

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ESTUDIO DE CARACTERES MORFOLÓGICOS Y
BIOQUÍMICOS EN SUICO
(*Tagetes minuta* L.)**

por

Biól. Yamile Massuh

Directora: Dra. Marta S. Ojeda

Director: Dr. Julio A. Zygadlo

Facultad de Ciencias Agropecuarias - UNC

IMBIV - UNC / CONICET



**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

Córdoba, Argentina

2014

COMISIÓN ASESORA

Dra. Adriana Salvo, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales - Universidad Nacional de Córdoba

Dra. Sara Palacios, Facultad de Ciencias Químicas - Universidad Católica de Córdoba

Dra. Marta S. Ojeda, Facultad de Ciencias Agropecuarias - Universidad Nacional de Córdoba

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma: Aclaración:

Firma: Aclaración:

Firma: Aclaración:

*A mis padres, por ser mis grandes guías y
compañeros en este camino...*

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A Marta, que como directora orientó mis pasos en este camino de las plantas aromáticas y medicinales, brindándose generosamente en cada etapa acompañándome tanto en lo académico como en lo personal.
- ❖ A Julio Zygadlo, por su tiempo y sus ganas, por aportar siempre una mirada constructiva y presentarme nuevos desafíos.
- ❖ Al Tribunal Evaluador, por el tiempo dedicado en la lectura y corrección de esta Tesis.
- ❖ A Adriana Salvo y Sara Palacios por el permanente apoyo y dedicación; por sus enriquecedores aportes, porque cada una con su asesoramiento me ayudó a crecer en esto que tanto me apasiona!
- ❖ A MI FAMILIA!! Así, en grande y a lo grande!! porque recibí en ella mi mayor bendición! Con ustedes todo es posible e inmensamente más hermoso! LOS AMO!!
 - ◆ Pá y Má: saben que son mi ejemplo, GRACIAS por su confianza y apoyo incondicional, por ayudarme a lograr mis metas y disfrutar conmigo cada paso!
 - ◆ Lu, por estar siempre y compartir tus conocimientos y experiencias, por ser mi compañero y el mejor hermano mayor!!
 - ◆ San GRACIAS POR TANTO!! Tiempo y esfuerzo compartido entre plantines ensayos, por bancarte hasta la alergia a mis plantas para ayudarme!
 - ◆ Pabli, por brindarte siempre incondicionalmente, por acompañarme en cada proyecto permitiéndome que te contagie mi pasión por las plantas.
 - ◆ Abuelos, tíos, primos y ahijados... mi gran motor energizante! A cada uno de ustedes los llevo en mi corazón!
 - ◆ Cora, Enrique, tías, tíos y primos... mi nueva gran familia que desde el primer día me brindó todo el cariño y su apoyo incondicional.
- ❖ A mis compañeras de aventuras Soni, Paula (Poli), Lore, Guada, Nidi porque formar parte de este gran equipo es un placer y un orgullo. Con nosotras unidas no hay ensayo a campo ni yuyo que se resista! Y al grupo ampliado... Marce, Ale, Martú, Pancho, Coti, Emi y Nachito porque sus presencias nos complementan.
- ❖ A Don Monjes y Don Oscar, dos grandes sabios amantes de las plantas que compartieron conmigo su tiempo y su energía pero especialmente su cariño.
- ❖ Mari, Clau, Nati, Vero, Debby, Sil, Marti, Iva, Kelly, Nico, Augus, Pablo, Maricel y Uli por tantísimos años de tan bella amistad y por enriquecer mi vida con su compañía. Son la sal de mi vida!! GRACIAS TOTALES!!

- ❖ A todo el gran grupo de alumnos de iniciación profesional por estar a mi lado durante estos años siendo las papás adoptivos de “mis niños” en cada uno de los ensayos, dando toda la energía y alegría haciendo que todo tome otro color!
- ❖ A los Ingenieros Carlos Álvarez y Ricardo Peusser por estar siempre al pié del cañón, dando lo mejor desinteresadamente; facilitando mi trabajo en el campo.
- ❖ Al equipo mosquitero: Gonza, Seba y Mauri por los días compartidos cuidando larvas y preparando bioensayos, por estar siempre con la mejor onda para trabajar, por los mejores mates y charlas de amigos!
- ❖ A Marta Contigiani y a todo el grupo del Viroológico por abrirme las puertas de su casa y permitirme descubrir el mundo de los bioensayos, al lado de ustedes la experiencia fue maravillosa!
- ❖ A todo el grupo de Química Orgánica de Exactas por brindarse al 100 %! Por compartir sus conocimientos y hacer mucho más lindas las actividades del laboratorio!
- ❖ A Julio Di Rienzo, por su inmensa generosidad, por su tiempo, asesoramiento y por ayudarme a descubrir otra cara de la estadística.
- ❖ A Marga, por adoptarme en su grupo con tanto cariño y contagiarme siempre su entusiasmo! Guardo en mi corazón cada charla, cada consejo...
- ❖ Al Doctorado de Biología, especialmente a Graciela Valladares, Raúl Marín, Euge, Lourdes y Julio por estar atentos a nuestras necesidades como doctorandos y responder siempre con actitud positiva!
- ❖ A la Facultad de Ciencias Agropecuarias (UNC), al Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, a la Mariápolis, a SeCyT y a CONICET instituciones todas que me recibieron y posibilitaron la realización de este trabajo de Tesis.
- ❖ A Maxi... MI GRAN AMOR... mi complemento, por energizar mis días, llenarlos de cariño y ser un compañero incondicional. Juntos todo es posible!!

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

OBTENCIÓN DE PRODUCTOS TECNOLÓGICOS, REGISTRO O PATENTE

Inscripción en el Registro Nacional de Cultivares - INASE del cultivar de *Tagetes minuta* L.: DON MONJES. Obtentores: Massuh, Yamile, Ojeda Marta y Zygadlo Julio. Año 2014. (En proceso de inscripción en el INASE).

PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS

Massuh, Y.; Torres, L.E.; Ocaño, S.F.; Bruentti, P.; Chaves, A.G.; Zygadlo, J.A. y Ojeda, M.S. 2014. Generación y caracterización de una población de *Tagetes minuta* de base genética amplia - Obtención de individuos selectos. *Phyton, Revista Internacional de Botánica Experimental*. Aceptado para su publicación.

PUBLICACIONES EN CONGRESOS

1. Massuh, Y.; González-Coloma, A.; Arraiza, M.P.; Ojeda, M.S.; Zygadlo, J.A.; Andrés, M.F. 2014. Actividad nematocida del aceite esencial de tres quimiotipos de *Tagetes minuta*. XVII Congreso de Sociedad Española de Fitopatología. 7-10 de Octubre de 2014, Lleída - España.
2. Bernaldez Brunt, N.; Massuh, Y.; Torres, L.E.; Brunetti, P.; Chaves, A.; Ocaño, S. y M. Ojeda. 2014. Evaluación y seguimiento de una población mejorada de *Tagetes minuta*. XXXVII Congreso Argentino de Horticultura. 23-26 de Septiembre de 2014, Mendoza – Argentina.
3. Massuh, Y.; Ocaño, S.F.; Torres, L.E.; Bruentti, P.; Chaves, A.G.; Zygadlo, J.A. y Ojeda, M.S. 2014. Mejoramiento y selección de *Tagetes minuta* por la composición de su aceite esencial: Obtención de quimiotipos. VII Congreso de Mejora Genética de Plantas. 16-18 de Septiembre de 2014, Zaragoza – España.
4. Huenten, D.; Massuh, Y., Cobos, A.; Contigiani, M.; Konigheim, B.; Batallán, G. 2014. Biopesticidas: estrategia alternativa para el control epidemiológico de arbovirus de importancia en la salud humana. Jornadas de Medicina 24 de Octubre de 2014, Córdoba - Argentina.
5. Martínez F.; Konigheim, B.; Massuh, Y.; Aguilar J.; Batallan, G.; Farias, A.; Ojeda, M.; Contigiani M. 2014. Bioactividad de extractos etanólicos de *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) sobre virus de importancia médico-veterinario. XV Jornadas Argentinas de Microbiología. 14-16 de Agosto de 2014, Córdoba – Argentina.
6. Cobo, A.; Huenten, D.; Massuh, Y.; Contigiani, M.; Koingheim, B. y Batallán, G. 2014. Efecto larvicida del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) sobre *Culex quinquefasciatus* Say (Díptera: Culicidae). IX Jornadas Regionales sobre Mosquitos. 4 y 5 de Septiembre de 2014, Resistencia, Chaco – Argentina.

7. Massuh, Y.; Ocaño, S.F.; Bruentti, P.; Torres, L.E.; Chaves, A.G.; Bernaldez, N.; Zygadlo, J.A. y Ojeda, M.S. 2013. Heredabilidad de caracteres morfológicos cuanti y cualitativos en tres generaciones de plantas cultivadas de *Tagetes minuta* L. XXXVI Congreso Argentino de Horticultura, III Simposio de Aromáticas, Medicinales y Condimenticias. 24-26 de Septiembre de 2013, Tucumán – Argentina.
8. Massuh, Y.; Ocaño, S.F.; Bruentti, P.; Chaves, A.G.; Torres, L.E. y Ojeda, M.S. 2011. Evaluación comparativa de familias de *Tagetes minuta* L. por caracteres morfológicos, fenológicos y químicos del aceite esencial. XXXIV Congreso Argentino de Horticultura, II Simposio de Aromáticas, Medicinales y Condimenticias. 27-30 de Septiembre de 2011, Buenos Aires – Argentina.
9. Batallán, G.; Massuh, Y.; Flores, F.; Ojeda, M.; Contigiani, M.; Almirón, W. 2010. Actividad larvicida del aceite esencial de *Tagetes minuta* sobre larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). VII Jornadas Regionales sobre Mosquitos. 2 al 4 de Septiembre de 2010, Posadas – Misiones – Argentina.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	1
ÍNDICE DE TABLAS.....	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
CAPÍTULO I.....	10
Introducción General	10
HIPÓTESIS Y PREDICCIONES	19
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
CAPÍTULO II.....	21
Caracterización y evaluación fenotípica en <i>Tagetes minuta</i> : individuos selectos y sus familias derivadas	21
INTRODUCCIÓN.....	22
Sección 1: Generación y caracterización de una población de <i>Tagetes minuta</i> de base genética amplia - Obtención de individuos selectos.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS	25
RESULTADOS	32
DISCUSIÓN.....	38
Sección 2: Generación de familias de hermanos completos.	41
MATERIALES Y MÉTODOS	41
RESULTADOS	46
DISCUSIÓN.....	55
CONCLUSIÓN	57
CAPÍTULO III	58
Caracterización de los compuestos principales del aceite esencial de familias selectas de <i>Tagetes minuta</i>	58
INTRODUCCIÓN.....	59
MATERIALES Y MÉTODOS	63
RESULTADOS	66
DISCUSIÓN.....	73
CONCLUSIÓN	77

CAPÍTULO IV	78
Bioactividad del aceite esencial de los quimiotipos de <i>Tagetes minuta</i>	78
INTRODUCCIÓN.....	79
MATERIALES Y MÉTODOS	84
RESULTADOS	88
DISCUSIÓN.....	91
CONCLUSIÓN	94
CAPÍTULO V	95
Relaciones entre caracteres morfológicos, químicos y bioactividad: Caracteres discriminantes.....	95
INTRODUCCIÓN.....	96
MATERIALES Y MÉTODOS	98
RESULTADOS	99
DISCUSIÓN.....	103
CONCLUSIÓN	106
CAPÍTULO VI.....	107
Conclusiones finales	107
CONCLUSIONES FINALES	108
BIBLIOGRAFÍA.....	111
APÉNDICE I.....	124
Tablas de caracteres cuantitativos por familia en cada ciclo de cultivo	124
APÉNDICE II.....	137
Tablas de caracteres cualitativos por familia en cada ciclo de cultivo	137

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura I.1: Población silvestre de *T. minuta*, Estancia “Las Higueritas” 17
- Figura I.2: Población silvestre de *T. minuta*, Estancia “San José” 18

CAPÍTULO II

Sección 1

- Figura II.1: Localidades de recolección de semillas de poblaciones silvestres..... 25
- Figura II.2: Población de base genética amplia: Obtención de semillas..... 26
- Figura II.3: Densidad de inflorescencias de *T. minuta*..... 29
- Figura II.4: Color de inflorescencias de *T. minuta*..... 29
- Figura II.5: Bolsa de autofecundación..... 29
- Figura II.6: Individuos selectos cosechados..... 29
- Figura II.7: Estructura de plantas de *T. minuta*..... 32
- Figura II.8: Representación del perfil de AE de los 12 individuos selectos de *T. minuta*..... 34
- Figura II.9: Caracteres cuantitativos de los individuos selectos..... 35
- Figura II.10: Caracteres cualitativos en de los individuos selectos..... 35
- Figura II.11: Análisis de componentes principales de caracteres cuantitativos en los individuos selectos..... 37
- Figura II.12: Análisis de correspondencia de los caracteres cualitativos..... 37

Sección 2

- Figura II.13: Esquema del proceso de selección de individuos de *T. minuta*..... 42
- Figura II.14: Folíolo de *T. minuta*..... 43
- Figura II.15: Análisis de conglomerados agrupando las familias por caracteres cuantitativos..... 48
- Figura II.16: Análisis de componentes principales con los caracteres cuantitativos..... 48
- Figura II.17: Rendimiento promedio de AE por familia..... 49
- Figura II.18: Análisis de conglomerados con todos los caracteres cualitativos..... 52
- Figura II.19: Análisis de conglomerados con los caracteres cualitativos..... 52
- Figura II.20: Análisis de conglomerados con los caracteres cualitativos reducidos 53
- Figura II.21: Presencia de caracteres cualitativos de inflorescencias y glándulas foliares..... 54

CAPÍTULO III

- Figura III.1: Estructuras moleculares de los 7 compuestos principales del AE de *T. minuta*..... 60

Figura III.2: Destiladores tipo Clevenger.....	64
Figura III.3: Perfiles de composición de AE por familia en los tres ciclos de cultivo.....	68
Figura III.4: Perfiles multivariados del AE y dendrogramas de familias para cada ciclo de cultivo.....	69
Figura III.5: Análisis de conglomerados con los 7 compuestos principales del AE corregidos.....	70
Figura III.6: Análisis de conglomerados con 3 compuestos principales de AE corregidos.....	70
Figura III.7: Diferenciación de los tres quimiotipos.....	71
CAPÍTULO IV	
Figura IV.1: Compuestos principales (%) del AE utilizado en bioensayos.....	85
Figura IV.2: Secuencia explicativa del bioensayo.....	87
Figura IV.3: Mortalidad de larvas de <i>St. aegypti</i> ante quimiotipos de <i>T. minuta</i> del segundo ciclo de cultivo.....	89
Figura IV.4: Mortalidad de larvas de <i>St. aegypti</i> ante quimiotipos de <i>T. minuta</i> del tercer ciclo de cultivo.....	90
Figura IV.5: Mortalidad de larvas de <i>St. aegypti</i> ante el AE de una población silvestre de <i>T. minuta</i>	90
CAPÍTULO V	
Figura V.1: Configuración de consenso del análisis de procrustes generalizado con casos graficados.....	99
Figura V.2: Análisis de componentes principales con los caracteres cualitativos y cuantitativos corregidos.....	100
Figura V.3: Análisis de componentes principales con los tres caracteres de mayor peso.....	101
Figura V.4: Análisis discriminante con caracteres morfológicos y de composición de AE.....	102
Figura V.5: Comparación de bioactividad, composición de AE y características morfológicas de las familias con similar perfil químico.....	105

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO II

Sección 1

Tabla II.1: Ubicación cartográfica y número de herbario de las poblaciones silvestres de <i>T. minuta</i>	26
Tabla II.2: Población de base genética amplia: medidas de resumen.....	33
Tabla II.3: Población selecta: medidas de resumen.....	33

Sección 2

Tabla II.4: Heredabilidad de los caracteres morfológicos y varianzas que la determinan.....	46
Tabla II.5: Heredabilidad de componentes del AE y varianzas que la determinan.....	46
Tabla II.6: Relación entre familias y caracteres en el segundo y tercer ciclo de cultivo.....	50
Tabla II.7: Asociaciones entre caracteres cualitativos según el análisis de correlación.....	51

CAPÍTULO III

Tabla III.1: Proporción de los 7 compuestos principales en el AE de <i>T. minuta</i>	61
Tabla III.2: Quimiotipos de <i>T. minuta</i> descritos en la norma IRAM N°18622.....	62
Tabla III.3: Proporción promedio y error estándar (EE) de los 7 compuestos principales respecto al total de compuestos del AE en cada ciclo de cultivo.....	66
Tabla III.4: Autovalores del análisis discriminante.....	72
Tabla III.5: Valores de Lambda de Wilks del análisis discriminante.....	72
Tabla III.6: Medidas de resumen de los 7 compuestos principales para los quimiotipos definidos.....	72

CAPÍTULO IV

Tabla IV.1: Bioactividad del AE de diferentes especies aromáticas sobre larvas de <i>St. aegypti</i>	81
Tabla IV.2: Quimiotipos identificados y perfil químico de la población silvestre...	84
Tabla IV.3: DL ₅₀ del AE de <i>T. minuta</i> sobre larvas de <i>St. aegypti</i>	89

CAPÍTULO V

Tabla V.1: Autovalores del análisis de procrustes generalizado.....	99
Tabla V.2: Sumas de cuadrado por grupo del análisis de procrustes generalizado..	99
Tabla V.3: Autovalores del análisis discriminante.....	101
Tabla V.4: Valores de Lambda de Wilks del análisis discriminante.....	102

RESUMEN

Las plantas aromáticas presentan un marcado incremento en su utilización con fines industriales y medicinales, particularmente por sus aceites esenciales (AE) que resultan de interés como alternativas a productos sintéticos utilizados tanto en la salud humana como en la protección de cultivos. Este proceso conlleva el requerimiento de una mejor calidad del AE y mayor estabilidad en cuanto a su composición química. Sin embargo, el aumento en la demanda de especies aromáticas no es acompañado en igual magnitud por la búsqueda de formas de producción y aprovechamiento sustentable del recurso silvestre. En este contexto, es necesaria la caracterización y evaluación de especies aromáticas nativas a fin de establecer criterios de manejo y utilización. La especie estudiada en esta Tesis es *Tagetes minuta*, una hierba aromática anual nativa en Argentina, de gran interés por su AE, el cual se utiliza industrialmente y por sus principios activos. El objetivo de esta Tesis fue contribuir al conocimiento de dicha especie determinando la variabilidad genética de caracteres morfológicos, fenológicos y de AE, estableciendo criterios de selección referidos a la importancia de su aplicación. El proceso de estudio de la especie comenzó con la generación y cultivo de una población de base genética amplia representativa de la variabilidad natural de poblaciones silvestres de la provincia de Córdoba. En dicha población, se identificaron por selección independiente los 100 mejores individuos destacados morfológicamente y se autofecundaron. La selección final de estos individuos se hizo tomando como criterio la composición química del AE, obtenido por hidrodestilación y analizado por CG/EM. Se seleccionaron 12 individuos que se destacaron por su morfología y por su AE. Estos 12 individuos selectos y su descendencia (familia) fueron evaluados en tres generaciones sucesivas, cada una cultivada en diferente año y localidad. En cada ciclo de cultivo se seleccionó un individuo por familia del cual se obtuvieron semillas por autofecundación que dieron origen a plantas que constituyeron entre sí hermanos completos (debidamente identificados) sobre los que se repitió el proceso de selección. A través de análisis multivariados se compararon las familias morfológica y químicamente y se definieron parámetros genéticos. *T. minuta* mostró una buena respuesta adaptativa al manejo a campo lo cual constituyó un promisorio comienzo del proceso de domesticación. Si bien las plantas fueron autofecundadas la variabilidad en la descendencia fue amplia, encontrándose diferencias morfológicas y químicas entre las familias. Los caracteres morfológicos fueron más influenciados por el ambiente por lo que su heredabilidad fue baja. Para los compuestos *E*-ocimenona y dihidrotagetona la

heredabilidad fue alta lo que implica que su presencia en el AE tiene una componente genética de peso. Los caracteres cualitativos presentaron gran estabilidad para cada familia en las tres generaciones por lo que constituyeron buenos descriptores. Se identificaron tres caracteres con mayor poder discriminante: peso seco de planta completa, inflorescencia blanca y *E*-ocimenona los cuales explicaron un 96,3 % de la variabilidad y diferenciaron a las familias en tres grupos: “Ocimenona”, “Dihidrotagetona” y “OTLO” (ocimenona-tagetona-limoneno-ocimeno), los cuales fueron definidos como morfo-quimiotipos. Un objetivo adicional fue evaluar la bioactividad de los quimiotipos sobre insectos, eligiéndose larvas de *Stegomyia aegypti* por su importancia sanitaria. Los tres quimiotipos identificados presentaron efecto larvicida diferencial, siendo más efectivo el quimiotipo Ocimenona. El análisis conjunto de todos los resultados definió una asociación positiva entre caracteres cualitativos-AE-bioactividad lo cual constituye un importante avance a los fines de cultivar plantas con el perfil de AE de interés. Los resultados de este proceso de domesticación, selección, mejoramiento y determinación de bioactividad promueven el cultivo de *T. minuta* para obtener AE de calidad en respuesta a demandas industriales y sin ejercer presión sobre el recurso silvestre. Esta Tesis constituye un aporte a la caracterización y puesta en valor de la flora aromática nativa de Argentina y a su conocimiento para establecer pautas de manejo orientadas hacia la producción de calidad y con valor agregado.

