa), la parte aceitosa separada en frascos ámbar conservados en cuarto oscuro a temperatura de 18 ± 2 °C. El rendimiento de aceite esencial se obtuvo referido en biomasa fresca.

Para la identificación de los componentes del aceite esencial, se utilizó el extracto oleo de la destilación a nivel piloto y se realizó mediante cromatografía de gases con detector de masas (Adams, 2001). El cromatógrafo correspondió al modelo 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. Las temperaturas del inyector y del detector se mantuvieron a 250 °C y 280 °C, respectivamente, y se alcanzaron a una velocidad de 10 °C min⁻¹. La temperatura inicial del horno fue de 70 °C, durante 1 min y posteriormente 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. Las muestras se diluyeron (1/100) en acetona (v/v) de 1 µL y posteriormente se inyectaron en el equipo en modo "Split" automático mediante un inyector 7683D (Agilent Technologies, USA); se realizaron tres repeticiones. Los datos de abundancia relativa se obtuvieron a partir del porcentaje de área de los picos cromatográficos. Como compuestos mayoritarios se consideraron aquellos con más de 5 % de abundancia relativa. El intervalo de masas detectado fue de 35-500 m/z. Los

compuestos n-alcanos, n-octano (C₈ H₁₈) y n-octadecano (C₁₈ H₃₈), se usaron como referencias en el cálculo de los índices de Kovats. La identificación de los componentes se realizó por comparación de los índices de retención relativa, más los espectros de masas comparados con la base de datos NIST 05 del sistema GC-MS (National Institute of Standard and Technology) y con los datos espectrales publicados por la Carol Stream Corp., USA (Adams, 2001).

2.4.3 Evaluación de efectos antimicóticos

Las cepas de los hongos *A. niger*, *R. solani*, *F. oxysporum* y *P. janthinellum*, provenientes de cultivos del Campo Agrícola Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), se obtuvieron e identificaron en el Laboratorio de Micología Agrícola del Departamento de Parasitología de la UACH. Para reproducir las cepas se realizaron cortes de PDA-micelio en cada caja Petri (100x15 mm) con medio PDA (200 g papa, 20 g dextrosa, 20 g agar) las cuales se incubaron a 28 °C durante 72 h, posteriormente se transfirieron a cajas Petri con cada uno de los tratamientos, los cuales se bioensayaron en dos experimentos.

Experimento 1. La preparación de las cajas Petri con los tratamientos se hizo de la manera siguiente. El aceite esencial en concentraciones de 1 mL L⁻¹ (0.1 %) y 10 mL L⁻¹ (1 %) se disolvió por separado en PDA; para disolver el aceite en el medio de cultivo se utilizó Tween® 20 como emulsificante en 1 mL L⁻¹ en todos los tratamientos. El fungicida comercial Benomil® (butilcarbamoil benzimidazol-2-ilcarbamato de metilo) al 1 % se utilizó como testigo positivo o referencial además de incluir un testigo absoluto sin aceite esencial. El experimento constó de 16 tratamientos generados de la combinación de los factores de estudio concentración de aceite (0,1 y 10 mL), fuente de hongos (cuatro especies) y testigo referencial (para cada uno de los hongos), tratamientos que se distribuyeron siguiendo el diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones. Cada repetición estuvo conformada por cuatro unidades experimentales, cada unidad experimental correspondió a una caja Petri (placa) de 100 x 15 mm.

De las cajas Petri con el inóculo micelial se hicieron cortes de agar con micelio de 1 cm², y se trasladaron al centro de la caja Petri que contenía el extracto del PDA y los tratamientos respectivos. Experimento 2. Con las mismas condiciones del primer experimento, se ensayaron concentraciones de 20 mL L⁻¹ (2 %) y 30 mL L⁻¹ (3 %), y como testigo referencial Benomil (1 %). El experimento consistió de 16 tratamientos, cada uno repetido cuatro veces.

En ambos experimentos, las placas o cajas se incubaron a una temperatura de 28 °C y se observó el desarrollo micelial hasta el crecimiento límite del hongo. La actividad del aceite esencial se evaluó considerando la prueba de crecimiento micelial (Ríos, 1988); para el registro del crecimiento micelial se midieron dos posiciones del diámetro de crecimiento del área del inóculo inicial a intervalos de 24 h y se obtuvo el diámetro promedio. Con los datos de diámetro de crecimiento se calculó el porcentaje de reducción de crecimiento con respecto al tratamiento testigo (RRT) mediante la fórmula:

$$\text{RRT (\%)} = \frac{\text{TCT} - \text{TCt}}{\text{TCT}} \times 100$$

donde, TCT= tasa de crecimiento en el testigo y TCt= tasa de crecimiento del tratamiento.

El análisis de varianza sobre el diámetro del micelio en los dos experimentos se hizo como un factorial 3x4 utilizando el modelo lineal general y la comparación de medias mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) con el paquete estadístico SAS versión 9 (SAS Institute, 2004).

2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1 Rendimiento de aceite esencial e identificación de compuestos

El rendimiento promedio de aceite esencial a nivel de matraz y a nivel piloto fue de 0.28 % con respecto al peso de tejido fresco (Cuadro 2), resultado por debajo

de lo reportado para esta especie (0.3 y 0.4 %) (Cáceres, 1998) y muy inferior comparado contra otras especies como el hinojo (Sellam *et al.*, 2015). Las características del hábitat en el que se desarrolla la población de *T. lucida* seguramente debe ser importante en la respuesta de productividad natural; al respecto, Haslam (1986) propone que factores como el suelo y el clima son los principales factores que influyen en el rendimiento y calidad del aceite esencial.

Cuadro 2. Biomasa de referencia y rendimiento de aceite esencial de plantas de la población de *T. lucida* de Atotonilco el Grande, Hidalgo.

Tipo	Biomasa (Kg) peso fresco, PF	Biomasa (Kg) peso seco, PS	Aceite esencial extraído (mL)	Rendimiento (%) mL 100 g ⁻¹ PF	Rendimiento (%) mL 100 g ⁻¹ PS
Matraz	1.4075	1,054	4.04	0.2869	0.3832
Piloto	46	35	130.00	0.2826	0.3714
Piloto ^z (1 ha)	2,000	1,513	5,600	0.2800	0.3701

^z Extrapolación del ensayo piloto a 1 hectárea.

En cuanto a la identificación de compuestos se detectaron nueve, separados en tiempos de retención de 3.9 a 17 min los cuales aparecieron en la secuencia siguiente: β -mirceno (3.93 min), 3,7-dimetil-1,3,6-octatrieno (4.60 min), 3,7-dimetil -1,6-octadieno-3-ol (5.30 min), estragol (6.67 min), 4-metoxibenzaldehído (7.43 min), 1-metoxi-4-(1-propenil) benceno (7.86 min), 1,2-dimetoxi-4-(2-propenil) benceno (9.32 min), óxido de cariofileno (11.72 min) y ácido trans-13-octadecanoico (17.09) (Cuadro 3, Figura 5).

Los componentes mayoritarios fueron: estragol (1-alil-4-metoxibenceno) (48 %) y anetol (1-metoxi-4-(1-propenil) benceno) (35 %) (Picos 2 y 4 del Cuadro 3), los cuales se han registrado con anterioridad para la especie en cuestión (Bicchi *et al.*, 1997; Marotti *et al.*, 2004). Estos compuestos químicos son

fenilpropanoides que se distinguen por ser isómeros de posición reportados en otras especies de *Tagetes* (Serrato *et al.*, 2008); éstos metabolitos secundarios tienen efecto biológico contra diversas especies de insectos y de hongos (Koul, 2008; Sellam *et al.*, 2015). Cabe señalar que el anetol, como componente mayoritario combinado con otras moléculas en el aceite esencial de *T. filifolia*, tiene una mayor actividad biológica que en estado puro (Camarillo *et al.*, 2009), evidencia que sugiere un efecto de sinergismo (Koul, 2008). El anetol y el estragol se encuentran en otras especies aromáticas como estragón (*Artemisia dracunculus*), albahaca (*Ocimum basilicum*), hinojo (*Foeniculum vulgare*), anís (*Pimpinella anisum*) y anís estrella (*Illicium verum*) (Freire *et al.*, 2005; Rietjens *et al.*, 2005).

Cuadro 3. Composición química del aceite esencial de *T. lucida* de Atotonilco el Grande, Hidalgo.

Pico	Compuesto	Tiempo de retención (min)	Área	Porcentaje
1	β-Mirceno	3.93	1336863	2.32
2	3,7-dimetil-1,3,6-octatrieno	4.60	425990	0.74
3	3,7-dimetil-1,6-Octadieno-3-ol	5.30	808900	1.40
4	Estragol	6.67	28073041	48.84
5	4-metoxibenzaldehido	7.43	742814	1.29
6	1-metoxi-4-(1-propenil) benceno (anetol)	7.86	20569878	35.78
7	1,2-dimetoxi-4-(2-propenil) benceno	9.32	1300116	2.26
8	Oxido de cariofileno	11.72	836063	1.45
9	Ácido trans-13-octadecanoico	17.09	3384380	5.88

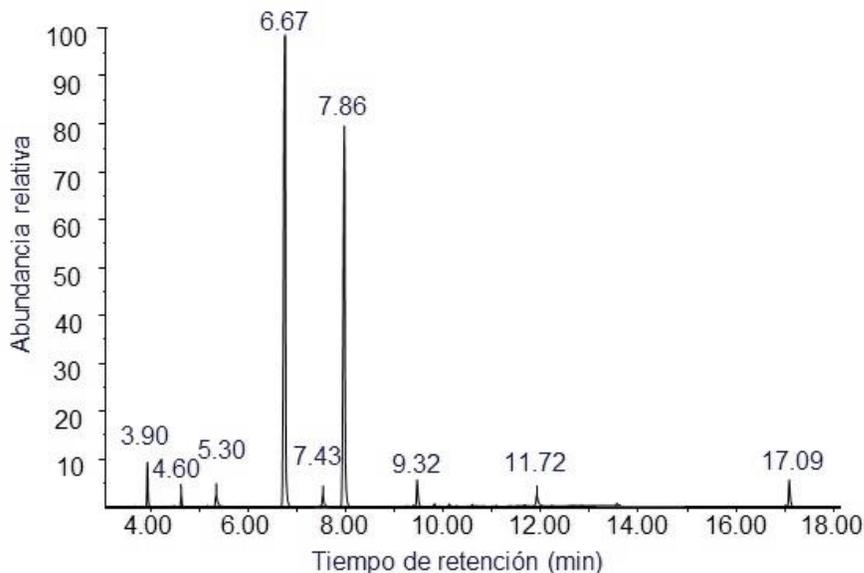


Figura 5. Cromatograma de los componentes del aceite esencial de *T. lucida*.

2.5.2 Evaluación de la actividad antimicótica

En los dos experimentos, las características morfológicas que presentaron los hongos fueron como sigue. En *A. niger*, el crecimiento del hongo al inicio mostraba colonias blancas y a partir de las 72 h éstas se volvieron negras y con una textura similar a semillas de pimienta; *F. oxysporum* mostró colonias blancas al inicio y posteriormente se tornaron color púrpura, de textura algodonosa y produjeron un pigmento púrpura que se difundió en el medio de cultivo; *P. janthinellum* presentó colonias de coloración verde grisáceo, de forma plana, aterciopeladas y fasciculadas, conforme crecía, era notoria una notable producción de exudados, probablemente metabolitos secundarios; *R. solani* desarrolló colonias de color café pardo y planas al inicio de su crecimiento, posteriormente presentó la formación de una superficie algodonosa de color blanco, al finalizar su crecimiento, se observó una pigmentación verde oscuro. Las características morfológicas de los hongos coincidieron con lo reportado para estas especies en sus diferentes fases con un crecimiento limitado, pero sin daños aparentes (Agrios, 1995).

En el Experimento 1, el diámetro inicial del micelio en el medio de cultivo con Benomil® se mantuvo sin cambio en los diferentes momentos de registro de esta variable, es decir, no hubo crecimiento significativo al término de la evaluación (1.5 mm, $P \leq 0.05$) (Cuadro 4), respuesta que coincide con otros resultados como el de Villa *et al.* (2015) donde se reporta un efecto fungicida del Benomil® (testigo de referencia) con valores superiores al 95 % de actividad. Por el contrario, en el testigo absoluto, el crecimiento del micelio tuvo el mayor diámetro (9.0 mm) (Cuadro 4). La concentración del aceite esencial, la especie fúngica y su interacción influyeron ($P \leq 0.05$) el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos estudiados (Cuadro 4). Considerando el factor concentración del aceite, el diámetro de la zona de crecimiento de los hongos fue disminuyendo proporcionalmente al aumentar la concentración (Cuadro 4); este efecto se ha observado en trabajos previos de evaluación de extractos de *Tagetes* en hongos (Céspedes *et al.*, 2006). La tendencia observada en la disminución del crecimiento micelial permite suponer que con mayores concentraciones de aceite se podría lograr la inhibición total de crecimiento y quizá la muerte del hongo, tal consideración motivó plantear el segundo experimento que se comentará más adelante. En cuanto al crecimiento del diámetro del micelio y su relación con las diferentes especies de hongos (Cuadro 4), se encontró que los ascomicetos *A. niger* y *P. janthinellum* respondieron de manera similar (8.0-8.1 mm), con crecimiento mayor ($P \leq 0.05$) comparado con el del basidiomiceto *R. solani* y el deuteromiceto *F. oxysporum*, ambos de crecimiento micelial parecido (6.7-7.1 mm); estas diferencias se podrían atribuir a la naturaleza genética de estos organismos. En cuanto al efecto de interacción, destacó que con 0.1 y 1 % de aceite de *T. lucida* aplicados a las cuatro especies de hongos se logró menor diámetro micelial ($P \leq 0.05$) con respecto del testigo absoluto (Cuadro 4), confirmando el efecto biológico del aceite. También fue notorio que con 0.1 % de aceite, el diámetro del micelio de *F. oxysporum* y de *R. solani* fue menor ($P \leq 0.05$) (4.86.8 mm) que el de *A. niger* y de *P. janthinellum* (7.4-7.9 mm) (Cuadro 4), respuesta que confirma cierta especificidad entre el tipo de hongo y la naturaleza química del aceite. Al respecto, agentes antimicóticos en ascomicetos impiden el

crecimiento del hongo en condiciones *in vitro*, afectan su capacidad esporulativa, y la germinación de conidios (Castellanos *et al.*, 2011); en hongos basidiomicetos, el mecanismo de acción antifúngica está dado por compuestos flavonoides de efecto biocida (Céspedes *et al.*, 2006). Finalmente, en cada especie de hongo las dos concentraciones de aceite no influyeron con significancia estadística el diámetro del micelio (Cuadro 4), resultado que tendría implicaciones económicas favorables de aplicar la concentración de 0.1 %.

Cuadro 4. Comparación de medias del crecimiento micelial (diámetro) y porcentaje de reducción del crecimiento micelial (%) de *A. niger*, *F. oxysporum*, *P. janthinellum* y *R. solani* a 15 días de la siembra *in vitro* del inóculo expuesto a 0.1 y 1.0 % de aceite esencial.

Aceite <i>T. lucida</i> (%) y testigo	Diámetro en mm de la circunferencia del micelio y reducción del crecimiento (%)				
	<i>A. niger</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. janthinellum</i>	<i>R. solani</i>	Factor (C)
<i>Experimento 1</i>					
	Interacción (HxC)				
0.0	9.1±0.2 a ^z (0)	9.0±1.1 a (0)	9.1±0.3 a (0)	9.1±0.5 a (0)	9.0±0.5 A (0)
0.1	7.9±0.8 b (13.1)	6.3±1.2 c (30.0)	7.8±0.9 b (14.2)	6.8±0.6 c (25.2)	7.2±0.9 B (20.6)
1.0	7.1±1.1 bc (21.9)	4.8±0.2 cd (46.6)	7.4±0.1 bc (16.6)	5.5±0.7 c (39.5)	6.2±0.6 C (31.1)
Factor (H)	8.0±0.4 A (11.6)	6.7±0.8 B (25.5)	8.1±0.5 A (10.2)	7.1±0.6 B (21.5)	
Benomil® 1.0	1.5±0.5 d (83.5)	1.4±0.6 d (84.4)	1.5±0.8 d (83.5)	1.5±0.3 d (83.5)	1.5±0.5 D (83.7)
<i>Experimento 2</i>					
	Interacción (HxC)				
0.0	9.0±0.3 a (0)	9.1±0.4 a (0)	8.9±0.4 a (0)	9.1±0.5 a (0)	9.0±0.4 A
2.0	6.6±0.6 b (26.6)	4.7±0.2 c (48.3)	6.8±0.6 b (23.6)	3.9±0.6 c (57.1)	5.5±0.5 B (38.9)
3.0	6.4±0.7 b (28.8)	4.2±0.6 c (53.8)	6.7±0.3 b (24.7)	2.8±0.5 cd (72.5)	5.0±0.5 B (44.9)
Factor (H)	7.3±0.5 A (18.4)	6.0±0.4 B (34.0)	7.5±0.4 A (16.1)	5.3±0.5 C (43.2)	
Benomil® 1.0**	1.6±0.6 d (82.2)	1.4±0.5 d (84.6)	1.6±0.3 d (82.0)	1.5±0.1 d (83.5)	1.5±0.4 C

^z Valores con la misma letra minúscula o mayúscula dentro de la columna o mayúscula dentro de fila son iguales estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

La reducción de la tasa de crecimiento micelial de los cuatro hongos expuestos al aceite de 'pericón' de Atotonilco el Grande, desde 23 hasta 46 % (Cuadro 4), es indicador de un efecto fungistático de este extracto vegetal que contiene ocho compuestos químicos distintos, con abundancia de estragol y anetol (Cuadro 3). Este efecto fungistático causado por el aceite de *T. lucida* se había detectado previamente contra *Sclerotium rolfsii* y *Monilinia fructicola*, hongos importantes en postcosecha de productos agrícolas (Barajas *et al.*, 2011). Para los ascomicetos (*A. niger* y *P. janthinellum*), la tasa de reducción de micelio de 13 a 21 %, comparada con la registrada para el basidiomiceto *R. solani* (25 a 39 %) y el deuteromiceto *F. oxysporum* (30 a 46 %), es indicadora de que la actividad biológica del aceite de la población Atotonilco en las concentraciones ensayadas no parece tener alcances promisorios contra los ascomicetos en este experimento.

En el Experimento 2, el micelio en el medio de cultivo con Benomil® no presentó un incremento significativo (1.5 mm) ($P \leq 0.05$) al término del experimento (Cuadro 4), mientras que el micelio del testigo absoluto tuvo el mayor diámetro (9.0 mm, Cuadro 4). El tamaño del micelio de los hongos fitopatógenos, al igual que en el Experimento 1, resultó influido ($P \leq 0.05$) por la especie fúngica (Cuadro 4): los fitopatógenos no esporulativos (*F. oxysporum* y *R. solani*) resultaron menos afectados que los esporulativos (*A. niger* y *P. janthinellum*). Por otra parte, no hubo efecto de concentración en el diámetro micelial aunque éste fue relativamente menor comparado con lo observado en el primer experimento (Cuadro 4). Considerando el efecto de interacción, se observó que 2 y 3 % de aceite de *T. lucida* ocasiona menor diámetro y mayor porcentaje de reducción micelial en *F. oxysporum* (4.7-4.2 mm; 48 y 53 %) y en *R. solani* (3.9-2.8 mm; 57 y 72 %), con respecto del testigo absoluto (9.0-9.1 mm) y en comparación con *A. niger* (6.6-6.4 mm; 26-28 %) y *P. janthinellum* (6.8-6.7; 23-24 %) (Cuadro 4). Estos resultados coinciden parcialmente con lo reportado por Castellanos *et al.* (2011) quienes indican que el micelio de *R. solani* resulta inhibido por extractos

metanólicos de *T. lucida* en dosis de 240 µg/mL. La poca inhibición de los hongos *A. niger* y *P. janthinellum* se debe a su actividad esporulativa, ya que esporas y conidios pueden ser más resistentes ante algunos agentes antimicóticos (Barajas *et al.*, 2011); por lo tanto, la actividad biológica del aceite de esta población de *T. lucida* en los ascomicetos estudiados no es promisoría, como arriba se señaló.

En general, se conoce que fenilpropanoides como el estragol y el anetol que se encuentran en el aceite esencial de la población Atotonilco, son metabolitos secundarios que también están presentes en otras especies vegetales como el hinojo (*Foeniculum* spp) o el anís (*Pimpinella anisum*) cuyo aceite posee actividad fungistática o fungicida (Freire *et al.*, 2005; Rietjens *et al.*, 2005; Sellam *et al.*, 2015). En el caso de la actividad biológica del Benomil®, el mecanismo está dado por la acción inhibitoria de la síntesis de ergosterol, que es un componente estructural de la membrana de los hongos, causando deformaciones y proliferación anormal de tubos germinativos (Púrez, 1983).

La aplicación de sustancias sintéticas o naturales contra hongos fitopatógenos debe valorar las implicaciones al ambiente y al humano, así como su viabilidad técnica-económica; en este último sentido, la extrapolación del rendimiento de biomasa y de aceite de la población de *T. lucida* en condiciones de secano en Atotonilco, Hidalgo, así como el destacado efecto fungistático evaluado contra los hongos *F. oxysporum* y *R. solani*, permiten estimar que con un rendimiento de 2,000 kg de biomasa fresca por hectárea obtenido por recolección en las áreas naturales de Atotonilco y con un rendimiento de aceite esencial de 0.28 %, se podrían obtener cerca de 5.6 L de aceite esencial (Cuadro 2), con lo cual se podrían formular más de 1000 L de biopesticida al 1 % y más de 10 000 L al 0.1 %. Por lo tanto, este recurso natural de Atotonilco, Hidalgo puede tener buenas perspectivas en agricultura ecológica contra tales hongos; su evaluación en campo resultará conveniente, a la vez que fomentar el manejo agroecológico de la población de 'pericón' para aumentar el número de plantas por unidad de superficie.

2.6 CONCLUSIONES

La productividad en aceite esencial de la población natural de *T. lucida* de Atotonilco, Hidalgo no fue alta y los componentes mayoritarios en el aceite fueron anetol y estragol. Las pruebas de evaluación *in vitro* contra los hongos fitopatógenos bioensayados evidenciaron un efecto fungistático del aceite, especialmente contra el hongo *R. solani* en la condición de alta concentración del aceite.

2.7 LITERATURA CITADA

- Adams, R. P. (2001). Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole. Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation. USA. 468-572.
- Agrios, G. N. (1995). Fitopatología. 2ª ed. Uthea. México. 838.
- Anderson, N. A. (1982). The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. *Annual Review of Phytopathology*. 20(1):329-347.
- Barajas, J. S., Montes, R., Castrejón, F., Flores, H. E. & Serrato, M. A. (2011). Propiedades antifúngicas en especies del género *Tagetes*. *Revista Mexicana de Micología*. 34:85-91.
- Benkeblia, N. (2004). Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *LWT-Food Science and Technology*. 37(2):263-268.
- Bicchi, C., Fresia, M., Rubiolo, P., Monti, D., Franz, C. & Goehler, I. (1997). Constituents of *Tagetes lucida* Cav. ssp. *lucida* essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*. 12:47-52.

- Cáceres, A., López, B., González, S., Berger, I., Tada, I. & Maki, J. (1998). Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 62(3): 195-202.
- Camarillo, G. A., Ortega, L. D., Serrato, M. A. & Rodríguez, H. C. (2009). Actividad biológica de *Tagetes filifolia* (Asteraceae) en *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 35(2):177-184.
- Castellanos, L., Muiño, B. L., Lorenzo, M. E., Rodríguez, A. & Gómez, M. (2011). Efecto *in vitro* de siete fungicidas químicos sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. *Fitosanidad*. 15(1):31-38.
- Céspedes, C. L., Avila, J. G., Martínez, A., Serrato, B., Calderón, J. C. & Salgado, R. (2006). Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(10):3521-3527.
- Daouk, R. K., Dagher, S. M. & Sattout, E. J. (1995). Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L. *Journal of Food Protection*. 58(10):1147-1149.
- Duke, J. A. (2008). Duke's handbook of medicinal plants of Latin America CRC Press. 685-693.
- Freire, R. S., Morais, S. M. & Catunda, F. E. (2005). Synthesis and antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotector activities of anethole and related compounds. *Bioorganica and Medical Chemistry*. 13(13):4353–4358.
- Grainge, M. & Ahmed, S. (1988). Handbook of Plants with Pest-control Properties. 1st edition. John Willey and Sons. USA. 470 p.
- Halbrendt, J. M. (1996). Allelopathy in the management of plant parasitic nematodes. *Journal of Nematology*. 28:8-14.
- Haslam, E. (1986). Secondary metabolism—fact and fiction. *Natural Product Reports*. 3:217-249.

