

Generación y caracterización de una población de *Tagetes minuta* de base genética amplia - Obtención de individuos selectos

Generation and characterization of a population of *Tagetes minuta* of broad genetic base - Obtaining selected individuals

Massuh Y^{1,2}, LE Torres¹, SF Ocaño¹, P Bruentti¹, AG Chaves¹, JA Zygodlo², MS Ojeda¹

Resumen. *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) es una hierba aromática anual que presenta gran interés por las propiedades bioactivas de su aceite esencial (AE) y su uso industrial. En Argentina se extraen 0,5 tn/año de AE obtenido de poblaciones silvestres con un valor de 80-120 US\$/kg. Resulta de interés introducir en cultivo la especie iniciando un proceso de domesticación, selección y mejoramiento orientado a generar material de mayor rendimiento y calidad de AE como alternativa a la recolección silvestre. Se planteó como objetivo la generación de una población de base genética amplia para obtener gran variabilidad fenotípica, caracterizar morfológica y químicamente los individuos e identificar y seleccionar aquellos destacados por los caracteres de interés. A partir de semillas obtenidas del libre cruzamiento de plantas de diferentes procedencias, cultivadas en un ensayo preliminar, se generó en parcela experimental una población de base genética amplia. En las plantas se midieron caracteres morfológicos cuantitativos y cualitativos con los que se definió el criterio de selección para conformar la población selecta. Un 26% de las plantas evaluadas cumplieron con los criterios de selección morfológicos (altura, estructura de planta y N° de ramas) y de éstas un 2,7% fueron de interés por su composición de AE (individuos selectos). Se hicieron análisis descriptivos, de componentes principales y de correspondencia. Se encontró gran variabilidad en la población de base genética amplia, los caracteres definidos permitieron comparar y diferenciar las plantas evaluadas por lo que constituyen buenos descriptores de la especie. Los individuos selectos se diferenciaron morfológicamente en dos grupos y a nivel químico se diferenciaron tres grupos por su compuesto mayoritario en el AE. La selección de los individuos constituye la etapa inicial y posibilitará continuar con el proceso de domesticación y mejoramiento de la especie orientado a la obtención de quimiotipos.

Palabras clave: *Tagetes minuta*; Variabilidad; Cultivo; Mejoramiento genético; Aceite esencial.

Abstract. *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) is an annual herb that is of great interest due to the bioactive properties of its essential oil (EO) and its industrial use. In Argentina, 0.5 tons/year of EO are obtained from wild populations and commercialized with a value of 80-120 US\$/kg. The introduction of the species in culture, and the initiation of a process of domestication, selection and breeding material aimed at generating higher yields and quality of EO as an alternative to wild collection. The goal of this work was to generate a population with a broad genetic base to obtain high phenotypic variability, and characterize the individuals morphologically and chemically, thus identifying and selecting those with outstanding characteristics. From seeds obtained by free crossing of plants of different provenances grown in a preliminary test, a population of broad genetic base was generated in an experimental plot. Quantitative and qualitative morphological traits were measured in all plants and the selection criteria were defined to form a selected population. The morphological selection criteria (height, plant structure and N° of branches) were met by 26% of the evaluated plants, of which 2.7% presented interesting EO compositions (selected individuals). Descriptive, principal components and correspondence analysis were made. Great variability in the population of broad genetic base was found regarding the analyzed characters. Since our character definitions allowed to compare and differentiate the evaluated plants, they were considered as good descriptors of the species. The selected individuals were differentiated morphologically into two groups and chemically into three groups, which differed in their EO main compound. The selection of these individuals constitutes the initial stage of this ongoing work that will enable us to continue the process of domestication and breeding of the species oriented to obtain selected chemotypes.

Keywords: *Tagetes minuta*; Variability; Crop; Genetic breeding; Essential oil.

¹ Cátedra de Genética, Facultad de Ciencias Agropecuarias - Universidad Nacional de Córdoba, Ing. Agr. Félix Aldo Marrone 746, Ciudad Universitaria, CP 5000, Córdoba, Argentina.

² Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV)-CONICET. Cátedra de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales - Universidad Nacional de Córdoba, Av. Vélez Sarfield 1611, Ciudad Universitaria, CP 5000, Córdoba, Argentina.

Address correspondence to: Yamile Massuh, Tel.: 0054-351-4334116/17, Fax: 0054-351-4334118, e-mail: ymassuh@yahoo.com.ar

Received 7.IX.2014. Accepted 1.III.2016.

INTRODUCCIÓN

Tagetes minuta L. (Asteraceae) es una hierba aromática anual originaria de regiones cálidas de América Central y del Sur, presente en el norte y centro de Argentina (Petenatti y Ariza Espinar, 1997). Ampliamente dispersada por actividades antrópicas, su distribución actual es cosmopolita (Martínez-Ghersa et al., 2000). Estudios sobre la biología reproductiva de la especie reflejan que posee la capacidad de polinizarse por autogamia -interviene polen de la misma flor-, geitonogamia -interviene polen de otra flor de la misma planta- y xenogamia -interviene polen de otra planta- (Visintin y Bernardello, 2005). Estas posibilidades de cruzamientos al azar determinan, entre otros factores, que exista gran variabilidad intra e interpoblacional. La especie se caracteriza por su aceite esencial (AE) que se encuentra en hojas y flores, y está compuesto principalmente por los monoterpenos E- y Z-ocimeno, E- y Z-tagetona, dihidrotagetona, limoneno y ocimeno (Alonso, 2004).

Si bien *T. minuta* es considerada una maleza de los cultivos tradicionales, es altamente demandada por las propiedades bioactivas de su AE (Singh et al., 2002; Ball-Coelho et al., 2003; Cestari et al., 2004; Furtado et al., 2005; Ruffinengo et al., 2007; Al-Musayeb et al., 2012) y por su aplicación en las industrias de perfumería y alimentos (Leung y Foster, 1996; Singh et al., 2003). Argentina, India, Egipto, Sudáfrica y Zimbabue constituyen los principales países exportadores de AE de *T. minuta* (Baser y Buchbauer, 2010). En Argentina se extraen aproximadamente 0,5 tn/año de AE de *T. minuta*, obtenido de poblaciones silvestres, que se comercializa a un valor de 80-120 US\$/kg (Bandoni, 2002). La utilización del recurso natural se realiza sin considerar la presión de extracción, que conlleva un costo ambiental y la pérdida de variabilidad genética en las poblaciones silvestres. Según el Índice de prioridad de conservación de especies vegetales elaborado por Martínez (2003) para el Valle de Paravachasca (provincia de Córdoba), *T. minuta* se encuentra en el puesto 8° entre 35 hierbas citadas. Dicho índice considera la sensibilidad ecológica, la demanda comercial y el origen de la especie para el área por lo que refleja integralmente su estado e importancia respecto a la utilización. En países en desarrollo la obtención del 95% de las plantas aromáticas y medicinales es por recolección de poblaciones silvestres (Karki, 2002) y en Europa menos del 10% de las especies comercializadas son cultivadas (Vines, 2004). Como resultado, la necesidad de fomentar el cultivo de estas especies es a nivel mundial. El cultivo de plantas medicinales tiene ventajas respecto a la recolección silvestre que normalmente varía en calidad y composición del AE debido a diferencias ambientales y genéticas (Amujoyegbe et al., 2012). Arora et al. (2010) plantean otras ventajas del cultivo en relación a la producción: 1) la optimización del rendimiento y alta calidad del producto; 2) la correcta identificación del material vegetal; 3) la reducción de variabilidad genética y fenotípica;

4) la reducción o ausencia de contaminantes; 5) la reducción de la variabilidad en extractos y en su inestabilidad, y 6) la disponibilidad en gran cantidad de material sin generar problemas ambientales asociados a la extracción.