Palabras clave: *Tagetes minuta*, Asteraceae, aceite esencial, mejoramiento genético vegetal, quimiotipos, bioactividad.

ABSTRACT

Aromatic plants show a marked increase in its use for industrial and medicinal purposes, particularly for its essential oils (EO) which represent alternatives to synthetic products used in both human health and crop protection. The increase in demand for aromatic species leads to the requirement for a better quality of EO and higher stability in terms of its chemical composition. However, this process has not been adequately complemented by efforts tending to find efficient ways of production and sustainable exploitation of the resource found in the wild. In this context, the characterization and evaluation of native aromatic species to establish criteria for handling and use is required. The species studied in this Thesis is *Tagetes minuta*, a native annual herb in Argentina, of great interest for its EO, which is used industrially and by their active components. The aim of this Thesis was to contribute to the knowledge of this species by determining the genetic variability of morphological, phenological and EO traits, establishing selection criteria related to the importance of its implementation. The study of the species began with the creation and cultivation of a population of broad genetic base, representative of the natural variability of wild populations in the province of Córdoba. In this population, 100 morphologically outstanding individuals were identified by independent selection and selfed. The final selection of these individuals was made by the chemical composition of EO, obtained by hydrodistillation and analyzed by GC/MS. Individuals who stood out for their morphology and their EO were selected. These 12 selected individuals and their offspring were evaluated in three generations, each grown in different year and locality. Self-fertilized seeds were obtained from one selected individual per family per growing season. From these seeds, groups of full sibling plants were generated and the selection process was repeated. Through multivariate analysis families were compared both morphologically and chemically and genetic parameters were defined. *T. minuta* showed a good adaptive response to management in crop which is a promising start in the domestication process. Even when plants were selfed, offspring variability was wide, showing morphological and chemical differences between families. Morphological traits showed a high degree of influenceability by the environment, which indicated a low heritability. For compounds E-ocimenone and dihydrotagetone heritability was high implying that their presence in the EO has an important genetic component. The qualitative traits showed great stability for every family in three generations what constituted good descriptors. Three traits with high

discriminant power were identified: dry weight of whole plant, white inflorescence, and E-ocimene, which explained 96.3% of the variability and assigning the families into one of three groups: "Ocimene", "Dihydrotagetone" and "OTLO" (ocimene-tagetone-limonene-ocimene) which were defined as morpho-chemotypes. One additional objective was to evaluate the bioactivity of the chemotypes on larvae of *Stegomyia aegypti*, which were chosen for their importance in human health. The three chemotypes identified showed differential larvicidal effect, which was higher in the chemotype Ocimene. The joint analysis of all the results identified a positive association between qualitative traits-EO-bioactivity which is an important step in order to select for plants with the desired EO profile. The results of this process of domestication, selection, breeding and determination of bioactivity enabled the cultivation of *T. minuta* to obtain EO of quality in response to industrial demands without putting pressure on wild populations. This Thesis is a contribution to the characterization and valorization of native aromatic flora from Argentina and to the establishment of management guidelines oriented towards quality production with added value.

Keywords: *Tagetes minuta*, Asteraceae, essential oil, plant breeding, chemotypes bioactivity.

LISTA DE ABREVIATURAS

- % EP/PLANTA: proporción del peso fresco del eje principal en el peso fresco de la planta completa (expresado como porcentaje).
- % H₂O/PLANTA: proporción de agua en el peso fresco de la planta completa (expresado como porcentaje).
- ACP: análisis de componentes principales
- AE: aceite esencial
- AEs: aceites esenciales
- BF: botones florales
- CITES: convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora)
- CG/EM: cromatografía gaseosa/espectrometría de masa
- CP: componente principal
- DHT: dihidrotagetona
- DL₅₀: dosis letal media
- DL₉₉: dosis letal noventa y nueve
- DMSO: dimetilsulfóxido
- DS: diferencial de selección
- EE: error estándar
- E-Ona: *E*-ocimenona
- E-Tag: *E*-tagetona
- F: flores
- FCA: Facultad de Ciencias Agropecuarias
- Flias.: familias
- GC/MS: gas chromatography/mass spectrometry
- GxA: interacción genotipo-ambiente
- MLGM: modelos lineales generalizados mixtos
- Lim: limoneno
- Ono: ocimeno
- OTLO: ocimenona-tagetona-ocimeno-limoneno
- P: pimpollos
- PFEP: peso fresco eje principal

PFPC: peso fresco planta completa

PFPCs/EP: peso fresco planta completa sin eje principal

ppm: partes por millón

PSEP: peso seco eje principal

psi: pounds per square inch (libra por pulgada cuadrada)

PSPC: peso seco planta completa

PSPCs/EP: peso seco planta completa sin eje principal

SM: solución madre

St. aegypti: *Stegomyia aegypti*

T. minuta: *Tagetes minuta*

Z-Ona: Z-ocimenona

Z-Tag: Z-tagetona

CAPÍTULO I

Introducción General

LAS ESPECIES AROMÁTICAS: UN RECURSO DE IMPORTANCIA

En el mundo están reconocidas 17.500 especies aromáticas distribuidas en 60 familias (Lawrence, 1995). Las plantas aromáticas constituyen un amplio grupo formado por especies que pueden generar por medio de procesos físico-químicos un “producto aromático”, es decir, aquellos que tienen un olor o un sabor determinado (Bandoni *et al.*, 2002). Generalmente estas plantas poseen propiedades medicinales por la presencia de principios activos, es decir, compuestos que pueden cambiar o modificar funciones en órganos y sistemas de otros seres vivos (Bakkali *et al.*, 2008; Shaaban *et al.* 2012). Estos compuestos se encuentran en diferentes tejidos y órganos de las plantas y pueden ser derivados de su metabolismo primario o secundario. Particularmente los aceites esenciales (AEs) son producto del metabolismo secundario de las plantas y están constituidos principalmente por terpenos volátiles. El AE le proporciona el aroma a estas especies y también es el responsable de la actividad biológica que poseen (Tunc *et al.*, 2000; Isman, 2002; Erler *et al.*, 2006; Toloza *et al.*, 2006; Gillij *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2009). Por ser menos tóxicos para el hombre y para el ambiente los productos naturales tienen más aceptación para su uso como biocida, por lo que el mercado de AEs está experimentando un marcado crecimiento (Regnault-Roger *et al.*, 2012).

La utilización de las especies aromáticas a nivel mundial se incrementa año a año, diversificándose las industrias que las emplean como la cosmética, alimenticia, farmacéutica, agroquímica, química fina y tabacalera entre otras (de la Fuente *et al.*, 2006; Lubbe & Verpoorte, 2011; Regnault-Roger *et al.*, 2012). Esta expansión es consecuencia de la mayor demanda de dichas plantas en un contexto mundial de regreso a los productos naturales y de cambios en los hábitos de consumo debido a los problemas que se le atribuyen a muchos productos sintéticos sobre la salud humana y el medio ambiente (Bandoni, 2002). En algunos casos también existen razones de índole económica por los elevados costos de síntesis o por la imposibilidad tecnológica, hasta el momento, de imitar exactamente un aroma natural debido a la complejidad de su composición química. Este último factor es de gran peso en el caso de algunas esencias usadas en perfumería.

En Argentina existe también un amplio mercado de plantas aromáticas silvestres, para uso en la industria alimenticia, licorera o farmacéutica; tal es el caso de la peperina

(*Minthostachys verticilata*), el incayuyo (*Lippia integrifolia*), la carqueja (*Baccharis crispa*), el tomillito de las sierras (*Hedeoma multiflorum*), el cedrón (*Lippia citriodora*), el poleo (*Lippia turbinata*) y el palo amarillo (*Aloysia gratissima*) entre otras. En este sentido, las especies aromáticas silvestres están cobrando mayor relevancia por sus propiedades medicinales y por la necesidad de descubrir nuevos compuestos químicos para la industria (Lubbe & Verpoorte, 2011).

El incremento en el consumo de especies aromáticas conlleva el requerimiento de una mejor calidad del AE y mayor estabilidad en cuanto a su composición química. Sin embargo, este aumento en la demanda de especies aromáticas silvestres no es acompañado en igual magnitud por la búsqueda de formas de producción y aprovechamiento sustentable del recurso silvestre. Ante esta situación dichas especies están sometidas a una alta presión de extracción, implicando la incorporación de algunas de ellas en los apéndices CITES (Ten Kate & Laird, 1999). A nivel mundial entre el 80 y 95 % de las especies aromáticas, tanto en países en desarrollo como desarrollados, se recolectan de poblaciones silvestres (Correa, 2002; Karki, 2002; Vines, 2004). A su vez, el material obtenido por recolección no cumple con los requerimientos industriales de calidad y cantidad. La calidad se ve afectada por la gran variabilidad morfológica y química de las especies silvestres y la cantidad por la velocidad e intensidad de extracción del recurso que impiden o retardan su regeneración natural.

Las industrias alimenticia (sabores) y cosmética (elaboración de perfumes) son las más importantes y exigentes en cuanto al requerimiento de calidad y cantidad de productos aromáticos. La demanda se orienta a la homogeneidad del material y a la abundancia y pureza de componentes bioactivos o de interés en el caso de aceites esenciales (AEs). La calidad responde a la alta especificidad de la demanda y depende en gran medida del material vegetal original empleado. La posibilidad de introducir a cultivo una especie silvestre, permite lograr una producción constante y más homogénea en cuanto a calidad. La variabilidad morfológica y química de las especies aromáticas silvestres es amplia y es consecuencia de la genética de las plantas y sus respuestas adaptativas a los ambientes donde se desarrollan (Amujoyegbe *et al.*, 2012). Si bien desde el punto de vista ecológico y ambiental esta característica es positiva y necesaria no favorece al mercado ya que éste demanda estabilidad y homogeneidad en la calidad del material.

La mayoría de las compañías y mercados farmacéuticos y de hierbas prefieren el

material cultivado (Laird & Pierce, 2002; Lubbe & Verpoorte, 2011). Aún así, menos del 1 % del total de especies medicinales utilizadas en el mundo están incluidas en sistemas de cultivo para la producción comercial (Schippmann *et al.*, 2006). Arora *et al.* (2010) destacan las principales ventajas del cultivo en relación a la recolección silvestre: 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 desde poblaciones silvestres.

Por lo antedicho es doble la necesidad de avanzar en la caracterización y el cultivo de las especies aromáticas silvestres; por un lado posibilitar un uso racional de los recursos naturales y, por otro, caracterizarlas y evaluarlas para promover su introducción a cultivo en respuesta a demandas industriales. Ambos requerimientos favorecen el desarrollo de regiones generalmente excluidas de los sistemas productivos tradicionales (Amujoyegbe *et al.*, 2012) por lo que además la respuesta a éstos tendría un efecto positivo en la sociedad.

LA ESPECIE EN ESTUDIO: *Tagetes minuta*

Clasificación, descripción botánica y origen

El género *Tagetes* pertenece a la familia Asteraceae (Tribu Helenieae), está compuesto por 50 especies, 12 de ellas presentes en Argentina de las cuales 5 son endémicas (Ariza Espinar 1967; Barboza *et al.*, 2006). Las especies de *Tagetes* presentan amplia variabilidad en cuanto a las características de su AE (Maestri *et al.*, 1991; Zygadlo *et al.*, 1990; 1993a, b y c), el cual se halla contenido en glándulas oleíferas epidérmicas de hojas y brácteas involucrales (Ferraro, 1955; Ariza Espinar, 1967; Petenatti & Ariza Espinar, 1997).

Tagetes minuta L., conocida vulgarmente como suico o chinchilla, es una hierba aromática anual, con hojas opuestas e imparipinnatisectas cuya altura oscila entre 25 y 180 cm. Presenta flores amarillentas, tubulares y liguladas dispuestas en capítulos corimbiformes (Ariza Espinar, 1967). Posee glándulas oleíferas alargadas en el involucre de las flores y en el borde de las hojas y, raras veces, presenta glándulas puntiformes distribuidas en toda la lámina foliar (Ariza Espinar, 1967). El período de floración de esta

especie tiene lugar entre fines del verano y comienzo del otoño (Alonso, 2004). Es originaria de regiones cálidas de América Central y del Sur, encontrándose abundantemente en el norte y centro de Argentina (Petenatti & Ariza Espinar, 1997; Neher, 1968). Desde tiempos de la conquista de América fue introducida en Europa (Jordano & Ocana, 1955). Actualmente presenta distribución cosmopolita, ampliamente dispersada por actividades antrópicas y es considerada maleza en los cultivos tradicionales (Martínez-Ghersa *et al.*, 2000).

Aceite esencial: composición y usos

El AE de *T. minuta* está constituido principalmente por los terpenos limoneno, ocimeno, dihidrotagetona, *E*-tagetona, *Z*-tagetona, *Z*-ocimenona y *E*-ocimenona (Gil *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2003; Babu & Kaul, 2007; Chamorro *et al.*, 2008). Dicho AE posee efecto bioactivo sobre diversos organismos entre los que se destacan por su importancia sanitaria insectos vectores de enfermedades (Jacobson *et al.*, 1975; Maradufu *et al.*, 1978; Green *et al.*, 1991; Macedo *et al.*, 1997; Keita *et al.*, 2000). Además su AE es de interés para la industria (Neher, 1968) utilizándose principalmente en cosmetología como fragancia para perfumes de alta calidad (Leung & Foster, 1996). Aprobado por la Food and Drug Administration (FDA N° 172.510) (McCaleb, 1993); es utilizado como saborizante en productos alimenticios (postres lácteos congelados, dulces, productos horneados, gelatinas) y en bebidas cola y alcohólicas (Singh *et al.*, 2003). Además se utiliza como base para la síntesis química de nuevos compuestos aromáticos a partir de dihidrotagetona, tagetonas (*E* y *Z*) y ocimenonas (*E* y *Z*) (Singh *et al.*, 2003).

Comercialización y obtención del aceite esencial

Especies como *T. minuta* son potencialmente interesantes ya que pertenecen a la flora nativa y pueden significar una alternativa productiva importante para economías regionales (de la Fuente *et al.*, 2006). Argentina junto con India, Egipto, Sudáfrica y Zimbabue constituyen los principales países exportadores de AE de *T. minuta* (Baser & Buchbauer, 2010). En Argentina se extraen aproximadamente 0,5 tn/año de AE de *T. minuta* obtenido de poblaciones silvestres y se comercializa a un valor de 80-120 US\$/kg (Bandoni, 2002). Esta forma de explotación del recurso natural se realiza sin considerar la presión de extracción (que conlleva un costo ambiental) ni la calidad del AE en cuanto a

composición química. Según el *Índice de prioridad de conservación de especies vegetales* elaborado por Martínez (2003) para el Valle de Paravachasca (provincia de Córdoba) la especie se encuentra 8ª 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.

Hábito de crecimiento, reproducción y variabilidad fenotípica

Tagetes minuta es una especie r-estratega, aparece en los primeros estadios de sucesión en un ambiente alterado por cambios en el uso de la tierra o por incendios. Presenta resistencia a condiciones que son sub-óptimas para otras especies (de la Fuente, 2006); frecuentemente aparece como ruderal en campos abandonados (Pettenatti & Ariza Espinar, 1997).

Su forma de multiplicación es sexual; las semillas son relativamente pequeñas, sin dormancia y sin banco de semillas persistente en el suelo (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 & Bernardello, 2005). Estas posibilidades de cruzamientos al azar determinan, entre otros factores, que exista variabilidad intra e interpoblacional.

Al ser una especie nativa en Argentina, las poblaciones silvestres de *T. minuta* han permanecido en la región a lo largo de años y están adaptadas a condiciones ambientales específicas (Esquinas Alcazar, 1981). Estos cambios genéticos adaptativos diferencian a las poblaciones entre sí por características fenotípicas conservadas por generaciones. Las Figuras 1 y 2 ilustran la variabilidad de poblaciones silvestres de la especie en las Sierras Grandes de la provincia de Córdoba donde se realizaron muestreos (obs. pers.). Los campos estaban poco distantes entre sí pero presentaron diferencias de tipo orográficas. Las plantas de la población de la Estancia “Las Higuieritas” (ubicadas en una ladera con leve pendiente) se caracterizaron por ser pequeñas (menos de 0,5 m de altura), sin ramificaciones, con escasas inflorescencias (Fig. I.1). En contraposición, las plantas de la población de la Estancia “San José” (ubicadas en una zona llana) fueron de mayor porte (entre 1 y 1,5 m de altura), con ramificaciones y mayor número y tamaño de inflorescencias (Fig. I.2).