- Johnson, A. W., Dowler, C. C., Baker, S. H. & Handoo, Z. A. (1998). Crop yields and nematode population densities in triticale-cotton and triticale-soybean rotations. *Journal of Nematology*. 30:353-361.
- Kishore, N. & Dwivedi, R. S. (1991). Fungitoxicity of the essential oil of *Tagetes erecta* L. against *Pythium aphanidermatum* Fitz. the damping-off pathogen. *Flavour and Fragrance Journal*. 6(4):291-294.
- Koul, O., Walia, S. & Dhaliwal, G. S. (2008). Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopesticides International*. 4:63-84.
- Lemmen, C. (1999). *Moulds: Occurrence, Health Risks, Protective Measures*. Springer Verlag. Berlin. Germany. 192 p.
- Marotti, M., Piccaglia R., Biavati B. & Marotti I. (2004). Characterization and yield evaluation of essential oils from different *Tagetes* species. *Journal of Essential Oil Research*. 16(5):440-444.
- Púrez, L., Moa, V. T., & Mauri, F. (1983). Lucha contra *Mycosphaerella musicola*, agente causal de la Sigatoka en el plátano con fungicidas sistémicos derivados de triazol. *Ciencia y Técnica en la Agricultura. Protección de Plantas*. 6(4):87-98.
- Raper, K. B., Fennell, D. I. (1965). *The genus Aspergillus*. Baltimore, Williams & Wilkins Co. USA. 686.
- Rhodes, D. J. (1993). Formulation of biological control agents. *In: Exploitation of Microorganisms*. Jones, D. G. (ed.). Chapman and Hall, London. UK. 411-439.
- Rietjens, I. M., Boersma, M. G. & Van Der Woude, H. (2005). Review: Flavonoids and alkenylbenzenes: mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. *Mutation Research*. 574(1):124-138.
- Ríos, J., Recio, M. & Villar, A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 23(2-3):127-149.

- Romagnoli, C., Bruni, R., Andreotti, E., Rai, M. K., Vicentini, C. B. & Mares, D. (2005). Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitulum from wild Indian *Tagetes patula* L. *Protoplasma*. 225(1-2):57-65.
- Sellam, K., Bammou, M., Ramchoun, M., Bouhlali, E. D. T., J'aiti, F., Nassiri, L., El-Rhaffari, L. (2015). Antifungal potential of the seed and leaf *Foeniculum vulgare* Mill essential oil in liquid and vapor phase against phytopathogenic fungi. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 5 (11): 50-54.
- Serrato, M. A. (2014). El Recurso Genético Cempoalxóchitl (*Tagetes* spp) de México (Diagnóstico). Universidad Autónoma Chapingo- SINAREFI-SNICS-SAGARPA. 182 p.
- Serrato, M. A. & Quijano M. L. (1993). Usos de algunas especies de *Tagetes*: Revisión bibliográfica (1984-1992). *In: Memorias I Simposio Internacional y II Reunión Nacional sobre Agricultura Sostenible: Importancia y Contribución de la Agricultura Tradicional*. CEICADAR, Puebla. México. 228-238.
- Serrato, M. A., Barajas, J. S. & Díaz, F. (2007). Aceites esenciales del recurso genético *Tagetes* para el control de insectos, nematodos, ácaros y hongos. *In: Agricultura Sostenible Vol. 3 Sustancias Naturales Contra Plagas*. López-Olguín, J. F.; Aragón-García, A.; Rodríguez-Hernández, C. y Vázquez-García, M. (eds.). Montecillo, Texcoco, México. México. 142-200.
- Serrato, M. A., Díaz, F. & Barajas, J. S. (2008). Composición en el aceite esencial en germoplasma de *Tagetes filifolia* Lag. de la región centro-sur de México. *Agrociencia*. 42:277-285.
- Singh, G., Chen, W., Rubiales, D., Moore, K., Sharma, Y. R. & Gan, Y. (2007). Diseases and their management. *In: Chickpea Breeding and Management*. Yadav, S. S.; Redden, R. J.; Chen, W. y Sharma, B. (eds). CABI. 497-519.

- Soule, J. A. (1996). Novel annual and perennial *Tagetes*. *In: Progress in New Crops*. Janick, J. (ed.). American Society for Horticultural Science Press, Arlington, Virginia. USA. 546-551.
- Statistical Analysis System (SAS Institute) (2004). SAS/GRAPH user's guide Version 9.1 SAS Institute. Cary, NC, USA 359 p.
- Teodorescu, G., Sumedrea, M., Marin, F. & Murariu, F. (2009). Use of vegetal extracts in control of *Monilia spp.* *International Society for Horticultural Science*. 825:363-370.
- Villa, A., Pérez, R., Morales, H. A., Basurto, M., Soto, J. M. & Martínez, E. (2015). Current situation of *Fusarium spp* in the control and evaluation of the antifungal activity on vegetables extracts. *Acta Agronómica*. 64(2):194-205.
- Villarreal, J. A. (2003). Familia Compositae. Tribu *Tageteae*. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Fascículo 113. Instituto de Ecología A. C. Pátzcuaro, Michoacán. México. 85 p.
- Villavicencio, M. A., Pérez, B. E. & Gordillo, A. J. (2010). Plantas tradicionalmente usadas como plaguicidas en el Estado de Hidalgo, México. *Polibotánica*. 30:193-238.
- Zygadlo, J. A., Guzmán, C. A. & Grosso, N. R. (1994). Antifungal properties of the leaf oils of *Tagetes minuta* L. and *T. filifolia* Lag. *Journal of Essential Oil Research*. 6(6):617-621.

CAPÍTULO III.
COMPOSICIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE POBLACIONES DE *Tagetes*
spp DE HIDALGO, MÉXICO

3.1 RESUMEN

Tagetes es un recurso fitogenético aromático de México que poco se ha estudiado en su caracterización química. En el presente estudio se obtuvieron muestras *in situ* de tallos florales de 53 poblaciones correspondientes a seis especies distribuidas en ocho tipos de climas del Estado de Hidalgo, de las cuales se extrajo aceite esencial mediante hidrodestilación y se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los compuestos mayoritarios en las poblaciones fueron: β -ocimeno (21.22 a 44.10 %), terpinoleno (15.2 a 43.3 %) y verbenona (16.6 a 48.2 %) en *T. erecta*; estragol (28.3 a 45.1 %), anetol (31.3 a 47.3 %), limoneno (23.4 a 33.1 %) y β -cuvabeno (35.5 a 39.6 %) en *T. filifolia*; limoneno (23.4 y 33.1 %) y β -cuvabeno (39.6 y 35.5 %) en *T. micrantha*; β -ocimeno (10.5 a 25.1 %), acetato de geranilo (25.2 a 41.3 %), estragol (22.5 a 48.8 %), metil eugenol (52.2 %) y anetol (17.7 a 35.8 %) en *T. lucida*; α -pineno (14.4 a 24.1 %), β -felandreno (14.5 a 23.1 %) y limoneno (31.3 a 55.2 %) en *T. lunulata*; α -pineno (14.1 a 25.4 %), terpinoleno (13.3 a 23.2 %), verbenona (18.4 a 24.4 %), cariofileno (13.2 a 27.3 %) y β -farneseno (15.8 %) en *T. patula*. La presencia-ausencia de compuestos en los aceites esenciales estuvo relacionada con factores ambientales como clima y altitud de los puntos de colecta.

Palabras clave: *Tagetes*, aceite esencial, composición química.

CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OIL OF *Tagetes* spp POPULATIONS OF HIDALGO, MEXICO

3.2 ABSTRACT

Tagetes is an aromatical plant resource of Mexico that has been little studied on its chemical composition. In the present study floral stems were sampled *in situ* from 53 plant populations growing at eight different climates of Hidalgo province to obtain essential oils by hydrodistillation and then analyzed by GC-ME. Major compounds in plant populations were: β -ocimene (21.22 to 44.10 %), terpinolene (15.2 a 43.3 %) and verbenone (16.6 a 48.2 %) in *T. erecta*; estragole (28.3 to 45.1 %), anethole (31.3 to 47.3 %), limonene (23.4 to 33.1 %) and β -cuvabene (35.5 to 39.6 %) in *T. filifolia*; limonene (23.4 to 33.1 %) and β -cuvabene (35.5 to 39.6 %) in *T. micrantha*; β -ocimene (10.5 to 25.1 %), geranile acetate (25.2 to 41.3 %), estragole (22.5 to 48.8 %), methyl eugenol (52.2 %) and anethole (17.7 to 35.8 %) in *T. lucida*; α -pinene (14.4 to 24.1 %), β -felandrene (14.5 to 23.1 %) and limonene (31.3 to 55.2 %) in *T. lunulata*; α -pinene (14.1 to 25.4 %), terpinolene (13.3 to 23.2 %), verbenone (18.4 to 24.4 %), cariofilene (13.2 to 27.3 %) and β -farnesene (15.8 %) in *T. patula*. The presence-absence of compounds in essential oils was related to environmental factors such as climate and altitude of collection points.

Index words: *Tagetes*, essential oil, chemical composition.

3.3 INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son el producto final del metabolismo secundario de plantas aromáticas, se trata de cualquier aceite volátil de una planta que contiene diferentes componentes aromáticos que proporcionan distintos sabores y aromas; se encuentran en diferentes partes de la planta como en hojas, tallos, corteza, flores, raíces y frutos (Koul *et al.*, 2008). Estos metabolitos secundarios se conforman principalmente por ácidos, aldehídos, cetonas, ésteres, fenilpropanos, terpenos y terpenoides (Greathead, 2003), que pueden propiciar un efecto biológico contra diferentes organismos como hongos, ácaros, nematodos e insectos (Koul *et al.*, 2008).

Entre otras familias botánicas que se caracterizan por la producción de aceites esenciales y su actividad biológica, se encuentra la familia Asteraceae (Bernath, 2009); *Tagetes*, es uno de los géneros de esta familia, el cual se integra por aproximadamente 56 especies distribuidas en el Continente Americano, desde el sureste de Estados Unidos hasta Argentina, aunque la mayoría de ellas se localiza en México (Soule, 1996). Las plantas de *Tagetes* comúnmente son herbáceas anuales, aunque las hay perennes, de aromas particulares que se liberan al ser estrujadas (Calderón y Rzedowski, 2001). Diversas propiedades biológicas de estas plantas se han reportado, específicamente contra virus, bacterias, hongos, nematodos, insectos y malezas (Serrato y Quijano, 1993). Existen diferentes factores que influyen en el rendimiento y composición del aceite esencial de una planta aromática, como el origen del material vegetal, la variabilidad entre individuos, el estado fenológico de la planta, los procedimientos de obtención del aceite y las condiciones ambientales naturales o bajo cultivo en las que se encuentran las plantas (Marotti *et al.*, 2004).

Para el género *Tagetes* se reportan al menos 126 metabolitos secundarios en el aceite esencial y entre los principales grupos químicos se encuentran: alcoholes, éteres, aldehídos, cetonas, ésteres, derivados fenólicos, feniltropanoides, tiofenos, triterpenoides, alcaloides, flavonoides y carotenoides (Marotti *et al.*,

2004; Xu *et al.*, 2012). Por otra parte, el tipo de metabolito secundario y su cantidad en los aceites esenciales de *Tagetes* varían de acuerdo con la constitución genética de la especie o sus poblaciones y las condiciones en que se desarrollan las plantas (Krishna *et al.*, 2002; Sefidkon *et al.*, 2004), lo cual significa que para el aprovechamiento de este recurso natural, que es abundante en México (Serrato, 2014), es necesaria la caracterización del perfil de aceites, asumiendo la hipótesis de que las condiciones ambientales, que también son muy diversas en México, pueden influir en el contenido de aceite esencial. Para ilustrar el fenómeno de variabilidad química y ambiental en *Tagetes*, se ha encontrado que la composición del aceite esencial de poblaciones de *T. lucida* de Costa Rica, Guatemala y México es diferente; por ejemplo, unas pueden contener metil cavicol (38.9 %), metil eugenol (24.3 %) y anetol (23.8 %) (Bicchi *et al.*, 1997); pero otras pueden contener metil eugenol (80 %) y metil cavicol (12 %) (Marotti *et al.*, 2004) o solamente metil eugenol (95 -97 %) (Ciccio, 2004). Un fenómeno similar se consigna para poblaciones de *T. filifolia* originarias de diferente sitios geográficos de México (Serrato *et al.*, 2008) y de Argentina (Maestri *et al.*, 1991).

Considerando la importancia potencial del recurso fitogenético *Tagetes* de México como fuente de bioplaguicidas para la agricultura, durante 2008-2012 en el Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos de la SAGARPA se implementaron trabajos de colecta de germoplasma a nivel nacional conformando un importante acervo de accesiones de este taxa que se encuentra en la fase de caracterización. Entre las accesiones se reconocen 230 del Estado de Hidalgo, que pertenecen a seis especies; esta entidad se ubica en la región centro-oriental de México con superficie de 20 846 km² (INEGI, 2007) y se divide en diferentes zonas con gran diversidad de vegetación conformada por 4 000 especies (Villavicencio *et al.*, 1998). Tal diversidad florística se localiza en la zona Otomí-Tepehua, Sierras de Hidalgo y de Pachuca, valles de Tulancingo y del Mezquital, la Huasteca, barranca de Metztitlán (Rzedowski, 1996; INEGI, 1992). En la mayoría de esas regiones se distribuye *Tagetes*, áreas donde también se

presentan problemas de sanidad vegetal en sistemas de producción agrícolas (Santana, 2015).

Atendiendo a la diversidad ambiental del Estado de Hidalgo y el uso potencial del recurso fitogenético *Tagetes* para su aprovechamiento en problemáticas de sanidad vegetal en sistemas de producción agrícolas en la entidad, en el presente trabajo se pretende dar un panorama general de la composición del aceite esencial de poblaciones *in situ* de *Tagetes* de diferentes regiones de Hidalgo con la finalidad de aportar información básica sobre la fitoquímica de este recurso natural que favorezca posibles acciones sobre su uso sustentable en agricultura y al mismo tiempo enriquecer la bases de datos del banco de germoplasma.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1 Material vegetal y procedencia

Durante los meses de octubre y noviembre de 2014 en diferentes localidades del Estado de Hidalgo se colectó tejido fresco de la parte aérea de plantas de 53 poblaciones de *Tagetes* en etapa fenológica de floración terminal; los lugares de recolecta (Figura 6, Cuadro 5) correspondieron a los detectados en una exploración previa realizada por la Universidad Politécnica Francisco I. Madero, en el Estado de Hidalgo en 2012, en la que se obtuvieron muestras de semillas que se ingresaron al Banco Nacional de Germoplasma Vegetal, México (BANGEV, UACH). Los tallos florales recién cortados se conservaron en agua hasta su utilización. La identidad taxonómica de las especies se verificó consultando el herbario HGOM del Centro de Investigaciones Biológicas perteneciente a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y el herbario CHAP perteneciente a la División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma Chapingo.

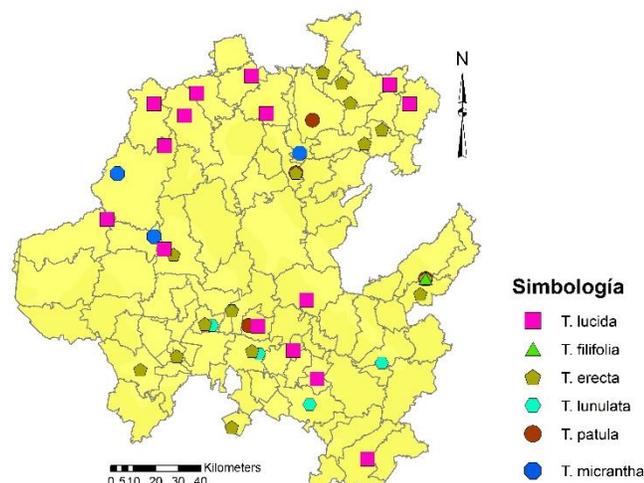


Figura 6. Localización geográfica de los puntos de recolecta de las especies de *Tagetes* del Estado de Hidalgo. Escala 1: 250 000.

Cuadro 5. Sitios de colección de tallos florales de poblaciones de *Tagetes* en el Estado de Hidalgo.

Población	Id.	Localidad	Altitud (msnm)	Coordenadas Geodésicas	
				Longitud	Latitud
<i>T. erecta</i>	ER01	Actopan, Actopan	1961	-98.9834361	20.2728194
<i>T. erecta</i>	ER02	Papatatla, Calnali	275	-98.4504278	20.9011528
<i>T. erecta</i>	ER03	Huatepango, Chapulhuacán	956	-98.9038889	21.1547222
<i>T. erecta</i>	ER04	UPFIM, Francisco I Madero	2018	-99.0905556	20.2227778
<i>T. erecta</i>	ER05	Tehuacán, Huejutla de Reyes	321	-98.5076000	21.0535778
<i>T. erecta</i>	ER06	Ixmiquilpan, Ixmiquilpan	1700	-99.2166667	20.4833333
<i>T. erecta</i>	ER07	El Chote, Jaltocán	225	-98.5418861	21.1277222
<i>T. erecta</i>	ER08	Molango, Molango	468	-98.7255139	20.7908389
<i>T. erecta</i>	ER09	San Agustín Tlaxiaca, San Agustín Tlaxiaca	2324	-98.9013139	20.1212500
<i>T. erecta</i>	ER10	Buena Vista, San Bartolo Tutotepec	959	-98.2052778	20.3930556
<i>T. erecta</i>	ER11	San Felipe, San Felipe Orizatlán	187	-98.6179556	21.1680944
<i>T. erecta</i>	ER12	Tasquillo, Tasquillo	1873	-99.4833333	20.6166667
<i>T. erecta</i>	ER13	Tenango, Tenango de Doria	1652	-98.2266667	20.3355556
<i>T. erecta</i>	ER14	San Juan, Tepehuacán Guerrero	882	-98.8441667	21.0130556
<i>T. erecta</i>	ER15	Tizayuca, Tizayuca	2273	-98.9833333	19.8333333
<i>T. erecta</i>	ER16	Tlaxcoapan, Tlaxcoapan	2073	-99.2032806	20.1005000
<i>T. erecta</i>	ER17	Tula, Tula	2083	-99.3500000	20.0500000
<i>T. erecta</i>	ER18	Yahualica, Yahualica	665	-98.3805528	20.9530278
<i>T. filifolia</i>	FL01	Santa María, Chapulhuacán	956	-98.9038888	21.1547222
<i>T. filifolia</i>	FL02	La Cuesta Colorada, Jacala	1690	-99.1719444	21.0052778

<i>T. filifolia</i>	FL03	Juliapán, Pacula	1322	-99.2955556	21.0497222
<i>T. filifolia</i>	FL04	Chilijapan, Tepehuacán Guerrero	882	-98.8441667	21.0130556
<i>T. lucida</i>	LC01	Apan, Apan	2546	-98.4384078	19.7126605
<i>T. lucida</i>	LC02	Ojo de Agua, Arenal	2143	-98.877625	20.2146778
<i>T. lucida</i>	LC03	Tiltepec, Atotonilco el Grande	2021	-98.6827778	20.3130555
<i>T. lucida</i>	LC04	Santa María, Chapulhuacán	956	-98.9038889	21.1547222
<i>T. lucida</i>	LC05	El Guajolote, Epazoyucan	2451	-98.6408093	20.0153681
<i>T. lucida</i>	LC06	La Puerta, Huautla	491	-98.2701472	21.0491306
<i>T. lucida</i>	LC07	Santa Catarina, Huejutla de Reyes	168	-98.3496944	21.1218806
<i>T. lucida</i>	LC08	Ixmiquilpan, Ixmiquilpan	1699	-99.254325	20.5038667
<i>T. lucida</i>	LC09	Panalito, Jacala	1690	-99.1719444	21.0052778
<i>T. lucida</i>	LC10	Cobrecito, La Misión	1454	-99.1233333	21.0897222
<i>T. lucida</i>	LC11	Camino al Real, Pachuca	2397	-98.7358333	20.1225000
<i>T. lucida</i>	LC12	Juliapan, Pacula	1322	-99.2955556	21.0497222
<i>T. lucida</i>	LC13	Tasquillo, Tasquillo	1873	-99.4833333	20.6166667
<i>T. lucida</i>	LC14	San Juan, Tepehuacán Guerrero	882	-98.8441667	21.0130556
<i>T. lucida</i>	LC15	Las Manzanas, Zimapán	2002	-99.2519444	20.8922222
<i>T. lunulata</i>	LN01	Actopan, Actopan	1961	-98.9834361	20.2728194
<i>T. lunulata</i>	LN02	San Juan Tepatepec, Francisco. I Madero	2008	-99.0622111	20.2165167
<i>T. lunulata</i>	LN03	El Pinalito, Jacala	1690	-99.1719444	21.0052778
<i>T. lunulata</i>	LN04	Camino al Real, Pachuca	2397	-98.7358333	20.1225000
<i>T. lunulata</i>	LN05	Pacula, Pacula	1322	-99.2955556	21.0497222
<i>T. lunulata</i>	LN06	San Agustín Tlaxiaca, San Agustín Tlaxiaca	2417	-98.8741611	20.1101778
<i>T. lunulata</i>	LN07	Tasquillo, Tasquillo	1873	-99.4833333	20.6166667
<i>T. lunulata</i>	LN08	Santiago Tulontepec, Tulancingo	2155	-98.3803611	20.0745556
<i>T. lunulata</i>	LN09	Zempoala, Zempoala	2467	-98.6705556	19.9186111
<i>T. micrantha</i>	MC01	Buena Vista, San Bartolo Tutotepec	959	-98.2052778	20.3930556
<i>T. micrantha</i>	MC02	Tepeapulco, Tepeapulco	2546	-98.4384078	19.7126605
<i>T. patula</i>	PT01	El Rincón, El Arenal	2029	-98.9166667	20.2166667
<i>T. patula</i>	PT02	Molango, Molango	1648	-98.7255139	20.7908389
<i>T. patula</i>	PT03	Nando, San Bartolo Tutotepec	1959	-98.2052778	20.3930556
<i>T. patula</i>	PT04	Tasquillo, Tasquillo	1873	-99.4833333	20.6166667
<i>T. patula</i>	PT05	San Cristobal, Tlanchinol	1537	-98.6592917	20.9887806

3.4.2 Caracterización del medio ecológico de los sitios de colecta de las poblaciones

Para la descripción del medio ecológico se elaboraron mapas de los puntos donde se colectaron las 53 muestras de *Tagetes* en Hidalgo. El mapa de clima se elaboró a partir del conjunto de datos de climas escala 1:250 000 (INEGI, 2007), por medio del programa de análisis geoestadísticos ArcGIS v.10.3.1.

3.4.3 Extracción e identificación de compuestos

Desde la recolecta de los tallos florales hasta la realización de la destilación transcurrieron alrededor de 2 h. El material vegetal se cortó en trozos de 4 a 5 cm utilizando un cuchillo de cocina. La extracción del aceite esencial se llevó a cabo mediante hidrodestilación en un destilador de cristal modelo italiano de 6 L de capacidad. La cantidad de tejido fresco fue de 1.5 kg y se hicieron tres repeticiones; el periodo de la destilación, a partir del inicio de la precipitación de los extractos, fue de 45 min hasta terminar del proceso. Los destilados correspondieron a una fase acuosa y otra aceitosa, las cuales se separaron y almacenaron en frascos ámbar de 5 mL de capacidad, manteniéndolos en un cuarto oscuro a temperatura ambiente de 18 °C.

Para la identificación de los componentes del aceite esencial se utilizó el extracto oleo de la destilación y se realizó mediante cromatografía de gases con detector de masas (Adams, 2001). El cromatógrafo correspondió al modelo 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. 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 inicial del horno fue de 70 °C durante 1 min y posteriormente 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. Las muestras se diluyeron (1/100) en acetona (v/v) de 1 µL y posteriormente se inyectaron manualmente en el equipo en modo "Split" automático mediante un inyector 7683D (Agilent Technologies, USA); se realizaron tres repeticiones.

El porcentaje de abundancia relativa se obtuvo a partir del porcentaje de área total de los picos cromatográficos dividiendo el área de cada pico entre esta y multiplicando por 100. Como compuestos mayoritarios se consideraron aquellos con más de 5 % de abundancia relativa y elementos traza aquellos con menos

del 5 % (Stashenko *et al.*, 2003). El intervalo de masas detectado fue de 35-500 m/z. Los compuestos n-alcanos, n-octano (C8 H18) y n-octadecano (C18 H38), se usaron como referencias en el cálculo de los índices de Kovats. La identificación de los componentes se realizó por comparación de los índices de retención relativa, más los espectros de masas comparados con la base de datos NIST 05 del sistema GC-MS (National Institute of Standard and Technology) y con los datos espectrales publicados por la Carol Stream Corp., USA (Adams, 2001).

3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.5.1 Caracterización del medio ecológico de los sitios de colecta de las poblaciones

La mayor parte de las muestras de *Tagetes* se ubicaron en clima árido y semiárido, seguidas del templado y el cálido (Figura 7) (INEGI, 2007).