En este contexto, resulta de interés introducir en cultivo la especie iniciando un proceso de domesticación, selección y mejoramiento orientado a generar material de mayor rendimiento y calidad de AE. Debido a que *T. minuta* es una especie nativa en Argentina, con poblaciones adaptadas a diferentes condiciones ambientales y con amplia variabilidad, es necesario que dicha variabilidad sea considerada para caracterizar y evaluar la especie.

La hipótesis de este trabajo fue que al comparar en un mismo ambiente individuos de *T. minuta* de distintas procedencias, se expresan características morfológicas y de AE diferenciales, que pueden ser heredadas por la descendencia. Dicha hipótesis se puso a prueba con los siguientes objetivos: (1) generar una población de base genética amplia para obtener gran variabilidad fenotípica intraespecífica, (2) realizar su caracterización morfológica y química, y (3) identificar y seleccionar individuos que se destaquen en los caracteres de interés.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de Base Genética Amplia. Se recolectaron semillas de 5 poblaciones silvestres de la provincia de Córdoba lo suficientemente distantes para garantizar el aislamiento reproductivo (Tabla 1). Un ejemplar de cada población silvestre fue depositado en el Herbario de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba (Tabla 1). Con dichas semillas se generaron plantines en invernadero que fueron llevados a un ensayo a campo con diseño completamente aleatorizado donde se evaluaron conjuntamente las 5 poblaciones silvestres (Massuh, 2007). Las semillas obtenidas del libre cruzamiento de las plantas de dicho ensayo fueron utilizadas para conformar la población de base genética amplia. Se consideró que dicha población presentó una base genética amplia debido a que contuvo la diversidad genética de *T. minuta* de diferentes zonas de la provincia de Córdoba. Las semillas fueron sembradas en invernadero, y los plantines obtenidos se mantuvieron bajo condiciones controladas hasta su trasplante a campo.

Ensayo a campo. Plantines representativos de la variabilidad natural (672 en total), se llevaron a una parcela experimental ubicada en un campo en la localidad de Alta Gracia (Ruta C-45 Km 2, Córdoba, Argentina; 31° 38' 10" S – 64° 26' 12" O). Dicha parcela estuvo constituida por 24 surcos de 28 plantas cada uno, con una distancia de plantación de 0,70 m entre surcos y 0,50 m entre plantas sobre el surco. Las plantas se mantuvieron a campo por un período de cinco meses, con las labores culturales necesarias (Muñoz, 2000; Ojeda, 2004).

Tabla 1. Ubicación cartográfica, altitud, precipitaciones y número del ejemplar de herbario de las poblaciones silvestres de *T. minuta* de la provincia de Córdoba de las que se recolectaron las semillas.

Table 1. Geographical location, altitude, rainfall, and number of herbarium specimen of wild populations of *T. minuta* in Córdoba province from which the seeds were collected.

Localidad	Latitud Sur	Longitud Oeste	Altitud (msnm)	Precipitación anual (mm)	Número de Herbario
Villa Fontana	30° 53'	63° 07'	137	700	GR 591
Río Cuarto	33° 08'	64° 21'	452	847	GR 590
Quilino	30° 13'	64° 31'	402	548	GR 589
Falda del Carmen	31° 35'	64° 28'	650	654	GR 587
Alta Gracia	31° 40'	64° 26'	553	769	GR 588

Los caracteres cuantitativos y cualitativos evaluados fueron aquellos que mejor explican la variabilidad existente en *T. minuta* (Massuh, 2007). Los caracteres cuantitativos fueron (1) altura de planta: inicial, a 30 y 60 días del trasplante, y final (cm); (2) N° de ramas; y (3) peso (g) fresco y seco de planta completa (PFPC y PSPC), del eje principal (PFEP y PSEP) y de planta completa sin eje principal (PFPCs/EP y PSPC/sEP). A partir de los caracteres medidos se estimaron variables relacionadas con el crecimiento (altura final-altura inicial); densidad (laxa o densa) de inflorescencias; relación eje principal/planta (%EP/PLANTA) y contenido de agua por planta (%H₂O/PLANTA). Los caracteres cualitativos registrados fueron estructura de planta; presencia de eje principal; disposición (intercalar o terminal), y color (blanca o amarilla) de las inflorescencias; prevalencia de botones florales y pimpollos, de flores y de frutos. Los caracteres relacionados con el ciclo fenológico fueron relevados en el mismo día a partir de que el 100% de las plantas inició el proceso de floración.

Se utilizó el método de selección individual (Cubero, 2003) adaptado para seleccionar individuos que presentaron todas las características deseadas de manera simultánea. En base a resultados preliminares (Massuh, 2007) se definieron como criterio de selección los caracteres altura de planta (*h*), estructura de planta y número de ramas (*N° de ramas*). Dichos caracteres fueron medidos en todas las plantas 60 días después del trasplante; antes de la aparición de botones florales. Se consideró el valor medio poblacional para establecer el límite inferior de cada carácter del criterio de selección. El criterio para definir la población selecta quedó definido de la siguiente manera:

$$\text{Planta selecta} = h (\geq \bar{X}) + \text{Estructura selecta de planta} + \text{N° de Ramas} (\geq \bar{X})$$

Las plantas de la población de base genética amplia que cumplieron con el criterio de selección constituyeron la población selecta. Cada planta seleccionada fue cosechada individualmente (manteniendo su identificación) en plena floración que es el

período de mayor rendimiento del AE (Muñoz, 2000; Singh et al., 2003). A cada planta se le cubrieron algunas ramas florales en estadio de botones florales para garantizar la autofecundación, y obtener semillas para su uso en ensayos posteriores.