Se ha demostrado que esta variabilidad intraespecífica en *T. minuta* también se ve reflejada tanto morfológica (Ordóñez *et al.*, 2006; Massuh, 2007) como químicamente en la concentración y composición de su AE (Gil *et al.*, 2000; Massuh, 2007). A partir de diferencias cualitativas y cuantitativas en el contenido de terpenos se identificaron quimiotipos de *T. minuta* (Gil, 2000; Gil *et al.*, 2000). Los quimiotipos presentan perfiles de AE donde uno de los compuestos se encuentra ausente o en mayor proporción que en un perfil normal. La variabilidad encontrada en poblaciones silvestres de *T. minuta* es de gran importancia y constituye la base para iniciar un proceso de selección y domesticación.

Considerando la riqueza y variabilidad de las especies aromáticas nativas en cuanto a su AE y su morfología, éstas han sido poco estudiadas desde un punto de vista genético. Más escasos aún son los trabajos que relacionan la determinación genética expresada fenotípicamente en la composición química del AE y, a su vez, su efecto bioactivo.



Figura I.1: Población silvestre de *T. minuta*, Estancia “Las Higuieritas”. Copina, Dpto. Punilla; Córdoba: 31° 38′ 10,70″ S y 64° 37′ 22,84″ O; 1014 msnm.



Figura I.2: Población silvestre de *T. minuta*, Estancia “San José”. Copina, Dpto. Punilla; Córdoba: 31° 39′ 23,80″ S y 64° 35′ 53,40″ O; 963 msnm.

Ante este contexto y considerando que la especie constituye un recurso de interés en Argentina, se planteó su caracterización y evaluación tanto morfológica como química y bioactiva en el marco de las siguientes hipótesis y predicciones:

HIPÓTESIS Y PREDICCIONES

Hipótesis 1:

Cuando las diferencias morfológicas, fenológicas y químicas (de aceite esencial) entre individuos de una misma especie tienen un fuerte componente genético, éstas se manifiestan al ser cultivados todos en un mismo ambiente y se transmitirán a la descendencia.

Hipótesis 2:

El aceite esencial de *Tagetes minuta* posee bioactividad sobre insectos que varía en los quimiotipos.

Teniendo en cuenta estas hipótesis, se plantean las siguientes predicciones a comprobar durante esta tesis:

- a) Los individuos de *T. minuta* crecidos en un mismo ambiente expresarán diferencias morfológicas debidas al genotipo.
- b) Los individuos de *T. minuta* crecidos en un mismo ambiente expresarán diferencias en la composición del aceite esencial debidas al genotipo.
- c) Las diferencias morfológicas y de composición de aceite esencial debidas al genotipo se expresarán en la descendencia.
- d) El aceite esencial de los diferentes individuos de *T. minuta* presentará diferencias en su bioactividad, relacionadas con las variaciones en su composición.

OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento de la especie *Tagetes minuta* L. determinando la variabilidad genética de caracteres morfológicos, fenológicos y de aceite esencial, estableciendo criterios de selección referidos a la importancia de su aplicación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar fenotípicamente *familias* de *Tagetes minuta* y determinar sus parámetros genéticos. Entendiéndose por familias a un grupo de individuos emparentados entre sí, generados a partir de semillas obtenidas por autofecundación de las inflorescencias de una planta.
2. Caracterizar *familias* selectas de *Tagetes minuta* por los compuestos principales de su aceite esencial.
3. Evaluar comparativamente perfiles de composición del aceite esencial por su bioactividad.
4. Identificar caracteres discriminantes que permitan iniciar un proceso de selección de individuos que se destaquen por caracteres morfológicos, fenológicos, químicos y por la bioactividad del aceite esencial.

CAPÍTULO II

**Caracterización y evaluación fenotípica en
Tagetes minuta: individuos selectos y sus
familias derivadas**

INTRODUCCIÓN

Para conocer, conservar y usar sustentablemente un recurso natural, es necesaria su caracterización y evaluación. De este modo se describen los atributos que permiten diferenciar poblaciones de una misma especie y determinar su estructura, variabilidad y utilidad (Jaramillo & Baena, 2000). Es a través de los caracteres morfológicos cuali y cuantitativos como mejor se pueden describir las plantas a los fines de establecer criterios para su manejo y aprovechamiento tanto de poblaciones silvestres como de cultivos. Los mejores descriptores son aquellos que se pueden detectar a simple vista, de fácil registro, que tienen alta heredabilidad y alto valor taxonómico y agronómico, que se pueden aplicar a muestras pequeñas y que permiten diferenciar poblaciones (Jaramillo & Baena, 2000). Complementariamente, la evaluación consiste en describir el rendimiento de material vegetal y en el caso de las plantas aromáticas también su producción de AE. Estos indicadores están asociados a caracteres cuantitativos que son más variables con el ambiente y de baja heredabilidad.

La caracterización y evaluación de una especie silvestre, como comienzo de un proceso de selección y cultivo, requiere de una población inicial que represente su variabilidad natural. En especies alógamas esa variabilidad es mayor por lo que es necesario que esa población inicial sea grande. Debido a que los caracteres a evaluar constituyen la expresión fenotípica del genotipo y son influenciados por el entorno para iniciar el proceso de cultivo es necesario estudiar las plantas en diferentes ambientes, ya sea simultáneamente en diferentes lugares o distintos años en el mismo o distinto lugar. Por otro lado, también se requiere un tratamiento igualitario de las plantas en las distintas etapas del proceso (siembra, transplante, mediciones, cosecha y poscosecha) en cada ciclo de cultivo para evitar alterar los valores de variabilidad. A partir del cultivo de esa población manejada uniformemente, el proceso continúa con la selección de individuos que se destaquen por caracteres de interés con el fin de obtener los mejores genotipos posibles (Cubero, 2003). De esta manera se realizan selecciones sucesivas de genotipos en base a características deseadas. La expresión de dichas características se observa en el fenotipo pero debe ser una manifestación del genotipo y no un efecto del ambiente (Jaramillo & Baena, 2000). El ciclo de “siembra-cosecha-siembra de semillas seleccionadas” crea una fortísima presión de selección que tiene como consecuencia hacer pasar una especie silvestre a cultivada. A ese proceso se lo denomina domesticación y a la

planta que surge de la silvestre, domesticada (Cubero, 2003). Para poder evaluar si el proceso de domesticación y selección está siendo eficiente es necesario tomar como herramienta parámetros genéticos que van a ser estimados a través de la variación fenotípica de los caracteres medidos.

Partiendo de la base que la expresión fenotípica responde a una componente genética, otra ambiental y una tercera que consiste en la interacción genotipo-ambiente; la varianza será el mejor estimador para medir la variación fenotípica existente en el conjunto de individuos (Cubero, 2003). En consecuencia, la varianza fenotípica depende de la suma de las varianzas genética, ambiental y de interacción. Una forma de evaluar la continuidad de caracteres fenotípicos de los padres en la descendencia es a través de la *heredabilidad*.

La heredabilidad en sentido amplio es un parámetro genético que se define como el porcentaje de la variación observada que es atribuible a los genes. Es una forma de medir si las diferencias que se observan entre individuos se deben al genotipo o al ambiente y en qué proporción a uno y a otro; puede tomar valores entre cero y uno (Cubero, 2003).

$$H = VG/VF; \quad VF = VG + VA + VG \times VA$$

Siendo H: heredabilidad, VG: varianza genotípica, VF: varianza fenotípica, VA: varianza ambiental, VG x VA: varianza de la interacción genotipo-ambiente.

Otro parámetro genético es el *diferencial de selección*, que consiste en un valor que brinda una medida de la superioridad de los progenitores seleccionados. Se define como la desviación del valor fenotípico medio de los individuos seleccionados como progenitores con respecto a la media de la población inicial.

En este marco es necesario plantear la base genética que presentan los caracteres fenotípicos cuantitativos y cualitativos. Los primeros son más influenciados por el ambiente, de variación continua y de carácter poligénico; con ellos se calcula la heredabilidad y el diferencial de selección. Los segundos son menos influenciados por el ambiente, de variación discontinua y son el efecto de un único gen de herencia simple; se analizan por presencia/ausencia en el individuo y se expresan como porcentaje en la población.

Debido a que *T. minuta* es una especie nativa, con poblaciones adaptadas a diferentes condiciones ambientales y con amplia variabilidad es necesario que dicha variabilidad sea considerada para caracterizar y evaluar la especie. Si bien *T. minuta* es esencialmente alógama también tiene la facultad de autopolinizarse. Esta característica posibilita que se

evalúe a los progenitores y su descendencia por autofecundación y así medir la heredabilidad de los caracteres. Las plantas obtenidas de esas semillas generadas por autofecundación constituyen entre sí hermanos completos. Los caracteres más interesantes de seleccionar son aquellos relacionados con la producción de AE y los compuestos que lo forman ya que es el producto de mayor uso e importancia en esta aromática. Así la selección se orienta a caracteres como la estructura de planta, la altura o el número de ramas ya que mayores valores implican mayor follaje y, por ende, mayor rendimiento de AE. Por otro lado la selección también se orienta a la presencia mayoritaria de alguno de los compuestos principales en el AE que generalmente son los responsables de las propiedades biológicas (Bakkali *et al.*, 2008) y además son utilizados en la industria (Arun Kumar *et al.*, 2004).

Como siguiente requisito es necesario que esos caracteres de interés seleccionados se mantengan en la descendencia, para poder generar una población con mayor rendimiento de AE y de mejor calidad.

En este contexto y considerando que ante una misma presión ambiental la expresión fenotípica está determinada por el genotipo y su interacción con el ambiente; al comparar en un mismo ambiente individuos de distintas procedencias se expresarán características morfológicas y de AE diferenciales que pueden ser heredadas por la descendencia.

Para poner a prueba esta hipótesis se planteó como objetivo específico caracterizar fenotípicamente familias de *Tagetes minuta* y determinar sus parámetros genéticos.

Sección 1: Generación y caracterización de una población de *Tagetes minuta* de base genética amplia - Obtención de individuos selectos

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de base genética amplia. Se recolectaron semillas de 5 poblaciones silvestres de la provincia de Córdoba separadas entre sí por una distancia mayor a 4 km, radio de vuelo de *Apis mellifera* (Seeley, 1985), principal polinizador en Asteráceas (Torres y Galetto, 2008) para garantizar el aislamiento reproductivo (Fig. II:1, Tabla II.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 II.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 (Fig. II.2). Se consideró que dicha población presentó una base genética amplia debido a que contuvo la diversidad génica de *T. minuta* de diferentes zonas de la provincia de Córdoba. Las semillas fueron sembradas en invernadero, los plantines obtenidos se mantuvieron bajo condiciones controladas hasta su trasplante a campo.

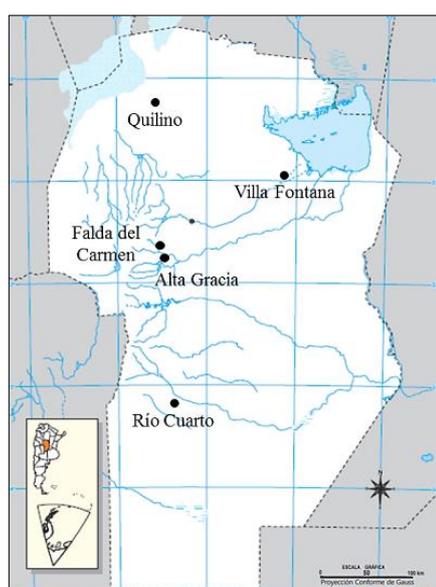


Figura II.1: Mapa de la provincia de Córdoba con las localidades de recolección de semillas de poblaciones silvestres de *T. minuta*. Escala gráfica 100 km (Proyección conforme de Gauss). Propiedad Ley N° 11723.

Tabla II.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.

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

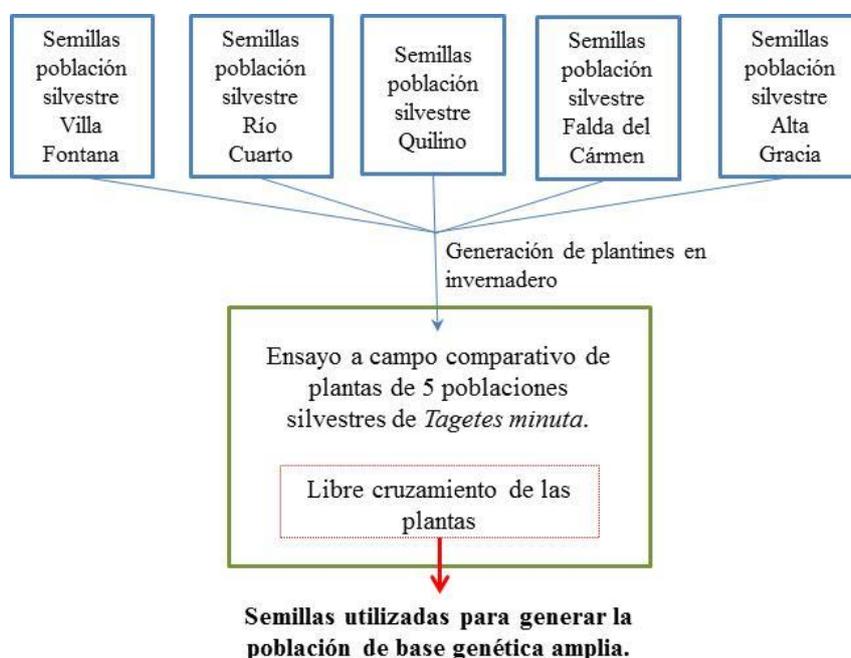


Figura II.2: Esquema de la obtención de semillas que fueron utilizadas para conformar la población de base genética amplia.

Ensayo a campo. 672 plantines, representativos de la variabilidad natural, fueron llevados 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. Además se colocaron como bordura perimetral 104 plantas para reducir el efecto borde. Las plantas se mantuvieron a campo por un período de cinco meses, con las labores culturales necesarias (Muñoz, 2000; Ojeda, 2004).

Los caracteres cuantitativos y cualitativos evaluados fueron definidos en base experiencias de cultivo preliminares (Massuh, 2007) y son los que mejor explican la variabilidad existente en *T. minuta*. Todos los caracteres se midieron al inicio de la floración, estadio donde la planta cesa su crecimiento las mediciones de altura se hicieron en diferentes etapas del cultivo y las de peso se realizaron posteriormente a la cosecha (Muñoz, 2000; Ojeda, 2004).

Caracteres cuantitativos:

Altura Inicial: Medición realizada a los 4 días del transplante.

Altura 2: Medición realizada a los 60 días del transplante.

Altura Final: Medición realizada previo a la cosecha de las plantas.

En todos los casos, la altura de planta (cm) se tomó desde la base hasta el extremo distal de la rama más larga.

N° de ramas: cantidad de ramas que nacen desde el eje principal o del punto de ramificación, dependiendo de la estructura de la planta.

Peso fresco y seco de planta completa (g): PFPC y PSPC respectivamente.

Peso fresco y seco de planta completa sin eje principal (g): PFPCs/EP y PSPC/sEP respectivamente.

Peso fresco y seco del eje principal (g): PFEP y PSEP respectivamente.

A partir de los caracteres medidos se estimaron las siguientes variables:

- Crecimiento: $\text{Altura Final} - \text{Altura Inicial}$.
- % EP/PLANTA: proporción del peso fresco del eje principal en el peso fresco de la planta completa.
- % H₂O/PLANTA: proporción de agua en el peso fresco de la planta completa.

Caracteres cualitativos:

Estructura de planta: Definida por la forma del follaje, la distribución de las ramas y la presencia de eje principal.

Presencia de eje principal: Rama central, directriz en la planta, de la cual salen ramificaciones secundarias subramificadas (Fig. II.7 b) o simples (Fig. II.7 c).

Los siguientes tres 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.

Prevalencia de BF y P: Mayor presencia de botones florales y pimpollos.

Prevalencia de F: Mayor presencia de flores.

Presencia de Frutos: Aparición de frutos.

Disposición de Inflorescencia: según se encontrasen a lo largo de toda la rama o en su extremo distal; se diferenciaron en intercalar o terminal respectivamente.

Densidad de inflorescencia: Se determinó por comparación de la densidad de las inflorescencias de cada planta con dos modelos seleccionados previamente. Se diferenciaron en densa o laxa (Fig. II.3).

Color de inflorescencia: Se diferenció en amarillo o blanco (Fig. II.4).

Identificación de la población selecta. Se utilizó el método de selección independiente (Cubero, 2003) adaptado para seleccionar individuos que presentaron de manera simultánea todas las características deseadas. 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 transplante; antes de la aparición de botones florales. Para establecer el límite inferior de cada caracter del criterio de selección se consideró el valor medio poblacional. El criterio para definir la población selecta quedó conformado de la siguiente manera:

$$\text{Individuo selecto} = h (\geq \bar{X}) + \text{Estructura selecta de planta} + N^{\circ} \text{ de Ramas} (\geq \bar{X})$$

Las plantas de la población de base genética amplia que cumplieron con el criterio de selección constituyeron la población selecta (subgrupo de la población de base genética amplia). A cada planta se le cubrieron algunas ramas florales en estadio de botones florales con bolsas de tela sintética de trama ultrafina (Fig. II.5) para garantizar la autofecundación y obtener sus semillas para su uso en ensayos posteriores.

Cosecha y poscosecha. Cada planta fue cosechada individualmente (manteniendo su identificación) en plena floración que es el período de mayor rendimiento del AE (Muñoz, 2000; Singh *et al.*, 2003). El ensayo se dejó de regar 3 días antes de la cosecha (Sangwan *et al.*, 2001); el nivel de corte de planta se determinó a 10 cm del suelo. A los individuos seleccionados y autofecundados se los cosechó parcialmente para asegurar la madurez de las semillas (Fig. II.6).

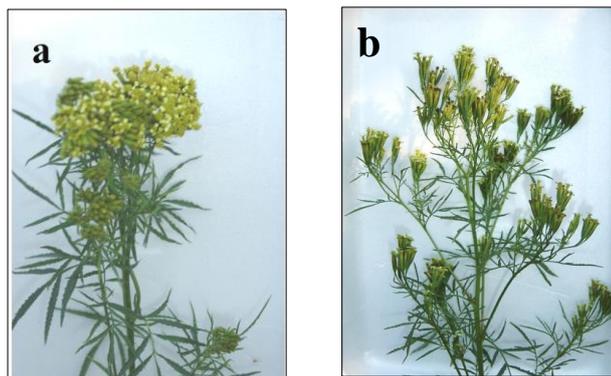


Figura II.3: Densidad de inflorescencias de *T. minuta*. a) Densa. b) Laxa.



Figura II.4: Color de inflorescencias de *T. minuta*. a) Amarilla. b) Blanca.

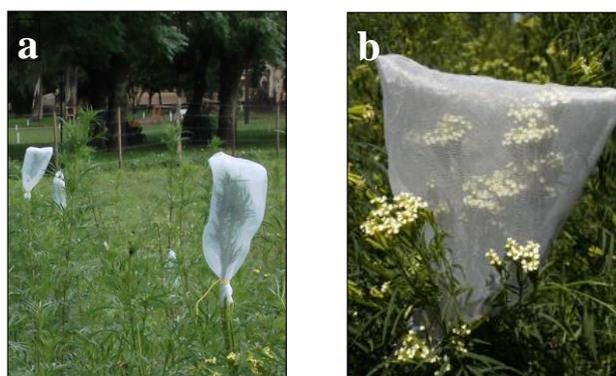


Figura II.5: Bolsa de autofecundación. Inflorescencias a) en desarrollo. b) desarrolladas dentro de la bolsa.