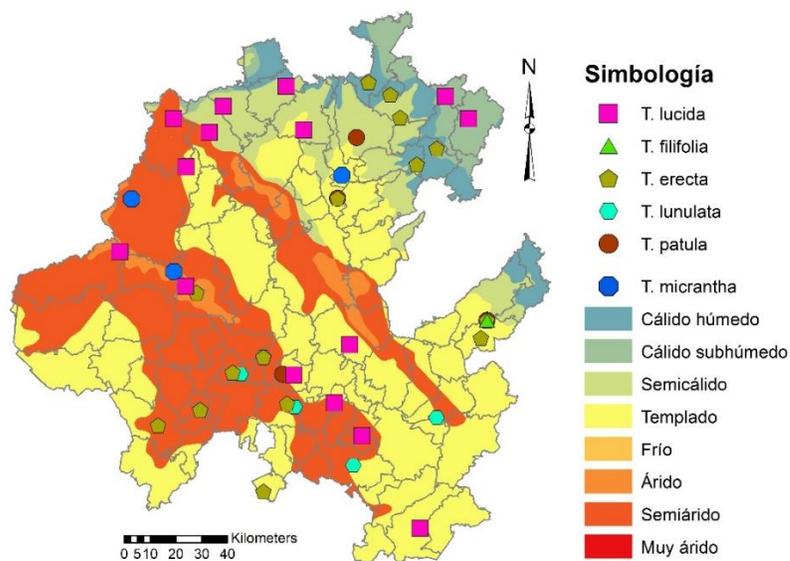


Figura 7. Mapa de la localización geográfica de los puntos de colecta de las especies de *Tagetes* y climas del Estado de Hidalgo. Escala 1: 250 000.

La especie *T. erecta* se encontró en todos los tipos de clima; *T. lucida* ausente en el clima cálido húmedo y el clima muy árido; *T. filifolia* prevaleció en climas cálido subhúmedo, semicálido, templado y frío, mientras que *T. micrantha* en semicálido y templado; *T. lunulata* en el templado, árido y semiárido; *T. patula* se asoció con climas semicálidos, templados, áridos y semiáridos (Cuadro 6).

Cuadro 6. Especies de *Tagetes* en distintos climas del Estado de Hidalgo.

Clima	Especie					
	<i>T. erecta</i>	<i>T. filifolia</i>	<i>T. lucida</i>	<i>T. lunulata</i>	<i>T. micrantha</i>	<i>T. patula</i>
Cálido húmedo	X					
Cálido subhúmedo	X	X	X			
Semicálido	X	X	X		X	X
Templado	X	X	X	X	X	X
Frío	X	X	X			
Árido	X		X	X		X
Semiárido	X		X	X		X
Muy Árido	X					

3.5.2 Identificación de compuestos del aceite esencial

De todas las poblaciones se obtuvo aceite esencial y se identificaron sus compuestos químicos (Cuadros 7 a 11). En las 18 poblaciones de *T. erecta* (Figura 7) se detectaron 24 compuestos, tres mayoritarios (β -ocimeno, terpinoleno y verbenona) y 21 en menor proporción (Cuadro 7); 13 de las poblaciones contenían β -ocimeno (21.22 a 44.10 %), en 7 se encontró terpinoleno (15.25 a 43.28 %) y en 10 verbenona (16.58 a 48.21 %), estos compuestos han sido reportados para esta especie (Singh *et al.*, 2003; Sefidkon *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2006). El β -ocimeno es un terpeno común en especies de *Tagetes* (Gil *et al.*, 2000), se caracteriza por su olor agradable, utilizado en perfumería y con propiedades de defensa en plantas debido a su actividad antifúngica (Fahlbusch *et al.*, 2003). El terpinoleno es otro terpeno común en la composición del aceite esencial de *T. erecta* (Sefidkon *et al.*, 2004) y de otras especies como *T. subulata* y *T. patula* (Armas *et al.*, 2012); se le atribuyen

propiedades antimicrobianas y antifúngicas (Carson *et al.*, 1995; Dorman *et al.*, 2000; Hernández *et al.*, 2003). La verbenona pertenece al grupo de terpenos presente en el aceite esencial de *T. minuta* (Ramaroson *et al.*, 2009), *T. terniflora* y *T. zypaquirensis* (Zapata *et al.*, 2015) metabolito secundario utilizado como repelente contra un coleóptero que ataca coníferas (Gillete *et al.*, 2009).

Cuadro 7. Porcentaje de abundancia relativa del aceite esencial de poblaciones *in situ* de *T. erecta* del Estado de Hidalgo.

Compuesto	Población																		
	ERO	ERT																	
1. Sabineno		2.18	2.43	1.22	3.27						3.28		1.23	3.16		4.97		1.46	1.28
2. β -ocimeno	34.67	23.43	36.36	44.10	21.43	7.23	10.02	35.36	32.75	36.36	7.35		54.32		41.35	33.40	21.22	32.33	
3. Terpinoleno	6.03	17.32	5.41		35.25	6.21		15.25	3.22		43.28	31.57		34.32		7.31	19.18		
4. cis-p-Mentha-2,8-dien-1-ol	2.56		3.72	2.03	0.80		5.21		4.59	2.29		1.12	2.12		3.59		1.42		
5. Éster de vinilo del ácido sórbico	2.60	2.55				6.34		3.75		1.65		2.31	1.56	3.24	2.29	2.67	3.24	1.80	
6. 1-butil-2-etil-ciclopropeno		2.55	0.75	2.22		4.03				6.32	3.64				7.32				
7. Terioen-4-ol	1.36				1.07		6.34						2.49	3.28		2.98	9.30	2.68	2.37
8. Timol	6.11		6.41			4.34		0.83	6.23	6.23		2.02			6.12		8.11		
9. Estragol	5.97		5.04	4.48				1.95	1.46		1.95		4.49	2.16		5.14	3.27	3.28	
10. Verbenona	7.30	16.93	3.91	522	19.93	48.21	37.98	16.58	17.30		21.22	37.23		33.25		8.23	8.13	24.02	
11. Fenetil acetato		3.44				2.35		2.44			1.32		2.01	2.28					1.13
12. Isopiperitenona	4.49	2.76	4.24	7.95			2.29	1.76	8.31	5.32		1.04	3.32	2.39		5.62	2.11		
13. Anetol	4.07		3.65		0.82				1.18	2.27			5.64		5.62		2.09	1.65	
14. Linalool	1.16	6.49				3.23	2.36	7.32				7.22			4.24				1.32
15. Xileno	7.02		7.25		2.75				6.23	8.53		2.12	6.28		6.91	9.09	7.34	7.25	
16. Guaieno						2.45	1.28						1.28	0.78		3.31	2.32	3.18	
17. p-Menta-1(7),8(10)-dien-9-ol	5.59		8.04	9.02		7.22	8.21	7.35		11.43		9.22		8.28					
18. Cariofileno		8.99					6.43		2.58	3.31	7.99		3.17	7.99	7.67		0.45	0.67	
19. β -Farneseno		1.64			0.65	3.13					0.64	3.24				1.28		0.52	
20. β -Cuvebeno	5.32	2.58	4.55	7.22	3.22		1.22	3.23	3.81	3.22			2.55		2.19		3.22		
21. γ -Elemeno	3.32	2.88	2.99	6.73	2.18		8.32		1.26	3.01		2.39				3.56	6.09	2.99	
22. Óxido de cariofileno					3.83	1.12							3.26	2.03		4.81	1.05	7.28	
23. Fitol							7.23		4.18	0.61	0.66	1.21		1.25			3.21	6.34	
24. β -Vatireno	1.12		0.47	3.01				0.50	1.98	0.47	0.50				2.87	2.29	2.01		

Para el caso de *T. filifolia* se identificaron 13 compuestos totales en las cuatro poblaciones consideradas (Cuadro 8) y dos fueron mayoritarias: estragol, 28.36 a 45.16 %; y anetol, 31.31 a 47.31 %, los cuales solamente anetol y estragol se han registrado previamente como mayoritarios para esta especie (De Feo *et al.*, 1998; Serrato *et al.*, 2008). Ambos fenilpropanoides tienen efecto biológico contra diversas especies de insectos (Koul, 2008) y propiedades antimicrobianas (Zygadlo *et al.*, 1993 y 1994). En *T. micrantha* se detectaron 12 compuestos en las dos poblaciones analizadas, pero sólo dos de ellos resultaron mayoritarios: limoneno (23.4 y 33.1 %) y β -cuvabeno (35 y 39 %) (Cuadro 6). Comúnmente el aceite esencial de *T. micrantha* principalmente contiene el fenilpropanoide estragol en abundancia (dato no publicado), pero en las poblaciones de Hidalgo este compuesto sólo se presentó en una población, mientras que en la otra estuvo presente el fenilpropanoide anetol; estos compuestos se presentaron en ambas poblaciones sólo como trazas (Cuadro 8). Limoneno y β -cuvabeno son terpenos que no se habían reportado previamente para esta especie, lo cual puede tener un gran significado para fitoquímica de *Tagetes*.

Cuadro 8. Porcentaje de abundancia relativa de compuestos en el aceite esencial de algunas poblaciones *in situ* de *T. filifolia* y *T. micrantha* del Estado de Hidalgo.

Compuesto	Poblaciones	<i>T. filifolia</i>				<i>T. micrantha</i>	
		FL01	FL02	FL03	FL04	MC01	MC02
α -Pinoeno		2.01		4.72		12.53	7.24
β -Felandreno		7.99	13.38	6.33	3.16	11.70	10.09
Limoneno		6.16	8.46		2.24	23.45	33.15
Terpinen-4-ol			0.99		1.16	0.89	
Estragol		45.16	38.48	28.36	34.22		0.80
Anetol		32.01	31.31	47.31	38.05	0.40	
2-metil-5-(1-metilvinil-8-metilbicyclo[5.3.0]decano			0.52			1.97	5.22
Cariofileno		1.33		2.16	4.28	5.86	
β -Cuvabeno		1.44			4.22	39.65	35.48
γ -Elemeno		1.56	0.34		3.28	2.26	
Spatulenol		0.84		3.22	4.21		0.48
Óxido de cariofileno		0.89		3.02	1.13		
β -Vatireno			2.87	1.18			3.12

En las 15 poblaciones de *T. lucida* (Cuadro 9) se encontraron 24 compuestos, 8 mayoritarios y 16 en menor proporción; entre los mayoritarios destacaron β -ocimeno (10.5 a 25.1 %), acetato de geranilo (25.2 a 41.3 %), estragol (22.5 a 48.8 %), metil eugenol (52.2 %) y anetol (17.75 a 35.8 %). Comúnmente el estragol, metil eugenol y anetol son abundantes en esta especie (Bicchi *et al.*, 1997).

Cuadro 9. Porcentaje de abundancia relativa de compuestos en el aceite esencial de algunas poblaciones *in situ* de *T. lucida* del Estado de Hidalgo.

Compuesto	Población														
	LC01	LC02	LC03	LC04	LC05	LC06	LC07	LC08	LC09	LC10	LC11	LC12	LC13	LC14	LC15
β -Pinoeno	4.05	1.07				1.04	1.39	1.12	3.7		2.18	0.86		1.65	0.59
β -Mirreno	6.13	3.28	3.93	6.28	2.16	2.25		1.29		4.94		3.32	5.59		9.97
Cis-3-hexenol						1.36					2.51		1.04	1.3	1.01
Ocimeno	1.49	1.22			1.61			1.38	6.29		1.27				1.86
β -Ocimeno	25.13	1.38	0.74	10.56		22.47	16.35	24.3	23.99	10.32	11.52	24.91	21.29	19.57	16.89
Linalool	2.03			3.54			1.59					0.84	1.16	1.47	1.19
Acetato de geranilo	26.08	11.79		41.28	9.36	32.46	25.18	27.16	8.38			31.72	33.11	23.84	25.92
Estragol		22.56	48.84		23.67				10.45	8.46	25.69	1.8			
Humuleno	2.34	1.76		2.86		2.16			12.89		2.19		2.14	2.47	3.37
Metil eugenol	2.56				2.19	0.68		3.38		52.21		7.27		3.8	
4-Metoxibenzaldehido			1.29						9.53		1.45		2.26		
Anetol		23.61	35.78		27.9				18.95	6.48	17.75	1.53			
Isoeugenol metil éter			2.26							4.36					
Cariofileno	3.32	5.34		4.32	3.65	5.74	12.64	6.36			8.15	5.55	6.11	7.88	5.95
α -Cariofileno						0.71		2.59			2.1			1.82	1.64
Óxido de cariofileno		3.24	1.45	2.68	1.89			4.64						1.72	
γ -Elemeno		5.67		4.85		4.93	4.93				4.25	2.4	1.27		
β -Farneseno				2.68				1.72					1.94	2.61	3.91
Nerolidol	6.03	4.61		9.17	11.34	6.64	10.64	12.52			7.2	8.65	7.68	9.18	9.93
Germacreno					9.51				1.91		5.78	4.8			8.16
β -Cubebeno	9.71	7.53		7.12			6.13	7.32	0.33	5.76	0.37		6.99	5.68	
Elixeno	3.88				1.78	1.07							4.56	5.82	5.32
δ -Cadineno					1.27		1.58				2.09	3.14	1.35	1.35	2.25
T-Cadinol		1.26			1.52	2.31	1.58	2.71		2.13				2.44	1.37

El β -ocimeno, con alto porcentaje de abundancia (25.13 %) en este estudio, ya se ha reportado en otras poblaciones (0.2 a 8.6 %) (Ciccio, 2004; Céspedes *et al.*, 2006); este compuesto tiene efecto antimicótico (Fahlbusch *et al.*, 2003). El acetato de geranilo se ha reportado en plantas como *Daucus carota* (Valente *et al.*, 2015) y *Thapsia minor* (Goncalves *et al.*, 2012), pero no en *Tagetes* (Tucker y Maciarelo, 1996; Kyarimpa *et al.*, 2014); este compuesto, posee propiedades bactericidas, antifúngicas y citotóxicas (Goncalves *et al.*, 2012; Pinto *et al.*, 2013; Valente *et al.*, 2015). La presencia de β -ocimeno y acetato de geranilo como mayoritarios en *T. lucida* es otro valioso hallazgo para la fitoquímica de *Tagetes*.

Por otra parte, los componentes nerolidol, cariofileno y humuleno a pesar de ser minoritarios para este estudio, poseen actividad biológica hacia diversos organismos: el nerolidol es un sesquiterpeno que en dosis bajas (0,5–2 %) presenta efecto fungicida hacia el hongo *Microsporum gypseum* (Lee *et al.*, 2007) además de ser utilizado en la industria farmacéutica (Arruda *et al.*, 2005); por su parte, al cariofileno, se le atribuye actividad antimicrobiana (Hernández *et al.*, 2003) y antibacteriana (Romagnoli *et al.*, 2005; Rondon *et al.*, 2006) sobre algunos patógenos como *Staphylococcus aureus* (Coutinho *et al.*, 2015); La actividad de humuleno ha sido reportada bactericida frente a *E. coli* (De Souza *et al.*, 2011), no obstante tiene importantes aplicaciones en el campo de la medicina al utilizarse en tratamientos contra la ansiedad, insomnio y sedante (Franco *et al.*, 2012).

En *T. lunulata* se detectaron 17 compuestos, tres mayoritarios y 14 menores en sus nueve poblaciones (Cuadro 10); los mayoritarios fueron α -pineno (14.4 a 24.1 %), β -felandreno (14.5 a 23.1 %) y limoneno (31.3 a 55.2 %). La composición del aceite esencial de esta especie no se había reportado previamente. El α -pineno se ha encontrado en *T. lacera* como minoritario (Díaz *et al.*, 2012), se le atribuyen propiedades antimicrobianas contra *Artemia salina*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella thyphi* (Senatore *et al.*, 2004; De Feo *et al.*, 2005).

Cuadro 10. Composición química del aceite esencial de las poblaciones de *T. lunulata* del Estado de Hidalgo.

Compuesto	Población								
	LN01	LN02	LN03	LN04	LN05	LN06	LN07	LN08	LN09
α -Pino	14.39	11.28	19.92	12.16	18.44	16.42	24.14		
β -Felandreno	14.56	22.14		15.51		18.91		21.19	23.11
Limoneno	31.35	40.54	38.16	38.01	42.21	36.42	37.03	52.13	55.17
α -Terpineno		1.18	4.43		5.82		6.21	1.03	
Terpinoleno			4.64	1.18		2.01	3.19	2.22	
2,6-Dimetil-1-nonen-3-yn-5-ol	5.17		3.51		2.17		2.23		1.07
Terpinen-4-ol	10.51	4.67	10.03	9.83	1.32	12.21		14.88	9.07
Estragol	4.23	3.13	2.18	3.24	4.21		3.01		
Verbenona		5.63		4.17	3.28	1.17	3.11	3.18	2.16
Metil éster de ácido 4-decanoico	2.63		2.25	1.16	2.21	2.24			1.97
β -Maaleno		2.23	1.19			1.16	3.23	2.11	1.27
Cariofileno	3.34				3.26	1.32	4.17		
β -Cuvebeno	1.96	1.32	2.16				3.31	1.17	2.16
γ -Elemeno	2.75	2.37		4.21	6.21	2.19			2.21
σ -Cadinene			2.23	1.62			2.17	1.21	
Spatulenol	5.21	3.75	8.16	6.16	9.12	3.25	4.22		
α -Cadinol	1.36			1.02		1.18	2.16		1.23

El β -felandreno se ha descrito como componente mayoritario en *T. lucida* (Vallejo y Nájera, 2016) y con actividad insecticida contra gorgojo de maíz (*Sitophilus zeamais*). Al limoneno se le identifica como componente mayoritario en *T. erecta*, *T. patula* y *T. minuta* (Hethelyi *et al.*, 1986; Scrivanti *et al.*, 2003); con efectos insecticida y antimicótico (Karr y Coats, 1988; Mazzanti *et al.*, 1998). Por otra parte, el terpinen-4-ol ha sido reportado como el componente principal del árbol del té (*Melaleuca alternifolia*) presentando actividad bactericida y fungicida contra numerosos organismos como lo son *Bacillus typhosus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* y *Proteus vulgaris* (Brophy *et al.*, 1989)

En el perfil de aceite esencial de las cinco poblaciones de *T. patula* (Cuadro 11), se distinguieron 18 metabolitos secundarios, pero sólo cinco mayoritarios: α -pino (14.1 a 25.4 %), terpinoleno (13.3 a 23.2 %), verbenona (18.4 a 24.4 %), cariofileno (13.2 a 27.3 %) y β -farneseno (15.8 %). Segovia *et al.* (2010)

consignan al α -pineno y la verbenona, ambos terpenos, como componentes del aceite esencial de *T. elliptica* con actividad antifúngica y antibacteriana, pero con mayor efecto biocida contra *Staphylococcus aureus*.

Cuadro 11. Porcentaje de abundancia relativa de aceite esencial de algunas poblaciones de *T. patula* del Estado de Hidalgo.

Compuesto	Población				
	PT01	PT02	PT03	PT04	PT05
α -Pineno	13.85	23.22	14.14	7.21	25.42
3,6,6-trimetil-2-norpinanol	2.57		2.78		1.1
Terpinoleno	16.00	14.02	16.52	23.22	13.33
Alocimeno	3.32	6.29	3.55		7.16
6-metil-6-hepta-4-yn-3-ol	1.36		1.41	3.42	
2-(2-propenil)-biciclo[2.2.1]heptano	2.06	1.89			
Estragol	2.40		3.51		1.17
Verbenona	18.42	9.76	3.19	24.47	10.21
Fentenil hexanoato	2.04	5.74	2.32		3.12
Piperitona	1.36		6.80		
Farneseno	3.43	1.96		4.38	
Trans-Jasmona		4.25	3.45		6.74
Cariofileno	24.01	15.42	17.26	27.31	13.22
β -Farneseno			15.81	3.25	
β -Cuvebeno	1.94		1.58		3.02
Viridiflorina	1.97	9.38			10.01
β -Bisaboleno	4.14	3.43	4.03	3.26	
Óxido de cariofileno		3.40	3.58	3.18	4.31

El terpinoleno y el cariofileno, también terpenos, presentes en las cinco poblaciones estudiadas, ya se les había reportado para esta especie y con propiedades antibacterianas (Romagnoli *et al.*, 2005; Rondon *et al.*, 2006). El β -farneseno es un sesquiterpeno referido como componente minoritario en *T. erecta* con propiedades antibacteriales y fungicidas (Siva, 2014); este compuesto únicamente estuvo presente como mayoritario en una población, por lo que su presencia se podría relacionar con el ambiente o con la variabilidad genética de la especie. Sin embargo, la viridiflorina, componente en menor

abundancia para la mayoría de las poblaciones de esta especie es un alcaloide que ha sido reportado anteriormente para la familia Asteraceae pero del cual poco se conoce sobre su actividad biológica (Edgar *et al.*, 2002; EFSA, 2007).

3.5.3 Comparación interespecífica de compuestos mayoritarios

En general, se identificaron 13 componentes mayoritarios en las poblaciones estudiadas y compuestos propios de cada especie (Cuadro 12); por ejemplo, el acetato de geranilo y metil eugenol solamente se presentó en *T. lucida*, el cariofileno y β -farneseno en *T. patula*, el β -cuvabeno en *T. micrantha* y β -felandreno en *T. lunulata*.

Cuadro 12. Compuestos mayoritarios en los aceites de las poblaciones *in situ* de *Tagetes* del Estado de Hidalgo.

Compuesto		Especie				
		<i>T. erecta</i>	<i>T. filifolia</i>	<i>T. lucida</i>	<i>T. lunulata</i>	<i>T. patula</i>
Acetato de Geranilo	(Monoterpeno)			X		
Anetol	(Fenilpropanoide)		X	X		
Cariofileno	(Sesquiterpeno)					X
Estragol	(Fenilpropanoide)		X	X		
Limoneno	(Terpeno)		X		X	
Metil eugenol	(Fenilpropanoide)			X		
Terpinoleno	(Terpeno)	X				X
Verbenona	(Terpeno)	X				X
α -pineno	(Terpeno)				X	X
β -cuvabeno	(Terpeno)		X			
β -farneseno	(Sesquiterpeno)					X
β -felandreno	(Terpeno)				X	
β -ocimeno	(Monoterpeno)	X		X		
Nerolidol	(Sesquiterpeno)			X		
Humuleno	(Sesquiterpeno)			X		
Viridiflorina	(Fenilpropanoide)					X

También se encontraron moléculas comunes en al menos dos especies, fue el caso del anetol y estragol presentes en *T. filifolia* y *T. lucida*; limoneno en *T. micrantha* y *T. lunulata*; terpinoleno y verbenona en *T. erecta* y *T. patula*; α -pineno en *T. lunulata* y *T. patula*, y β -ocimeno en *T. erecta* y *T. lucida*. Esta diversidad de metabolitos secundarios, algunos de ellos como el limoneno y β -cuvebano en *T. micrantha*, el acetato de geranilo en *T. lucida* y el perfil del aceite esencial de *T. lunulata* que por primera vez se registran, conforma una referencia importante para avanzar en el conocimiento de la fitoquímica de *Tagetes* de México, y especialmente un referente para plantear trabajos sobre biocontrol de plagas y enfermedades.

3.5.4 Comparación interpoblacional de compuestos mayoritarios y ambiente.

La variabilidad del ambiente (Cuadros 5 y 6) y los componentes de los aceites esenciales obtenidos de poblaciones de *Tagetes* del Estado de Hidalgo (Cuadros 7 a 11), permitieron comparar las condiciones de clima y altitud con la presencia o ausencia de estos compuestos en las poblaciones de cada especie (Cuadro 13) y como resultado de ello se identificaron grupos distintivos.

Respecto a las poblaciones de *T. lucida*, las asociaciones de estas respecto a sus componentes mayoritarios permitieron la formación de nueve grupos; en los grupos A, B, C, D y E, la presencia de estragol y anetol estuvo asociada con el clima templado en altitudes de 1700 a 2450 y con presencia de otros compuestos no tan abundantes como el nerolidol, humuleno, acetato de geranilo y β -ocimeno, la asociación de éstos últimos cuatro compuestos con el ambiente específico es necesaria, ya que los dos fenilpropanoides arriba referidos, cuya función es la de amortiguar la cristalización del agua, se presentan en bajas temperaturas (Zárate, 2016), en tanto que los lugares que corresponden a los cuatro compuestos monoterpénicos referidos, posiblemente se ubiquen en sitios donde incide algún nivel alto de calor. El grupo F, ubicado a 1454 msnm, con tendencia de más calor y ubicable en zona de transición altitudinal, se presenta el fenilpropanoide metil

eugenol y el monoterpeno β -ocimeno, muy abundantes, como si se tratara de una zona de amortiguamiento climático. Los grupos G, H e I destacaron por la presencia abundante de acetato de geranilo y de β -ocimeno, además de que la mayoría de los puntos de muestreo, de menor altitud, son más secos y cálidos.

La aparición de otros metabolitos secundarios como nerolidol y cariofileno en los grupos H e I, en lugares de menor altitud, también ameritan un mejor análisis del ambiente. En general, sobresale la tendencia de que en ambientes templados el aceite de *T. lucida* contiene fenilpropanoides, pero en climas calurosos, se presentan los monoterpenos acetato de geranilo y β -ocimeno. Sin embargo, casos como la muestra LC01 ubicada a 2450 msnm contiene en abundancia acetato de geranilo y β -ocimeno, cuando lo esperado sería un mayor contenido de fenilpropanoides, reivindicando con esto la necesidad de un análisis microambiental. La presencia de los fenilpropanoides y monoterpenos asociados con climas templados o cálidos también podría estar relacionada con la presencia de determinados organismos como hongos, insectos, ácaros, bacterias y nematodos en esos hábitats.