Obtención y análisis del aceite esencial. El AE de cada planta de la población selecta se extrajo por hidrodestilación en equipo Clevenger modificado. El rendimiento en AE se estimó como mL en 100 g de material vegetal seco. La composición relativa de cada muestra de AE fue determinada por Cromatografía Gaseosa-Espectrometría de Masa en un equipo Claruss 600 de Perkin Elmer. Se empleó una columna capilar de sílica fundida Perkin Elmer DB5 MS (60 m de largo; 0,25 mm de diámetro; 0,25 µm de espesor de fase líquida) y helio como gas portador (49,60 psi). La inyección de las muestras fue realizada en modo split. La ionización se llevó a cabo por impacto de electrones con energía de ionización de 70 eV. Las condiciones del programa de temperatura del horno fueron inicialmente 60 °C (durante 5 min), incrementando 5 °C/min hasta llegar a los 240 °C que se mantuvieron por 10 minutos. La presión en la cabeza de la columna fue de 15 psi y la temperatura del inyector de 250 °C. La línea de transferencia del cromatógrafo gaseoso se mantuvo a 200 °C. Los cromatogramas fueron adquiridos en modo "Scan" escaneando los cuadrupolos *m/z*= 50-300. Los compuestos fueron identificados por comparación de los índices de retención y sus espectros de masa mediante la biblioteca NIST MS 2.0 y Adams (2007). Se calcularon las áreas relativas de los 7 compuestos principales del AE y la relación entre el área de la suma de éstos y el área total, expresadas en porcentaje.

Fueron identificadas aquellas plantas de la población selecta que presentaron alto porcentaje de uno o varios de los compuestos principales del AE: E- y Z-ocimena, E- y Z-tagetona, dihidrotagetona, limoneno y ocimeno. Estas plantas constituyeron los individuos selectos.

Análisis estadístico. Se realizaron análisis descriptivos a los fines de caracterizar la población de base genética amplia, la población selecta y los individuos selectos. Se estableció el

diferencial de selección (DS) para los caracteres utilizados como criterio de selección. La caracterización de los individuos selectos se realizó a nivel cuantitativo (caracteres morfológicos y de rendimiento de AE) y cualitativo (caracteres morfológicos y fenológicos). Los resultados fueron analizados estadísticamente utilizando el software *InfoStat* (Di Rienzo *et al.*, 2013). Se realizaron análisis multivariados de componentes principales (ACP) para los caracteres cuantitativos (datos estandarizados) y de correspondencia para los cualitativos.

RESULTADOS

De las 672 plantas que constituyeron la población de base genética amplia, 453 sobrevivieron al trasplante. La mortalidad fue elevada (32%) debido a que las plantas tuvieron que soportar el estrés del trasplante, el manejo en cultivo y las nuevas condiciones ambientales.

Para el carácter estructura de planta se observaron 5 formas de las cuales se seleccionaron dos (Fig. 1 a y b) por presentar más ramificaciones y follaje, y por diferenciarse de la estructura característica de los individuos silvestres (Fig. 1 c).

La población de base genética amplia mostró amplia variabilidad en cuanto a los caracteres definidos como criterio de selección (Tabla 2).

A partir de la caracterización de la población de base genética amplia se definieron los límites del criterio de selección. Los valores promedio fueron 115 cm para altura de planta, y 13 ramas para N° de ramas; las estructuras selectas fueron la a o la b (Fig. 1).

Planta selecta = $h (\geq 115 \text{ cm}) + \text{Estructura selecta de planta (a o b)} + \text{N}^\circ \text{ de Ramas} (\geq 13)$

El 26% de las plantas de la población de base genética amplia cumplió con las tres condiciones establecidas como criterio de selección (Tabla 3). Estos 117 individuos constituyeron

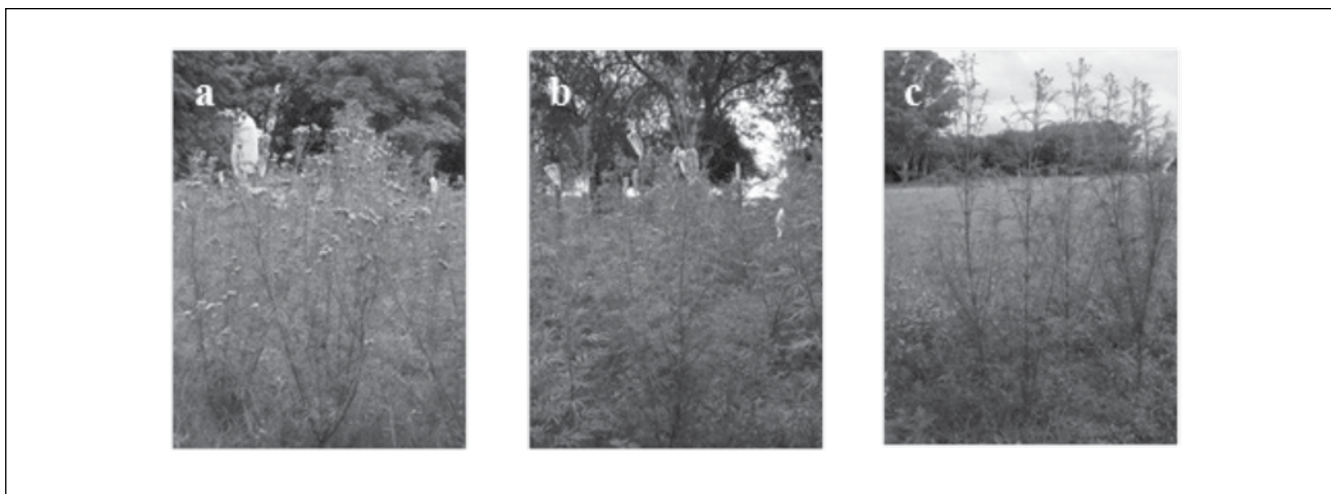


Fig. 1. Estructura de plantas de *T. minuta*. (a) Las ramificaciones son de largo similar y nacen a la misma altura, no hay eje principal. (b) Las ramificaciones nacen a lo largo del eje principal siendo más largas las de la base de la planta. (c) Las ramificaciones son de una longitud similar y nacen a lo largo del eje principal; es la estructura característica de la especie.

Fig. 1. Structure of *T. minuta* plants. (a) The ramifications are of similar length and are born at the same height; there is no main shaft. (b) The branches arise along the main shaft, being longer those born at the base than upper in the plant. (c) The ramifications have a similar length and are born along the main shaft (this is the characteristic structure of the species).

Tabla 2. Población de base genética amplia: medidas de resumen. Caracteres cuantitativos y cualitativos utilizados como criterio de selección morfológica.

Table 2. Summary of the characteristics of the population of broad genetic base. Quantitative and qualitative traits used for morphological selection criterion.