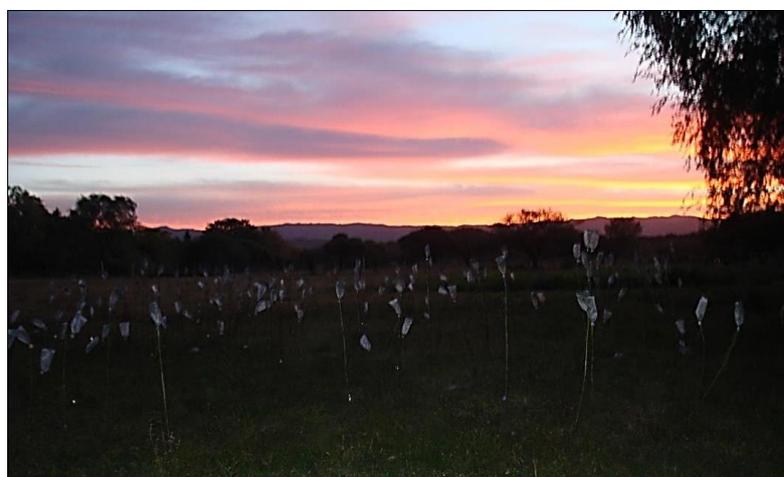


Figura II.6: Individuos selectos cosechados. Quedó en pie el eje principal y las ramas con bolsas de autofecundación.

Cada planta de la población selecta se colocó en bolsa de papel manteniendo su identificación y fue pesada (peso fresco). Las bolsas se almacenaron en una habitación techada y ventilada, secándose a temperatura ambiente siguiendo la metodología descrita por Muñoz (2000) para especies aromáticas. Una vez que las plantas estuvieron deshidratadas se las pesó nuevamente registrándose el peso seco.

Los restos de planta con las bolsas de autofecundación se cosecharon cuando estuvieron secos. Se los pesó manteniendo la identificación y se calculó su peso fresco en función del porcentaje de agua que presentó la parte de la planta cortada anteriormente. Las semillas autofecundadas de cada planta fueron almacenadas en bolsas de papel con la correspondiente identificación.

Obtención del aceite esencial. El material vegetal seco (hojas y flores) de cada una de las plantas fue destilado individualmente para la extracción del AE, su cuantificación y análisis químico por cromatografía gaseosa (éste último aspecto se desarrollará en el Capítulo III). La destilación se realizó por arrastre de vapor de agua en equipo Clevenger modificado, con cámara de extracción separada. El material vegetal destilado consistió en inflorescencias, hojas y tallos finos. Tallos gruesos y eje principal no fueron destilados ya que no aportan AE.

Las muestras de AE se deshidrataron mediante el agregado de sulfato de sodio anhidro y se conservaron en freezer (-4 °C) para ser analizadas. Se midió el volumen de AE obtenido de cada muestra de material vegetal destilada y se calculó el rendimiento, definiéndose una nueva variable cuantitativa:

Producción de AE (ml AE/100 g material vegetal seco)

Identificación de individuos selectos. A partir de la composición química, se seleccionaron 12 plantas que se identificaron como individuos selectos (subgrupo de la población selecta). Para la selección química se consideró la presencia en alto porcentaje de uno o varios de los compuestos principales del AE: limoneno, ocimeno, dihidrotagetona, *E*-tagetona, *Z*-tagetona, *Z*-ocimenona y *E*-ocimenona. De cada individuo selecto se tomaron las semillas autofecundadas para ser utilizadas en un ciclo de cultivo posterior donde se evaluaron familias.

Análisis estadístico. Con los datos del primer ciclo de cultivo se hicieron análisis descriptivos a los fines de caracterizar la población de base genética amplia, la población

selecta y los individuos selectos. De la población de base genética amplia y de la selecta se compararon los caracteres utilizados como criterio de selección y se calculó el diferencial de selección (DS).

La caracterización de los individuos selectos se realizó a nivel cuantitativo (caracteres morfológicos y de rendimiento de AE) y cualitativo (caracteres morfológicos y fenológicos). Mediante el programa estadístico *InfoStat* (Di Rienzo *et al.*, 2011) se realizaron análisis multivariados de componentes principales (ACP) para los caracteres cuantitativos (datos estandarizados). Debido a que el número de caracteres cuantitativos fue superior al de individuos selectos se realizó un análisis de correlación con el fin de reducir las variables a introducir en el ACP; se tomó como criterio eliminar aquellas con coeficiente de Pearson mayor a 0,7 ($p < 0,01$). Con los caracteres cualitativos, expresados como frecuencias relativas, se realizó un análisis de correspondencia.

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 a las cuales no todas se adaptaron.

Para el carácter estructura de planta se observaron 5 formas de las cuales se seleccionaron dos (Fig. II.7 *a* y *b*) por presentar más ramificaciones y follaje y por diferenciarse de la estructura característica de los individuos silvestres (Fig. II.7 *c*).



Figura II.7: Estructura de plantas de *T. minuta*. *a*) Las ramificaciones son de largo similar y nacen a la misma altura de la planta. *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 similar largo y nacen a lo largo del eje principal; es la estructura característica de la especie.

La población de base genética amplia mostró amplia variabilidad en cuanto a los caracteres definidos como criterio de selección (Tabla II.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 mientras que las estructuras selectas fueron la *a* o la *b* (Fig. II.7):

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

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

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

Caracteres Cuantitativos	Plantas totales	Promedio (cm)	E.E.* (cm)	Coefficiente de Variación (%)	Mín. (cm)	Máx. (cm)
Altura 2	453,00	115,00	1,44	27,60	19,00	197,00
Nº Ramas	453,00	13,00	0,43	69,23	1,00	46,00

Caracter Cualitativo	Plantas totales	Estruc. "a" (%)	Estruc. "b" (%)	Estruc. "c" (%)	Otras Estruc. (%)
Estructura	453,00	27,81	51,65	13,47	7,07

*E.E.: Error estándar.

Las 117 plantas que cumplieron con el criterio de selección constituyeron la población selecta (Tabla II.3) que 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.

Tabla II.3: Población selecta: medidas de resumen. Caracteres cuanti y cualitativos utilizados como criterio de selección morfológica.

Caracteres Cuantitativos	Plantas totales	Promedio (cm)	E.E. (cm)	Coefficiente de Variación (%)	Mín. (cm)	Máx. (cm)
Altura 2	117,00	152,91	1,43	10,12	122,00	192,00
Nº Ramas	117,00	23,43	0,58	28,45	13,00	46,00

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

El proceso final de selección se llevó a cabo sobre la población selecta, tomando como criterio de selección la composición química del AE. Se seleccionaron 12 individuos que se destacaron por presentar mayor proporción de alguno de los 7 compuestos principales del AE (Fig. II.8). En estos individuos los 7 compuestos principales conformaron en promedio el 85,6% de la composición total. Entre los individuos selectos se observó gran variabilidad en todos los caracteres evaluados, tanto cuantitativos (Fig. II.9) como cualitativos (Fig. II.10), excepto para estructura de planta que sólo fue representada por la forma *b* (Fig. II.7).

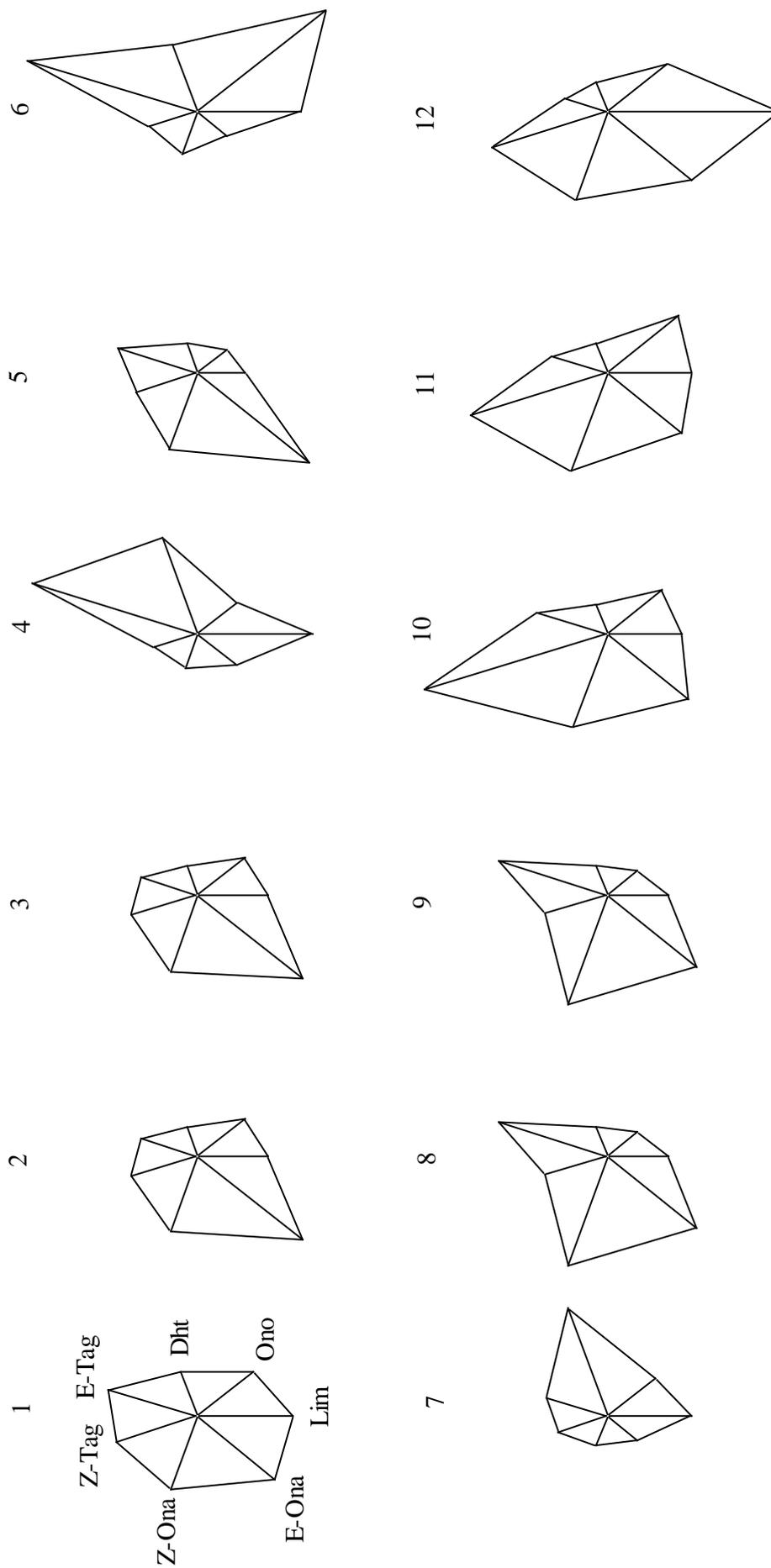


Figura II.8: Representación del perfil de AE de los 12 individuos selectos de *T. minuta*. Porcentaje relativo de los 7 compuestos principales.
 Lim: limoneno; Ono: ocimeno; Dht: dihidrotagetona; E-Tag: E-tagetona; Z-Tag: Z-tagetona; Z-Ona: Z-ocimenona; E-Ona: E-ocimenona.

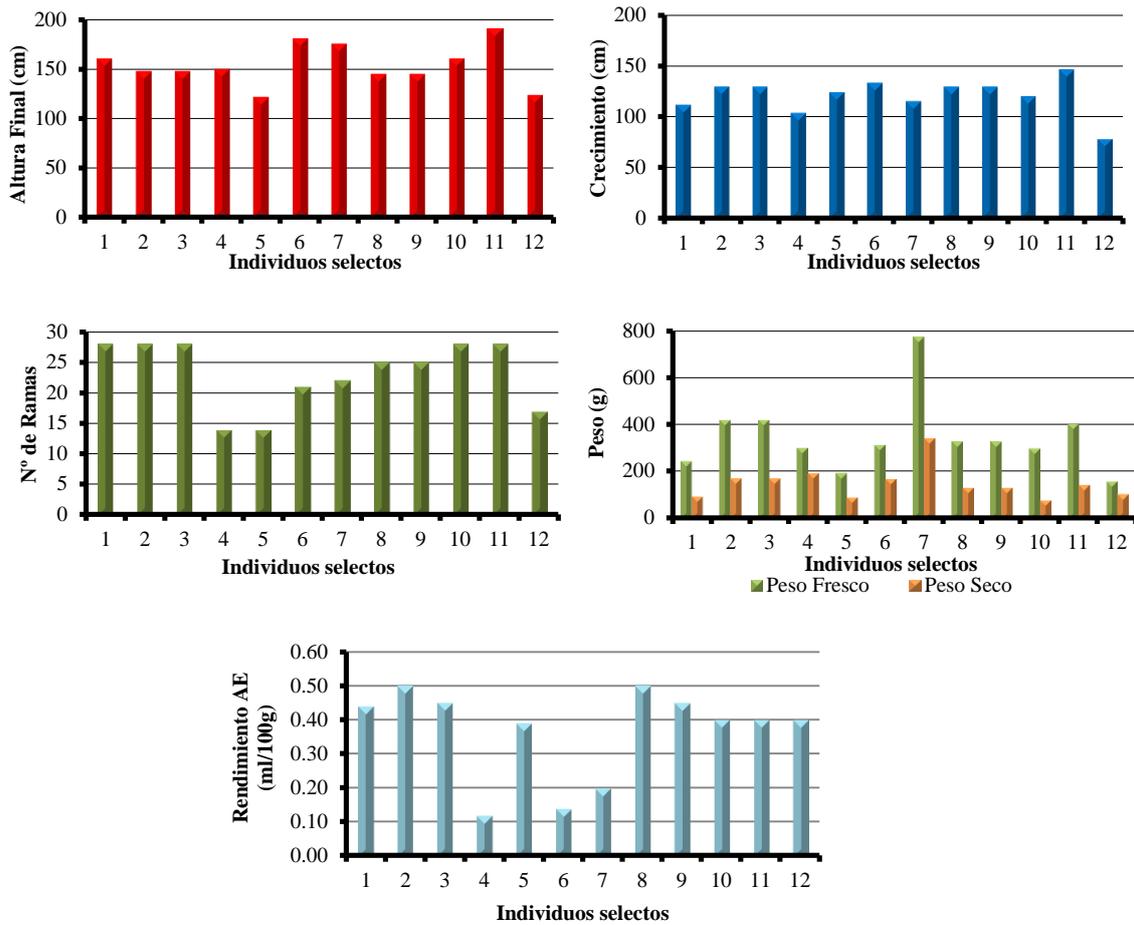


Figura II.9: Caracteres cuantitativos de los individuos selectos.

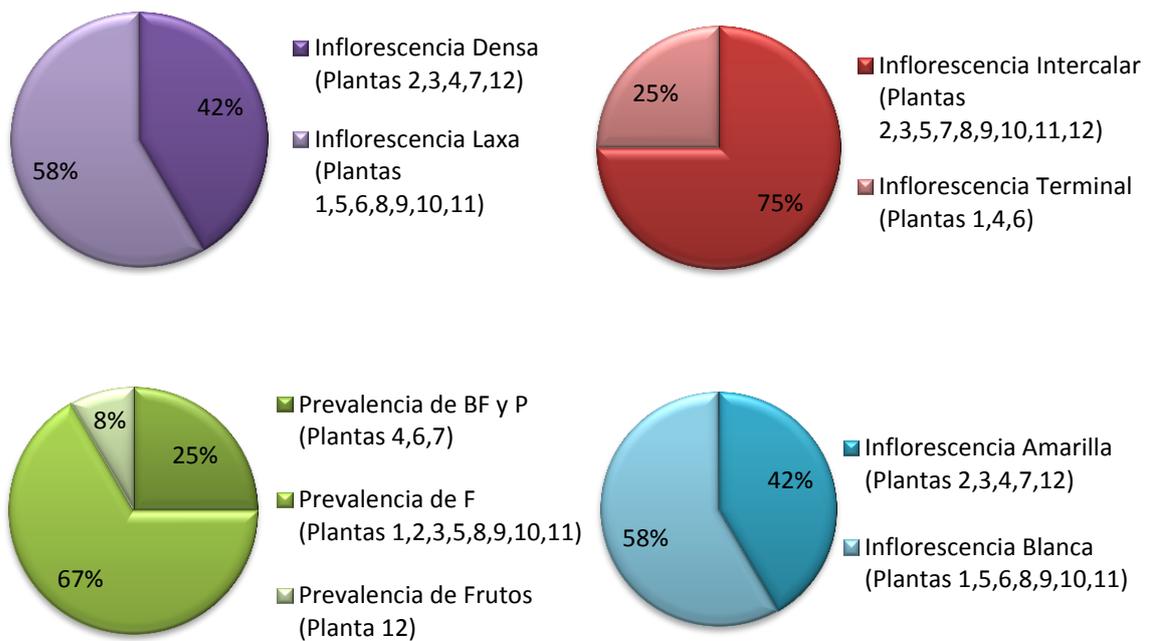


Figura II.10: Caracteres cualitativos de los individuos selectos.

Mediante el análisis de correlación se redujo el número de caracteres morfológicos cuantitativos de 14 a 7: %EP/PLANTA, PSPC/sEP, altura final, crecimiento, N° de ramas, %H₂O/PLANTA y AE en 100 g de material vegetal. Con estos 7 caracteres se realizó un ACP en el que el 70,9 % de la variabilidad observada entre los individuos selectos fue explicada por las dos primeras componentes (CP1 y CP2) (Fig. II.11). A nivel de la CP1, componente que explica el 42,7 % de la variabilidad total, las variables con más inercia fueron el N° de ramas y %EP/PLANTA; mientras que, a nivel de la CP2 (componente que explica 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. II.11). Se observó una correlación positiva para el carácter altura final con los caracteres N° de ramas, crecimiento, %H₂O/PLANTA y PSPC/sEP los cuales son indicadores de mayor tamaño de planta y mayor fitomasa características por las que se destacaron los individuos selectos 1, 2, 3, 8, 9, 10 y 11 que también presentaron mayor producción de AE en 100gr. 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 selectos 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 de frutos; en oposición, los individuos 4, 6 y 7 presentaron floración retrasada (predominaron botones florales y pimpollos) (Fig. II.12). Los individuos selectos 1, 5, 8, 9, 10, 11 y 12 se diferenciaron de los demás por presentar inflorescencias blancas, laxas y de disposición intercalar; además se observó asociación entre los caracteres color y densidad de inflorescencias.

El 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 (Fig. II.9). Se destacaron por su rendimiento los individuos selectos 2, 3, 8 y 9 mientras que los individuos 4 y 6 fueron los de menor producción.