Para *T. lunulata* se formaron tres grupos, en el grupo J se asociaron las poblaciones que tiene al α -pineno, β -felandreno y limoneno que corresponden a altitudes de entre 1322 y 1961 msnm con climas templado y semiárido, muy parecido al grupo K en cuanto a condiciones ambientales, excepto porque este grupo no presenta al β -felandreno dentro de sus compuestos mayoritarios. No obstante, el grupo L presenta β -felandreno y limoneno pero en altitudes más elevadas, 2008 a 2467 msnm de clima árido. La probable variación de compuestos químicos y las variantes climático-altitudinales requiere de un nivel preciso del factor climático.

			<i>T. erecta</i>				
			ocimeno	terpinoleno	verbenona		
N (ER01, ER03, ER0 ER10, ER1 ER15, ER16)	T, CH, A, SA	1961, 956, 2818, 959, 1652, 2273, 2073	X				
Ñ (ER17)	SA	2083	X	X			
O (ER06, ER07)	F, CH	1700, 225					X
P (ER09, ER18)	SC, CH	2324, 665	X				X
Q (ER11, ER12, ER14)	CH, SA, SC	187, 1873, 882		X			X
R (ER02, ER05, ER08)	CH, CS, SC	275, 468, 321	X		X		X
			<i>T. patula</i>				
			α -pineno	terpinoleno	verbenona	cariofileno	farneseno
S (PT01)	T	2029	X	X	X	X	
T (PT02, PT05)	SC	1648, 1537	X	X	X		
U (PT03)	T	1959	X	X	X	X	
V (PT04)	SA	1873		X	X		X

Simbología clima: CH (cálido húmedo); CS (cálido subhúmedo); SC (semicálido); T (templado); F (frío); A (árido); SA (semiárido); MA (muy árido).

Con respecto a las especies *T. micrantha* y *T. filifolia*, poseen los mismos compuestos pero en diferente abundancia. Por ejemplo, en el grupo LL, conformado por *T. filifolia*, en ambientes de climas semicálidos y altitudes medias entre 882 y 1690 msnm, se presenta estragol y anetol como componentes principales y como minoritarios limoneno y β -cuvabeno; en cambio, el grupo M integrado por *T. micrantha*, en hábitats de clima templado y en altitudes de 959 a 2546 msnm, los compuestos mayoritarios son los monoterpenos limoneno y β -cuvabeno, pero estragol y anetol (fenilpropanos) son minoritarios; es decir, que

en clima templado las moléculas corresponden a fenilpropanoides, pero hacia climas más cálidos se producen monoterpenos, fenómeno que ocurre en estas diferentes especies, no como en *T. lucida* en la que el fenómeno antes descrito ocurre a nivel de poblaciones.

En *T. erecta* se detectaron seis grupos con diferente presencia de los compuestos mayoritarios ocimeno, terpinoleno y verbenona; el grupo R posee estos compuestos y se distribuye en climas cálido subhúmedo y semicálido a altitudes bajas de 275 a 468 msnm que corresponden al sotavento de la Sierra Madre Oriental conocida como la Huasteca Hidalguense; en esta zona, pero a mayor altura, como en Yahualica (ER18, 665 msnm), solo aparecen ocimeno y verbenona. En altitudes más elevadas y distintos climas, que básicamente corresponden al Eje Neovolcánico, los grupos restantes (M, N, O, P, Q) únicamente presentaron uno o dos de los compuestos mayoritarios. Estos resultados sugieren que el ambiente juega un importante papel en la síntesis de metabolitos secundarios (Whittaker *et al.*, 1973) y quizá de idea de la amplia variabilidad de compuestos identificados en diferentes estudios sobre el perfil de aceites de *T. erecta*.

En la especie *T. patula* se reconocieron cuatro grupos que tienen en común terpinoleno y los demás compuestos como α -pineno, verbenona, cariofileno y farneseno van variando en un ambiente de climas templado, semicálido y semiárido con altitudes de 1537 hasta los 2029 msnm. El grupo T, asociado con la región Huasteca, presentó α -pineno, terpinoleno y verbenona como elementos comunes en sus puntos de colecta, no obstante, el resto de los puntos de colecta (S, U y V) que pertenecen al Altiplano mostraron, además, la presencia de cariofileno y farneseno. En esta especie hay amplia variabilidad morfológica asociada con procesos de selección bajo domesticación y de amplia migración por su uso en Días de Muertos. Estas variantes químicas y altitudinales-climáticas deben enmarcarse en un proceso de adaptación evolutiva que les ha permitido a esas poblaciones persistir en las condiciones de su hábitat (Whittaker *et al.*, 1973).

Tanto la ausencia o presencia y la abundancia de determinados metabolitos secundarios podrían conferirle a las poblaciones de plantas cierto grado de protección contra factores adversos como temperaturas extremas, escases de agua o contra depredadores (Root, 1967). Asimismo, la mayoría de las adaptaciones que sufren las plantas pueden ser inducidas tanto por el ambiente como debidas a variaciones genéticamente determinadas (Daubenmire, 1988); por ejemplo, si plantas genéticamente idénticas crecen en regiones diferentes, podrían desarrollar características según el hábitat, proceso traducido en la presencia o ausencia de metabolitos secundarios y su abundancia (Falconer y Mackay, 1996). Por otra parte, la expresión específica de las poblaciones de las distintas especies y los diversos hábitats donde se desarrollan, definen un perfil de aceites particular, lo cual sería una ventaja en la lógica del control de calidad en la producción local de materia prima para elaborar bioplaguicidas.

3.6 CONCLUSIONES

Las poblaciones de *Tagetes* estudiadas se distribuyen en una amplia gama de condiciones edafoclimáticas presentando diversidad en el perfil de aceites esenciales dentro y entre especies. Entre especies, el número de compuestos mayoritarios fue diferente, algunas de ellas tuvieron compuestos comunes y también los hubo distintivos. En *T. erecta*, *T. lucida* y *T. lunulata* la variabilidad química a nivel interpoblacional fue notoria y asociada con los ambientes donde están establecidas. En *T. lucida*, *T. lunulata* y *T. micrantha* se identificaron compuestos que no habían sido reportados previamente en la literatura.

3.7 BIBLIOGRAFÍA

- Armas, K., Rojas, J., Rojas, L., & Morales, A. (2012). Comparative study of the chemical composition of essential oils of five *Tagetes* species collected in Venezuela. *Natural Product Communications*, 7(9), 1225-1226.
- Arruda, D. C., D'Alexandri, F. L., Katzin, A. M., & Uliana, S. R. (2005). Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(5), 1679-1687.
- Bernath, J. (2009). Aromatic plants. 329-352. In: Fuleky G. (ed.). *Cultivated Plants, Primarily as Food Sources. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS). Volume 2. Paris, France.*
- Bicchi, C., Fresia, M., Rubiolo, P., Monti, D., Franz, C. & Goehler, I. (1997). Constituents of *Tagetes lucida* Cav. ssp. *lucida* essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*. 12(1):47-52.
- Brophy, J. J., Davies, N. W., Southwell, I. A., Stiff, I. A., & Williams, L. R. (1989). Gas chromatographic quality control for oil of *Melaleuca* terpinen-4-ol type (Australian tea tree). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(5), 1330-1335.
- Calderón, R. G., & Rzedowski J. (2001). *Flora Fanerogámica del Valle de México*. 2a. ed. Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán. 1406 p.
- Carson, C. F., & Riley, T. V. (1995). Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(3), 264-269.
- Céspedes, C. L., Avila, J. G., Martínez, A., Serrato, B., Calderón, J. C. & Salgado, R. (2006). Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(10), 3521-3527.

- Ciccio, J. F. (2004). A source of almost pure methyl chavicol: volatile oil from the aerial parts of *Tagetes lucida* (Asteraceae) cultivated in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 52(4), 853-857.
- Coutinho, P., De Freitas, B., de Alencar, J., & Cosmo, M. J. (2015). Atividade antimicrobiana in vitro de Geraniol e Cariofileno sobre *Staphylococcus aureus*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 20(1), 98-105.
- Daubenmire, R. F. (1979). Ecología vegetal: Tratado de Autoecología de Plantas (No. 581.5 D235e). México, MX: Limusa, 1988. 243 p.
- De Feo, V., Della Porta, G., Urrunaga Soria, E., Urrunaga Soria, R., & Senatore, F. (1998). Composition of the essential oil of *Tagetes filifolia* Lag. *Flavour and Fragrance Journal*, 13(3), 145-147.
- De Feo, V., Urrunaga Soria, E., Urrunaga Soria, R., & Pizza, C. (2005). Composition and *in vitro* toxicity of the essential oil of *Tagetes terniflora* HBK.(Asteraceae). *Flavour and Fragrance Journal*, 20(1), 89-92.
- De Souza, L., Damé, L. F., Hörnke, G., Ziemann, M. A., Alves, M. R., & Araújo, M. C. (2011). Evaluación de la actividad bactericida de aceites esenciales de hojas de guayabo, pitango y arazá. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(4), 324-330.
- Díaz, F., Serrato, M. A., De La Cruz, J., Sánchez, M. G., & López, V. (2013). Compuestos mayoritarios del aceite esencial en órganos de una población de *Tagetes coronopifolia* Willd. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(4), 405-411.
- Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-316.
- Edgar, J. A., Roeder, E., & Molyneux, R. J. (2002). Honey from plants containing pyrrolizidine alkaloids: a potential threat to health. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(10), 2719-2730.

- EFSA, European Food Safety Authority. (2007). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission related to Pyrrolizidine Alkaloids as undesirable substances in Animal Feeds. *The EFSA Journal*, 447:1-51.
- Fahlbusch, K. G., Hammerschmidt, F. J., Panten, J., Pickenhagen, W., Schatkowski, D., Bauer, K., & Surburg, H. (2003). Flavors and Fragrances. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.
- Falconer, D. S., & Mackay, T. F. C. (1996). Introduction to Quantitative Genetics. 4th ed. Longman Group Ltd: Essex, UK, 464.
- Franco, L., Sánchez, C., Bravo, R., Rodriguez, A., Barriga, C., & Juárez, J. (2012). The sedative effects of hops (*Humulus lupulus*), a component of beer, on the activity/rest rhythm. *Acta Physiologica Hungarica*, 99(2), 133-139.
- Gil, A., Ghersa, C. M., & Leicach, S. (2000). Essential oil yield and composition of *Tagetes minuta* accessions from Argentina. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(3), 261-274.
- Gillette, N. E., Erbilgin, N., Webster, J. N., Pederson, L., Mori, S. R., Stein, J. D., & Wood, D. L. (2009). Aerially applied verbenone-releasing laminated flakes protect *Pinus contorta* stands from attack by *Dendroctonus ponderosae* in California and Idaho. *Forest Ecology and Management*, 257(5), 1405-1412.
- Goncalves, M. J., Cruz, M. T., Tavares, A. C., Cavaleiro, C., Lopes, M. C., Canhoto, J., & Salgueiro, L. (2012). Composition and biological activity of the essential oil from *Thapsia minor*, a new source of geranyl acetate. *Industrial Crops and Products*, 35(1), 166-171.
- Greathead, H. (2003). Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proc. Nutr. Soc.* 62: 279-290.
- Haslam, E. (1986). Secondary metabolism—fact and fiction. *Nat. Prod. Rep.*, 3, 217-249.

- Hernández, L., Rodríguez, M., García, D., & Pino, J. (2003). Actividad antidermatofítica *in vitro* de aceites esenciales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 8(2), 10-15.
- Hethelyi, E., Danos, B., Tetenyi, P., & Koczka, I. (1986). GC-MS analysis of the essential oils of four tagetes species and the anti-microbial activity of *Tagetes minuta*. *Flavour and Fragrance Journal*, 1(4-5), 169-173.
- INEGI, 1992. Síntesis geográfica del estado de Hidalgo. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Aguascalientes. 134 p.
- INEGI, 2007. Anuario estadístico. Hidalgo. Tomos I, II. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Aguascalientes 1156 p.
- Karr, L. L., & Coats, J. R. (1988). Insecticidal properties of d-limonene. *Journal of Pesticide Science*, 13(2), 287-290.
- Koul, O., Walia S., & Dhaliwal G. S. (2008). Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopestic. Int.* 4: 63-84.
- Krishna, A., Mallavarapu G. R., Kumar S., & Ramesh S. (2002.) Volatile oil constituents of the capitula, leaves and shoots of *Tagetes patula* L. *J. Essent. Oil Res.* 14(6): 433-436.
- Kyarimpa, C. M., Böhmendorfer, S., Wasswa, J., Kiremire, B. T., Ndiege, I. O., & Kabasa, J. D. (2014). Essential oil and composition of *Tagetes minuta* from Uganda. Larvicidal activity on *Anopheles gambiae*. *Industrial Crops and Products*, 62, 400-404.
- Lee, S. J., Han, J. I., Lee, G. S., Park, M. J., Choi, I. G., Na, K. J., & Jeung, E. B. (2007). Antifungal effect of eugenol and nerolidol against *Microsporum gypseum* in a guinea pig model. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(1), 184-188.
- Maestri, D., Zygadlo, J., Grosso, N., Abburra, R., & Guzmán, C. (1991). Composición química del aceite esencial de poblaciones argentinas de *Tagetes filifolia* Lag. (Compositae). *Anuales de Biología*, 17 (6): 133-137.

- Marotti, M., Piccaglia R., Biavati B. & Marotti I. (2004). Characterization and yield evaluation of essential oils from different *Tagetes* species. *Journal of Essential Oil Research*, 16 (5): 440-444.
- Pérez, R., Hernández, H., & Hernández, S. (2006). Antioxidant activity of *Tagetes erecta* essential oil. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 51(2), 883-886.
- Pinto, E., Gonçalves, M. J., Hrimpeng, K., Pinto, J., Vaz, S., Vale-, L. A., & Salgueiro, L. (2013). Antifungal activity of the essential oil of *Thymus villosus* subsp. lusitanicus against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Industrial Crops and Products*, 51: 93-99.
- Ramaroson, B., Ramanoelina, P. A., Rasoarahona, J. R., & Gaydou, E. M. (2009). Chemical compositions of aerial part of *Tagetes minuta* L. chemotype essential oils from Madagascar. *Journal of Essential Oil Research*, 21(5): 390-392.
- Romagnoli, C., Bruni, R., Andreotti, E., Rai, M. K., Vicentini, C. B., & Mares, D. (2005). Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitula from wild Indian *Tagetes patula* L. *Protoplasma*, 225(1-2), 57-65.
- Rondon, M., Velasco, J., Hernandez, J., Pecheneda, M., Rojas, J., Morales, A. & Diaz, T. (2006). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) collected from the Venezuela Andes. *Revista Latinoamericana de Química*, 34(1/3), 32.
- Root, R. B. (1967). The niche exploitation pattern of the blue-gray gnatcatcher. *Ecological Monographs*, 37(4), 317-350.
- Rzedowski, J. (1996). Análisis preliminar de la flora vascular de los bosques mesófilos de montaña de México. *Acta Botánica Mexicana*, (35), 25-44.
- Santana, M. R. A., Gutiérrez, D. A. N., & Sánchez, J. J. M. (2015). Municipios de la Región otomí tepehua, Hidalgo, México. *Sistemas Agroforestales*, 405 p.

- Scrivanti, L. R., Zunino, M. P., & Zygadlo, J. A. (2003). *Tagetes minuta* and *Schinus areira* essential oils as allelopathic agents. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(6), 563-572.
- Sefidkon, F., Salehyar, S., Mirza, M., & Dabiri, M. (2004). The essential oil of *Tagetes erecta* L. occurring in Iran. *Flavour and Fragrance Journal*, 19(6), 579-581.
- Segovia, I. K., de la Cruz, L. L. S., Castro, A. J., Suárez, S., & Ruiz, J. R. (2010). Composición química del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith "chincho" y actividades antioxidante, antibacteriana y antifúngica. *Ciencia e Investigación*, 13(2), 82-87.
- Senatore, F., Napolitano, F., Mohamed, M. A. H., Harris, P. J. C., Mnkeni, P. N. S., & Henderson, J. (2004). Antibacterial activity of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) essential oil with different chemical composition. *Flavour and Fragrance Journal*, 19(6), 574-578.
- Serrato, M. A. (2014) El Recurso Genético Cempoalxóchitl (*Tagetes* spp) de México (Diagnóstico). Universidad Autónoma Chapingo- SINAREFI-SNICS-SAGARPA. 182 p.
- Serrato, M. A., Díaz, F., & Barajas, J. S. (2008). Composición del aceite esencial en germoplasma de *Tagetes filifolia* Lag. de la Región centro-sur de México. *Agrociencia*, 42(3), 277-285.
- Serrato, M. A., & Quijano, M. L. (1993). Usos de algunas especies de *Tagetes*: Revisión bibliográfica (1984-1992). Memorias I Simposio Internacional y II Reunión Nacional sobre Agricultura Sostenibles: Importancia y contribución de la agricultura tradicional. Comisión de Estudios Ambientales y Centro de Enseñanza, Investigación y Capacitación para el desarrollo Agrícola Regional (CEICADAR, Puebla), del Colegio de Postgraduados. México. 228-238.

- Singh, G., Singh, O., De Lampasona, M., & Catalan, C. A. (2003). Studies on essential oils. Part 35: chemical and biocidal investigations on *Tagetes erecta* leaf volatile oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(1), 62-65.
- Siva, V. (2014). Identification of Insecticidal Components of Mango Ginger Rhizome and *Tagetes erecta* Flower Extracts by GC-MS Analysis. *International Journal of Chemical and Pharmaceutical Analysis*, 1(4), 203-207.
- Soule, J. A. (1996). Novel annual and perennial *Tagetes*. In Progress in new crops, J. Janick (ed.). ASHS Press, Arlington, Virginia, 546-551
- Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., & Martínez, J. R. (2003). Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia *Verbenaceae*. *Rev. Acad. Colomb. Cienc*, 27(105), 579-597.
- Tucker, A. O., & Maciarelo, M. J. (1996). Volatile Leaf Oil of *Tagetes lemmonii* Gray. *Journal of Essential Oil Research*, 8(4), 417-418.
- Turner, B. L. (1996). Chapter 6: The comps of México-A systematic account of the family Asteraceae. Pp. 1-93. In: Adams R. P., and Turner B. L. (eds.). *Tageteae and Anthemideae*. Volume 10. Phytologia Memoirs. Texas. 93 p.
- Valente, J., Zuzarte, M., Resende, R., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Pereira, C. F., & Salgueiro, L. (2015). *Daucus carota* subsp. gummifer essential oil as a natural source of antifungal and anti-inflammatory drugs. *Industrial Crops and Products*, 65, 361-366.
- Vallejo, R., & Nájera, M. B. (2016). Actividad insecticida de los aceites esenciales de *Tagetes lucida* Cav. Y *Cosmos bipinnatus* Cav. (Asterales: Asteracea) sobre *Sitophilus zeamais* Motchulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Entomología Mexicana*, 3: 209-214.
- Vázquez, S. T., Carrillo, G. E., Reyes, T. B., Serrato, C., Sixtos, A., Nathan, J., (2002). Aceites esenciales de *Tagetes filifolia* y su efecto larvicida. XIX

Congreso Nacional de Fitogeética. 1 al 5 de Septiembre, Saltillo, Coahuila, México. 386 p.

Villavicencio, M. A., Pérez, B. E. & Ramírez, A. A., (1998). Lista florística del estado de Hidalgo. Recopilación bibliográfica. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca. 147 p.

Whittaker, R. H., Levin, S. A., & Root, R. B. (1973). Niche, habitat, and ecotope. *The American Naturalist*, 107(955), 321-338.

Xu, L. W., Chen J., Huan-Yang Q., and Yan-Ping S. (2012). Phytochemicals and their biological activities of plants of *Tagetes* L. *Chinese Herb. Med.* 4(2): 103-117.

Zapata, C., Serrato, M. Á., Ibarra, E., & Naranjo, B. (2015). Chemical compounds of essential oil of *Tagetes* species of Ecuador. Volume 1, Issue 1 July December 2015, 19.

Zarate, J. (2016). Ensayo piloto de extracción del aceite esencial de poblaciones naturales de *Tagetes lucida* Cav. Para la evaluación toxicológica en nemátodos presentes en jitomate (*Solanum lycopersicum* L.). Tesis de Mestría. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México.

Zygodlo, J. A., Lamarque, A. L., Maestri, D. M., Guzman, C. A., & Grosso, N. R. (1993). Composition of the inflorescence oils of some *Tagetes* species from Argentina. *Journal of Essential Oil Research*, 5(6), 679-681.

Zygodlo, J. A., Guzman, C. A., & Grosso, N. R. (1994). Antifungal properties of the leaf oils of *Tagetes minuta* L. and *T. filifolia* Lag. *Journal of Essential Oil Research*, 6(6), 617-621.

CAPÍTULO IV.
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE POBLACIONES DE *Tagetes* spp DE
HIDALGO, MÉXICO

4.1 RESUMEN

Marcadores ITS e ISSR se utilizaron para estudiar la relación y diversidad genética de materiales de *Tagetes* para proporcionar una base teórica y apoyo técnico para la adecuada conservación y utilización de los recursos genéticos existentes de este género del Estado de Hidalgo. El ADN genómico de 29 accesiones pertenecientes *T. erecta* y *T. lunulata* (6 accesiones c/u), *T. filifolia*, *T. lucida* y *T. micrantha* (5 c/u), *T. moorei* y *T. patula* (1 c/u) se amplificaron con los iniciadores ITS1 e ITS4 y con ello se confirmó la identidad independiente de esas especies.

Mediante nueve iniciadores ISSR se analizaron 179 accesiones de *Tagetes*, los cuales produjeron 16 a 25 bandas, en promedio 21.22 bandas por iniciador. Un total de 191 bandas se identificaron y 99.5 % de polimorfismo. El análisis de agrupamiento separó las accesiones en siete grupos, correspondientes a las diferentes especies.

Palabras clave: *Tagetes*, ITS, ISSR.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Tagetes* spp POPULATIONS OF HIDALGO, MEXICO

4.2 ABSTRACT

ITS and ISSR markers were used to study the relationships and genetic diversity of *Tagetes* accesions to provide a theoretical basis and technical support for their appropriate conservation and utilization of genetic resources of this genus in the state of Hidalgo. The genomic DNA of 29 accesions of *Tagetes* genus: six of *T. erecta*, five *T. filifolia*, five *T. lucida*, six *T. lunulata*, five *T. micrantha*, one *T. moorei* and one of *T. patula*, was amplified using ITS1 and ITS4 primers.

In addition genetic relationships among 179 *Tagetes* accesions were analyzed using 9 ISSR primers. A total of 191 bands were obtained, of which 190 were polymorphic (99.5 % of polymorphism). Each primer produced from 16 to 25 bands, with an average of 21.22 bands per primer. Cluster analysis produced seven groups, according to the seven different species.

Index words: *Tagetes*, ITS, ISSR

4.3 INTRODUCCIÓN

A México se le considera uno de los principales centros de diversificación biológica a nivel mundial, por lo que la conservación de los recursos genéticos debe ser una actividad prioritaria debido a las implicaciones que la diversidad debiera tener en el desarrollo y explotación de nuevas variedades de plantas para la alimentación y la agricultura (Rao y Hodgkin, 2002; Boada y Toledo, 2003). La diversidad genética es de especial importancia ya que los cultivos y plantas actuales se seleccionaron a partir de parientes silvestres por sus características específicas; el proceso de evolución de las poblaciones nativas las ha llevado a desarrollar múltiples características que les han permitido sobrevivir en condiciones variables, entre esas características se encuentran: tolerancia a temperaturas extremas, sequías, inundaciones, condiciones edáficas hostiles, etc., así como resistencia genética a plagas y enfermedades (Hoyt, 1992; Eigenbrode *et al.*, 1993). Por estas adaptaciones heredadas, las poblaciones nativas son fuente de germoplasma para el mejoramiento genético de las especies cultivadas (Hoyt, 1992), así como para la formación de nuevos cultivares a partir de especies silvestres no convencionales. En razón de ello, conviene el estudio de recursos fitogenéticos en el más amplio sentido.

La sistemática molecular es una disciplina científica que se encarga de comprender el origen y diversificación de organismos vivos a partir de la información contenida en las secuencias de los ácidos nucleicos, ADN o ARN (Swofford y Olsen, 1990). No obstante, el estudio de esta información presenta varios desafíos; por ejemplo, muestreos limitados de material genético y la imposibilidad de estudiar materiales genéticos ya extintos, por lo que tal disciplina ha desarrollado análisis estadísticos e informáticos que pretenden resolver estos retos, además de hacer uso de técnicas que emplean marcadores moleculares para así poder determinar la estructura genética de poblaciones, delimitación de especies y realizar inferencias filogenéticas (Ornelas *et al.*, 2013).