Caracteres Cuantitativos	Plantas totales	Promedio (cm)	Error Estándar (cm)	Coefficiente de Variación (%)	Valor Mínimo (cm)	Valor Máximo (cm)
Altura 60 días	453	115	1,44	27,60	19	197
N° Ramas	453	13	0,43	69,23	1	46

Carácter Cualitativo	Plantas totales	Estruc. "a" (%)	Estruc. "b" (%)	Estruc. "c" (%)	Otras Estruc. (%)
Estructura	453	27,81	51,65	13,47	7,07

la población selecta la cual superó el valor promedio de la población de base genética amplia tanto para la altura de planta (DS = 38 cm) como para el número de ramas por planta (DS = 10 ramas). Además estos caracteres presentaron menor variabilidad que en la población de base genética amplia donde los coeficientes de variación fueron mayores.

Doce plantas de la población selecta, las cuales constituyeron los individuos selectos, se destacaron por la composición química de su AE. En éstos, los 7 compuestos principales del AE conformaron en promedio el 85,6 % de la composición total del AE (Tabla 4). En los individuos selectos se observó gran variabilidad en todos los caracteres evaluados, tanto cuantitativos (Tabla 5) como cualitativos (Fig. 2), excepto para estructura de planta que sólo fue representada por la forma *b* (Fig. 1).

El ACP con los caracteres morfológicos cuantitativos mostró que el 70,9% de la variabilidad observada entre los individuos selectos fue explicada por las dos primeras componentes (CP1 y CP2) (Fig. 3). A nivel de la CP1, componente

que explica el 42,7% de la variabilidad total, las variables con más inercia fueron N° de ramas y %EP/PLANTA; a nivel de la CP2 (componente que explicó el 28,2% de la variabilidad observada), las variables que permitieron establecer diferencias entre los individuos fueron PSPC/sEP y el rendimiento de AE en 100 g de material vegetal (Fig. 3). Se observó una correlación positiva para el caracter altura final con los caracteres N° de ramas, crecimiento, %H₂O/PLANTA y PSPC/sEP, los cuales fueron indicadores de mayor tamaño de planta y mayor fitomasa, características por las que se destacaron los individuos 1, 2, 3, 8, 9, 10 y 11 que también presentaron mayor producción de AE en 100 g. Por el contrario, los individuos selectos 5 y 12 fueron los de menor tamaño y número de ramas; a su vez presentaron una mayor proporción de eje principal respecto al peso total de la planta. Los individuos 4, 6 y 7 se diferenciaron de los demás por tener mayor peso seco y menor rendimiento de AE en 100 g de material vegetal.

A nivel cualitativo el individuo selecto 12 se caracterizó por su ciclo de floración acelerado ya que predominó la presencia

Tabla 3. Medidas de resumen de la población selecta. Caracteres cuantitativos y cualitativos utilizados como criterio de selección morfológica.

Table 3. Summary of measures of the selected population. Quantitative and qualitative traits used for morphological selection criterion.

Caracteres Cuantitativos	Plantas totales	Promedio (cm)	Error Estándar (cm)	Coefficiente de Variación (%)	Valor Mínimo (cm)	Valor Máximo (cm)
Altura 60 días	117	153	1,43	10,12	122,00	192,00
N° Ramas	117	23	0,58	28,45	13,00	46,00

Caracter Cualitativo	Plantas totales	Estruc. "a" (%)	Estruc. "b" (%)	Estruc. "c" (%)	Otras Estruc. (%)
Estructura	117	9,40	90,60	0,00	0,00

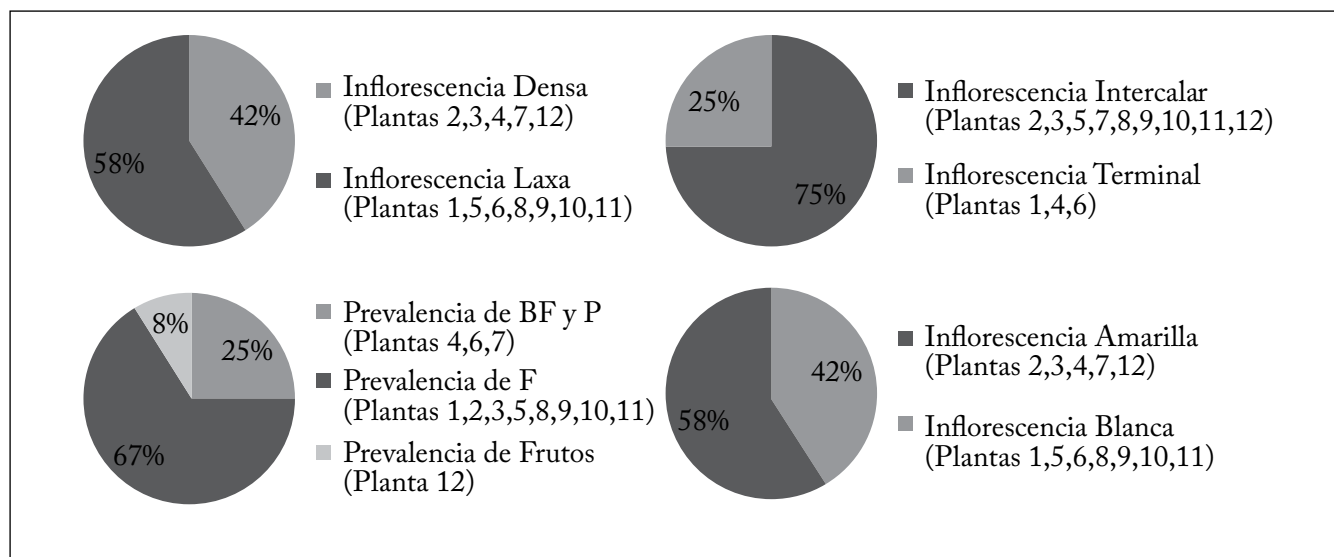


Fig. 2. Caracteres cualitativos de los individuos selectos de *T. minuta*. BF y P: Botones Florales y Pimpollos; F: Flores.
Fig. 2. Qualitative traits of selected individuals of *T. minuta*. BF y P: Boot stage and early-stage, closed petals. F: Flowers.

Tabla 4. Área relativa (%) de los compuestos principales y proporción de éstos respecto al total de compuestos del AE de los individuos selectos de *T. minuta*.

Table 4. Relative area (%) of the main compounds and their proportion in relation to the total compounds in the EO of the selected individuals of *T. minuta*.

INDIVIDUO SELECTO	limoneno	ocimeno	dihidrotagetona	E-tagetona	Z-tagetona	Z-ocimenona	E-ocimenona	Compuestos principales/ compuestos totales
1	3,29	12,94	0,39	2,08	1,82	28,25	51,23	86,75
2	1,45	7,00	0,01	1,26	1,65	24,64	63,99	88,96
3	1,43	7,02	0,05	1,20	1,50	23,80	65,00	89,24
4	3,15	3,91	72,45	8,45	0,12	3,68	8,26	86,21
5	0,61	0,05	0,16	2,87	1,35	24,91	70,05	82,99
6	2,70	39,10	41,73	8,76	0,46	7,12	0,13	89,26
7	1,67	6,18	74,10	1,30	0,44	10,58	5,74	75,34
8	1,15	0,06	0,01	4,74	1,38	41,36	51,29	81,91
9	1,10	0,08	0,03	4,45	1,24	41,10	52,00	82,15
10	1,63	9,90	0,01	2,23	9,36	33,25	43,62	87,44
11	2,02	16,69	0,02	1,30	6,36	35,37	38,25	88,98
12	5,21	12,33	0,01	0,40	4,91	30,03	47,11	88,26

Tabla 5. Caracteres cuantitativos de los individuos selectos de *T. minuta*.