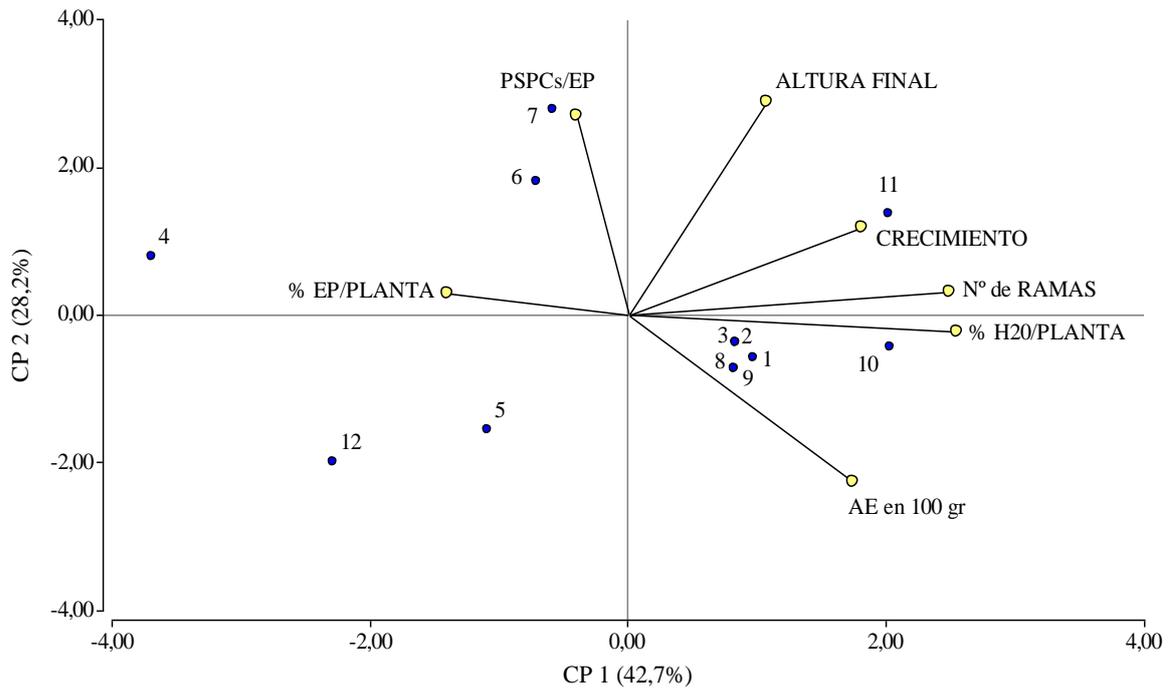


Figura II.11: Análisis de componentes principales de caracteres cuantitativos en los individuos selectos. Se compararon sólo aquellos de mayor peso para los individuos selectos. Los dos primeros ejes explican el 70,9 % de la variabilidad. Círculos azules: individuos selectos; vectores con círculo amarillo: caracteres.

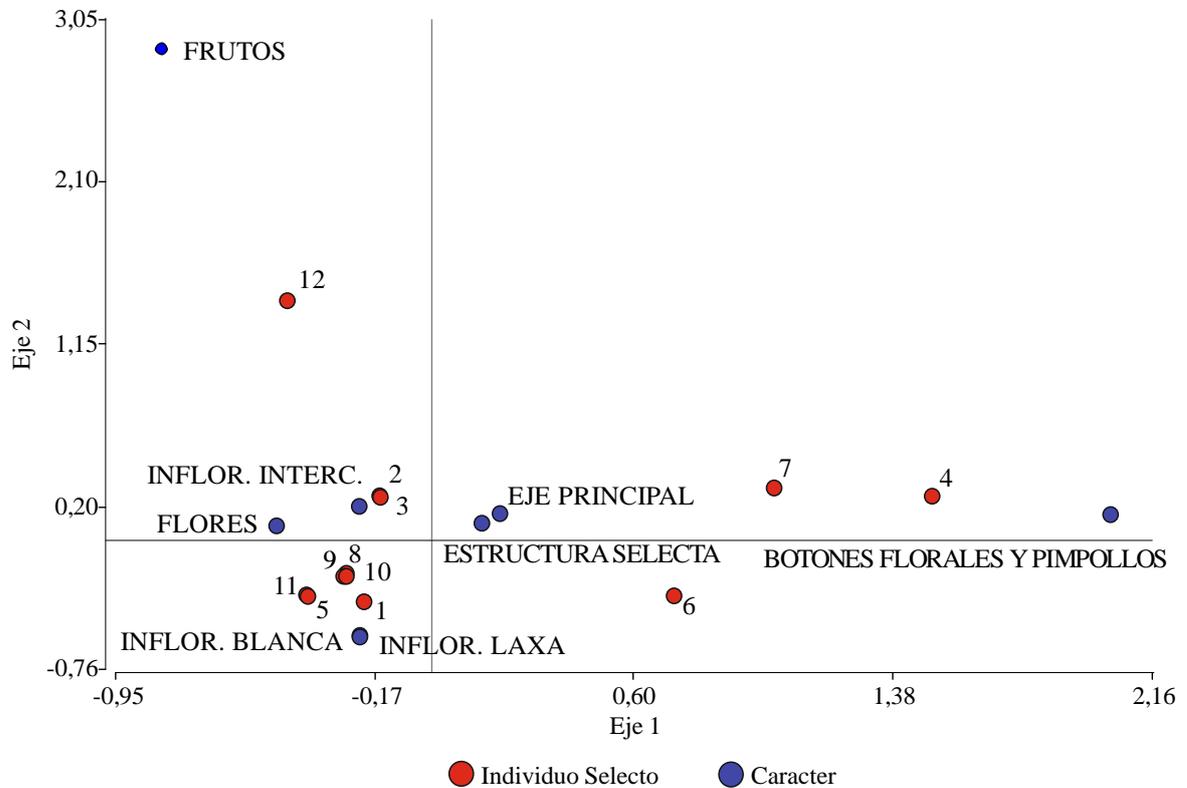


Figura II.12: Análisis de correspondencia de caracteres cualitativos. Se compararon los individuos selectos (círculos rojos) en relación con los caracteres (círculos azules).

DISCUSIÓN

En un proceso de domesticación la eficacia de la selección se basa en la variabilidad existente en el material inicial (Bernáth, 2002). 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 se reflejó en los altos valores de coeficiente de variación y constituyó un importante comienzo en el proceso de domesticación y mejoramiento.

Como indica Cubero (2003), al constituir una población con características superiores se busca mejorar la genética de la siguiente generación. Los caracteres altura, estructura de planta y N° de ramas definidos como criterio de selección constituyeron buenos descriptores para diferenciar las plantas; además presentan 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 de la cosecha es posible estimar la producción del cultivo. Los valores de estos descriptores en las plantas evaluadas fueron respuestas fenotípicas del genotipo, del ambiente y de la interacción entre ambos. Mediante el proceso de selección se aumenta la frecuencia de expresión de los caracteres deseados en esa nueva población. En esta primera etapa de selección la población selecta 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), quién 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 es una respuesta al proceso de selección y está correlacionado con un mayor follaje y mayor producción de AE.

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

Los 7 compuestos principales identificados en el AE estuvieron presentes en todos los individuos selectos aunque en diferente proporción, coincidentemente con lo descrito por Gil *et al.* (2000) y Chamorro *et al.* (2008). Los compuestos de mayor peso para diferenciar a los individuos selectos en función de la composición del AE 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, en otros trabajos se atribuyó a las condiciones ambientales y de manejo como las causas de las diferencias en la composición del AE (Gil *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2003; Chamorro *et al.*, 2008). Gil *et al.* (2000) y Chamorro *et al.* (2008) obtuvieron un AE rico en dihidrotagetona destilando hojas de plantas no florecidas mientras que Singh *et al.* (2003) lo extrajeron de plantas cultivadas en otoño. La existencia de una condicionante genética fuerte en la expresión fenotípica “composición del AE” de los individuos selectos posibilita continuar un proceso de selección química que, independientemente del manejo agronómico, permitirá obtener plantas con AE de composición menos variable. El rendimiento promedio de AE de todos los individuos selectos (0,37 ml/100g) fue inferior al obtenido por Gil *et al.* (2000) (0,88 ml/100g) pero superior al obtenido por Singh *et al.* (2003) (0,30 ml/100g) por lo que está dentro del rango de la especie.

Tanto Amujoyegbe *et al.* (2012) como Arora *et al.* (2010) destacan las ventajas del cultivo de plantas medicinales respecto a la recolección silvestre. Teniendo en cuenta la demanda que hay del AE de *T. minuta* (Bandoni, 2002) y la presión de extracción que tiene en la provincia de Córdoba (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.

Sección 2: Generación de familias de hermanos completos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para evaluar las familias originadas a partir de los individuos selectos se generaron dos nuevos ciclos de cultivo en años subsiguientes (Fig. II.13). Se nombró a las familias con el mismo número identificadorio (del 1 al 12) según el individuo selecto del que provenían.

El segundo ciclo de cultivo se realizó en el Campo Escuela de la Facultad de Ciencias Agropecuarias - UNC ($31^{\circ} 29' 11''$ S – $64^{\circ} 00' 22''$ O; Km 15 camino a Capilla de los Remedios, Córdoba). Se buscó una localidad diferente a la del primer ensayo para evaluar las familias en otro ambiente. Con las semillas (generadas por autofecundación) de los 12 individuos selectos se obtuvieron 240 plantines en invernáculo los cuales se mantuvieron identificados. La parcela experimental se diseñó con una familia por surco, cada uno con 20 plantas (hermanos completos). La separación entre surcos fue de 0,70 m y entre plantas 0,50 m. Además se generó un excedente de plantines de *T. minuta* que fueron colocados perimetralmente en el ensayo y constituyeron la bordura. Los caracteres evaluados y la metodología empleada fueron las mismas que las descriptas anteriormente para el primer ensayo a campo. Por cada familia se autofecundó una planta y se destilaron una o dos plantas para luego analizar su AE.

Se incorporaron dos nuevos caracteres cualitativos a partir de la observación de diferencias entre familias en relación a las glándulas oleíferas foliares:

Tipo de Glándulas: Presencia de glándulas oleíferas alargadas y puntiformes o sólo alargadas en la lámina foliar, se diferenció en glándulas de dos tipos o de un tipo respectivamente (Fig. II.14 a).

Densidad de Glándulas: Cantidad de glándulas oleíferas en la lámina foliar. Se diferenció en abundantes (más de 100 glándulas por folíolo; Fig. II.14 b) y escasas (menos de 100 glándulas por folíolo; Fig. II.14 c).

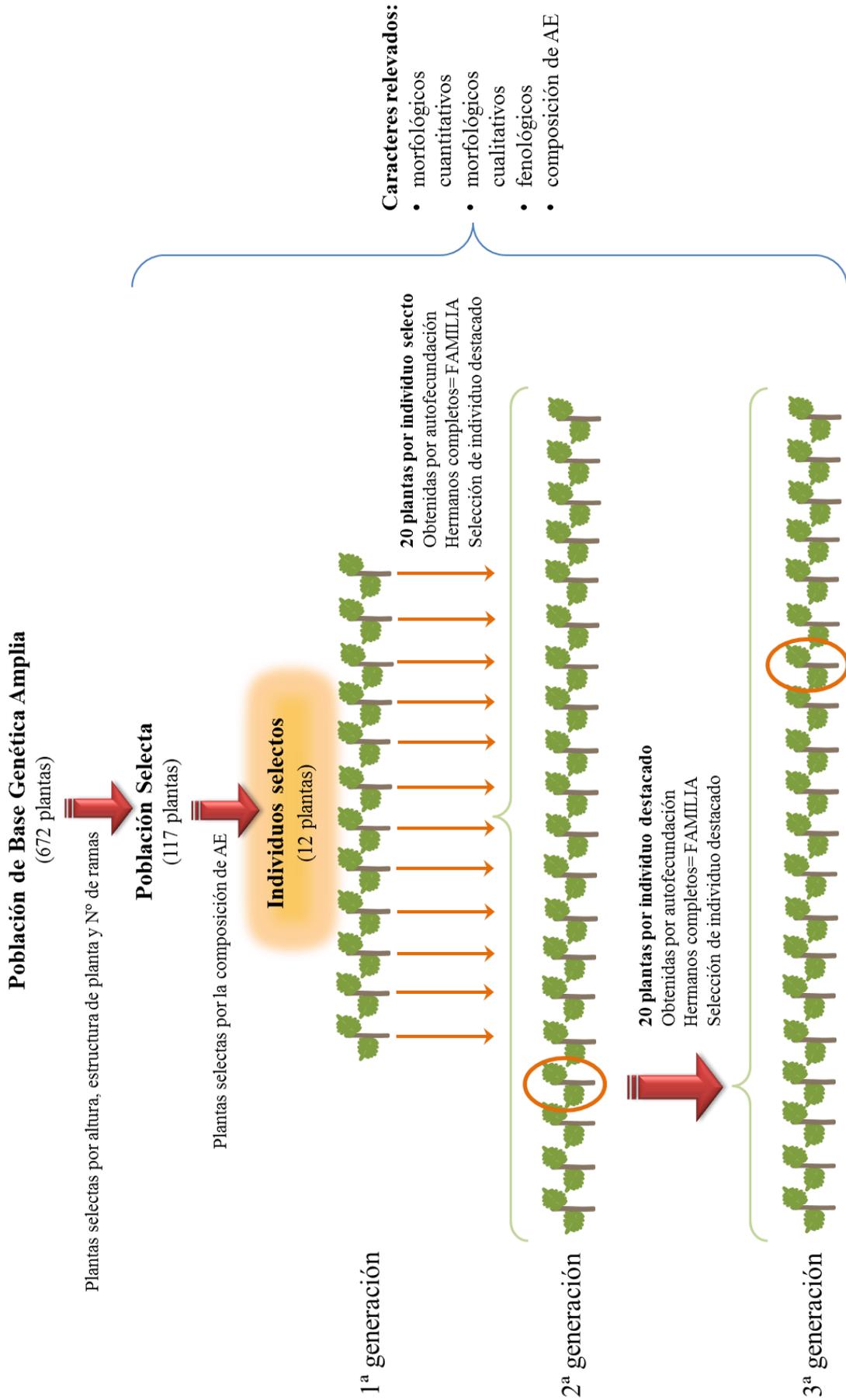


Figura II.13: Esquema del proceso de selección de individuos de *T. minuta*.

En relación al rendimiento de AE se incorporó una nueva variable que considera a las familias:

Producción promedio de AE por familia: Rendimiento de AE en el peso seco promedio de planta completa sin eje principal por familia en función a su rendimiento de AE en 100 g.

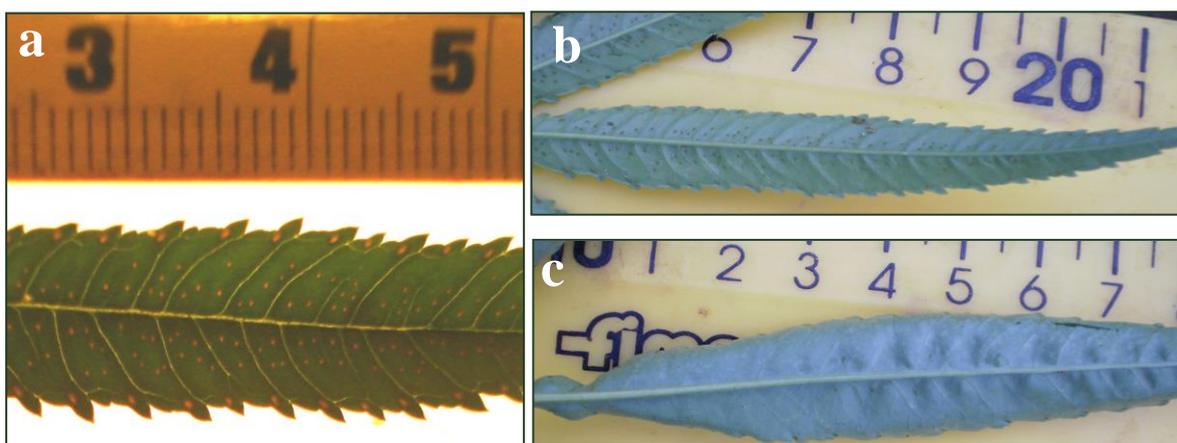


Figura II.14: Folíolo de *T. minuta*. a) Detalle de donde se muestran los dos tipos de glándulas oleíferas, vistas por transparencia. En los bordes del folíolo se encuentran las glándulas alargadas y en el centro, perinervalmente, las puntiformes. b) Folíolo con glándulas abundantes. c) Folíolo con glándulas escasas. Escala en centímetros.

Se realizó un tercer ciclo de cultivo en el verano siguiente para comparar las familias en la tercer generación. La parcela nuevamente se implantó en el Campo Escuela (FCA-UNC) pero por ser realizada en el siguiente verano se considera que el ambiente es diferente. Para ello se generaron plantines a partir de semillas obtenidas por autofecundación de una planta por familia de la segunda generación (segundo ciclo de cultivo). Las plantas autofecundadas fueron selectas por caracteres morfológicos y químicos (composición del AE). El diseño de la parcela experimental fue idéntico al descrito anteriormente: 12 surcos de 20 plantas cada uno perimetralmente rodeados por la bordura, con una familia de hermanos completos en cada surco. Los caracteres a evaluar y la metodología empleada fueron iguales a las detalladas anteriormente para el segundo ensayo a campo. Por cada familia se autofecundó una planta y se destilaron tres plantas para luego analizar su AE.

Análisis estadísticos. Todos los análisis se realizaron mediante el programa estadístico *InfoStat* (Di Rienzo *et al.*, 2011) con un nivel de significación de $\alpha = 0,05$.

Con los valores obtenidos para cada uno de los caracteres cuantitativos medidos en las plantas en los tres ciclos de cultivo se estimó el parámetro genético de heredabilidad en sentido amplio (Mariotti, 1986; Falconer & Mackay, 2001). Para ello se realizaron análisis por modelos lineales generalizados mixtos (MLGM) con el programa estadístico *InfoStat* (Di Rienzo *et al.*, 2011) con acceso a la plataforma *R* (R Development Core Team, 2011) y se calcularon los componentes de la varianza fenotípica. El modelo incluyó:

- Familias: variación fenotípica de origen genético.
- Ciclo de cultivo: variación fenotípica de origen ambiental.
- Familia-Ciclo de cultivo: variación fenotípica por interacción genotipo-ambiente.
- Residuo (con una única componente): variación fenotípica no explicada.

Finalmente, con los valores de los componentes de la varianza se calculó la heredabilidad en sentido amplio para cada carácter cuantitativo (morfológico y de composición de AE).

Para caracterizar cada familia se realizó un análisis de MLGM con cada una de las variables morfológicas cuantitativas evaluadas, incorporando el ciclo de cultivo como covariable de efecto aleatorio con el fin de eliminar el efecto año. Del análisis de cada variable se obtuvieron los residuos y predichos. Para cada individuo se obtuvo un nuevo valor de cada variable a partir de la suma de los residuos y predicho. Los nuevos valores fueron identificados agregando al nombre del carácter la denominación “corregido/a”.

Con los caracteres cuantitativos corregidos se realizaron análisis multivariados de conglomerados y de componentes principales. En el primero se evaluaron todos los caracteres y en el segundo sólo los de mayor peso definidos mediante análisis de correlación, se eliminaron aquellos con coeficiente de Pearson mayor a 0,7 ($p < 0,01$). Para determinar el nivel de corte (grupos formados) en el dendrograma del análisis de conglomerado se realizaron análisis de comparación de medias multivariadas (gDGC) con nivel de significación $\alpha = 0,05$ y encadenamiento ward. Se trabajó con los datos estandarizados.