Los marcadores moleculares representan características que pueden ser tanto genéticas como fenotípicas y permiten diferenciar y clasificar a los organismos vivos (Azofeifa, 2006). Los marcadores moleculares que asocian características genéticas se basan en la utilización de secuencias de nucleótidos incluidos en el genoma de un organismo, mismas que presentan variaciones entre individuos o grupos de individuos que permiten realizar una clasificación coherente (Campos *et al.*, 2012). Por su parte, los marcadores tipo ITS (Internal Transcribed Spacer, espaciadores internos transcritos) son regiones no codificantes de ADN que se localizan entre los genes codificantes para la subunidad ribosomal 35S, los cuales pueden ser 18S, 5.8S y 26S (Rafalski y Tingey, 1993). El ITS1 se localiza entre los genes ribosomales 18S y 5.8S, mientras que el ITS2 se encuentra entre los genes 5.8S y 26S; ambos se han utilizado para obtener la filogenia de varias especies y géneros (Roberts y Urbatsch, 2003; Bekele *et al.*, 2007; Susanna *et al.*, 2007).

Otro tipo de marcadores moleculares de ADN son los ISSR (Inter Sequences Simple Repeated, inter secuencias simples repetidas), las cuales son secuencias cortas, de 2 a 10 pares de bases y repetidas a lo largo de un genoma; estas secuencias son altamente variables en el número de unidades que las integran, por lo que su análisis hace que sean útiles en la búsqueda de polimorfismos, con lo cual, estos marcadores pueden ser utilizados para la diferenciación de individuos así como la identificación de variedades dentro de una misma especie (Valadez y Kahl, 2000).

En México existe una amplia diversidad de germoplasma del género *Tagetes*, asociada con procesos de domesticación y de evolución natural milenarios de los cuales no se tiene un estudio sistemático (Serrato, 2014). Este género se caracteriza por presentar plantas herbáceas anuales y semileñosas perennes, de tamaños variados, desde los 25 cm hasta 1 m de altura, erectas, ramificadas, de hojas opuestas, oblongas, de 5 a 15 cm de largo, con flores de colores amarillo, rojo e incluso naranja y de frutos negros (Sabillón y Bustamante, 1996; Dole y

Wilkins, 1999). Existen diversos trabajos enfocados a la evaluación del efecto biocida de especies de *Tagetes* destacando propiedades bactericidas, fungistáticos, nematocidas y acaricidas (Jacobs *et al.*, 1995; Ploeg, 1999; Alexander y Waldenmaier, 2002; Ileri *et al.*, 2010), perfilando al taxa como fuente de insumos orgánicos para la agricultura; otros aprovechamientos de *Tagetes* se refieren a la producción de pigmentos florales (Martínez *et al.*, 2004; Del Villar *et al.*, 2007) y al desarrollo de variedades ornamentales (Mehra *et al.*, 1975; Vasudevan *et al.*, 1997).

Los trabajos sobre caracterización molecular del género *Tagetes* son escasos (Chi *et al.*, 2000; Loockerman *et al.*, 2003; Rojas *et al.*, 2003; Shahzadi *et al.*, 2010), o al menos no se dispone de suficiente información al respecto para este recurso natural de México (Serrato *et al.*, 2014) representado por cerca de la mitad de las especies del género en América (Serrato, 2010; CONABIO, 2012).

Campos *et al.* (2012) exponen la primera aproximación de la diversidad molecular de varias especies de este género empleando la técnica de RAPD usando iniciadores de la serie OPM para establecer correlaciones entre especies de 11 híbridos de *Tagetes* seleccionados por su producción de aceite, no obstante, los iniciadores utilizados produjeron baja cantidad de fragmentos polimórficos. Loockerman *et al.* (2003) realizaron un trabajo de análisis filogenético mediante espaciadores internos transcritos (ITS) y secuencias del gen *dnhF* del cloroplasto para evaluar las relaciones filogenéticas dentro de la tribu *Tageteae* dentro de las cuales se incluyen los géneros *Adenopappus*, *Vilobia* y *Porophyllum*; dicho estudio permitió diferenciar 21 géneros dentro de la tribu *Tageteae*, que se encuentra dentro de la familia Asteraceae y abarca al género *Tagetes*. Otro trabajo sobre marcadores de ADN en *Tagetes* incluyen el de Li *et al.* (2010) al estudiar 29 accesiones de *T. erecta* y dos de *T. patula* mediante el uso de marcadores tipo ISSR concluyendo que la relación y la diversidad genética de *Tagetes* puede ser evaluada eficientemente con esta técnica, posibilitando que el análisis de agrupamiento correspondiera a la clasificación de las accesiones estudiadas.

Dentro del acervo de accesiones del recurso fitogenético *Tagetes* con que cuenta el Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos de la SAGARPA se registran 230 accesiones pertenecientes al Estado de Hidalgo que corresponden a las especies *T. erecta*, *T. filifolia*, *T. lucida*, *T. lunulata*, *T. micrantha*, *T. moorei* y *T. patula*, todas ellas poco estudiadas, por lo que se requieren trabajos de caracterización, entre ellos de tipo molecular que posibiliten un mejor conocimiento de estos recursos fitogenéticos.

El presente estudio tuvo como objetivo describir características moleculares de una muestra de poblaciones de las especies de *Tagetes* de Hidalgo mediante el uso de marcadores tipo ITS e ISSR para análisis de las especies y las relaciones de parentesco, así como variabilidad de las poblaciones, con la finalidad de coadyuvar con información suplementaria en la toma de decisiones sobre su utilización potencial dentro de un programa de mejoramiento genético, al mismo tiempo que enriquecer la información pasaporte en el banco de germoplasma nacional.

4.4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.4.1 Material vegetal y procedencia

Este estudio se realizó en una colección de materiales de *Tagetes* pertenecientes al Estado de Hidalgo, obtenida por la Universidad Politécnica Francisco I. Madero (Cuadro 14) en el marco de los trabajos implementados en la Red Cempoalxóchitl del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos que coordinó el SNICS-SAGARPA hasta 2012 (Serrato, 2014). Como parte de la exploración también se recolectaron semillas, las cuales se ingresaron como accesiones al Banco Nacional de Germoplasma Vegetal, México (BANGEV, UACH) para posteriores referencias.

Cuadro 14. Sitios de colección de poblaciones de *Tagetes* en el Estado de Hidalgo.

Id.	Municipio	Localidad	Coordenadas Geodésicas	
			Longitud	Latitud
<i>T. erecta</i>				
ER001	Actopan	Actopan	-98.9834361	20.2728194
ER002	Actopan	Actopan	-98.9834361	20.2728194
ER003	Actopan	Actopan	-98.9834361	20.2728194
ER004	Actopan	Actopan	-98.9834361	20.2728194
ER005	Actopan	Actopan	-98.9450000	20.2700000
ER006	Actopan	Actopan	-98.9834361	20.2728194
ER007	Actopan	Actopan	-98.9834361	20.2728194
ER008	Ajacuba	Ajacuba	-99.1213111	20.1058222
ER009	Ajacuba	Ajacuba	-99.1213111	20.1058222
ER010	Ajacuba	Santiago Tezontlate	-99.0900444	20.1579667
ER011	Ajacuba	Santiago Tezontlate	-99.1050556	20.1617000
ER012	Ajacuba	Santiago Tezontlate	-99.0809361	20.1570306
ER013	Ajacuba	Santiago Tezontlate	-99.1229611	20.1533833
ER014	Ajacuba	Santiago Tezontlate	-99.1036861	20.1756083
ER015	Atlapexco	Atlatilpa	-98.3533528	21.0149444
ER016	Atlapexco	Achiquihuitla	-98.3668611	20.9815806
ER017	Atlapexco	Achiquihuitla	-98.3668611	20.9815806
ER018	Calnali	Papatatla	-98.4504278	20.9011528
ER019	Calnali	Calnali	-98.5753361	20.8961389
ER020	Chapulhuacán	Huatepango	-98.9038889	21.1547222
ER021	Chapulhuacán	Huatepango	-98.9038889	21.1547222
ER022	Chapulhuacán	Santa María	-98.9038889	21.1547222
ER023	Cuautepec	Tecocomulco	-98.3203740	20.0384010
ER024	Francisco I. Madero	Guerrero	-99.0453556	20.1871889
ER025	Francisco I. Madero	Guerrero	-99.0464028	20.1962333
ER026	Francisco I. Madero	Guerrero	-99.0539694	20.1836639
ER027	Francisco I. Madero	Guerrero	-99.0420722	20.1843611
ER028	Francisco I. Madero	Guerrero	-99.0339583	20.1826639
ER029	Francisco I. Madero	UPFIM	-99.0905556	20.2227778
ER030	Francisco I. Madero	UPFIM	-99.0905556	20.2227778
ER031	Francisco I. Madero	UPFIM	-99.0905556	20.2227778
ER032	Francisco I. Madero	UPFIM	-99.0905556	20.2227778
ER033	Francisco I. Madero	El Jaguey	-99.0905556	20.2227778
ER034	Francisco I. Madero	El Jaguey	-99.0905556	20.2227778
ER035	Huehuetla	Rio Pantepec	-98.0783333	20.4611111
ER036	Huehuetla	Rio Pantepec	-98.0783333	20.4611111
ER037	Huehuetla	Crucero San Antonio	-98.0783333	20.4611111

ER038	Huehuetla	El Ocotlal	-98.0783333	20.4611111
ER039	Huejutla de Reyes	Calmecate	-98.3398139	21.1635333
ER040	Huejutla de Reyes	Calmecate	-98.3398139	21.1635333
ER041	Huejutla de Reyes	Tehuettlan	-98.5076000	21.0535778
ER042	Huejutla de Reyes	Tehuettlan	-98.5076000	21.0535778
ER043	Huejutla de Reyes	Chamizal	-98.4169500	21.1564250
ER044	Huejutla de Reyes	Chamizal	-98.4169500	21.1564250
ER045	Huejutla de Reyes	Los Otates	-98.3419806	21.1493417
ER046	Huejutla de Reyes	Los Otates	-98.3419806	21.1493417
ER047	Huejutla de Reyes	Los Otates	-98.3419806	21.1493417
ER048	Huejutla de Reyes	Huejutla	-98.4169500	21.1439250
ER049	Huejutla de Reyes	Huejutla	-98.4169500	21.1439250
ER050	Huejutla de Reyes	Santa Catarina	-98.3496944	21.1218806
ER051	Huejutla de Reyes	Santa Catarina	-98.3496944	21.1218806
ER052	Huejutla de Reyes	Santa Catarina	-98.3496944	21.1218806
ER053	Huejutla de Reyes	Atzompa	-98.4169306	21.1393694
ER054	Huejutla de Reyes	Atzompa	-98.4169306	21.1393694
ER055	Huejutla de Reyes	Atzompa	-98.4169306	21.1393694
ER056	Ixmiquilpan	Ixmiquilpan	-99.2166667	20.4833333
ER057	Jaltocán	El Chote	-98.5418861	21.1277222
ER058	Jaltocán	Jaltocán	-98.5416667	21.1277139
ER059	La Misión	Jacalilla	-99.1233333	21.0897222
ER060	Lolotla	Lolotla	-98.7186583	20.8495167
ER061	Lolotla	Lolotla	-98.7186583	20.8495167
ER062	Lolotla	Ixtlahuaco	-98.7186306	20.8661028
ER063	Lolotla	Ixtlahuaco	-98.7186306	20.8661028
ER064	Mixquiahuala	Mixquiahuala	-99.2130556	20.2311111
ER065	Molango	Molango	-98.7255139	20.7908389
ER066	Molango	Molango	-98.7255139	20.7908389
ER067	Pacula	Pacula	-99.2955556	21.0497222
ER068	Pacula	Pacula	-99.2955556	21.0497222
ER069	Pisaflores	La Peña	-99.0050000	21.1933333
ER070	Pisaflores	La Peña	-99.0050000	21.1933333
ER071	Pisaflores	La Peña	-99.0050000	21.1933333
ER072	Pisaflores	La Peña	-99.0050000	21.1933333
ER073	San Agustín Tlaxiaca	San Agustín Tlaxiaca	-98.9013139	20.12125
ER074	San Agustín Tlaxiaca	San Agustín Tlaxiaca	-98.8795111	20.1203444
ER075	San Agustín Tlaxiaca	San Agustín Tlaxiaca	-98.9063833	20.1225083
ER076	San Agustín Tlaxiaca	San Agustín Tlaxiaca	-98.8811389	20.1156111
ER077	San Agustín Tlaxiaca	San Agustín Tlaxiaca	-98.8811389	20.1156111
ER078	San Agustín Tlaxiaca	San Agustín Tlaxiaca	-98.8811389	20.1156111
ER079	San Agustín Tlaxiaca	San Agustín Tlaxiaca	-98.8741611	20.1101778
ER080	San Agustín Tlaxiaca	San Agustín Tlaxiaca	-98.8741611	20.1101778

ER081	San Bartolo Tutotepec	Buena Vista	-98.2052778	20.3930556
ER082	San Bartolo Tutotepec	Buena Vista	-98.2052778	20.3930556
ER083	San Bartolo Tutotepec	Buena Vista	-98.2052778	20.3930556
ER084	San Felipe Orizatlán	San Felipe	-98.6179556	21.1680944
ER085	San Felipe Orizatlán	San Felipe	-98.6179556	21.1680944
ER086	San Felipe Orizatlán	Buena vista	-98.6179556	21.1680944
ER087	Tasquillo	Tasquillo	-99.4833333	20.6166667
ER088	Tasquillo	Tasquillo	-99.4833333	20.6166667
ER089	Tenango de Doria	Tenango	-98.2266667	20.3355556
ER090	Tepehuacán Guerrero	San Juan	-98.8441667	21.0130556
ER091	Tetepango	Tetepango	-99.084875	20.1057083
ER092	Tetepango	Tetepango	-99.1689528	20.0934306
ER093	Tetepango	Tetepango	-99.1570889	20.1172222
ER094	Tetepango	Tetepango	-99.1850833	20.1030861
ER095	Tetepango	Tetepango	-99.1712944	20.0935972
ER096	Tizayuca	Tizayuca	-98.9833333	19.8333333
ER097	Tlanchinol	San Cristobal	-98.6592917	20.9887806
ER098	Tlanchinol	San Cristobal	-98.6592917	20.9887806
ER099	Tlanchinol	San Salvador	-98.7103861	20.8651806
ER100	Tlanchinol	San Salvador	-98.7103861	20.8651806
ER101	Tlaxcoapan	Tlaxcoapan	-99.2032806	20.1005000
ER102	Tlaxcoapan	Tlaxcoapan	-99.2032806	20.1005000
ER103	Tlaxcoapan	Tlaxcoapan	-99.2032806	20.1005000
ER104	Tlaxcoapan	Tlaxcoapan	-99.2032806	20.1005000
ER105	Tlaxcoapan	Tlaxcoapan	-99.2032806	20.1005000
ER106	Tula	Tula	-99.3500000	20.0500000
ER107	Tula	Tula	-99.3500000	20.0500000
ER108	Tula	Tula	-99.3500000	20.0500000
ER109	Tula	Teocalco	-99.3500000	20.0500000
ER110	Xochicuatlán	Xochicuatlán	-98.6789028	20.7797889
ER111	Xochicuatlán	Xochicuatlán	-98.6789028	20.7797889
ER112	Xochicuatlán	Xochicuatlán	-98.6789028	20.7797889
ER113	Xochicuatlán	Cuatecalco	-98.6816861	20.7766806
ER114	Yahualica	Tepetitla	-98.3699528	20.9698222
ER115	Yahualica	Tlanchiyahualica	-98.401225	20.9649139
ER116	Yahualica	Mecatlán	-98.4297333	21.0995833
ER117	Yahualica	Yahualica	-98.3805528	20.9530278
ER118	Yahualica	Yahualica	-98.3805528	20.9530278
ER119	Yahualica	Yahualica	-98.3805528	20.9530278
ER120	Yahualica	Entronque Tepetitla	-98.3845528	20.9614444
ER121	Yahualica	Xanatitlan	-98.3845528	20.9614444

<i>T. filifolia</i>				
FL001	Chapulhuacán	Santa María	-98.9038888	21.1547222
FL002	Jacala	La Cuesta Colorada	-99.1719444	21.0052778
FL003	Pacula	Juliapán	-99.2955556	21.0497222
FL004	San Bartolo Tutotepec	Buena Vista	-98.2052778	20.3930556
FL005	Tepeapulco	Tepeapulco	-98.4384078	19.7126605
FL006	Tepehuacán Guerrero	Chilijapan	-98.8441667	21.0130556
<i>T. lucida</i>				
LC001	Apan	Apan	-98.4384078	19.7126605
LC002	Arenal	Ojo de Agua	-98.8776250	20.2146778
LC003	Atotonilco el Grande	Tiltepec	-98.6827778	20.3130555
LC004	Chapulhuacán	Santa María	-98.9038889	21.1547222
LC005	Epazoyucan	El Guajolote	-98.6408093	20.0153681
LC006	Huautla	La Puerta	-98.2701472	21.0491306
LC007	Huejutla de Reyes	Santa Catarina	-98.3496944	21.1218806
LC008	Huejutla de Reyes	Coacuilco	-98.34969444	21.1218806
LC009	Ixmiquilpan	Ixmiquilpan	-99.2543250	20.5038667
LC010	Jacala	Panalito	-99.1719444	21.0052778
LC011	Jacala	Jacala	-99.1719444	21.0052778
LC012	La Misión	Cobrecito	-99.1233333	21.0897222
LC013	La Misión	El Cartel de Jacalilla	-99.12333333	21.0897222
LC014	Pachuca	Camino al Real	-98.7358333	20.1225000
LC015	Pacula	Juliapan	-99.2955556	21.0497222
LC016	Pacula	Pacula	-99.2955556	21.0497222
LC017	Tasquillo	Tasquillo	-99.4833333	20.6166667
LC018	Tepehuacán Guerrero	San Juan	-98.8441667	21.0130556
LC019	Zimapán	Trancas	-99.3833333	20.7333333
LC020	Zimapán	Las Manzanas	-99.2519444	20.8922222
<i>T. lunulata</i>				
LN001	Actopan	La Magdalena	-98.9450000	20.2700000
LN002	Actopan	Actopan	-98.9834361	20.2728194
LN003	Arenal	San Pedro	-98.9241000	20.2388889
LN004	Arenal	Ojo de Agua	-98.8776250	20.2146778
LN005	Chipalhuacán	Huatepango	-98.9038889	21.1547222
LN006	Chipalhuacán	Santa María	-98.9038889	21.1547222
LN007	Francisco I. Madero	San Juan Tepatepec	-99.0622111	20.2165167
LN008	Francisco I. Madero	El Jaguey	-99.0905556	20.2227778
LN009	Jacala	El Pinalito	-99.1719444	21.0052778
LN010	La Misión	Jacalilla	-99.12333333	21.0897222
LN011	Mineral de la Reforma	Palma Gorda	-98.77416667	20.0355556
LN012	Progreso de Obregón	Xochitla	-99.17898611	20.2512556
LN013	Pachuca	Camino al Real	-98.7358333	20.1225000
LN014	Pacula	Pacula	-99.2955556	21.0497222

LN015	Pisaflores	La Peña	-99.0050000	21.1933333
LN016	San Agustín Tlaxiaca	San Agustín Tlaxiaca	-98.8741611	20.1101778
LN017	Tasquillo	Tasquillo	-99.4833333	20.6166667
LN018	Tulancingo	Santiago Tutotepec	-98.3803611	20.0745556
LN019	Zempoala	Zempoala	-98.6705556	19.9186111
LN020	Zimapán	Trancas	-99.3833333	20.7333333
<i>T. micrantha</i>				
MC001	Ixmiquilpan	Ixmiquilpan	-99.2543250	20.5038667
MC002	La Misión	Jacalilla	-99.1233333	21.0897222
MC003	Tasquillo	Tasquillo	-99.2947638	20.5516806
MC004	Tlanchinol	Tlanchinol	-98.7103861	20.8651806
MC005	Zimapán	El Cobrecito	-99.4416666	20.7880556
<i>T. moorei</i>				
MR001	Zimapán	Mina Lomo de Toro	-99.4416666	20.7880556
<i>T. patula</i>				
PT001	Actopan	Bothi Baji	-98.9450000	20.2700000
PT002	El Arenal	El Rincón	-98.9166667	20.2166667
PT003	Molango	Molango	-98.7255139	20.7908389
PT004	San Bartolo Tutotepec	Nando	-98.2052778	20.3930556
PT005	Tasquillo	Tasquillo	-99.4833333	20.6166667
PT006	Tlanchinol	San Cristobal	-98.6592917	20.9887806

4.4.2 Extracción de ADN

Los materiales se establecieron en condiciones de invernadero para la obtención de tejido vegetal. El ADN se extrajo a partir de 6 a 10 plantas de *Tagetes* por colecta, utilizando el método CTAB propuesto por Doyle (1990), con algunas modificaciones. Hojas jóvenes y sanas se lavaron con alcohol al 70 %, se dejaron escurrir en papel secante, se pesaron 0.3 g de cada muestra y se maceraron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, a éste se le adicionó 1 mL de amortiguador de extracción (2 % CTAB, 100 mM de Tris pH 8, 1.4 M de cloruro de sodio, 20 mM de EDTA pH 8 y 0.1 % de β -mercapto etanol), se colocó en un tubo de polipropileno de 1.5 mL de capacidad y se agitó por inversión hasta homogeneizar. La suspensión se incubó a 60 °C durante 20 min, posteriormente se enfrió durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min. El sobrenadante se extrajo, se colocó en un tubo nuevo y se agregó un volumen de cloroformo:isoamílico (24:1 v/v), mezclando por inversión durante 2

min y enseguida la muestra se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min. La fase acuosa se colectó en un tubo nuevo y se le adicionaron 600 µl de isopropanol frío, se colocó en refrigeración durante 10 min y posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se descartó, se recuperó la pastilla formada al fondo del tubo y se resuspendió en 500 µl de agua destilada estéril, enseguida se le adicionó 800 µl de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1), esta mezcla se agitó y centrifugó a 12,000 rpm por 10 min. La fase acuosa se colocó en un tubo nuevo, se adicionó 25 µl de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 800 µl de etanol absoluto. La mezcla se llevó a refrigeración por 10 min y después se centrifugó a 12,000 por 10 min. La muestra resultante se suspendió en 50 µl de agua destilada.

4.4.3 Determinación de la concentración de ADN

Para determinar la concentración del ADN obtenido, se utilizó un espectrofotómetro Nanodrop a una absorbancia de 260 nm (Chan, *et al.*, 2012). La lectura obtenida en el equipo se utilizó en la siguiente fórmula (Sambrook *et al.*, 1989) para calcular su molaridad:

$$\frac{(\text{Abs } 260 \text{ nm})(\text{Factor de corrección})(\text{Factor de dilución})}{1000} = \mu\text{g/mL}$$

Donde:

Abs 260 nm: Absorbancia obtenida a 260 nm.

Factor de corrección: 50 µg de ADN (constante para ADN)

Factor de dilución: Se obtiene sumando los 5 µl de ADN que se utilizaron para la dilución y los 995 µl de agua donde se diluyó, el resultado es dividido entre los 5 µl de ADN; en este caso, el factor de dilución corresponde a 200.

4.4.4 Análisis de ITS

Para la amplificación de marcadores ITS se seleccionaron 29 muestras más representativas de las 7 especies de *Tagetes* del Estado de Hidalgo (Cuadro 14: *T. erecta*: ER028, ER046, ER054, ER064, ER098, ER105; *T. filifolia*: FL001, FL002, FL003, FL005, FL006; *T. lucida*: LC002, LC006, LC011, LC013, LC017; *T. lunulata*: LN004, LN005, LN009, LN010, LN012, LN014; *T. micrantha*: MC001, MC002, MC003, MC004, MC005; *T. moorei*: MR001; *T. patula*: PT001) y se recurrió al servicio externo que ofrece el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. Los iniciadores utilizados para llevar a cabo la técnica PCR fueron ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') bajo el protocolo que dicha institución establece en un termociclador marca Applied Biosystems (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA); los productos amplificados se visualizaron en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio y revelados con luz ultravioleta en un fotodocumentador marca Bio-Rad (Life Science, Hercules, CA, USA).

Una vez obtenidas las secuencias ITS, estas se editaron manualmente con el paquete BioEdit versión 7.0.0, posteriormente se determinó la distancia genética entre las secuencias usando el método de agrupamiento del vecino cercano (Neighbor-Joining) mediante el programa Mega 5 (Tamura *et al.*, 2011).

4.4.5 Análisis de ISSR

Para este análisis se utilizó el ADN de 179 poblaciones de *Tagetes* del estado de Hidalgo (Cuadro 14) extraído como se mencionó anteriormente. Se probaron originalmente 10 iniciadores (Cuadro 15) de los cuales se seleccionaron los 9 que mostraron mayor número de bandas bien definidas. Los iniciadores utilizados se sintetizaron por Invitrogen® y se disolvieron en agua grado biología molecular (Invitrogen No. 10977) a una concentración de 10 ng/μL.