Table 5. Quantitative traits of the selected individuals of *T. minuta*.

PLANTA SELECTA	A60 (cm)	AF (cm)	CRE (cm)	PSPCs/EP (g)	PSEP (g)	PSPC (g)	% EP/PL	%H2O/PL	Nº de RAMAS	AE (mL/100g)
1	144,00	161,00	111,00	74,50	19,00	93,50	20,16	61,91	28,00	0,44
2	139,00	148,00	130,00	111,50	58,00	169,50	34,21	59,59	28,00	0,50
3	139,00	146,00	132,00	109,00	55,00	164,00	33,54	60,10	29,00	0,45
4	138,00	150,00	104,00	128,00	64,00	192,00	33,33	36,00	14,00	0,12
5	115,00	122,00	79,00	64,50	25,00	89,50	27,84	53,87	14,00	0,39
6	158,00	181,00	133,00	112,00	56,00	168,00	33,33	46,41	21,00	0,14
7	154,00	176,00	115,00	254,50	83,00	337,50	24,55	56,40	22,00	0,20
8	133,00	145,00	129,00	97,00	33,00	130,00	25,34	60,55	25,00	0,50
9	133,00	144,00	127,00	105,00	40,00	145,00	27,59	54,97	23,00	0,45
10	149,00	161,00	120,00	78,00	0,00	78,00	0,00	73,91	28,00	0,40
11	166,00	191,00	146,00	114,50	27,00	141,50	19,06	64,98	28,00	0,40
12	124,00	124,00	78,00	77,00	27,00	104,00	25,79	34,59	17,00	0,40

A60: Altura a 60 días; AF: altura final; CRE: crecimiento; PSPCs/EP: peso seco planta completa sin eje principal; PSEP: peso seco eje principal; PSPC: peso seco planta completa; %EP/PC: proporción peso seco eje principal/peso seco planta completa; %H2O/PC: proporción de agua en el peso fresco de planta completa; AE: aceite esencial, PL: planta; CV: Coeficiente de variación.

de frutos; en oposición, los individuos 4, 6 y 7 presentaron floración retrasada (predominaron botones florales y pimpollos) (Fig. 4). Los individuos selectos 1, 5, 8, 9, 10, 11 y 12 se diferenciaron de las demás por sus inflorescencias blancas, laxas y de disposición intercalar; además se observó asociación para color y densidad de inflorescencias (Fig. 4).

En función de la composición del AE, las dos primeras componentes del ACP (CP1 y CP2) explicaron un 71,7% de

la variabilidad total observada entre los individuos selectos (Fig. 5). A nivel de la CP1, componente que explicó el 50,1% de la variabilidad total, las variables con más inercia fueron los compuestos dihidrotagetona y E-ocimenona. A nivel de la CP2 (componente que explicó el 21,6% de la variabilidad observada) los compuestos con mayor peso fueron el limoneno y la E-tagetona (Fig. 5). Los individuos selectos 4, 6 y 7 se diferenciaron del resto por presentar mayor proporción de dihidrotagetona

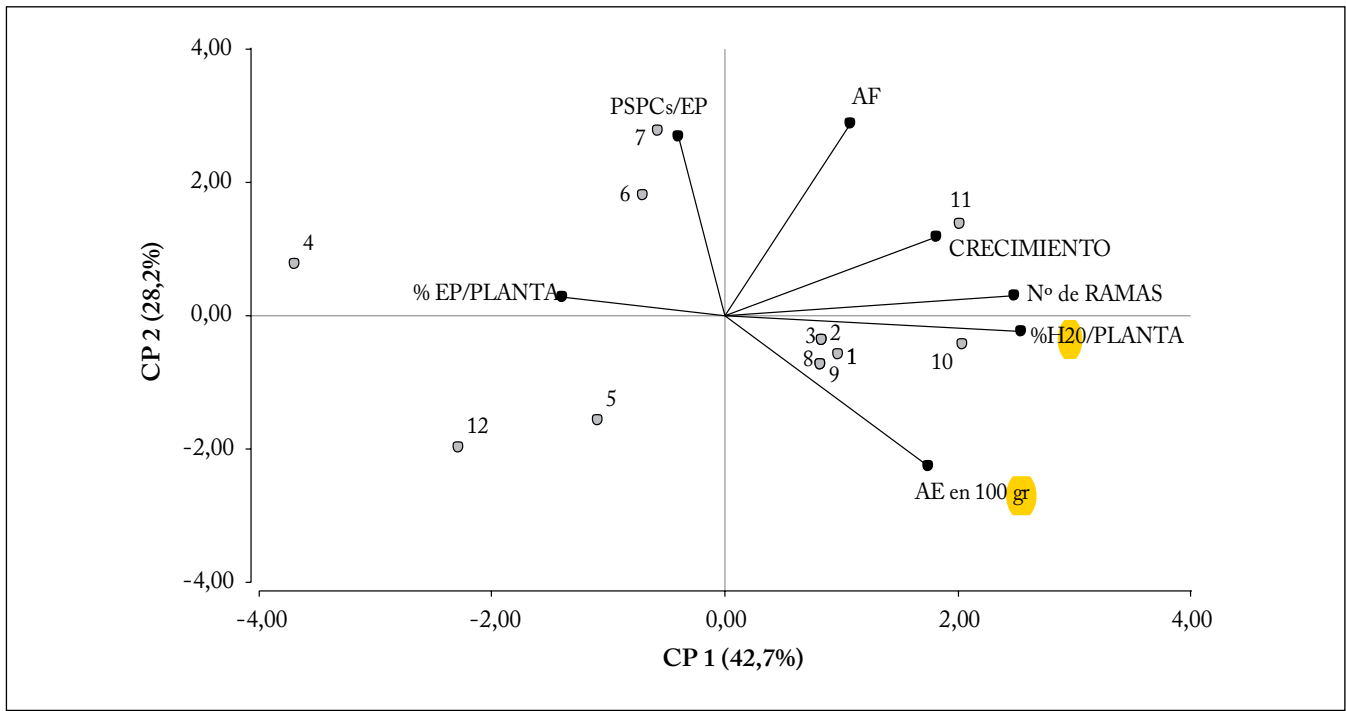


Fig. 3. Análisis de componentes principales de caracteres cuantitativos de los individuos seleccionados. Se compararon aquellos caracteres de mayor peso. Los dos primeros ejes explican el 70,9% de la variabilidad. Círculos grises: individuos seleccionados. Vectores con círculo negro: caracteres.