La comparación del rendimiento de AE se hizo a través de un ANOVA sólo con las plantas del tercer ciclo de cultivo ya que en éste se dispuso de suficientes repeticiones por familia. Se utilizó como test *a posteriori* de comparación de medias el DGC (Di Rienzo *et al.*, 2001).

En el caso de los caracteres cualitativos se trabajó con tablas de contingencia mediante análisis Chi^2 considerándose como estadístico el valor de Chi^2 de Pearson; los individuos selectos (primer ciclo de cultivo) no fueron incluidos en este análisis ya que el mismo requiere de repeticiones. Se realizaron análisis de conglomerados y de correspondencia para evaluar conjuntamente todos los caracteres cualitativos relacionándolos con las familias en los tres ciclos de cultivo. Para reducir el número de caracteres cualitativos a introducir en el análisis de correspondencia se realizó un análisis de correlación con todos los caracteres cualitativos registrados y se tomó como criterio eliminar aquellos con coeficiente de Pearson mayor a 0,7 ($p < 0,01$).

RESULTADOS

Los caracteres cuantitativos morfológicos manifestaron amplia variabilidad entre los progenitores y su descendencia, esto se reflejó en los bajos valores de heredabilidad que presentaron (Tabla II.4). Sin embargo los componentes del AE se mantuvieron con más estabilidad en la descendencia. Se destacaron los compuestos *E*-ocimenona y dihidrotagetona (DHT) que presentaron los mayores valores de heredabilidad (Tabla II.5).

Tabla II.4: Heredabilidad de los caracteres morfológicos y varianzas que la determinan.

Caracter	Heredabilidad	VARIANZA FENOTÍPICA			
		Varianza Genética	Varianza Ambiental	Varianza GxA	Varianza Residual
Altura Final	0,13	142,91	56,69	170,41	706,27
Crecimiento	0,04	166,20	0,00	0,00	3819,60
PFPCs/EP	0,24	6985,10	0,00	3735,80	17839,10
PFEP	0,06	218,84	1768,61	290,38	1534,11
PFPC	0,23	8647,12	795,67	4152,92	23902,42
PSPCs/EP	0,21	801,05	34,05	720,87	2191,38
PSEP	0,08	44,45	286,78	55,99	196,69
PSPC	0,22	1075,29	0,00	891,91	2991,72
N° de Ramas	0,13	7,30	15,28	10,30	25,35

Tabla II.5: Heredabilidad de componentes del AE y varianzas que la determinan.

Compuesto	Heredabilidad	VARIANZA FENOTÍPICA			
		Varianza Genética	Varianza Ambiental	Varianza GxA	Varianza Residual
limoneno	0,22	4,28	6,21	6,13	2,48
ocimeno	0,13	8,11	0,00	48,33	7,22
DHT	0,44	335,81	4,09	415,00	6,23
<i>E</i>-tagetona	0,11	1,42	0,57	0,31	10,11
<i>Z</i>-tagetona	0,22	7,67	7,34	7,54	11,80
<i>Z</i>-ocimenona	0,07	9,77	54,76	75,27	3,50
<i>E</i>-ocimenona	0,55	355,95	60,27	214,59	12,54

Los valores de varianza residual elevados que presentaron los caracteres morfológicos indican que un gran porcentaje de la variación no está explicada en el

modelo. De modo contrario, los valores de varianza residual para los compuestos del AE fueron menores, indicando un mejor ajuste del modelo.

En base al análisis de conglomerado y la comparación de medias multivariadas con todos los caracteres cuantitativos se generaron 5 grupos (Fig. II.15). Mediante el análisis de correlación se redujo el número de caracteres morfológicos cuantitativos de 15 a 6: %EP/PLANTA, altura final, PSPC, crecimiento, N° de ramas, %H₂O/PLANTA. En el ACP realizado con los 6 caracteres de mayor peso (Fig. II.16) los dos primeros ejes explicaron un 86,8 % de la variabilidad. En el CP1 (53,2 %), los caracteres con mayor inercia fueron el crecimiento y la proporción peso del eje principal/peso de planta completa (% EP/Planta). En el CP2 (33,6 %), los caracteres de mayor influencia fueron altura final y el porcentaje de agua en la planta (%H₂O/PLANTA). La familia 12 se diferenció por ser la de menor tamaño y la 7 por presentar mayor valor en la relación % EP/Planta. El agrupamiento de las familias en el ACP con los caracteres de mayor peso (Fig. II.16) fue congruente con el obtenido en el análisis de conglomerados realizado con todos los caracteres (Fig. II.15).

El rendimiento de AE presentó diferencias significativas entre familias tanto en 100 g de materia seca ($F= 13,49; p < 0,0001$) (Fig. II.17 a) como en el peso seco promedio de planta completa sin eje principal ($F= 31,28; p < 0,0001$) (Fig. 17 b). Las familias 2 y 3 se destacaron en el rendimiento en 100 g y por planta, en este último los valores fueron mayores ya que ambas familias contaron con plantas grandes. Las familias 8, 9 y 11, si bien no se destacaron en el rendimiento en 100 g, al considerar el peso promedio de las plantas, el valor de rendimiento aumentó notablemente. Las familias 4, 5 y 12, presentaron plantas pequeñas (promedio de peso seco inferior a 100 g) y al expresar el rendimiento de AE por planta el valor fue menor.

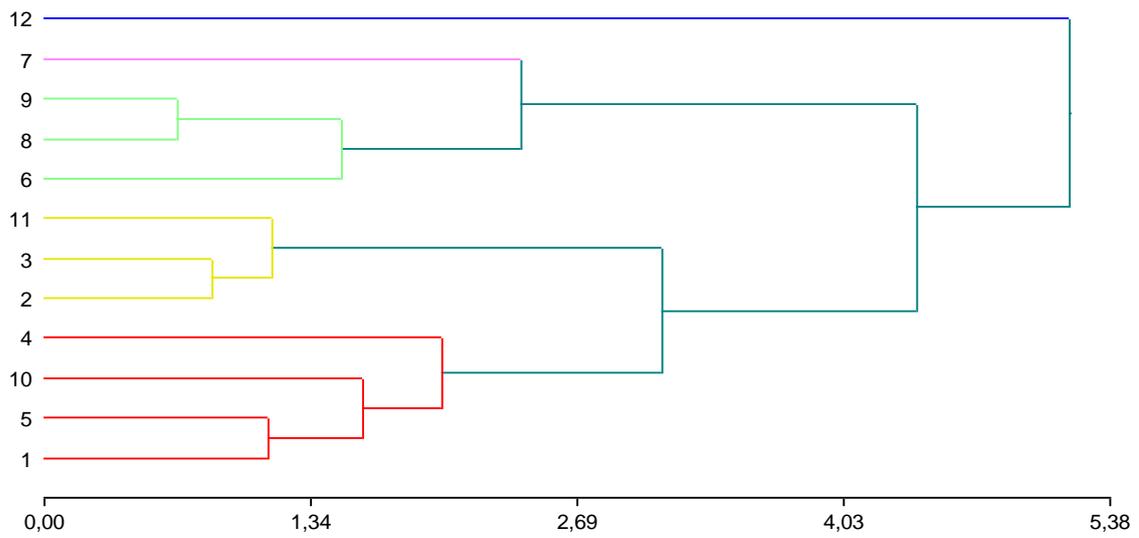


Figura II.15: Análisis de conglomerados agrupando las familias por caracteres cuantitativos. Correlación cofenética= 0,685. Se utilizaron los caracteres corregidos, el método Ward y la distancia Mahalanobis. Los grupos (representados por colores) se definieron mediante el análisis gDGC.

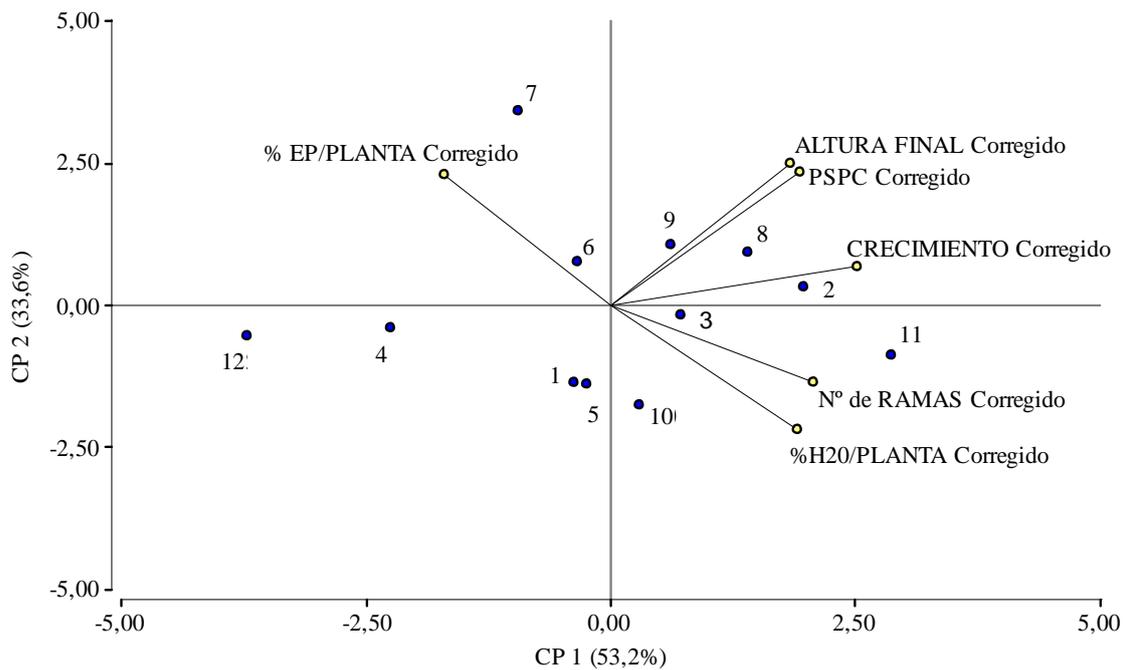


Figura II.16: Análisis de componentes principales con los caracteres cuantitativos. Se compararon los caracteres corregidos de mayor peso. Los dos primeros ejes explican el 86,8 % de la variabilidad. Círculos azules: familias; vectores con círculo amarillo: caracteres.

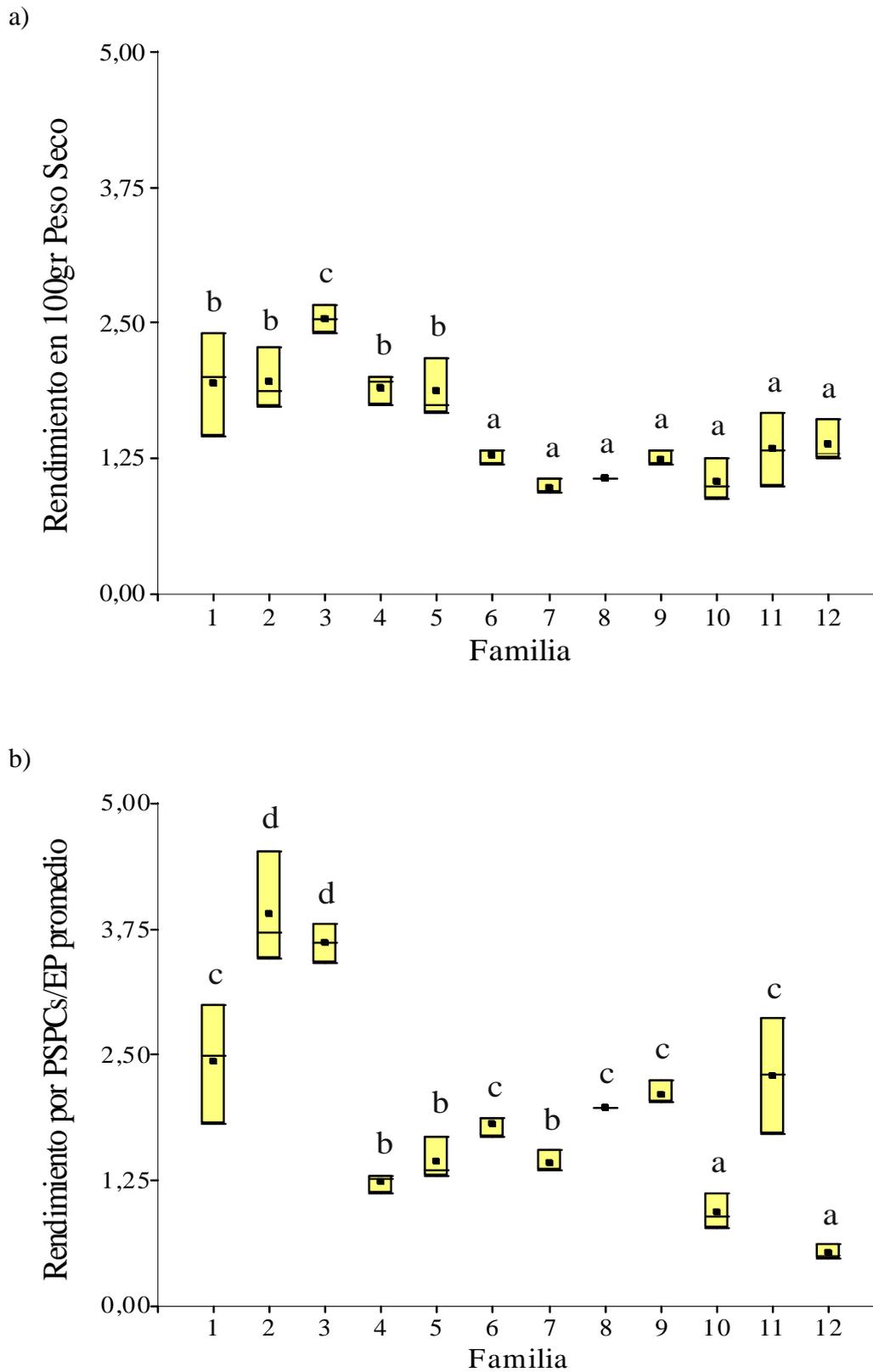


Figura II.17: Rendimiento promedio de AE por familia. a) En 100 g de material vegetal. b) En el peso seco promedio de planta completa sin eje principal. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,0001$; $\alpha = 0,05$).

Los caracteres cualitativos fueron analizados por tablas de contingencia, estableciendo relaciones con las familias en el segundo y tercer ciclo de cultivo (Tabla II.6). De las 12 familias, 5 presentaron asociaciones con al menos un caracter cualitativo en el segundo y/o tercer ciclo de cultivo. La presencia de asociación familia-caracter cualitativo en los dos ciclos de cultivo (familias 7 y 12) es indicador de la estabilidad del caracter en cuestión para esa familia y lo convierte en un buen identificador.

Los caracteres cualitativos relacionados con las inflorescencias y con las glándulas foliares presentaron dos formas de expresión mutuamente excluyentes, identificándose una relación de asociación entre éstas y algunas familias (Tabla II.6). En las familias 7, 8 y 9 hubo asociación los caracteres inflorescencias densas y amarillas y glándulas escasas y de un tipo. La familia 4 estuvo asociada con la ausencia de estructura selecta y la 12 con la presencia de frutos.

Tabla II.6: Relación entre familias y caracteres en el segundo y tercer ciclo de cultivo.

Familia	Caracter	Segundo Ciclo de Cultivo		Tercer Ciclo de Cultivo	
		<i>Chi</i> ²	<i>p</i>	<i>Chi</i> ²	<i>p</i>
4	Estructura selecta*	112,10	< 0,0001
	Inflorescencias densas	110,25	< 0,0001	212,52	< 0,0001
	Inflorescencias amarillas	108,17	< 0,0001	215,08	< 0,0001
7	Inflorescencias terminales	26,39	< 0,0057	186,37	< 0,0001
	Glándulas escasas	102,21	< 0,0001	190,65	< 0,0001
	Glándulas de un tipo	94,65	< 0,0001	201,41	< 0,0001
	Inflorescencias densas	212,52	< 0,0001
8	Inflorescencias amarillas	215,08	< 0,0001
	Glándulas escasas	190,65	< 0,0001
	Inflorescencias densas	212,52	< 0,0001
9	Inflorescencias amarillas	215,08	< 0,0001
	Glándulas escasas	190,65	< 0,0001
12	BF y P*	133,93	< 0,0001	139,89	< 0,0001
	Frutos	33,52	< 0,0001	137,26	< 0,0001

*Caracteres con asociación negativa (ausencia del carácter).

BF y P: Botones Florales y Pimpollos

Se estableció además una correlación positiva significativa para algunos de los caracteres cualitativos entre sí (Tabla II.7), lo que significa que la presencia de uno implica que el otro también se expresa en la planta. Ésta es otra forma de identificar posibles descriptores ya que los caracteres asociados tienen una fuerte base genética.

Tabla II.7: Asociaciones entre caracteres cualitativos según el análisis de correlación.

Caracteres correlacionados	Probabilidad	Coefficiente de correlación de Pearson
Inflorescencia laxa - Inflorescencia blanca	$p = 0$	0,94
Inflorescencia laxa - Glándulas abundantes	$p = 0$	0,78
Inflorescencia laxa - Glándulas de dos tipos	$p = 0$	0,91
Glándulas abundantes - Glándulas de dos tipos	$p = 0$	0,86

Al relacionar la información de las Tablas II.6 y II.7 se puede observar que los caracteres correlacionados entre sí (Tabla II.7) presentaron el mismo tipo de relación (presencia/ausencia) con las familias donde se identificó asociación (Tabla II.6). Esto refuerza la posibilidad de asociación a nivel genético de los caracteres ya que el análisis de correlación se realizó solamente con los caracteres, sin incorporar las familias.

El análisis de conglomerados con todos los caracteres cualitativos diferenció a las familias en tres grupos (Fig. II.18). Las asociaciones entre familias y caracteres cualitativos se establecieron a partir del análisis de correspondencia donde el agrupamiento de las familias fue congruente con el que presentaron en el de conglomerados. Para complementar la información entre ambos análisis se utilizaron colores indicando las relaciones familias-caracteres. Con los resultados del análisis de correlación (Tabla II.7) se eliminó un carácter de cada par asociado reduciéndose de 10 a 6 los caracteres a introducir en un nuevo análisis de conglomerados.

Con los caracteres estructura selecta, presencia de eje principal, inflorescencia intercalar, inflorescencia blanca, presencia de frutos y glándulas abundantes se realizó un nuevo análisis de conglomerados en el que se observó la misma agrupación de las familias (Fig. II.19).