La reacción de PCR se preparó en un volumen final de 25 μ L, la cual contenía 200 μ M de c/dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 3.0 mM de MgCl₂, 30 ng de iniciador, 25 ng de ADN y 1.5 unidades de ADN Taq polimerasa (Invitrogen No. 11615-010).

Cuadro 15. Secuencia de iniciadores seleccionados y temperatura de alineamiento la obtención de patrones ISSR en 179 poblaciones de *Tagetes* del Estado de Hidalgo.

Iniciador	Secuencia (5' - 3')	Ta °C	Referencia
ISSR 3	(GA) ₈ CTC	58	Bojinov y Danailov, 2009
ISSR 5	(AC) ₈ CTA	56	Bojinov y Danailov, 2009
ISSR 6	(AC) ₈ CTG	58	Bojinov y Danailov, 2009
ISSR 7	(AG) ₈ CTG	58	Bojinov y Danailov, 2009
UBC 840	(GA) ₈ CTT	56	González <i>et al.</i> , 2006
UBC 848	(CA) ₈ AGG	58	González <i>et al.</i> , 2006
LOL 2	(CT) ₈ GC	45	Marotti <i>et al.</i> , 2007
PI01	(CA) ₆ AGCT	48	Vargas <i>et al.</i> , 2011
PI02	(CA) ₆ AGG	48	Vargas <i>et al.</i> , 2011
PI03	AGCT(GACA) ₃	48	Vargas <i>et al.</i> , 2011

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador TECHNE TC-412 iniciando con un ciclo de predesnaturalización a 93 °C por un min, seguido de 40 ciclos con los siguientes segmentos: 20 seg a 93 °C, 1 min a la temperatura de alineamiento de cada iniciador (Cuadro 15), y 20 seg a 72 °C; el último ciclo (extensión final) ocurrió a 72 °C durante 6 min. Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa ultrapura (Invitrogen No.

16500-500) al 2 % en TAE 1X (Sambrook *et al.*, 1989). La separación se realizó a 200 voltios durante 2 h. Los geles se tiñeron en bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 15 min, se observaron y documentaron en un fotodocumentador "DigiDoc-it Imaging system" (UVP).

4.4.6 Análisis de agrupamiento

Con las imágenes obtenidas del fotodocumentador, se creó una matriz básica de datos (MBD) en donde se registró, con 1 la presencia y con 0 la ausencia de las distintas bandas. Con la MBD se procedió a estimar el índice de similitud de Dice entre pares de accesiones y se realizó un análisis de agrupamiento mediante el método del vecino cercano (Neighbor Joining). Finalmente con los resultados obtenidos se procedió a elaborar un dendrograma usando el programa FreeTree versión 0.9.1.50 (Schliep, 2011).

4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.5.1 Análisis de ITS

Las muestras de ADN genómico obtenidas se sometieron a un protocolo de amplificación por PCR para aislar los fragmentos tipo ITS. En la Figura 8 se observan las fotografías de los productos amplificados en gel de agarosa 1 %, ahí se muestra el revelado de los fragmentos producidos en las diferentes especies del género *Tagetes*.

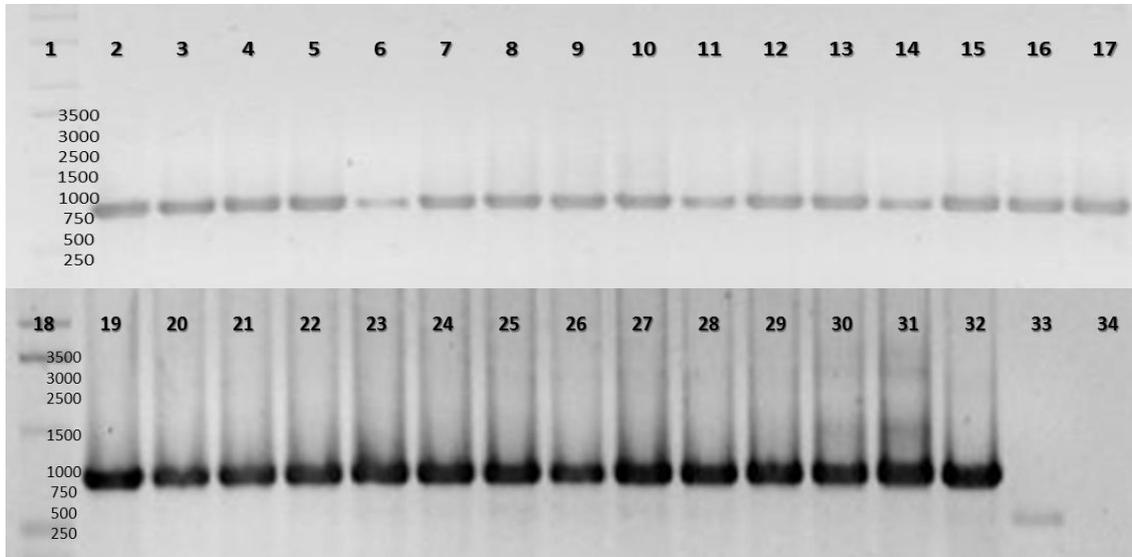


Figura 8. A Gel de agarosa 1 % que muestra la presencia de fragmentos ITS con un tamaño de entre 700 y 1000 pb. Marcador de peso molecular 1 Kb (1, 18); *T. erecta*: ER028 (2), ER046 (3), ER054 (4), ER064 (5), ER098 (6), ER105 (7); *T. filifolia*: FL001 (8), FL002 (9), FL003 (10), FL005 (11), FL006 (12); *T. lucida*: LC002 (13), LC006 (14), LC011 (15), LC013 (16), LC017 (17); *T. lunulata*: LN004 (19), LN005 (20), LN009 (21), LN010 (22), LN012 (23), LN014 (24); *T. micrantha*: MC001(25), MC002 (26), MC003 (27), MC004 (28), MC005 (29); *T. moorei*: MR001 (30); *T. patula*: PT001 (31); Muestra testigo *Tagetes* spp. (32); Muestra testigo *Fusarium oxyaporum* (33); Control negativo (34).

En el análisis de agrupamiento de las secuencias tipo ITS de 29 poblaciones de *Tagetes* del Estado de Hidalgo mediante el método del vecino más próximo, se realizó un total de 2,000 remuestreos (bootstrap) para corroborar la robustez del agrupamiento, por lo que se hicieron pseudo-alineamientos y se determinó el nivel de probabilidad de que cada clado del árbol presentara una estructura que se ajustara a las relaciones de parentesco reales de los organismos analizados. El resultado obtenido se muestra en la Figura 9 donde se observan las relaciones que existen entre las siete especies de *Tagetes* estudiadas. Los individuos de la misma especie se agruparon en el mismo clado, o bien, se colocaron cerca uno de otro. Valores iguales o superiores al 80 % reflejan asociaciones estables (Egan, 2006). En el grupo conformado por los individuos de la especie *T. micrantha* el porcentaje fue de 99 %; en el grupo de *T. filifolia* de 87 %; en el de *T. lucida* fue de 100 %; en los grupos de *T. erecta* y *T. lunulata* fueron de 99 %; mientras que las especies *T. moorei* y *T. patula* se localizaron en clados

independientes debido a que presentan variaciones en cuanto a las asociaciones con las otras especies. Los altos valores obtenidos en todos los casos permiten tener confianza en que los agrupamientos obtenidos reflejan las relaciones filogenéticas reales entre estas especies que a continuación de describen.

En el dendrograma se puede apreciar que la ramificación principal separa a la especie *T. patula* del resto de los grupos, posiblemente debido a que se trata de una especie tetraploide (Towner, 1961) y esta condición le confiere un distanciamiento genético considerable respecto de otras especies como *T. filifolia*, *T. micrantha*, *T. lucida* y *T. moorei*, pero en relación con *T. erecta* y *T. lunulata*, con las que *T. patula* se separa, la posición aledaña entre ellas podría estar relacionada con el posible origen aloploide de *T. patula*, resultado del cruzamiento entre las especies diploides *T. erecta* y *T. lunulata* (Towner, 1961).

También se observa que *T. micrantha* y *T. filifolia* se posicionan en grupos separados aunque pertenecientes a la misma rama, por lo que se podría inferir que pueden compartir características morfológicas (Linares *et al.*, 1987) y de composición química con perfiles de aceites similares (Damián *et al.*, 2008), incluso se les ha confundido reconociéndolas comúnmente con el nombre de anisillo (Villaseñor y Espinosa, 1998); sin embargo, hay características morfológicas distintivas entre esas especies (Turner, 1996) y el perfil de aceites esenciales y características altitudinal y climática donde se encuentra cada especie, confirman diferencias importantes. En observaciones de campo en zonas de transición climática, se han encontrado híbridos interespecíficos naturales y la presencia de las especies putativas, lo que indicaría cercanía genética y confirmaría lo observado en el dendrograma de la Figura 9; sin embargo, se requiere de un análisis estricto.

Aunque el análisis de agrupamiento muestra que *T. moorei* tiene una asociación cercana con *T. erecta*, se trata de taxones muy diferentes: *T. moorei* es endémico y silvestre, de capítulo tipo simple y pequeño (Villareal y De La Rosa, 2002), con mecanismo de dispersión de semillas especial (Serrato y Martínez, 2013); *T. erecta* es de condición domesticada, de amplia distribución en ambientes de

cultivo, de capítulo grande y de dispersión de semillas normal (Neher, 1965). La proximidad entre estas especies no parece de fácil explicación por lo que convendrá someter un mayor número de especies al análisis por ITS.

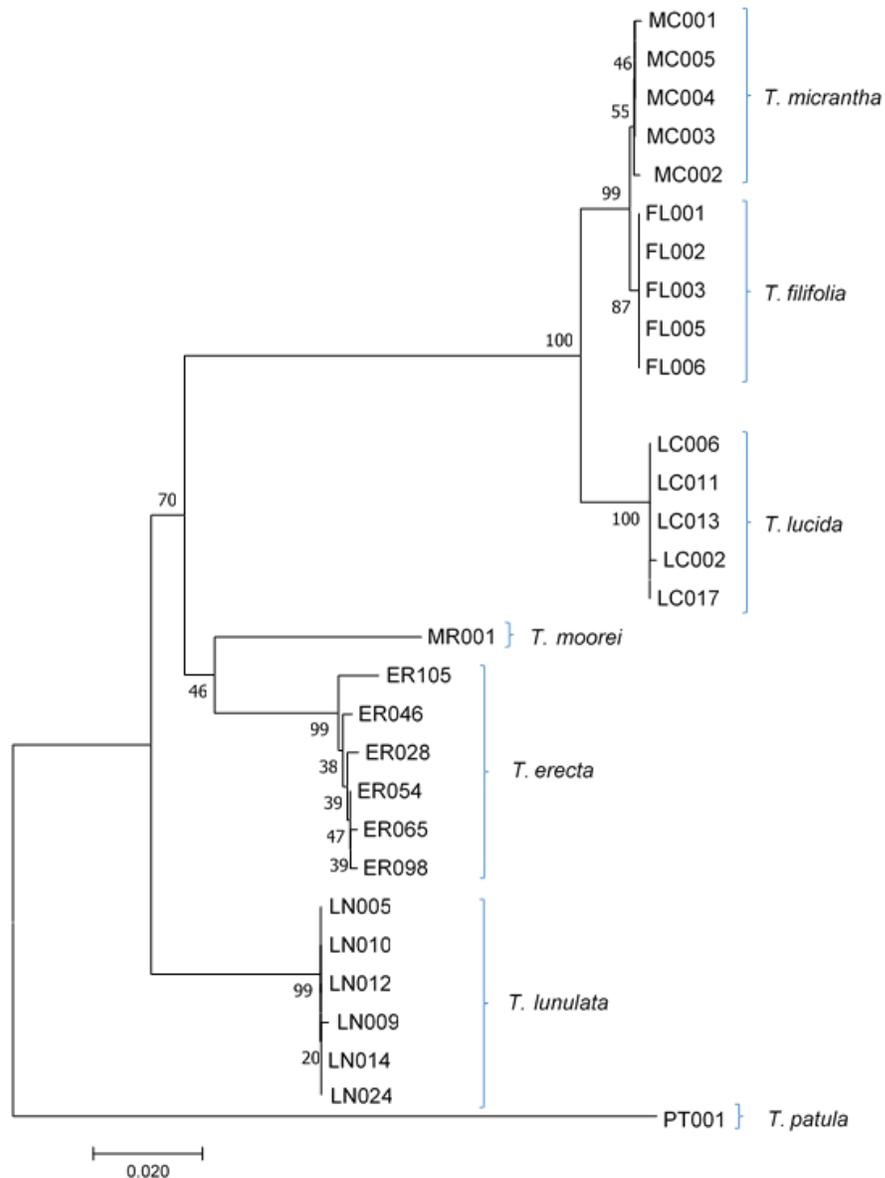


Figura 9. Dendrograma de 29 poblaciones de *Tagetes* pertenecientes al Estado de Hidalgo obtenidos a partir de marcadores ITS mediante el método de agrupamiento del vecino cercano (Neighbor Joining).

Respecto a la ubicación de las poblaciones de las cuales se obtuvieron muestras de diversas regiones del Estado de Hidalgo, pero agrupadas en el mismo clado, se puede determinar que sus secuencias las agrupan dentro de la misma especie, aún con diferencias entre individuos dentro de la misma población, pero a su vez, las diferencia del resto de las especies. Las diferencias de individuos dentro de poblaciones de la misma especie se pueden esclarecer con los análisis de ISSR.

4.5.2 Análisis de ISSR

De los diez iniciadores ISSR originalmente probados, nueve de ellos generaron productos de amplificación reproducibles, claros y distintos. En total se obtuvieron 191 bandas, de las cuales 190 fueron polimórficas, lo cual representó un 99 % de polimorfismo (Cuadro 16) indicando alta diversidad genética en los materiales estudiados.

Cuadro 16. Número de bandas amplificadas con 9 iniciadores ISSR en 179 poblaciones de *Tagetes* pertenecientes al estado de Hidalgo.

Iniciador	Secuencia (5' - 3')	Productos amplificados		% de polimorfismo	% de bandas monomórficas
		Totales	Polimórficos		
ISSR 3	(GA) ₈ CTC	21	21	100	0
ISSR 5	(AC) ₈ CTA	22	22	100	0
ISSR 6	(AC) ₈ CTG	20	20	100	0
ISSR 7	(AG) ₈ CTG	23	22	95.6	4.4
UBC 848	(CA) ₈ AGG	20	20	100	0
LOL 2	(CT) ₈ GC	23	23	100	0
PI01	(CA) ₆ AGCT	16	16	100	0
PI02	(CA) ₆ AGG	21	21	100	0
PI03	AGCT(GACA) ₃	25	25	100	0
		191	190	99	

El número de bandas amplificado por iniciador osciló entre 16 y 25 con un promedio de 21.22 por accesión. Estos resultados superan los obtenidos por Li *et al.* (2010), en cuyo trabajo reportan de 5 a 11 bandas por iniciador usando 8 iniciadores, con un promedio 6.8 bandas y loci polimórficos entre 40 y 100 % para accesiones de *T. erecta* y *T. patula*.

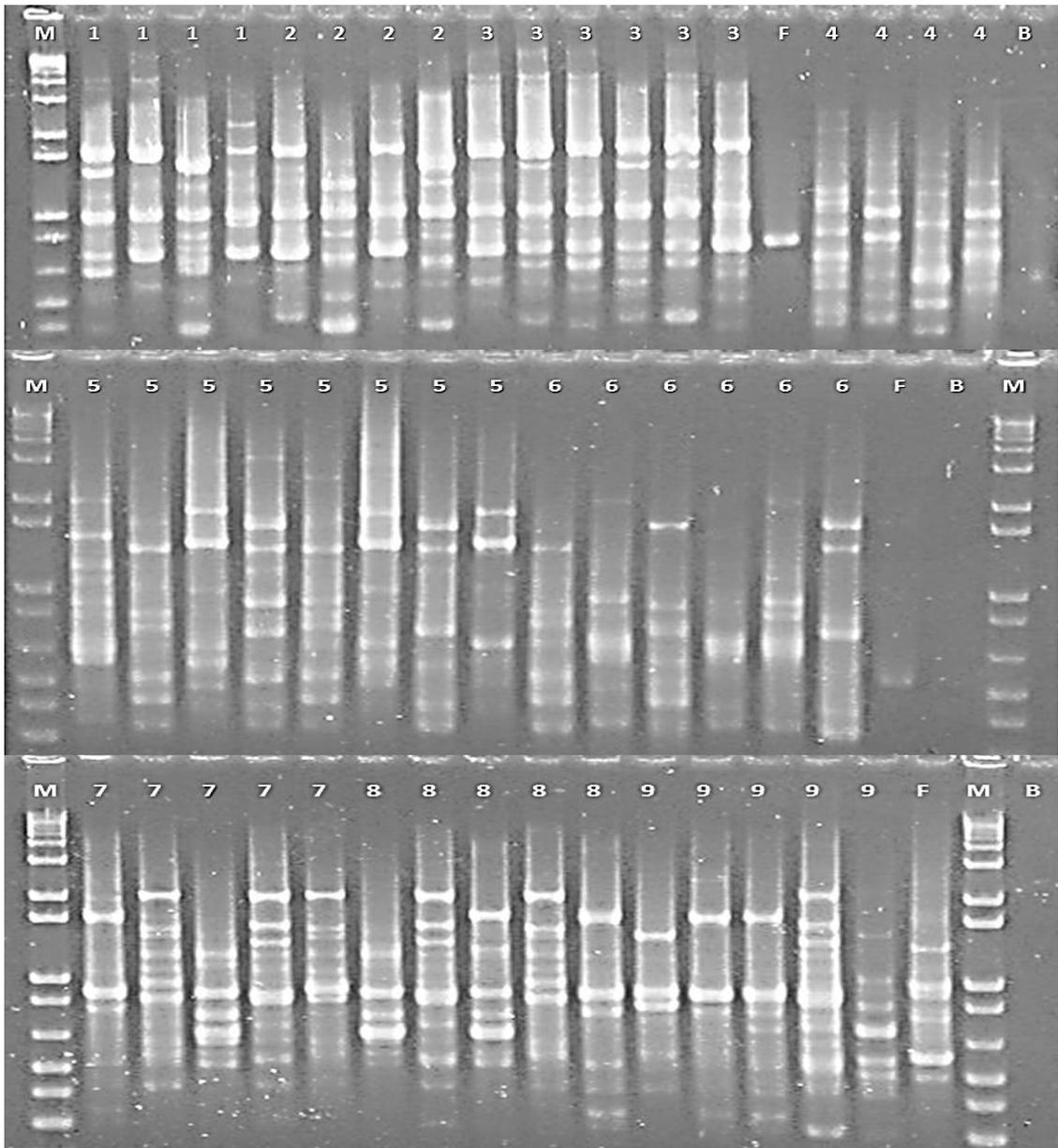


Figura 10. Patrones de bandeo de 179 poblaciones de *Tagetes* de Hidalgo. ISSR 3 (1), ISSR 5 (2), ISSR 6 (3), ISSR 7 (4), UBC 840 (5), LOL 12 (6), PI01 (7), PI02 (8), PI03 (9), Marcador de peso molecular 1 Kb (M), Blanco (M) y Testigo frijol (F).

Otros investigadores que han utilizado marcadores ISSR para caracterizar accesiones de *Tagetes*, al emplear un mayor número de iniciadores (11) lograron incrementar el polimorfismo específico hasta en un 95.17 % (Qi *et al.*, 2007). En el presente estudio, el iniciador UBC 840 fue el que produjo el menor número de bandas y mostró un bajo nivel de polimorfismo como se ha reportado por otros trabajos donde este tipo de iniciadores genera menor número de bandas polimórficas respecto de otros (Vargas y Pablo, 2011; Hernández *et al.*, 2014).

En la Figura 10 se muestran los patrones de bandeo obtenidos mediante la amplificación con los iniciadores antes mencionados, pudiéndose apreciar claras diferencias entre la presencia o ausencia de bandas entre los diferentes iniciadores.

Con la MBD obtenida a partir de la codificación de las 199 bandas polimórficas obtenidas se procedió a calcular el coeficiente de similitud de Dice entre pares de accesiones y luego se realizó un análisis de agrupamiento con el método de pares de medias aritméticas sin ponderar (UPGMA). El dendrograma obtenido para las accesiones evaluadas (Figura 11) muestra una gran diversidad genética entre los grupos estudiados, resultado esperado debido a que se incluyeron materiales de todo el Estado de Hidalgo, el cual se divide en zonas geográficas con gran diversidad de factores edáficos y climáticos (Villavicencio *et al.*, 1998).

En relación al número de individuos para la realización de este trabajo, Nei (1978) indica que el número de individuos para estimar la distancia genética puede ser muy bajo, incluso menor de diez individuos si el número de loci representados es mayor a 50. Este autor estima que en la construcción de un dendrograma a partir de las distancias genéticas para un grupo de especies, un sólo individuo puede ser suficiente en la obtención de la topología correcta del mismo si los niveles de heterocigosidad son bajos. Por otra parte, Hollingsworth y Ennos (2004) indican que cuando existen altos niveles de diferenciación entre poblaciones, un número de loci de 50 es suficiente para confiar en la resolución de los agrupamientos que resulten del estudio. Tomando en cuenta esto, se puede considerar que el número de individuos evaluados fue aceptable para la realización de este trabajo.

En otros cultivos como tomate, agave y frijol, los marcadores ISSR han sido exitosos con fines de diferenciación, llegando a reportarse hasta un promedio de polimorfismo de 85 % (Marotti *et al.*, 2007; González *et al.*, 2015; Núñez *et al.*, 2015). No obstante, referente a trabajos reportados para la caracterización de *Tagetes* con ISSR, se reporta el trabajo de Qi *et al.* (2007) quienes analizaron 12 accesiones de *T. patula* y 2 de *T. erecta* con 10 marcadores tipo ISSR, obteniendo un total de 145 bandas de las cuales únicamente 138 resultaron polimórficas. Otro estudio es el reportado por Banyal (2013) en el que al analizar 15 accesiones de *T. patula* y *T. erecta* con 12 iniciadores ISSR obtuvo porcentajes de polimorfismo de hasta el 90 %. Por lo anterior, los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con los niveles de polimorfismo detectados en las especies de *Tagetes* antes citadas.

El uso de técnicas moleculares de tipo ITS e ISSR evidenció que tales técnicas son un instrumento útil y rápido para el estudio de variaciones inter e intra-específicas de las plantas, pues ayuda a realizar una discriminación adecuada y aislar genotipos. Es por ello que las implicaciones prácticas a las que conlleva este tipo de resultados de polimorfismos genéticos entre poblaciones de la misma especie radican en que al tratarse de diferentes formas en las secuencias de ADN, el estudio de estas tendrá diversas aplicaciones en el desarrollo de investigaciones biológicas y de evolución (Caratachea, 2007).

La técnica ISSR ha mostrado su utilidad para detectar la variabilidad interpoblacional (Alcántara, 2007), en el caso del dendrograma de la Figura 11 se aprecia la formación de los diferentes grupos asociados por especies, no obstante, al analizar los grupos de manera individual existen variaciones dentro de estos, posiblemente dados por el origen geográfico de las poblaciones, lo cual repercute en características propias que los diferencian dentro de la misma especie. Por ejemplo, en el grupo A, conformado por individuos de la especie *T. erecta*, por ser el grupo con mayor número de individuos, se observa la formación de subclados, a partir de los cuales se podría determinar qué individuos comparten características moleculares similares y cuáles no.

La técnica ISSR ha tenido un uso destacado por investigadores debido a que estos marcadores son considerarlos adecuados para el estudio del polimorfismo molecular y las relaciones filogenéticas en el germoplasma, por lo que se han utilizado con éxito para la caracterización de los polimorfismos genéticos de una amplia variedad de especies de importancia agronómica como maíz (Kantety *et al.*, 1995), papa (McGregor *et al.*, 2000) y olivo (Terzopoulos, 2005).

El uso de marcadores moleculares de tipo ITS e ISSR evidenció que tales técnicas son un instrumento útil y rápido para el estudio de variaciones inter e intra-específicas de las accesiones de *Tagetes*, pues ayudó a realizar una discriminación adecuada y aislar genotipos, con lo cual se tienen las primeras referencias del germoplasma de *Tagetes* de Hidalgo.

4.6 CONCLUSIONES

El uso de técnicas de marcadores moleculares de tipo ITS e ISSR evidenció que tales técnicas son un instrumento útil y rápido para el estudio de variaciones inter e intra-específicas de las plantas, pues ayuda a realizar una discriminación adecuada y aislar genotipos.

De acuerdo con el presente estudio, existe un alto grado de diversidad y variabilidad genética entre poblaciones de las diferentes especies de *Tagetes* del Estado de Hidalgo.

En los análisis de agrupamientos obtenidos en los dendrogramas refleja que la técnica ITS resulta más efectiva para evaluar variabilidad a nivel de especie mientras que la técnica ISSR para variabilidad dentro de poblaciones de la misma especie.