Fig. 3. Principal component analysis of the main quantitative traits of the selected individuals. The first two axes explained 70.9% of the variability. Gray circles: selected individuals. Vectors with black circles: characters.

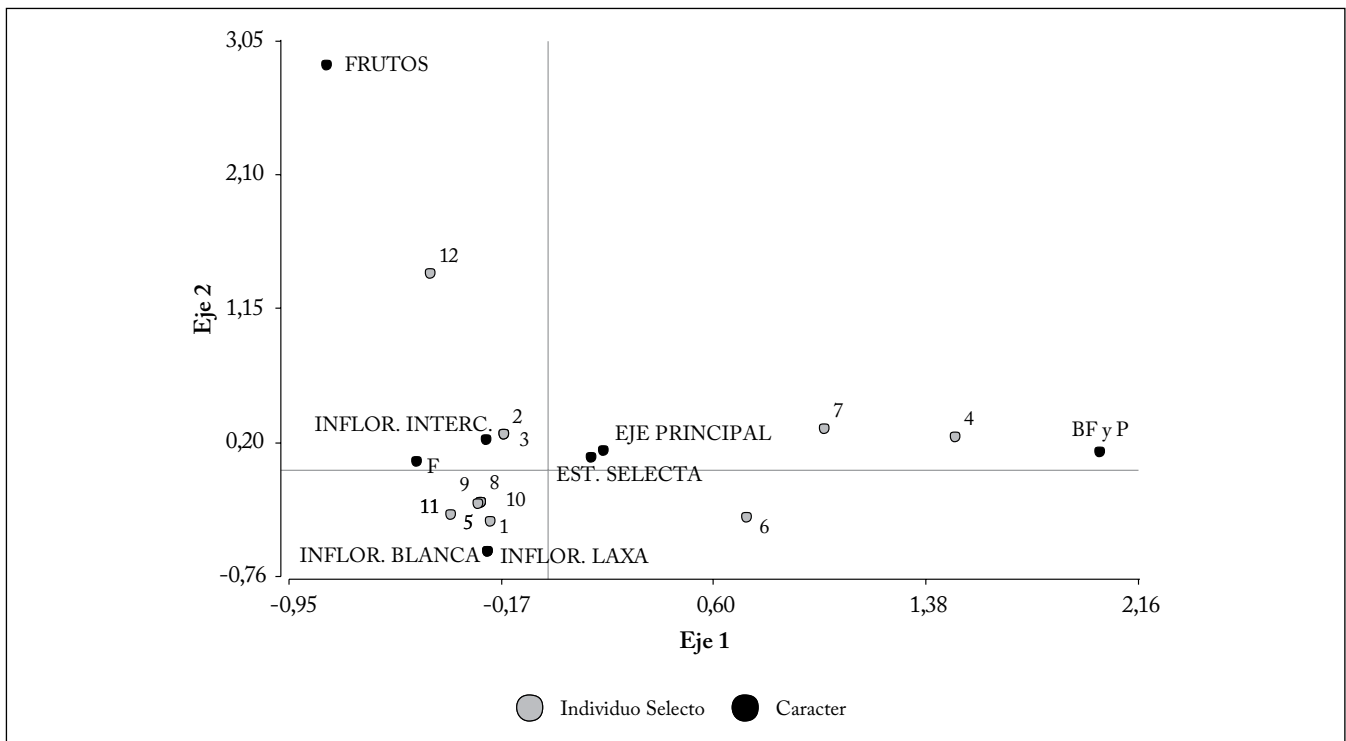


Fig. 4. Análisis de correspondencia de caracteres cualitativos de los individuos seleccionados. BF y P: Botones Florales y Pimpollos; F: Flores.

Fig. 4. Correspondence analysis of qualitative traits of the selected individuals. BF y P: Boot stage and early stage, closed petals. F: Flowers.

y E-tagetona, y menor proporción de E y Z-ocimenona. A su vez los individuos selectos 10, 11 y 12 se diferenciaron de las demás por presentar mayor proporción de Z-tagetona. El grupo de individuos selectos 2, 3, 5, 8 y 9 se destacó por presentar alto porcentaje de E-ocimenona. En cuanto al rendimiento de AE en 100 g de material vegetal seco el promedio fue de 0,37 mL con valores mínimos y máximos de 0,12 y 0,50 mL, respectivamente (Tabla 5); los individuos selectos 2, 3, 8 y 9 se destacaron por su mayor producción de AE.

Relacionando a los individuos selectos en función de los caracteres morfológicos (cuanti y cualitativos) y la composición del AE (Fig. 3, 4 y 5) se diferenciaron dos grupos; por un lado los individuos 4, 6 y 7 y por otro lado los individuos 1, 5, 8, 9, 10, 11 y 12.

DISCUSIÓN

Las diferencias morfológicas y químicas observadas entre los individuos de la población de base genética amplia reflejaron la gran variabilidad de *T. minuta*, aun cuando las poblaciones silvestres que le dieron origen provinieron de un área

reducida respecto a su rango de distribución tanto regional como mundial (Martínez-Ghersa et al., 2000). La existencia de gran variabilidad en la población de base genética amplia constituyó un importante comienzo en el proceso de domesticación y mejoramiento considerando que la eficacia de la selección está condicionada por la variabilidad en el material inicial (Bernáth, 2002). Esta última se vio reflejada en los altos valores de los coeficientes de variación.

Tagetes minuta mostró una buena respuesta adaptativa al manejo en cultivo desde las bandejas de germinación hasta la implantación en la parcela a campo. A partir de la caracterización y evaluación de plantas cultivadas se seleccionaron los individuos con mejores características agronómicas y químicas. Los caracteres altura, estructura de planta y N° de ramas definidos como criterio de selección constituyeron buenos descriptores para diferenciar las plantas; éstos presentan además la ventaja de que pueden ser medidos en una etapa temprana del desarrollo permitiendo identificar desde el inicio del cultivo a aquellos individuos que poseen los caracteres deseados. Otra característica de importancia de estos descriptores es que son indicadores de rendimiento por lo que antes