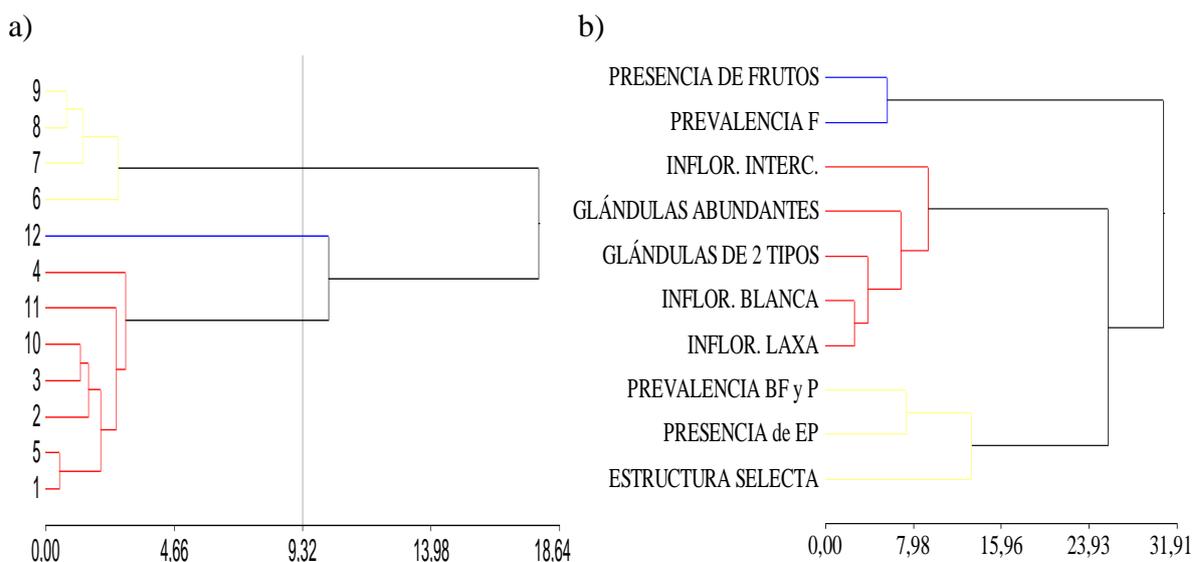


Figura II.18: Análisis de conglomerados con todos los caracteres cualitativos. Se separaron a) familias en función de los caracteres, correlación cofenética= 0,804, b) caracteres en función de las familias, correlación cofenética= 0,921. Método Ward; distancia Euclídea. Los colores de los dendrogramas indican relación explicativa entre familias y caracteres según el análisis de correspondencia.

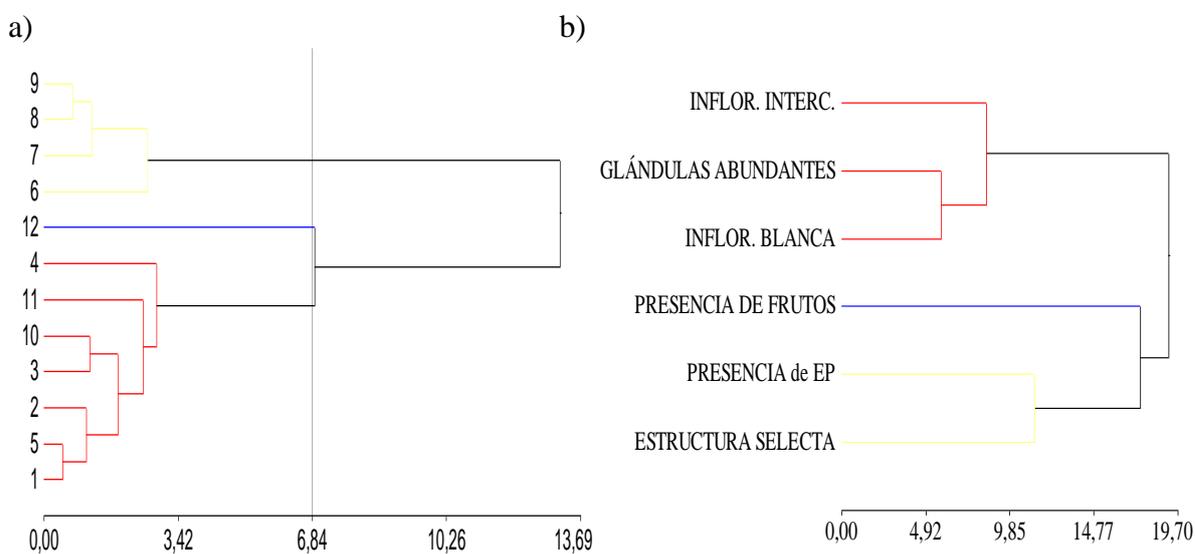


Figura II.19: Análisis de conglomerados con los caracteres cualitativos. Se utilizaron los caracteres de mayor peso definidos por gDGC. Se separaron a) familias en función de los caracteres, correlación cofenética= 0,801; b) caracteres en función de las familias, correlación cofenética= 0,809. Método Ward; distancia Euclídea. Los colores de los dendrogramas indican relación explicativa entre familias y caracteres según el análisis de correspondencia.

La familia 12 en los dos análisis de conglomerados anteriores quedó separada de las demás. Para identificar a cuál de los otros grupos pertenecía se quitó del análisis el caracter

presencia de frutos con el que presentó asociación según el análisis de correlación (Tabla II.6). En el nuevo conglomerado la familia 12 quedó agrupada con las familias 1, 2, 3, 4, 5, 10 y 11 (Fig. II.20).

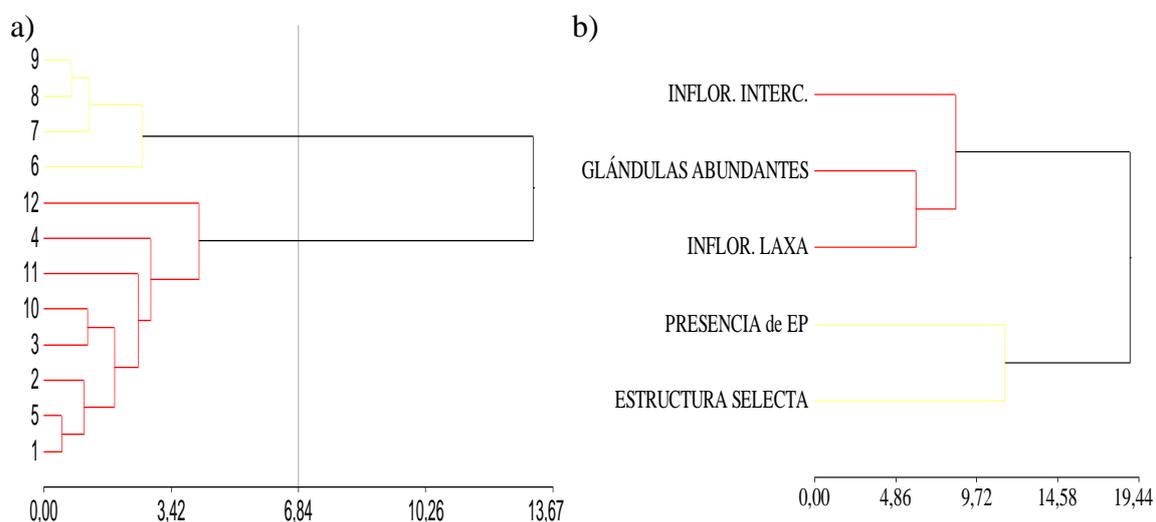
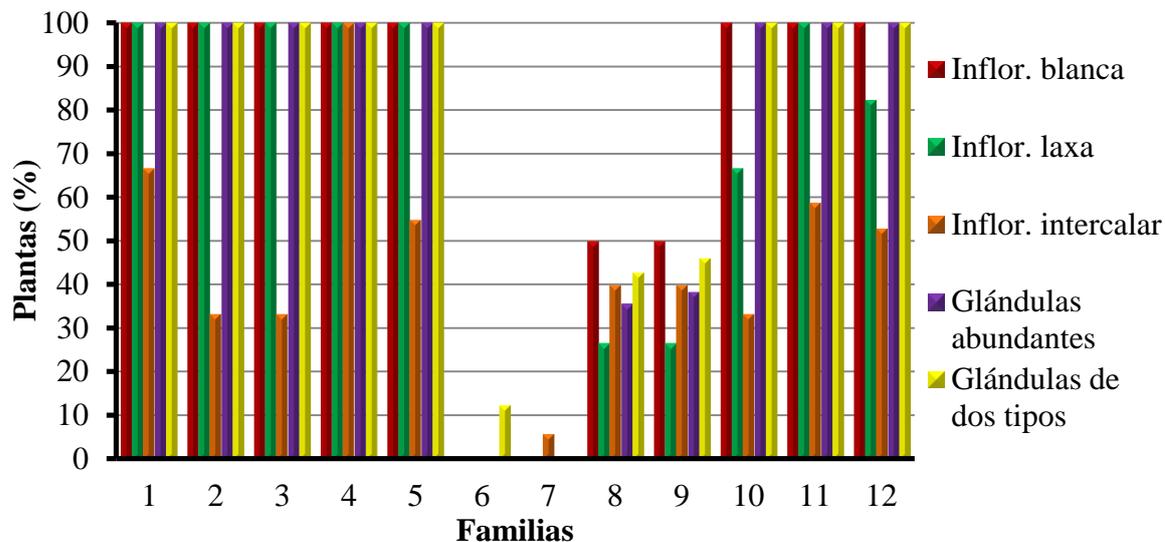


Figura II.20: Análisis de conglomerados con los caracteres cualitativos reducidos. Entre los de mayor peso se excluyó el caracter presencia de frutos. Se separaron a) familias en función de los caracteres, correlación cofenética= 0,854; b) caracteres en función de las familias, correlación cofenética= 0,863. Método Ward; distancia Euclídea. Los colores de los dendrogramas indican relación explicativa entre familias y caracteres según el análisis de correspondencia.

Los caracteres cualitativos relacionados con las inflorescencias y con las glándulas foliares también separaron a las familias en dos grupos (Fig. II.21). El primero formado por las familias 1, 2, 3, 4, 5, 10, 11 y 12 que se destacaron por sus inflorescencias blancas, laxas, de disposición intercalar en las ramas y por sus hojas con glándulas abundantes y de dos tipos (alargadas y redondas). El segundo grupo -formado por las familias 6, 7, 8 y 9- se destacó por presentar inflorescencias densas, de color amarillo y disposición terminal y glándulas foliares escasas y sólo de tipo alargado. Dichos grupos se mantuvieron en los dos ciclos de cultivo, pero en el segundo la homogeneidad en la expresión de los caracteres dentro de cada grupo fue mayor.

a)



b)

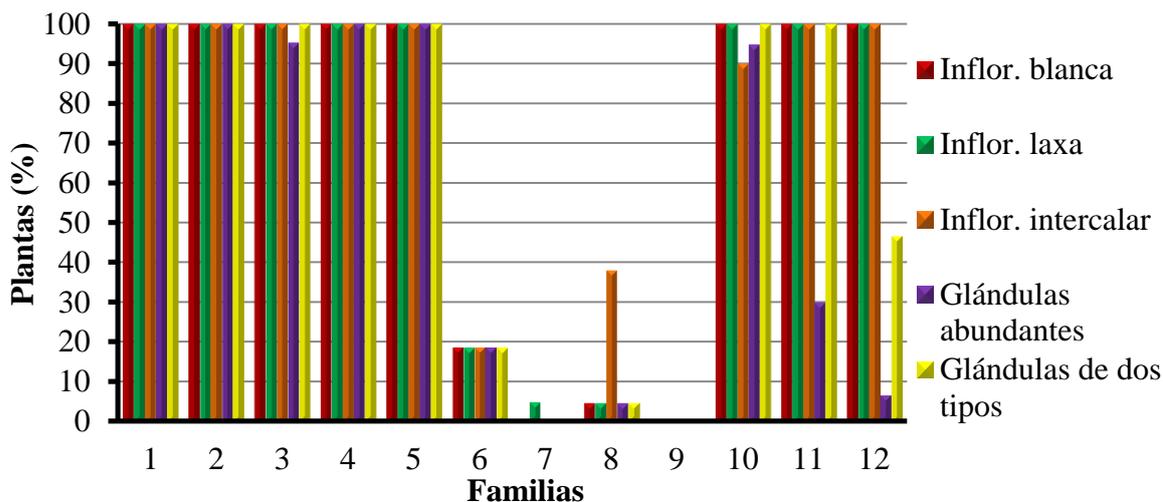


Figura II.21: Presencia de caracteres cualitativos de inflorescencias y glándulas foliares. Comparación entre familias (% de plantas por familia). *a* y *b*: segundo y tercer ciclo de cultivo respectivamente. Tipologías de cada caracter (mutuamente excluyentes): inflorescencia blanca o amarilla, laxa o densa, intercalar o terminal; glándulas escasas o abundantes, de dos tipos: alargadas y redondas o de un tipo: alargadas.

Todas las familias en el tercer ciclo de cultivo aumentaron la proporción de plantas con presencia de los caracteres descriptos para sus respectivos grupos. Esto constituye una respuesta al proceso de selección.

DISCUSIÓN

T. minuta mostró gran capacidad adaptativa al manejo en cultivo desde las bandejas de germinación hasta la implantación en las parcelas a campo, lo cual constituye un comienzo prometedor en el proceso de selección y domesticación. La mayoría de las plantas cultivadas han sido obtenidas por métodos de selección convencionales (Bernáth, 2002), pero la producción de plantas para la obtención de AE es diferente que la requerida para fines ornamentales o de alimentación (Lubbe & Verpoorte, 2011) lo cual requiere que los caracteres de interés sean específicos para dicho fin. El método de mejoramiento aplicado para la selección de individuos y para la generación de las 12 familias de *T. minuta* fue apropiado para identificar genotipos de interés en función de su composición química. La variabilidad observada en los individuos en respuesta a una misma presión ambiental permitió comparar las familias en cada ciclo de cultivo identificando diferencias en los caracteres de interés y evaluando su permanencia en cada generación.

A partir de los valores obtenidos para los caracteres cuantitativos se observó variabilidad en las tres generaciones de cada familia, aún cuando las plantas fueron generadas por autofecundación. Los caracteres cuantitativos morfológicos fueron los más variables por lo que presentaron bajos valores de heredabilidad. Por el contrario, los caracteres cuantitativos relacionados con la composición del AE fueron menos variables, destacándose por sus altos valores de heredabilidad los compuestos *E*-ocimenona y dihidrotagetona. Estos resultados posibilitan continuar el proceso de selección en función de la composición química y que el condicionamiento ambiental sea reducido.

Los caracteres cualitativos presentaron mayor estabilidad en las familias (entre los individuos selectos y su descendencia) y, a su vez, permitieron agrupar y diferenciar a las familias entre sí. La asociación encontrada entre familias y algunos caracteres cualitativos (particularmente los relacionados con inflorescencias y glándulas foliares) en cada ciclo de cultivo permitió identificar descriptores para diferenciar las familias. Además, se estableció una correlación positiva de algunos caracteres cualitativos entre sí lo cual evidencia una fuerte base genética en su expresión.

Se ha demostrado en diversos trabajos que la composición del AE de las especies aromáticas está condicionada por el ambiente donde crecen las plantas y también por su genética (Sangwan *et al.*, 2001; Bandoni, 2002; de la Fuente *et al.*, 2006). A través de diferentes estrategias de mejoramiento se ha logrado aumentar los compuestos de interés

en especies aromáticas (Bernáth, 2002) pero no hay antecedentes de estudios con seguimiento generacional a nivel morfológico y químico donde se evalúa la determinación genética de los compuestos del AE, por lo que los resultados obtenidos en esta Tesis cobran mayor relevancia. Los valores de heredabilidad que presentaron los compuestos *E*-ocimenona y dihidortagetona indican que ambos tienen gran peso genético en su expresión fenotípica en las familias estudiadas. Esto posibilita que su presencia en la planta se independice en gran medida del ambiente donde crece. La importancia de esta característica radica en la posibilidad de cultivar diferencialmente plantas de *T. minuta* según la composición de interés del AE. Singh *et al.* (2003) obtuvieron diferentes composiciones de AE según el momento de cosecha de las plantas, pero esta forma de manejo es limitada debido a que la biosíntesis de los compuestos está condicionada genética y ambientalmente. La metodología aplicada por Singh *et al.* (2003) no sería válida en las familias evaluadas ya que las plantas fueron sometidas al mismo manejo y momento de corte y aún así presentaron diferencias en la composición del AE de las 12 familias. Por otro lado, la composición del AE de cada familia resultó poco variable al comparar las generaciones, entre un ciclo de cultivo y otro. Estos resultados complementan la información respecto al manejo en cultivo y se logrará estabilidad y calidad en el AE si se puede multiplicar material vegetal de características conocidas.

Otro aspecto importante desde el punto de vista del manejo es el desarrollo del ciclo fenológico de las plantas. El cultivo de plantas con ciclo similar (precoz, normal o retrasado) permite sincronizar los tiempos para optimizar la producción de AE ya que el momento de la floración va a ser homogéneo. Por otro lado conocer el ciclo fenológico posibilita escalonar la floración y, por ende, la cosecha de las plantas.

Dentro del género *Tagetes* otras especies han sido domesticadas (*T. tenuifolia*, *T. patula*, *T. erecta* y *T. foetidisima*) producto de manejo para el uso de sus flores en ceremonias religiosas y de las plantas como ornamentales (Serrato Cruz *et al.*, 1998; Serrato Cruz, 2002 y 2009; Marotti *et al.*, 2004). Estos antecedentes para el género y los resultados obtenidos en esta Tesis son promisorios para continuar con el proceso de cultivo y domesticación de *T. minuta* orientado a la producción de AE de calidad.

CONCLUSIÓN

Tagetes minuta mostró una buena respuesta adaptativa al manejo a campo lo cual constituye un promisorio comienzo del proceso de domesticación. A partir de la caracterización y evaluación de plantas cultivadas de *T. minuta* se seleccionaron los individuos con mejores características agronómicas y químicas. Los caracteres de mayor peso fueron altura final; N° de ramas; color, densidad y distribución de inflorescencias y estructura de planta. A nivel de AE los compuestos de mayor peso fueron dihidrotagetona y ocimenona. Estos caracteres permitieron comparar y diferenciar las plantas evaluadas por lo que constituyen buenos descriptores de la especie.

Los caracteres cuantitativos morfológicos mostraron amplia variabilidad, tanto en los individuos selectos como en la descendencia, por lo que sus valores de heredabilidad fueron bajos. Por el contrario, los caracteres cualitativos diferenciaron de manera evidente a las familias y fueron altamente heredados.

Se estableció una asociación positiva entre las familias 6, 7, 8 y 9 con la presencia de inflorescencias amarillas, densas y terminales y con glándulas foliares escasas y de tipo alargadas. Estos caracteres permiten diferenciar a dichas familias de las restantes (1, 2, 3, 4, 5, 10, 11 y 12) que, a su vez, constituyen otro grupo bien definido por los mismos caracteres pero con expresión fenotípica alternativa. A su vez la familia 12 se caracterizó en las tres generaciones por su ciclo fenológico acelerado.

Los valores de heredabilidad para la *E*-ocimenona y la dihidrotagetona son indicadores de una gran influencia genética que determina la presencia de estos compuestos en el AE. Estos resultados constituyen una base promisoriosa para continuar realizando la selección y el manejo de la especie con miras a obtener plantas con calidad y composición de AE estable.