4.7 BIBLIOGRAFÍA

- Alcántara, M. R. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. *Ecología molecular*, 541-566.
- Azofeifa, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía mesoamericana*, 17(2), 221-242.
- 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.
- Boada, M., Toledo, V. M., & Artis, M. (2003). El planeta, nuestro cuerpo: la ecología, el ambientalismo y la crisis de la modernidad. *Fondo de Cultura Económica*. 240 p.
- Bojinov, B. M., & Danailov, Z. P. (2008, September). Applicability of ISSRs for genotype identification in a tomato breeding collection. In IV Balkan Symposium on Vegetables and Potatoes 830 (pp. 63-70).
- Campos, J., Martínez, X., Bernal, J., Cruz, J., Serrato, M., Cruz, A. (2012). Análisis molecular del género *Tagetes* spp: análisis de materiales productores de aceite. *Red Tagetes SINAREFI*, 30-143.
- Caratachea, M. A. C. (2007). Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 20(3), 213-221.
- Chan, S. W., Chevalier, S., Aprikian, A., & Chen, J. Z. (2012). Simultaneous quantification of mitochondrial DNA damage and copy number in circulating blood: a sensitive approach to systemic oxidative stress. *BioMed research international*, 1-10.
- Chi, B., Robert, M. L., & Rivera, R. (2000). Extraction of total RNA from a high pigment content plant. *Molecular biotechnology*, 16(1), 17-21.

- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. CONABIO. México: 2012.
- Del Villar, A. A., Serrato, M. Á., Solano, A., Arenas, M. L., Quintero, A. G., Sánchez, J. L. & Vanegas, P. E. (2007). Carotenoides en *Tagetes erecta* L. la modificación genética como alternativa. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(2).
- Damián, L. M., Salgado, R., Martínez, R. E., & Martínez, M. M. (2008). Antifungal properties of some Mexican medicinal plants. *Open Nat Prod J*, 1, 27-33.
- Dole, J., & Wilkis, H. (1999). Floriculture: Principles and species. *Prentice-Hall, Inc.*, 533-535.
- Doyle, J. J. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Egan, M. G. (2006). Support versus corroboration. *Journal of Biomedical Informatics*, 39(1), 72-85.
- Eigenbrode, S. D., Trumble, J. T., & Jones, R. A. (1993). Resistance to beet armyworm, hemipterans, and *Liriomyza* spp. in *Lycopersicon* accessions. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118(4), 525-530.
- González, D., Núñez, C., Villordo, E., Medina, G., & 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.
- González, M., Medina, M. A., Medina, M., & Palomares, G. (2006). Identificación y selección de marcadores moleculares Inter-microsatelite (ISSR) para la diferenciación varietal en *Capsicum annuum* L. In Congreso de Mejora Genética en plantas (3º, 2006, Valencia, España). Resúmenes Solanáceas (No. 30).
- Hernández, L., Sahagún, J., Rodríguez, J., Peña, M., & 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. M., & Ennos, R. A. (2004). Neighbour joining trees, dominant markers and population genetic structure. *Heredity*, 92(6), 490-498.
- Hoyt, E. (1992). Conservando los parientes silvestres de las plantas cultivadas (No. 16288). Addison-Wesley Useroamericana. Delaware, Estados Unidos de America. 52 p.
- Kantety, R. V., Zeng, X., Bennetzen, J. L., & Zehr, B. E. (1995). Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Molecular Breeding*, 1(4), 365-373.
- Li, Z., LiangJun, Z., Jia, S., & ZiGang, Z. (2010). Analysis of genetic relatedness of genetic resources of *Tagetes* as revealed by ISSR. *Scientia Agricultura Sinica*, 43(1), 215-222.
- Linares, E., & Bye, R. A. (1987). A study of four medicinal plant complexes of Mexico and adjacent United States. *Journal of ethnopharmacology*, 19(2), 153-183.
- Loockerman, D. J., Turner, B. L., & Jansen, R. K. (2003). Phylogenetic relationships within the Tageteae (Asteraceae) based on nuclear ribosomal ITS and chloroplast *ndhF* gene sequences. *Systematic botany*, 28(1), 191-207.
- Marotti, I., Bonetti, A., Minelli, M., Catizone, P., & Dinelli, G. (2007). Characterization of some Italian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces by RAPD, semi-random and ISSR molecular markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54(1), 175-188.
- Martínez, M., Cortés, A., & 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. *Técnica Pecuaria en México*, 42(1).
- McGregor, C., Lambert, C., Greyling, M., & Louw, J. (1999). Una evaluación comparativa de las técnicas de detección de huellas genéticas de AND (RAPD, ISSR, AFLP y SSR) en tetraploide papa, *Solanum tuberosum*

- L. germoplasma. *American Journal of Potato*. República de Sudáfrica, África. Vol. 81, No. 4., 243-250.
- Mehra, K. L., Kanodia, K. C., & Srivastava, R. N. (1975). Folk uses of plants for adornment in India. *Economic Botany*, 29(1), 39-46.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3), 583-590.
- 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, J. F., Sosa, V., Soltis, D. E., Daza, J. M., González, C., Soltis, P. S., & Ruiz-Sanchez, E. (2013). Comparative phylogeographic analyses illustrate the complex evolutionary history of threatened cloud forests of northern Mesoamerica. *Plos One*, 8(2).
- Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1993). Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends in Genetics*, 9(8), 275-280.
- Rao, V. R., & Hodgkin, T. (2002). Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68(1), 1-19.
- Rojas, R. I., Zavaleta, E., Lee, M., Martini, M., & Aspiros, H. S. (2003). Detection and characterization of the phytoplasma associated with marigold phyllody in Mexico. *Journal of Plant Pathology*, 81-86.
- Sabillón, A., & Bustamante, M. (1996). Guía fotográfica para la identificación de plantas con propiedades plaguicidas parte I. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Tegucigalpa Honduras, 110.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual (No. Ed. 2). Cold Spring Harbor Laboratory press, New York.
- Schliep, K. P. (2011). Phangorn: Phylogenetic Analysis in R. *Bioinformatics*, 27(4), 592-593.

- Serrato, M. A. (2004). Colecta, caracterización y aprovechamiento de *Tagetes erecta* L. Como Ornamental. Avances. Metodología De Investigación. Texcoco: Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, 1-109.
- Serrato, 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 especies de las que México es centro de origen y diversidad genética, 63.
- Serrato, M. A., Bautista F. F., Monroy S. S. (2014). Guía para conocer el Germoplasma Mexicano de Cempoalxóchitl (*Tagetes* spp). Universidad Autónoma Chapingo. México. 83 p.
- Shahzadi, I., Ahmed, R., Hassan, A., & Shah, M. M. (2010). Optimization of DNA extraction from seeds and fresh leaf tissues of wild marigold (*Tagetes minuta*) for polymerase chain reaction analysis. *Genetics and Molecular Research*, 9(1), 386-393.
- Swofford, D. L. (1990). Phylogeny reconstruction. *Molecular systematics*, 411-501.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731-2739.
- Terzopoulos, P. J., Kolano, B., Bebeli, P. J., Kaltsikes, P. J., & Metzidakis, I. (2005). Identification of *Olea europaea* L. cultivars using inter-simple sequence repeat markers. *Scientia Horticulturae*, 105(1), 45-51.
- Towner, J. W. (1961). Cytogenetic studies on the origin of *Tagetes patula*. I. Meiosis and morphology of diploid and allotetraploid *T. erecta* X *T. tenuifolia*. *American Journal of Botany*, 743-751.
- Vargas, R., & Pablo, R. (2011). Análisis de la diversidad genética de 21 accesiones de piñon (*Jatropha curcas* L.) utilizando marcadores de tipo

- ISSR (Inter-microsatélites) (Bachelor's thesis, Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, 2012.).
- Vasudevan, P., Kashyap, S., & Sharma, S. (1997). *Tagetes*: a multipurpose plant. *Bioresource Technology*, 62(1-2), 29-35.
- Valadez, E. & Kahl, G. (2000). Huellas de ADN en genomas de plantas. Texcoco: Mundiprensa, 39-86.
- Vargas, O., Pérez, L. F., Zamora, P., & Rodríguez, A. (2011). Assessing genetic diversity in Mexican husk tomato species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29(3), 733-738.
- Villarreal, J. A., & De La Rosa, M. (2002). A new variety of *Tagetes moorei* (Asteraceae), a poorly known species from central Mexico. *Brittonia*, 54(3), 164-167.
- Villaseñor, J. L., & Espinosa, Y. F. (1998). Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica, México, DF.
- Villavicencio, M. A., Pérez, B. E. & Ramírez, A.A., (1998). Lista florística del estado de Hidalgo. Recopilación bibliográfica. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca. 147 p.

CAPÍTULO V.
**CONTENIDO DE ADN EN POBLACIONES DE *Tagetes* spp. DE HIDALGO,
MÉXICO MEDIANTE CITÓMETRO DE FLUJO**

5.1 RESUMEN

En Asteraceae, la tribu *Tageteae* no ha sido suficientemente descrita por su contenido de ADN nuclear y sobre el género *Tagetes*, con cerca de la mitad de las especies distribuida en México, los datos son escasos, limitando avanzar en aspectos de sistemática, filogenia y evolución. En el presente estudio se determinó el tamaño del genoma de 91 accesiones de siete especies de *Tagetes* del Estado de Hidalgo mediante citómetro de flujo detectando los siguientes tamaños: *T. erecta* 3.01-3.42 pg, *T. filifolia* 4.00-4.23 pg, *T. lucida* 2.58-2.93 pg, *T. lunulata* 2.33-2.76 pg, *T. micrantha* 3.46-3.71 pg, *T. moorei* 3.72 pg y *T. patula* de 5.12-5.57 pg. La variación total del contenido de ADN en las poblaciones de *Tagetes* estudiadas fue de 2.33 a 5.57 pg.

Palabras clave: *Tagetes*, Asteraceae, ADN nuclear.

DNA CONTENT IN *Tagetes* spp. POPULATIONS OF HIDALGO, MEXICO USING FLOW CYTOMETRY

5.2 ABSTRACT

In Asteraceae, *Tageteae* tribe has not been enough described for its nuclear DNA content, for the *Tagetes* genus, with about half of the species distributed in Mexico, data are limited, restricting progress in systematics, phylogeny and evolution. In the present study, the genome size of 91 accessions of seven *Tagetes* species from the State of Hidalgo was determined by flow cytometer detecting the following sizes: *T. erecta* 3.01-3.42 pg, *T. filifolia* 4.00-4.23 pg, *T. lucida* 2.58-2.93 pg, *T. lunulata* 2.33-2.76 pg, *T. micrantha* 3.46-3.71 pg, *T. moorei* 3.72 pg and *T. patula* 5.12-5.57 pg. The total variation of DNA content in the *Tagetes* populations studied was 2.33 to 5.57 pg.

Index words: *Tagetes*, Asteraceae, nuclear DNA.

5.3 INTRODUCCIÓN

La citometría de flujo es una técnica que permite el análisis de las propiedades ópticas como la dispersión de la luz y fluorescencia de partículas que fluyen en una suspensión líquida. Esta medición en flujo es efectuada a alta velocidad y garantiza un análisis objetivo de las partículas que constituyen la población de interés (Dolezel, 1997), por lo que resulta una herramienta ventajosa, entre otras aplicaciones, para analizar el contenido de ADN y el nivel de ploidía; esta última aplicación de la citometría de flujo supera el conteo cromosómico convencional que, en ocasiones, es difícil por las elevadas tasas de división mitótica requerida, además de que el tamaño de los cromosomas puede ser pequeño, haciendo laborioso y a veces imposible el estudio cariotípico (Dolezel, 1997).

Una descripción cariotípica de plantas, sobre todo cuando han sido poco exploradas y de naturaleza silvestre o ruderal, o que corresponden a recursos naturales nativos, es útil no sólo para caracterizar germoplasma por su ploidía sino porque puede proporcionar datos sobre su filogenia y evolución (Orillo y Bonierbale, 2009), ya que la masa nuclear o contenido total de ADN nuclear tiene fuerte relación con el ambiente (Galbraith *et al.* 1983) y su variabilidad, en términos de ganancia o pérdida, es indicador de procesos adaptativos en el contexto de la evolución natural bajo domesticación de las especies.

El núcleo de la célula contiene la mayor parte de la información genética de un organismo (90 % de ADN repetitivo y 10 % funcional) (Rebolledo, 2006) y su medición sirve para detectar cambios en número de cromosomas, en el ciclo mitótico, duración de la meiosis, ciclo de vida (De Azkue y Martínez, 1984). Por el valor biológico que representa el nucleotipo o masa nuclear, en fenómenos citogenéticos-evolutivos, se han realizado estudios que buscan identificar cómo se despliega la diversidad y variación de la masa nuclear en un número cada vez mayor de taxa y taxones (Caponi, 2011). En Asteraceae se ha implementado un extenso trabajo para ubicar el estatus al respecto, encontrando que la masa nuclear corresponde a un rango de 2 a 21 pg (Price y Bachmann, 1975; Jones y

Brown, 1976; Lawrence, 1985; Cavallini y Natali, 1991); recientemente se proponen tamaños de genoma muy pequeños de ≤ 1.4 pg hasta pequeños de ≤ 3.5 pg (en valores de 1C) en el 57.2 % de especies de Asteraceae (Valles *et al.*, 2013), lo que significa que hace falta explorar más el tamaño del genoma en esta familia. En México, existe el 10 % de especies de Asteraceas en el mundo (Turner y Nesom, 1993); entre las tribus más importantes que se tienen en México se encuentra Tageteae, representada con 16 a 18 géneros que incluyen de 230 a 250 especies; la mayoría de especies de esta tribu son nativas del Continente Americano y pocas son del viejo mundo (Turner y Nesom, 1993). De las Asteraceas exploradas por su tamaño de genoma, la tribu Tageteae está poco estudiada (Valles *et al.*, 2013).

En México debido a su gran extensión territorial y heterogeneidad ambiental, se han generado multitud de especies y variedades de géneros, ubicándose como uno de los países con mayor diversidad de plantas, reptiles y mamíferos (Mittermeier y Goettsch, 1992). El género *Tagetes* pertenece a Tageteae, que en forma natural es endémico de América y del cual cerca de la mitad de las especies (alrededor de 55) se distribuyen en nuestro país (Serrato, 2014), conformando un centro de radiación de especies (Turner y Nesom, 1993), además de que algunas de ellas se encuentran en proceso de domesticación desde la época prehispánica (Serrato, 2014). A este género se le describe como plantas herbáceas anuales y perennes de tamaños variados, desde los 25 cm hasta 1 m de altura, erectas, ramificadas, de hojas opuestas, oblongas de 5 a 15 cm de largo, con flores de colores amarillo, rojo e incluso naranja de 5 a 13 cm de alto y de frutos negros (Dole y Wilkins, 1999). En el Estado de Hidalgo se distribuyen siete especies de *Tagetes*: *T. erecta*, *T. filifolia*, *T. lucida*, *T. lunulata*, *T. micrantha*, *T. moorei* y *T. patula* (Villavicencio *et al.*, 2010; CONABIO, 2012; Serrato, 2014), distribuidos en los más diversos ambientes del Eje Neovolcánico Transversal y Sierra Madre Oriental, esta última en sierras locales como: Sierra Alta (Calnali, Lolotla, Molango de Escamilla, Tepehuacán de Guerrero, Tianguistengo, Tlanchinol y Xochicoatlán), Sierra Baja (Eloxochitlán, Juárez Hidalgo, San Agustín Metzquititlán, Metztitlán, Tlahuiltepa

yZacualtipán de Ángeles), Sierra de Tenango (Agua Blanca de Iturbide, Huehuetla, San Bartolo Tutotepec y Tenango de Doria), Sierra Gorda (Chapulhuacán, Jacala de Ledezma, La Misión, Pacula, Pisaflores y Zimapán), Huasteca hidalguense (Atlapexco, Huautla, Huazalingo, Huejutla de Reyes, Jaltocán, San Felipe Orizatlán, Xochiatipan y Yahualica).

En la actualidad, los trabajos respecto a caracterizaciones del género *Tagetes* son escasos (Serrato, 2014), la información sobre las relaciones genéticas y evolución sigue siendo limitada (Towner, 1961; Strother, 1977; Serrato, 2014) y su distribución ecogeográfica todavía incipiente, todo lo cual dificulta el conocimiento básico sobre esta taxa, además de que aún no está completa su situación taxonómica.

El contenido de ADN y el nivel de ploidía son útiles para caracterizar la amplia diversidad de plantas silvestres y domesticadas de *Tagetes* (Serrato *et al.*, 2000). Aunque no se han explorado aspectos de la citogenética de la mayoría de especies de *Tagetes* de México (Serrato, 2014), el número básico de cromosomas es $X=11, 12$, destacando especies diploides ($2n=2x=22, 24$) y tetraploides ($2n=4x=48$) (Towner, 1961) y de tamaño pequeño de cromosomas, posiblemente desde 0.88 a 2.23 μm , lo que dificulta definir el cariotipo (Arana, 1993). En relación con el contenido nuclear de *Tagetes*, detectado mediante citómetro de flujo, los primeros reportes generados en especies de México, referidos al valor 4C (Serrato *et al.*, 2000), indican lo siguiente: *T. erecta* ($x=2.38$ pg), *T. foetidissima* ($x=2.87$ pg), *T. tenuifolia* ($x=2.42$ pg población Acozac y $x=2.97$ pg población Tepoztlán), *T. remotiflora* ($x=2.49$ pg) y *T. heterocarpa* ($x=2.51$ pg), promedio general 2.61 ± 0.23 pg, de ploidía $2x=24$ por conteo de cromosomas, con variación de 20 % entre poblaciones y de 4 a 13 % dentro de poblaciones. En *T. patula*, con ploidía $4x=48$, el ADN nuclear es 5.35 ± 0.13 pg (Serrato *et al.*, 2000), pero Bennet *et al.* (2000) reportan $4C=4.7$ pg para esta especie en 4C. Considerando la importante variabilidad ambiental en el Estado de Hidalgo y reconociendo la importancia que tiene el conocimiento sobre el tamaño del genoma en la sistemática, filogenia y evolución de *Tagetes*

de México, el presente estudio tuvo por objeto describir el contenido de ADN nuclear de una colección de accesiones de *Tagetes* del Estado de Hidalgo, México con la finalidad de contribuir a la caracterización de este recurso fitogenético para su aprovechamiento y para generar información básica sobre el proceso de conformación natural de este recurso vegetal.

5.4 MATERIALES Y MÉTODOS

5.4.1 Material vegetal y procedencia

Un total de 91 accesiones de *Tagetes* pertenecientes al Estado de Hidalgo (Cuadro 17) fue la colección de trabajo, de las cuales, 43 pertenecen a *T. erecta*, 6 a *T. filifolia*, 16 a *T. lucida*, 14 a *T. lunulata*, 5 a *T. micrantha*, 1 a *T. moorei* y 6 a *T. patula*, obtenidas por la Universidad Politécnica Francisco I. Madero y registradas como accesiones ingresadas al Banco Nacional de Germoplasma Vegetal, México (BANGEV, UACH) como parte de la exploración botánica en 2013 al Estado de Hidalgo como parte de los trabajos de la Red Cempoalxóchitl-SINAREFI-SNICS-SAGARPA. Durante los meses de septiembre y octubre de 2015 germinaron las semillas en cajas Petri y una vez emergidas, las plántulas se establecieron en condiciones de invernadero para la obtención de tejido vegetal para sus posteriores análisis. De estas plantas se utilizó el tejido foliar joven para aislar las células.

Como estándar interno para determinar el contenido de ADN relativo de las muestras, se utilizaron tejidos foliares jóvenes de plantas de cebada (*Hordeum vulgare*) variedad Sultán, proporcionada por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT).

Cuadro 17. Poblaciones de *Tagetes* en el Estado de Hidalgo y sitios de recolección.

Población	Id.	Localidad	Altitud (msnm)	Coordenadas Geodésicas	
				Longitud	Latitud
<i>T. erecta</i>	ER001	Actopan, Actopan	1961	-98.9834361	20.2728194
<i>T. erecta</i>	ER008	Ajacuba, Ajacuba	2116	-99.1213111	20.1058222
<i>T. erecta</i>	ER010	Santiago Tezontlate, Ajacuba	2101	-99.0900444	20.1579667
<i>T. erecta</i>	ER015	Atlatilpa, Atlapexco	160	-98.3533528	21.0149444
<i>T. erecta</i>	ER016	Achiquihuitla, Atlapexco	352	-98.3668611	20.9815806
<i>T. erecta</i>	ER018	Papatatla, Calnali	275	-98.4504278	20.9011528
<i>T. erecta</i>	ER019	Calnali, Calnali	943	-98.5753361	20.8961389
<i>T. erecta</i>	ER020	Huatepango, Chapulhuacán	956	-98.9038889	21.1547222
<i>T. erecta</i>	ER022	Santa María, Chapulhuacán	956	-98.9038889	21.1547222
<i>T. erecta</i>	ER023	Tecocomulco, Cuautepec	2235	-98.3203740	20.0384010
<i>T. erecta</i>	ER024	Guerrero, Francisco I. Madero	2196	-99.0453556	20.1871889
<i>T. erecta</i>	ER029	UPFIM, Francisco I. Madero	2018	-99.0905556	20.2227778
<i>T. erecta</i>	ER035	Rio Pantepec, Huehuetla	427	-98.0783333	20.4611111
<i>T. erecta</i>	ER039	Calmecate, Huejutla de Reyes	106	-98.3398139	21.1635333
<i>T. erecta</i>	ER043	Chamizal, Huejutla de Reyes	137	-98.4169500	21.1564250
<i>T. erecta</i>	ER045	Los Otates, Huejutla de Reyes	139	-98.3419806	21.1493417
<i>T. erecta</i>	ER053	Atzompa, Huejutla de Reyes	138	-98.4169306	21.1393694
<i>T. erecta</i>	ER056	Ixmiquilpan, Ixmiquilpan	1700	-99.2166667	20.4833333
<i>T. erecta</i>	ER057	El Chote, Jaltocán	225	-98.5418861	21.1277222
<i>T. erecta</i>	ER058	Jaltocán, Jaltocán	225	-98.5416667	21.1277139
<i>T. erecta</i>	ER059	Jacalilla, La Misión	1454	-99.1233333	21.0897222
<i>T. erecta</i>	ER060	Lolotla, Lolotla	1544	-98.7186583	20.8495167
<i>T. erecta</i>	ER062	Ixtlahuaco, Lolotla	1509	-98.7186306	20.8661028
<i>T. erecta</i>	ER064	Mixquiahuala, Mixquiahuala	2000	-99.2130556	20.2311111
<i>T. erecta</i>	ER065	Molango, Molango	1648	-98.7255139	20.7908389
<i>T. erecta</i>	ER067	Pacula, Pacula	1322	-99.2955556	21.0497222
<i>T. erecta</i>	ER069	La Peña, Pisaflores	269	-99.0050000	21.1933333
<i>T. erecta</i>	ER073	San Agustín Tlaxiaca, San Agustín Tlaxiaca	2324	-98.9013139	20.1212500
<i>T. erecta</i>	ER081	Buena Vista, San Bartolo Tutotepec	959	-98.2052778	20.3930556
<i>T. erecta</i>	ER084	San Felipe, San Felipe Orizatlán	187	-98.6179556	21.1680944
<i>T. erecta</i>	ER087	Tasquillo, Tasquillo	1873	-99.4833333	20.6166667
<i>T. erecta</i>	ER089	Tenango, Tenango de Doria	1652	-98.2266667	20.3355556
<i>T. erecta</i>	ER090	San Juan, Tepehuacán Guerrero	882	-98.8441667	21.0130556
<i>T. erecta</i>	ER091	Tetepango, Tetepango	2153	-99.0848750	20.1057083
<i>T. erecta</i>	ER096	Tizayuca, Tizayuca	2273	-98.9833333	19.8333333
<i>T. erecta</i>	ER097	San Cristobal, Tlanchinol	537	-98.6592917	20.9887806
<i>T. erecta</i>	ER099	San Salvador, Tlanchinol	1518	-98.7103861	20.8651806
<i>T. erecta</i>	ER101	Tlaxcoapan, Tlanchinol	2073	-99.2032806	20.1005000