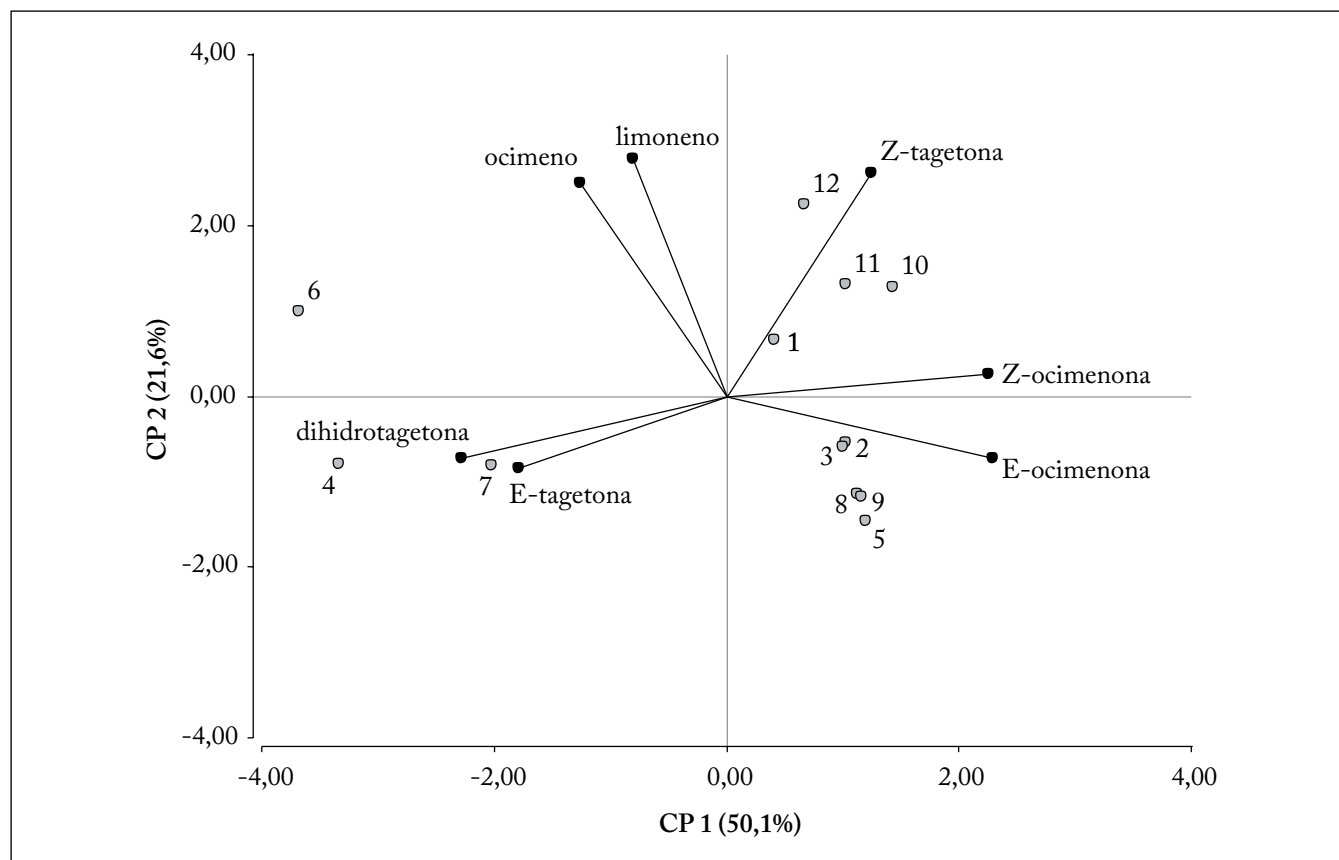


Fig. 5. Análisis de componentes principales de compuestos del AE de los individuos selectos. Los dos primeros ejes explican el 71,7% de la variabilidad. Círculos grises: individuos selectos. Vectores con círculo negro: compuestos principales del AE.

Fig. 5. Principal component analysis of EO compounds of selected individuals. The first two axes explained 71.7% of the variability. Gray circles: selected individuals. Vectors with black circles: main compounds of the EO.

de la cosecha es posible estimar la producción del cultivo. Por otro lado, los caracteres cualitativos color, densidad y distribución de inflorescencias también diferenciaron las plantas. Resultados similares fueron observados en un estudio preliminar (Massuh, 2007), lo cual es coincidente con lo descrito por Cubero (2003) respecto a la mayor estabilidad de los caracteres cualitativos. Estos últimos son menos influenciados por el ambiente y, por lo tanto, constituyen buenos descriptores.

En esta primera etapa de selección la población mejorada superó notablemente a la población de base genética amplia, particularmente para los caracteres altura, N° de ramas y estructura selecta; los valores promedio se incrementaron en un 23; 77 y 26%, respectivamente. Los menores valores de los coeficientes de variación indicaron una disminución en la variabilidad en la población selecta respecto a la de base genética amplia. Estos resultados evidencian lo que afirma Cubero (2003) en relación al aumento en la frecuencia de expresión de los caracteres deseados como resultado de un proceso de selección.

Comparativamente, los valores de altura de planta registrados en la población de base genética amplia se corresponden con los reportados por Ariza Espinar (1967), quien describe el rango para la especie entre 25 y 180 cm. Los individuos selectos presentaron valores de altura que se encuentran en el cuarto superior del rango antes mencionado, lo cual está correlacionado con un mayor follaje y mayor producción de AE.

La mayor ramificación en los individuos selectos de *T. minuta* fue obtenida mediante el proceso de selección, el cual se basa en la variabilidad genética, y busca que el carácter esté presente en la siguiente generación como parte del proceso de mejoramiento genético. Singh et al. (2003) iniciaron un proceso de cultivo de *T. minuta* basado únicamente en prácticas de manejo y promovieron la ramificación de plantas mediante la eliminación de meristemas apicales. Este tipo de práctica tiene como desventaja que requiere ser realizada en cada ciclo del cultivo y, a su vez, implica mayor disponibilidad de mano de obra, maquinaria y tiempo, lo cual se traduce en mayores costos.

Los 7 componentes principales identificados en el AE estuvieron presentes en todos los individuos selectos, aunque en diferentes proporciones, coincidentemente con lo descrito por Gil et al. (2000) y Chamorro et al. (2008). Los compuestos de mayor peso en el AE, y que permitieron diferenciar a los individuos selectos, fueron dihidrotagetona y ocimenona. Esta diferenciación del AE fue consecuencia de la variabilidad química propia de la especie ya que todas las plantas fueron cultivadas en el mismo ambiente, cosechadas en el mismo estadio fenológico (floración) y cada muestra destilada tuvo la misma composición (hojas y flores). Sin embargo, otros autores (Gil et al., 2000; Singh et al., 2003 y Chamorro et al., 2008) identificaron a estas últimas como las causas de las diferencias en el AE. Para el caso de AE rico en dihidrotagetona, Gil et al. (2000) y Chamorro et al. (2008) coinciden en que

este compuesto se encuentra principalmente en las hojas de plantas no florecidas. Singh et al. (2003), sin embargo, sostienen que el mismo se obtiene si la planta se cultiva en otoño. Haber establecido que la variación en la composición del AE de los individuos selectos fue el resultado de la genética de las plantas posibilita continuar un proceso de selección química que, independientemente del manejo agronómico, permitirá obtener plantas con AE de composición estable. El rendimiento promedio de AE de todos los individuos selectos (0,37 mL/100 g) fue inferior al obtenido por Gil et al. (1999) (0,88 mL/100 g) pero equivalente al obtenido por Singh et al. (2003) (0,3 mL/100 g).

Tanto Amujoyegbe et al. (2012) como Arora et al. (2010) destacan las ventajas del cultivo de plantas medicinales respecto a la recolección silvestre, más aún en especies como *T. minuta*. Esto se debe a que esta especie presenta gran demanda por su AE (Bandoni, 2002), y sus poblaciones silvestres están expuestas a una fuerte presión de extracción (Martínez, 2003).

Los resultados de este trabajo constituyen una base importante para la introducción de la especie al cultivo orientada a la producción de AE que responda a los requerimientos industriales de calidad y estabilidad en cuanto a su composición química. La selección de los individuos constituye la etapa inicial, y posibilitará continuar con el proceso de domesticación y mejoramiento orientado a la obtención de quimiotipos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Movimiento de Focolares Alta Gracia por poner a disposición el campo para implantar la parcela experimental; a los señores A. Monjes y D. Oscar por la asistencia técnica; al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET) por el otorgamiento de una beca doctoral, y a la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Córdoba por el financiamiento del proyecto de investigación.

REFERENCIAS

- Adams, R.P. (2007). Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4th Edition. Allured Publishing Co.
- Al-Musayeb, N.M., R.A. Mothana, A. Matheeußen, P. Cos y L. Maes (2012). *In vitro* antiplasmodial, antileishmanial and anti-trypansomal activities of selected medicinal plants used in the traditional Arabian Peninsular region. *BMC Complementary & Alternative Medicine* 12: 49.
- Alonso, J. (2004). Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos. 1^a edición; Editorial Corpus Libros, Rosario, Argentina.
- Amujoyegbe, B.J., J.M. Agbedahunsi y O.O. Amujoyegbe (2012). Cultivation of medicinal plants in developing nations: means of conservation and poverty alleviation. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 2: 345-353.

- Ariza Espinar, L. (1967). Las especies de *Tagetes* (Compositae) de la región central argentina. *Kurtziana* 4: 51-71.
- Arora, R., A. Mathur y A.K. Mathur (2010). Emerging Trends in Medicinal Plant Biotechnology. Ed. Arora, R. ISBN-13: 9781845936785. 46 p.
- Ball-Coelho, B., A.J. Bruin, R.C. Roy y E. Riga (2003). Forage Pearl Millet and Marigold as Rotation Crops for Biological Control of Root-Lesion Nematodes in Potato. *Agronomy Journal* 95: 282-292.
- Bandoni, L.A. (2002). Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica: Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. CYTED. Subprograma IV - Proyecto IV.6: Buenos Aires, Argentina; 418 p.
- Baser, K.H.C. y G. Buchbauer (2010). Handbook of essential oils: science, technology, and applications. Baser, K.H.C.; Buchbauer, G. (Eds.). ISBN 978-1-4200-6315-8. EE. UU., CRC Press; 994 p.
- Bernáth, J. (2002). Strategies and recent achievements in selection of medicinal and aromatic plants. *Acta Horticulturae* 576: 115-128.
- Cestari, I. M., S.J. Sarti, C.M. Waib y A. Castello Branco (Jr.) (2004). Evaluation of the potential insecticide activity of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil against the head lice *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). *Neotropical Entomology* 33: 805-807.
- Chamorro, E.R., G. Ballerini, A.F. Sequeira, G.A. Velasco y M.F. Zalazar (2008). Chemical composition of essential oil from *Tagetes minuta* L. leaves and flowers. *Journal of the Argentine Chemical Society* 96: 80-86.
- Cubero, J.I. (2003). Introducción a la Mejora Genética Vegetal. 2ª Edición; Mundi-Prensa, España; 567 p.
- Di Rienzo, J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada y C.W. Robledo (2011). InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Furtado, R.F., M.G. de Lima, M. Neto, J.N. Bezera y M.G. Silva (2005). Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology* 34: 843-847.
- Gil, A., C.M. Ghersa y S. Leicach (2000). Essential oil yield and composition of *Tagetes minuta* accessions from Argentina. *Biochemical Systematics and Ecology* 28: 261-274.
- Karki, M.B. (2002). Organic conversion & certification: A strategy for improved value-addition and marketing of medicinal plants products in the Himalayas; Paper presented at the Regional Workshop at Wise Practices and Experimental Learning in the Conservation and Management of Himalayan Medicinal Plant; December 15-20, 2002; Kathmandu, Nepal.
- Leung, A. y S. Foster (1996). Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics. John Eiley & Sons. N. York. USA.
- Martínez, G. (2003). Estudio etnobotánico de las plantas vinculadas con la medicina tradicional de los campesinos de paravachasca y calamuchita, provincia de Córdoba – Aportes para su conservación. Tesis para optar al título de Magister en Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba; 248 p.
- Martínez-Ghersa, M.A., C.L. Ghersa, R.L. Benech-Arnold, R. Mac Donough y R. Sanchez (2000). Adaptive traits regulating dormancy and germination of invasive species. *Plant Species Biology* 15: 127-137.
- Massuh, Y. (2007). Comparación entre poblaciones de *Tagetes minuta* de la Provincia de Córdoba, una especie aromática promisoría. Trabajo Final, Carrera de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba; 54 p.
- Muñoz, F. (2000). Plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado. Mundi-Prensa; España; 336 p.
- Ojeda, M.S. (2004). Caracterización de poblaciones y avances en la domesticación de Peperina *Minthostachys mollis* (KUNTH.) GRISEB. Tesis para optar al título de Doctora en Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba; 132 p.
- Petenatti, E.M. y L. Ariza Espinar (1997). Tribu VI. Helenieae. En A.T. Hunziker (Ed), Flora Fanerogámica Argentina 45: 3-35.
- Ruffinengo, S., M. Maggi, C. Faverin, S.B. García de la Rosa, P. Bailac, J. Principal y M. Eguaras (2007). Essential oils toxicity related to *Varroa destructor* and *Apis mellifera* under laboratory conditions. *Zootecnia Tropical* 25: 63-69.
- Singh, B., V.P. Joshi, R. Ram, A. Sharma y A.A. Zaidi (2002). Use of *Tagetes minuta* oil and its components as antiviral agents. United States patent N° US 6.444.458 B1.
- Singh, V., B. Singh y V.K. Kaul (2003). Domestication of wild marigold (*Tagetes minuta* L.) as a potential economic crop in Western Himalaya and North Indian plains. *Economic Botany* 57: 535-544.
- Vines, G. (2004). Herbal harvests with a future: towards sustainable sources for medicinal plants, Plantlife International; www.plantlife.org.uk
- Visintin, A.M y G. Bernardello (2005). Morfología y anatomía floral de *Tagetes minuta* L. (Asteraceae). *Arnaldoa* 12: 8-15.