<i>T. erecta</i>	ER106	Tula, Tula	2083	-99.3500000	20.0500000
<i>T. erecta</i>	ER110	Xochicuatlán, Xochicuatlán	1629	-98.6789028	20.7797889
<i>T. erecta</i>	ER113	Cuatecalco, Xochicuatlán	1685	-98.6816861	20.7766806
<i>T. erecta</i>	ER114	Tepetitla, Yahualica	515	-98.3699528	20.9698222
<i>T. erecta</i>	ER120	Entronque Tepetitla, Yahualica	480	-98.3845528	20.9614444
<i>T. filifolia</i>	FL001	Santa María, Chapulhuacán	956	-98.9038888	21.1547222
<i>T. filifolia</i>	FL002	La Cuesta Colorada, Jacala	1690	-99.1719444	21.0052778
<i>T. filifolia</i>	FL003	Juliapán, Pacula	1322	-99.2955556	21.0497222
<i>T. filifolia</i>	FL004	Buena Vista, San Bartolo Tutotepec	959	-98.2052778	20.3930556
<i>T. filifolia</i>	FL005	Tepeapulco, Tepeapulco	2546	-98.4384078	19.7126605
<i>T. filifolia</i>	FL006	Chilijapan, Tepehuacán Guerrero	882	-98.8441667	21.0130556
<i>T. lucida</i>	LC001	Apan, Apan	2546	-98.4384078	19.7126605
<i>T. lucida</i>	LC002	Ojo de Agua, Arenal	2143	-98.8776250	20.2146778
<i>T. lucida</i>	LC003	Tiltepec, Atotonilco el Grande	2021	-98.6827778	20.3130555
<i>T. lucida</i>	LC004	Santa María, Chapulhuacán	956	-98.9038889	21.1547222
<i>T. lucida</i>	LC005	El Guajolote, Epazoyucan	2451	-98.6408093	20.0153681
<i>T. lucida</i>	LC006	La Puerta, Huautla	491	-98.2701472	21.0491306
<i>T. lucida</i>	LC007	Santa Catarina, Huejutla de Reyes	168	-98.3496944	21.1218806
<i>T. lucida</i>	LC009	Ixmiquilpan, Ixmiquilpan	1699	99.25432500	20.5038667
<i>T. lucida</i>	LC010	Panalito, Jacala	1690	99.17194440	21.0052778
<i>T. lucida</i>	LC012	Cobrecito, La Misión	1454	99.12333330	21.0897222
<i>T. lucida</i>	LC014	Camino al Real, Pachuca	2397	98.73583330	20.1225000
<i>T. lucida</i>	LC015	Juliapan, Pacula	1322	99.29555560	21.0497222
<i>T. lucida</i>	LC017	Tasquillo, Tasquillo	1873	99.48333330	20.6166667
<i>T. lucida</i>	LC018	San Juan, Tepehuacán Guerrero	882	98.84416670	21.0130556
<i>T. lucida</i>	LC019	Trancas, Zimapán	1752	99.38333333	20.7333333
<i>T. lucida</i>	LC020	Las Manzanas, Zimapán	2002	99.25194440	20.8922222
<i>T. lunulata</i>	LN001	La Magdalena, Actopan	2004	98.94500000	20.2700000
<i>T. lunulata</i>	LN004	Ojo de Agua, Arenal	2143	98.87762500	20.2146778
<i>T. lunulata</i>	LN005	Huatepango, Chipalhuacán	956	98.90388889	21.1547222
<i>T. lunulata</i>	LN008	El Jaguey, Francisco I. Madero	2018	99.09055556	20.2227778
<i>T. lunulata</i>	LN010	Jacalilla, La Misión	1454	99.12333333	21.0897222
<i>T. lunulata</i>	LN011	Palma Gorda, Mineral de la Reforma	2343	98.77416667	20.0355556
<i>T. lunulata</i>	LN013	Camino al Real, Pachuca	2397	98.73583330	20.1225000
<i>T. lunulata</i>	LN014	Pacula, Pacula	1322	99.29555560	21.0497222
<i>T. lunulata</i>	LN015	La Peña, Pisaflores	269	-99.0050000	21.1933333
<i>T. lunulata</i>	LN016	San Agustín Tlaxiaca, San Agustín Tlaxiaca	2417	-98.8741611	20.1101778
<i>T. lunulata</i>	LN017	Tasquillo, Tasquillo	1873	-99.4833333	20.6166667
<i>T. lunulata</i>	LN018	Santiago Tutotepec, Tulancingo	2155	-98.3803611	20.0745556
<i>T. lunulata</i>	LN019	Zempoala, Zempoala	2467	-98.6705556	19.9186111
<i>T. lunulata</i>	LN020	Trancas, Zimapán	1752	99.38333333	20.7333333
<i>T. micrantha</i>	MC001	Ixmiquilpan, Ixmiquilpan	1699	99.25432500	20.5038667
<i>T. micrantha</i>	MC002	Jacalilla, La Misión	1454	99.12333333	21.0897222

<i>T. micrantha</i>	MC003	Tasquillo, Tasquillo	1641	99.29476389	20.5516806
<i>T. micrantha</i>	MC004	Tlanchinol, Tlanchinol	1518	98.71038611	20.8651806
<i>T. micrantha</i>	MC005	El Cobrecito, Zimapán	1551	99.44166667	20.7880556
<i>T. moorei</i>	MR001	Mina Lomo de Toro, Zimapán	1551	99.44166667	20.7880556
<i>T. patula</i>	PT001	Bothi Baji, Actopan	2004	-98.9450000	20.2700000
<i>T. patula</i>	PT002	El Rincón, El Arenal	2029	-98.9166667	20.2166667
<i>T. patula</i>	PT003	Molango, Molango	1648	-98.7255139	20.7908389
<i>T. patula</i>	PT004	Nando, San Bartolo Tutotepec	959	-98.2052778	20.3930556
<i>T. patula</i>	PT005	Tasquillo, Tasquillo	1873	-99.4833333	20.6166667
<i>T. patula</i>	PT006	San Cristobal, Tlanchinol	1537	-98.6592917	20.9887806

5.4.2 Aislamiento de núcleos

De 50 a 100 mg de tejido fresco de cada una de las diferentes muestras se depositaron por separado en cajas Petri plásticas de 60 x 15 mm previamente colocadas sobre hielo a las cuales se adicionaron 750 μL del buffer descrito por Galbraith *et al.* (1983) (MgCl_2 45 mM, citrato de sodio 30 mM, MOPS 20 mM, Triton X-100 0.1 % (v/v), pH 7.0) enfriado con hielo. Mediante una navaja de afeitar se fraccionó el tejido hasta obtener los núcleos; el homogeneizado se filtró para eliminar residuos con un filtro de nylon de 30 μm , posteriormente se adicionaron 750 μL del buffer mencionado enjuagando el tejido cortado y filtrando la suspensión. El homogeneizado filtrado se trató con RNasa ($10 \mu\text{L mL}^{-1}$) por 10 min previo a la tinción. Para la tinción del ADN nuclear se añadieron 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de yoduro de propidio a cada muestra y se colocaron en oscuridad durante 30 minutos hasta antes del análisis.

5.4.3 Determinación del contenido de ADN

Para determinar el contenido de ADN nuclear se empleó un citómetro de flujo de enfoque electroacústico Attune (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) equipado con láseres azul y violeta (488 nm [20mW] y 405 nm [50mW]) en el Centro Regional Universitario Centro Occidente (CRUCO) de la Universidad Autónoma Chapingo.

El citómetro utilizado cuenta con una combinación de filtros para determinar la tinción con el yoduro de propidio y con el software Attune® Cytometric Software (Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA). El citómetro se calibró de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

La determinación del contenido relativo de ADN se computa automáticamente como un índice, que representa el cociente del valor medio de la intensidad de fluorescencia de los núcleos de la muestra y el estándar interno (Leblanc *et al.*, 1995). Tres lecturas se realizaron por accesión considerando que el coeficiente de variación (CV) no fuera superior al 5 % ya que es un indicador de que la muestra no tuvo impurezas (Wang y Hoffman, 2017). La estimación del contenido de ADN se realiza comparando la posición media de los picos obtenidos de los núcleos de las plantas analizadas respecto de la posición media del estándar interno de acuerdo a la siguiente fórmula (Arumuganathan y Earle, 1991):

$$\text{Contenido de ADN nuclear} = \left[\frac{\text{media de núcleos de la planta}}{\text{media de núcleos del estándar}} \right] \times \text{Contenido de ADN del estándar}$$

Los valores del índice fueron transformados a valores absolutos (picogramos de ADN nuclear). Para ello se consideró el valor absoluto del ADN de cebada (*Hordeum vulgare*) var. Sultan de 2C = 11.12 pg referida por Johnston *et al.* (1999).

5.4.4 Análisis estadístico

El contenido absoluto de ADN entre y dentro de la colección de materiales analizados se analizó mediante el procedimiento PROC GLM del paquete SAS (1993). La comparación de medias se hizo con base en la prueba de Tukey.

5.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido promedio de ADN (2C) para la especie *T. erecta* fue de 3.18 pg, en *T. filifolia* de 4.08 pg, en *T. lucida* de 2.78 pg, en *T. lunulata* de 2.57 pg, en *T. micrantha* de 3.64 pg, en *T. moorei* 3.72 pg, y en *T. patula* 5.38 pg (Cuadro 18). Así, la variación total del contenido de ADN en las poblaciones de *Tagetes* estudiadas fue de 2.33 a 5.57 pg.

Cuadro 18. Contenido de ADN nuclear (2C) en las poblaciones de *Tagetes* estudiadas.

Id.	Población	Media de núcleos	Contenido de ADN (pg) ^z	Desviación estándar
ER001	<i>T. erecta</i>	507341	3.17 d	0.04
ER008	<i>T. erecta</i>	505740	3.16 d	0.10
ER010	<i>T. erecta</i>	512142	3.20 d	0.03
ER015	<i>T. erecta</i>	528146	3.30 d	0.06
ER016	<i>T. erecta</i>	515343	3.22 d	0.12
ER018	<i>T. erecta</i>	510541	3.19 d	0.04
ER019	<i>T. erecta</i>	512142	3.20 d	0.06
ER020	<i>T. erecta</i>	507341	3.17 d	0.03
ER022	<i>T. erecta</i>	505740	3.16 d	0.02
ER023	<i>T. erecta</i>	499338	3.12 d	0.08
ER024	<i>T. erecta</i>	507341	3.17 d	0.11
ER029	<i>T. erecta</i>	504140	3.15 d	0.05
ER035	<i>T. erecta</i>	547352	3.42 d	0.04
ER039	<i>T. erecta</i>	515343	3.22 d	0.10
ER043	<i>T. erecta</i>	513742	3.21 d	0.03
ER045	<i>T. erecta</i>	515343	3.22 d	0.06
ER053	<i>T. erecta</i>	512142	3.20 d	0.12
ER056	<i>T. erecta</i>	507341	3.17 d	0.10
ER057	<i>T. erecta</i>	504140	3.15 d	0.07
ER058	<i>T. erecta</i>	505740	3.16 d	0.03
ER059	<i>T. erecta</i>	481733	3.01 d	0.06
ER060	<i>T. erecta</i>	484934	3.03 d	0.09
ER062	<i>T. erecta</i>	483334	3.02 d	0.03
ER064	<i>T. erecta</i>	507341	3.17 d	0.10
ER065	<i>T. erecta</i>	510541	3.19 d	0.11

ER067	<i>T. erecta</i>	500939	3.13 d	0.05
ER069	<i>T. erecta</i>	502539	3.14 d	0.04
ER073	<i>T. erecta</i>	505740	3.16 d	0.09
ER081	<i>T. erecta</i>	481733	3.01 d	0.08
ER084	<i>T. erecta</i>	497738	3.11 d	0.04
ER087	<i>T. erecta</i>	512142	3.20 d	0.12
ER089	<i>T. erecta</i>	499338	3.12 d	0.09
ER090	<i>T. erecta</i>	504140	3.15 d	0.05
ER091	<i>T. erecta</i>	513742	3.21 d	0.06
ER096	<i>T. erecta</i>	510541	3.19 d	0.09
ER097	<i>T. erecta</i>	531347	3.32 d	0.03
ER099	<i>T. erecta</i>	529747	3.31 d	0.04
ER101	<i>T. erecta</i>	505740	3.16 d	0.06
ER106	<i>T. erecta</i>	500939	3.13 d	0.10
ER110	<i>T. erecta</i>	524945	3.28 d	0.03
ER113	<i>T. erecta</i>	516943	3.23 d	0.08
ER114	<i>T. erecta</i>	532948	3.33 d	0.05
ER120	<i>T. erecta</i>	529747	3.31 d	0.05
FL001	<i>T. filifolia</i>	654581	4.09 b	0.07
FL002	<i>T. filifolia</i>	640177	4.00 b	0.11
FL003	<i>T. filifolia</i>	644979	4.03 b	0.04
FL004	<i>T. filifolia</i>	676988	4.23 b	0.06
FL005	<i>T. filifolia</i>	648180	4.05 b	0.08
FL006	<i>T. filifolia</i>	652981	4.08 b	0.11
LC001	<i>T. lucida</i>	454526	2.84 e	0.05
LC002	<i>T. lucida</i>	449725	2.81 e	0.06
LC003	<i>T. lucida</i>	446524	2.79 e	0.07
LC004	<i>T. lucida</i>	448124	2.80 e	0.03
LC005	<i>T. lucida</i>	427318	2.67 e	0.09
LC006	<i>T. lucida</i>	449725	2.87 e	0.10
LC007	<i>T. lucida</i>	468930	2.93 e	0.06
LC009	<i>T. lucida</i>	456126	2.79 e	0.03
LC010	<i>T. lucida</i>	448124	2.80 e	0.04
LC012	<i>T. lucida</i>	444923	2.78 e	0.09
LC014	<i>T. lucida</i>	454526	2.84 e	0.08
LC015	<i>T. lucida</i>	459327	2.71 e	0.03
LC017	<i>T. lucida</i>	452925	2.83 e	0.11
LC018	<i>T. lucida</i>	432120	2.70 e	0.10
LC019	<i>T. lucida</i>	412914	2.58 e	0.05
LC020	<i>T. lucida</i>	417716	2.61 e	0.06
LN001	<i>T. lunulata</i>	441722	2.76 e	0.09
LN004	<i>T. lunulata</i>	424117	2.65 e	0.10
LN005	<i>T. lunulata</i>	406513	2.54 e	0.07

LN008	<i>T. lunulata</i>	398510	2.49 e	0.04
LN010	<i>T. lunulata</i>	416115	2.60 e	0.08
LN011	<i>T. lunulata</i>	414515	2.59 e	0.08
LN013	<i>T. lunulata</i>	433720	2.71 e	0.07
LN014	<i>T. lunulata</i>	374504	2.34 e	0.11
LN015	<i>T. lunulata</i>	376104	2.35 e	0.10
LN016	<i>T. lunulata</i>	435321	2.72 e	0.10
LN017	<i>T. lunulata</i>	441722	2.75 e	0.09
LN018	<i>T. lunulata</i>	414515	2.59 e	0.06
LN019	<i>T. lunulata</i>	396910	2.48 e	0.05
LN020	<i>T. lunulata</i>	372903	2.33 e	0.03
MC001	<i>T. micrantha</i>	580961	3.63 c	0.07
MC002	<i>T. micrantha</i>	553753	3.46 c	0.09
MC003	<i>T. micrantha</i>	593764	3.71 c	0.05
MC004	<i>T. micrantha</i>	592164	3.70 c	0.07
MC005	<i>T. micrantha</i>	588963	3.68 c	0.09
MR001	<i>T. moorei</i>	595365	3.72 c	0.11
PT001	<i>T. patula</i>	819427	5.12 a	0.04
PT002	<i>T. patula</i>	867440	5.42 a	0.06
PT003	<i>T. patula</i>	854637	5.34 a	0.03
PT004	<i>T. patula</i>	891447	5.57 a	0.05
PT005	<i>T. patula</i>	864239	5.40 a	0.10
PT006	<i>T. patula</i>	872242	5.45 a	0.07

Para la especie *T. erecta*, los valores de contenido de ADN oscilaron entre 3.01 y 3.42 pg con una media de 3.18 ± 0.11 pg. Las poblaciones con los valores más altos fueron: ER035 (3.42 pg), ER097 (3.32 pg) y ER114 (3.33 pg), cuyas poblaciones pertenecen a Huehuetla, Tlanchinol y Yahualica respectivamente, localidades que forman parte de la Huasteca Hidalguense (INEGI, 2007) cuyos climas predominantes son el cálido subhúmedo y templado húmedo con altitudes bajas (427 a 537 msnm), mientras que para los valores más bajos se encuentran los puntos ER059 (3.01 pg), ER060 (3.03 pg), ER062 (3.02 pg) y ER081 (3.01 pg) correspondientes a los poblados La Misión, Lolotla y San Bartolo Tutotepec respectivamente, las cuales pertenecen al eje Neovolcánico que atraviesa el estado y de climas mayormente cálido subhúmedo, semicálido y templado con altitudes más elevadas con respecto de las anteriores (1454 a 1544 msnm).

Aunque en las partes altas o bajas hay ciertas diferencias climáticas, la variabilidad en el ADN nuclear se encuentra asociada con la altitud: a menor altitud mayor tamaño de genoma y va disminuyendo a mayor altitud. Lo esperado sería que con la variación altitudinal también habrían cambios en temperatura, y así relacionar el ADN nuclear con este factor físico, sin embargo, es necesaria la consulta de estaciones meteorológicas locales. La tendencia antes referida para *T. erecta* también se observó para *T. filifolia* y *T. lunulata*. En *T. filifolia*, con promedio de 4.08 ± 0.08 pg, el contenido más alto de ADN nuclear lo tuvo la población FL004 (4.23 pg) ubicada a 959 msnm y clima templado, mientras que el valor más bajo fue para FL002 (4.00 pg) localizada a una altitud de 1690 msnm en clima cálido subhúmedo. En *T. lucida*, con promedio de 2.78 ± 0.09 pg, los valores altos 2.93 pg y 2.87 pg se registraron en las poblaciones LC007 y LC006, altitudes de 168 a 491 msnm, respectivamente, y clima cálido subhúmedo; mientras que las poblaciones con menor contenido de ADN (LC019, 2.58 pg y LC020, 2.61 pg) se encontraron en altitudes de 1752 y 2002 msnm, respectivamente.

Sin embargo, en *T. lunulata* se obtuvieron valores de alto o de bajo contenido de ADN nuclear en altitudes elevadas como en: LN005 con 2.76 pg (2004 msnm) y LN020 con 2.33 (1752 msnm). En *T. micrantha* también se observó que valores altos (MC003, 3.71 pg y MC004, 3.70 pg) o bajos (MC002, 3.46 pg) se obtuvieron en altitudes parecidas (1641, 1518 y 1454 msnm, respectivamente). En estos casos, es necesaria información meteorológica precisa para verificar si existe variabilidad climática.

La especie *T. moorei* cuyo contenido de ADN fue de 3.72 pg, es de condición endémica, muy cercana en tamaño de genoma con algunas poblaciones de *T. micrantha*, aunque diferente del promedio poblacional (3.64 pg). La información sobre tamaño del genoma en endémicas es muy importante en análisis sobre evolución de las especies (Valles *et al.*, 2013), por lo que el análisis de otras endémicas de México como *T. parryi*, *T. lacera*, *T. oaxacana*, *T. mulleri*,

entre otras, podría aportar nuevos conocimientos sobre la evolución de *Tagetes* de México.

La especie *T. patula*, debido a su condición de tetraploide (Towner, 1961), tuvo un valor promedio de 5.38 ± 0.06 pg, lo cual es similar a los resultados reportados por Serrato (2000). No obstante, el valor más bajo (5.12 pg) correspondió a una población con altitud de 2004 msnm y clima templado, mientras que el más alto (5.57 pg) a una población de menor altitud (959 msnm) de igual clima. Con lo cual se puede decir que aparentemente el clima no tiene influencia directa en el contenido de ADN, no así con la altitud pues para esta especie, a mayor altitud existe menor cantidad de ADN, caso contrario con las poblaciones de menor altitud que mostraron mayor cantidad de ADN, lo cual coincide para las poblaciones de las especies de *T. erecta*, *T. filifolia*, *T. lucida* y *T. patula*, probablemente debido a que fueron poblaciones de mayor número de individuos y se pudo establecer esa relación, no así con las especies de menor tamaño.

5.6 CONCLUSIONES

La citometría de flujo representa una técnica útil, rápida y confiable para determinar el contenido de ADN en plantas, lo cual facilita estudios de carácter citológico.

El contenido de ADN pudiera estar relacionado con factores tales como la altitud pues para la mayoría de las especies estudiadas, a menor altitud se encontraron los valores más altos de contenido de ADN, mientras que a altitudes mayores se vió disminuido.

5.7 BIBLIOGRAFÍA

- Arumuganathan, K., & Earle, E. D. (1991). Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9(3), 229-241.
- Bennett, M. D., Bhandol, P., & Leitch, I. J. (2000). Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses 807 new estimates. *Annals of Botany*, 86(4), 859-909.
- Caponi, G. (2011). Taxa as types: Buffon, Cuvier and Lamarck. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, 18(1), 15-31.
- Cavallini, A., & Natali, L. (1991). Intraspecific variation of nuclear DNA content in plant species. *Caryologia*, 44(1), 93-107.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. CONABIO. México: 2012.
- De Azkue, D., & Martinez, A. (1984). Variación del cariotipo, volumen nuclear y contenido de ADN en siete especies de *Oxalis*. *Darwiniana*, 267-277.
- Dole, J. M., & Wilkins, H. F. (1999). Floriculture: Principles and species. *Prentice-Hall Inc.* 533-535.
- Dolezel, J. (1997) Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics*. 38:285-302.
- Galbraith, D. W., Harkins, K. R., Maddox, J. M., Ayres, N. M., Sharma, D. P., & Firoozabady, E. (1983). Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, 220(4601), 1049-1051.
- INEGI, (2007). Anuario estadístico. Hidalgo. Tomos I, II. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Aguascalientes 1156 p.
- Jones, R. N., & Brown, L. M. (1976). Chromosome evolution and DNA variation in *Crepis*. *Heredity*, 36(1), 91-104.

- Johnston, J. S., Bennett, M. D., Rayburn, A. L., Galbraith, D. W., & Price, H. J. (1999). Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *American Journal of Botany*, 86(5), 609-613.
- Lawrence, M. E. (1985). *Senecio* L.(Asteraceae) in Australia: nuclear DNA amounts. *Australian Journal of Botany*, 33(2), 221-232.
- Leblanc, O., Duenas, M., Hernandez, M., Bello, S., Garcia, V., Berthaud, J., & Savidan, Y. (1995). Chromosome doubling in *Tripsacum*: the production of artificial, sexual tetraploid plants. *Plant Breeding*, 114(3), 226-230.
- Mittermeier, R., & Goettsch, C. (1992). La importancia de la diversidad biológica de México. México ante los Retos de la Biodiversidad. Ed. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, 63-73.
- Orrillo, M., & Bonierbale, M. (2009). Biología reproductiva y citogenética de la papa. *International Potato Center*, Lima, 9-17.
- Price, H. J., & Bachmann, K. (1975). DNA content and evolution in the Microseridinae. *American Journal of Botany*, 262-267.
- Rebolledo, F. A., & CIMA, D. M. (2006). Genoma humano. Parte II. Reflexión epigenética. *Plasticidad y Restauración Neurológica*, 5(1), 62-69.
- Sabillón, A., & Bustamante, M. (1996). Guía fotográfica para la identificación de plantas con propiedades plaguicidas parte I. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Tegucigalpa Honduras. 110 p.
- SAS Institute (1993). SAS/STAT Users Guide. Ver. 6. 4th ed. SAS Institute Inc. NC, USA. 1686 p.
- Serrato, M. A. (2004). Colecta, caracterización y aprovechamiento de *Tagetes erecta* L. Como Ornamental. Avances. Metodología De Investigación. Texcoco: Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, 1-109.

- Serrato, 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 especies de las que México es centro de origen y diversidad genética, 63.
- Serrato, M. A. (2014). El Recurso Genético Cempoalxóchitl (*Tagetes* spp) de México (Diagnóstico). Universidad Autónoma Chapingo- SINAREFI-SNICS-SAGARPA. 182 p.
- Serrato, M. A., Hernández, & R.M., Savidan, Y. (2000). Contenido de ADN y nivel de ploidía en *Tagetes* spp utilizando citómetro de flujo. *Agrociencia*, 34:729-734.
- Strother, J. L. (1977). *Tagetes*-systematic review. In: The Biology and Chemistry of the Compositae. Heywood, V. H., J. B. Harborne, and B. O. Turner (eds.). Academic Press. New York. USA. 769-783.
- Towner, J. W. (1961). Cytogenetic studies on the origin of *Tagetes patula*. I. Meiosis and morphology of diploid and allotetraploid *T. erecta* X *T. tenuifolia*. *American Journal of Botany*, 743-751.
- Turner, B. L., and G. L. Nesom. 1993. Biogeography, diversity, and endangered or threatened status of Mexican Asteraceae. In: Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution. Ramamoorthy, T. P., R. Bye, A. Lot, and J. Fa (eds.). Oxford Univ. Press. New York, USA. 290-299.
- Vallès, J., Canela, M. Á., Garcia, S., Hidalgo, O., Pellicer, J., Sánchez-Jiménez, I., & Garnatje, T. (2013). Genome size variation and evolution in the family Asteraceae. *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*, 66(3), 221-235.
- Villavicencio, M. A., Pérez, B. E. & Gordillo, A. J. (2010). Plantas tradicionalmente usadas como plaguicidas en el Estado de Hidalgo, México. *Polibotánica*. 30:193-238.

Wang, L., & Hoffman, R. A. (2017). Standardization, calibration, and control in flow cytometry. *Current Protocols in Cytometry*, 1-3.