CAPÍTULO III

**Caracterización de los compuestos
principales del aceite esencial de familias
selectas de *Tagetes minuta***

INTRODUCCIÓN

Los AEs son una mezcla compleja de terpenos que presentan la particularidad de ser volátiles a temperatura ambiente y presión atmosférica normal (Zygodlo, 2011). Están constituidos principalmente por terpenos y sesquiterpenos que se originan en el metabolismo secundario de la planta y son los responsables de su aroma característico (Chamorro *et al.*, 2012). Se encuentran en diferentes órganos de las plantas, en las hierbas aromáticas están en estructuras especializadas (glándulas, tricomas, etc.) distribuidas en hojas, flores y tallos. Las funciones del AE en la planta son numerosas: atrayente de insectos polinizadores, defensa contra herbívoros, protección en procesos de cicatrización, actividad antimicrobiana y mecanismo de defensa contra otros vegetales (alelopatía), entre otras (López, 2006; Bakkali *et al.*, 2008).). A su vez, los AEs son los principales extractivos comercializados a partir de especies aromáticas (de la Fuente *et al.*, 2006) por lo que poseen valor económico.

La variación en la calidad y cantidad de AE es característica en plantas de la misma especie y puede ser atribuida a la variabilidad genética (Tavares *et al.*, 2005; de la Fuente *et al.*, 2006), ambiental (Halva *et al.*, 1992; Letchamo *et al.*, 1994; Weiss, 1997; Stojanova *et al.*, 2000; Bandoni, 2002; Thompson *et al.*, 2007), estacional, a factores ontogénicos (Langenheim, 1994; Baser & Buchbauer, 2010) y a la parte de la planta de dónde se extrae (Chamorro *et al.*, 2012). Además, debe agregarse a estos factores la variabilidad genética intraespecífica debida a presiones de selección natural o a objetivos de mejoramiento particulares; lo que implica la existencia de diferentes quimiotipos con perfiles distintivos de terpenos (de la Fuente *et al.*, 2006); entendiéndose por quimiotipo a individuos que se diferencian de otros de la misma especie por la composición química de su AE y también pueden o no distinguirse por caracteres morfológicos (Juliani *et al.*, 2002; Fischer *et al.*, 2004; Soria *et al.*, 2008). Es interesante estudiar si esas diferencias tanto químicas como morfológicas de un individuo se mantienen en su descendencia o si son esencialmente expresiones de su genotipo en interacción con un ambiente dado.

La identificación de quimiotipos es de gran interés para las industrias relacionadas con los AEs. Su ocurrencia es frecuente en plantas aromáticas; tal es el caso de *Minthostachys verticillata* (peperina) (Ojeda, 2004), *Thymus vulgaris* (tomillo) (Thompson *et al.*, 2007), *Mentha spicata* (menta) (Kokkini & Vokou, 1989; Edris *et al.*, 2003), *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (orégano) (De Martino *et al.*, 2009), *Chamomilla recutita* (manzanilla) (Salamon *et al.*, 2010); *Lippia alba* (Tavares *et al.*, 2005); *Tagetes lucida*

(Bicchi *et al.*, 1997) y también *T. minuta* (suico) (Gil *et al.*, 2000). Particularmente para especies aromáticas nativas en Argentina, como lo son la peperina y el suico, la identificación de quimiotipos constituye un gran aporte en su caracterización.

El AE de *T. minuta* está constituido principalmente por limoneno, ocimeno, dihidrotagetona y los isómeros *E*-y *Z*-tagetona y *Z*- y *E*-ocimenona (también denominada tagetenona) (Fig. III.1) y ha sido ampliamente caracterizado en diferentes países (Tabla III.1). En Argentina existe la norma IRAM (N°18622, 2003) donde se describen dos perfiles químicos del AE de la especie considerando los 7 compuestos principales citados anteriormente (Tabla III.2). A través de dicha norma se establecen los estándares de calidad para la comercialización del AE de *T. minuta*. Es importante destacar que las variedades químicas se diferenciaron en base a descripciones de poblaciones silvestres lo que evidencia la gran variabilidad natural de la especie.

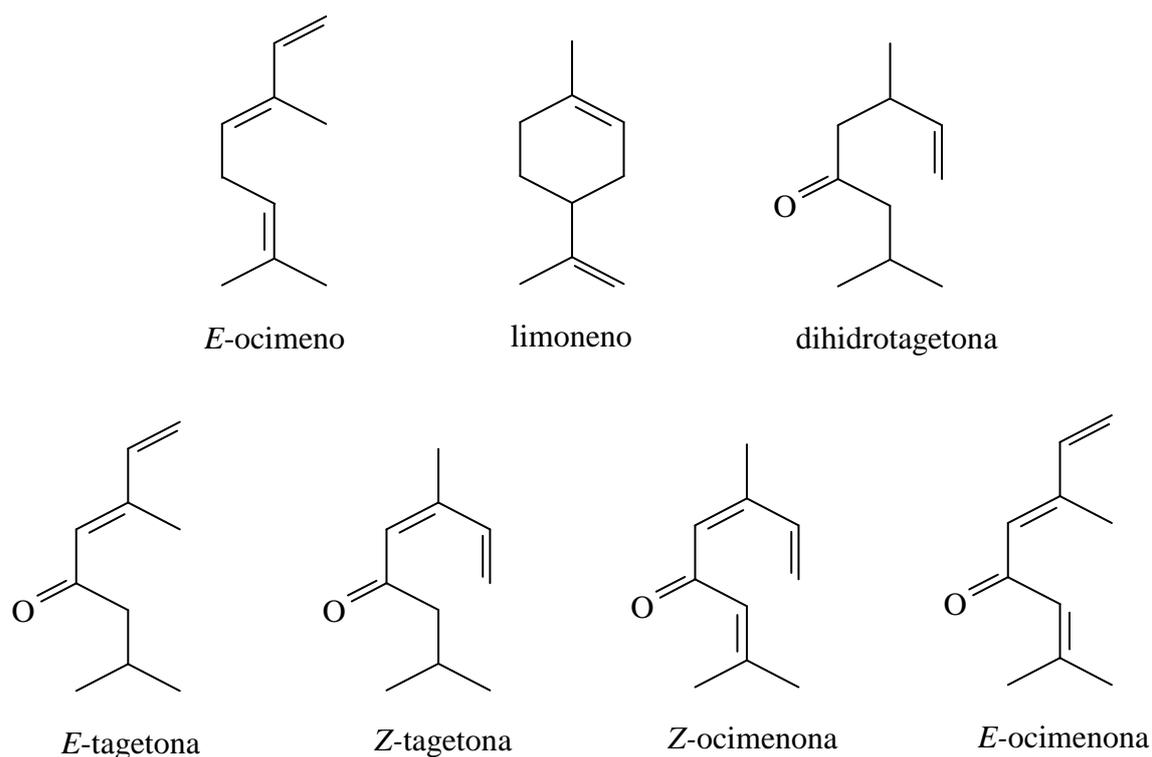


Figura III.1: Estructuras moleculares de los 7 compuestos principales del AE de *T. minuta*.

Tabla III.1: Proporción de los 7 compuestos principales en el AE de *T. minuta*. Relevamiento bibliográfico.

COMPUESTOS PRINCIPALES										Precedencia /Material /Año	Bibliografía
limoneno	ocimeno	dihidrotagetona	E- tagetona	Z- tagetona	Z- ocimenona	E- ocimenona					
3,35	13,98	62,89	0,72	9,11	3,04	1,54	Argentina (San Juan) 1995			Gil <i>et al.</i> (2000)	
7,11	26,43	2,33	4,39	19,25	16,58	11,50	Argentina (Jujuy) 1995			Gil <i>et al.</i> (2000)	
3,75	20,20	20,01	1,76	11,14	21,64	10,37	Argentina (Buenos Aires) 1995			Gil <i>et al.</i> (2000)	
3,76	16,53	53,66	1,31	12,35	4,67	2,19	Argentina (Mendoza) 1995			Gil <i>et al.</i> (2000)	
3,88	15,50	57,93	0,97	10,05	2,25	0,54	Argentina (Río Negro) 1996			Gil <i>et al.</i> (2000)	
5,80	6,65	-----	-----	-----	-----	-----	Argentina (Salta) 1996			Gil <i>et al.</i> (2000)	
10,02	19,43	26,68	3,59	14,25	6,01	5,85	Argentina (Buenos Aires) 1996			Gil <i>et al.</i> (2000)	
7,31	13,24	52,26	1,65	10,12	4,36	1,49	Argentina (Mendoza) 1996			Gil <i>et al.</i> (2000)	
2,08	13,03	-----	-----	-----	0,92	-----	Argentina (Salta) inflorescencias 1997			Gil <i>et al.</i> (2000)	
12,66	31,22	2,70	-----	-----	4,24	16,06	Argentina (Buenos Aires) inflorescencias 1997			Gil <i>et al.</i> (2000)	
8,18	38,09	2,07	-----	-----	10,18	6,02	Argentina (Mendoza) inflorescencias 1997			Gil <i>et al.</i> (2000)	
10,09	3,54	-----	-----	-----	3,47	-----	Argentina (Salta) hojas 1997			Gil <i>et al.</i> (2000)	
10,43	14,85	2,48	7,80	6,80	7,37	30,67	Argentina (Buenos Aires) hojas 1997			Gil <i>et al.</i> (2000)	
4,02	7,63	65,81	1,19	13,19	1,60	0,75	Argentina (Mendoza) hojas 1997			Gil <i>et al.</i> (2000)	
3,20	44,30	7,20	5,30	0,70	12,20	7,70	Argentina			Larrán <i>et al.</i> (2001)	
2,00 - 5,00	35,00 - 50,00	10,00 - 34,00	7,00 - 17,00*	15,00 - 25,00*			India			Singh <i>et al.</i> (2003)	
4,70	36,80	15,50	-----	17,10	3,00	7,50	India			Kaul <i>et al.</i> (2005)	
2,60	17,60	13,70	1,90	8,30	6,00	13,20	Irán			Farshbaf Moghaddam <i>et al.</i> (2004)	
13,00	-----	1,20	5,70	3,20	5,10	-----	Taiwan			Wang & Chen (2006)	
-----	-----	<0,05	2,53	4,32	14,36	48,08	Argentina (Córdoba)			López (2006)	
1,43	36,19	13,26	0,30	6,76	29,56	6,95	India (Himalaya)			Babu & Kaul (2007)	
10,30	17,50	30,30	16,60*	-----	-----	16,00*	Argentina (Chaco) hojas			Chamorro <i>et al.</i> (2008)	
7,00	45,40	7,70	5,60*	-----	-----	25,00*	Argentina (Chaco) inflorescencias			Chamorro <i>et al.</i> (2008)	
-----	43,78	16,71	8,67	1,95	-----	-----	Kenya			Wanza (2009)	
13,00	-----	1,20	0,00	3,20	5,10	-----	Irán (Khoramabad)			Meshkatsadat <i>et al.</i> (2010)	
3,20	2,80	9,70	1,90	-----	20,90	32,30	Argentina (Córdoba)			Vazquez <i>et al.</i> (2011)	

*No se diferenciaron los isómeros.

Tabla III.2: Quimiotipos de *T. minuta* descritos en la norma IRAM N°18622.

Compuestos	Variedad Oxigenados		Variedad Dihidrotagetona	
	Mín (%)	Máx (%)	Mín (%)	Máx (%)
limoneno	5,00	6,50	3,50	10,00
ocimeno	26,00	34,00	13,00	26,50
dihidrotagetona	2,00	10,00	20,00	63,00
<i>E</i>-tagetona	1,60	4,50	0,70	3,60
<i>Z</i>-tagetona	5,00	19,00	9,00	14,00
<i>Z</i>-ocimenona	7,50	25,50	2,00	21,50
<i>E</i>-ocimenona	10,00	15,50	1,50	15,00

En relación a la variación en la composición de los AEs en especies aromáticas en función del ambiente donde crecen se han realizado numerosos estudios (Halva *et al.*, 1992; Letchamo *et al.*, 1994; Bandoni, 2002; Thompson *et al.*, 2007; Bakkali *et al.*, 2008; Franz & Novak, 2010) pero no se ha abordado la genética de la planta como factor que determina o condiciona dicha composición. Por otro lado, las caracterizaciones del AE de *T. minuta* (Tabla III.1) fueron realizadas a partir de material vegetal silvestre o de plantas cultivadas sólo durante un ciclo de cultivo por lo que la posibilidad de evaluar químicamente el AE de plantas de tres generaciones de familias en condiciones de cultivo constituye un importante aporte en la descripción de la especie, particularmente ante el interés de producirla.

Se planteó como paso siguiente a la selección morfológica con la que se inició el proceso de mejoramiento de *T. minuta* la selección química, definiéndose como objetivo caracterizar las familias selectas en función de los compuestos principales de su AE; establecer diferencias o similitudes entre ellas y determinar la estabilidad de los perfiles químicos en las tres generaciones evaluadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. En cada ciclo de cultivo las plantas seleccionadas, cosechadas en plena floración, fueron destiladas una vez que estuvieron completamente secas. El material vegetal se secó en bolsas de papel con la identificación correspondiente, en habitación techada y ventilada, a temperatura ambiente (Muñoz, 2000). Esta metodología es apropiada para especies aromáticas ya que el material vegetal queda de color verde (no se oxida) y no se volatiliza el AE (como sucede cuando es secado al sol). De esta manera se garantizó que todas las plantas tuvieran el mismo manejo minimizando las posibilidades de variaciones en la composición del AE por estas causas.

Aceite esencial. Se destilaron individualmente entre una y tres plantas por familia, el material vegetal seco consistió en flores, hojas y ramas finas en proporciones que se mantuvieron para que el rendimiento sea comparativo. El AE se obtuvo a través de destilación por arrastre de vapor de agua. Para ello se utilizó un equipo Clevenger modificado (Fig. III.2) con cámara de extracción separada. Los destiladores utilizados están contruidos totalmente en vidrio y sus cámaras tienen capacidad para 100 g de material vegetal. Cada destilación tuvo una duración de 60 minutos a partir del momento en que se obtuvo la primera gota. El tiempo de destilación para la especie se ajustó en función de sucesivas pruebas optimizando la relación entre tiempo de destilado y AE obtenido.

El volumen de AE obtenido de cada planta fue cuantificado en el recolector graduado del destilador y se almacenó individualmente en tubos eppendorf con su correspondiente identificación. Las muestras de AE se deshidrataron mediante el agregado de sulfato de sodio anhidro y se conservaron en freezer (-4 °C) para su posterior análisis químico y su uso en bioensayos. Las muestras de cada ciclo de cultivo se analizaron días después de ser obtenidas para evitar que se volatilicen compuestos del AE.

Análisis cromatográfico. El análisis químico se realizó por CG/EM en un equipo Claruss 600 de Perkin Elmer, con el programa TurboMass 5.4. 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 en el espectrómetro de

masas por impacto de electrones con energía de ionización de 70 eV. Las muestras fueron analizadas con las siguientes condiciones de detección cromatográficas y de espectrometría de masa: Programa de temperatura del horno: 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 cuádrupolos de $m/z= 50-300$. 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.

Una vez obtenidos los resultados del análisis químico del AE se evaluó si su composición se modificó respecto a la del individuo selecto del que provino (Muñoz, 2000; Ojeda, 2004) para así identificar posibles quimiotipos y agrupar las familias según su perfil.



Figura III.2: Destiladores tipo Clevenger utilizados para la extracción del AE de *T. minuta*.

Análisis estadístico. La composición del AE de cada familia se presentó a través de gráficos de perfiles multivariados agrupados por ciclo de cultivo y también en función de los grupos generados en el análisis de conglomerado.

Para caracterizar química mente cada familia se realizó un análisis de MLGM con cada uno de los 7 compuestos mayoritarios del AE, incorporando el ciclo de cultivo como covariable de efecto aleatorio con el fin de eliminar el efecto año. Del análisis de cada compuesto se obtuvieron los residuos y predichos. Para cada individuo se obtuvo un nuevo valor de cada compuesto a partir de la suma de los residuos y predicho. Los nuevos valores fueron identificados agregando al nombre del compuesto la denominación “corregido/a”.

Con los compuestos corregidos se realizaron análisis multivariados de conglomerados, de componentes principales y discriminante. Los análisis de conglomerados se realizaron agrupando a las familias en función de los 7 compuestos y a los 7 compuestos en función de las familias. El primer análisis de conglomerado permitió identificar las agrupaciones de las familias y el segundo permitió identificar los compuestos de mayor peso en dicha agrupación. Además se realizó un segundo set de análisis de conglomerado en los que se redujo a 3 el número de compuestos del AE con el fin de identificar aquellos de mayor poder explicativo y que caracterizaran a cada grupo de familias. Para determinar el nivel de corte en el dendrograma de los análisis de conglomerado se realizaron análisis de comparación de medias multivariadas (gDGC) con nivel de significación $\alpha = 0,05$ y encadenamiento ward.

Además se realizó un análisis de correlación para identificar si existía asociación entre los compuestos. Todas las variables con coeficiente de Pearson mayor a 0,7 como valor absoluto ($p < 0,01$) se consideraron correlacionadas, el signo determinó si la relación fue positiva o negativa.

Los resultados se procesaron mediante el programa estadístico *InfoStat* (Di Rienzo *et al.*, 2011). Para el análisis discriminante se utilizó el programa *SPSS Statistics* (2008) debido a que brinda un valor de significación estadística.

RESULTADOS

Considerando todas las muestras de AE de cada ciclo de cultivo, la proporción de limoneno, ocimeno, dihidrotagetona, *E*-tagetona, *Z*-tagetona, *Z*-ocimenona y *E*-ocimenona respecto al total de los componentes del AE fue superior al 84 % (Tabla III.2). Los demás compuestos del AE no tuvieron una presencia significativa.

Tabla III.3: Proporción promedio y error estándar (EE) de los 7 compuestos principales respecto al total de compuestos del AE en cada ciclo de cultivo.

Ciclo de cultivo	Compuestos principales/Compuestos totales	
	Proporción promedio (%)	E.E.
1°	85,58	1,23
2°	95,23	0,49
3°	95,58	0,83

E.E.: Error Estándar

Cada una de las 12 familias estuvo constituida por el conjunto de individuos obtenidos de semillas autofecundadas de una misma planta cosechada en el ciclo de cultivo anterior (ver Capítulo II). Para cada familia en cada ciclo de cultivo se realizó la caracterización de su AE en base a la presencia de uno o varios de los compuestos principales. Si bien las proporciones de dichos compuestos en la misma familia variaron de un ciclo de cultivo a otro, el patrón general se mantuvo en las tres generaciones evaluadas (Fig. III.3). Los gráficos con los perfiles de composición química del AE permiten comparar y observar la variabilidad dentro de las familias (Fig. III.3, recuadro de cada familia) y las semejanzas o diferencias entre ellas (Fig. III.3). Como ejemplo se puede citar a la familia 7 que se caracterizó por la presencia de dihidrotagetona en su AE, compuesto que estuvo presente en los tres ciclos de cultivo. Al comparar los perfiles de la familia 7 con los demás se encuentra similitud con las familias 6, 8 y 9 y se la diferencia de las restantes.

A su vez, en cada ciclo de cultivo se identificaron tres grupos químicos, que fueron nombrados según el/los compuesto/s mayoritario/s: Dihidrotagetona, OTLO (ocimenonas-tagetonas-limoneno-ocimeno) y Ocimenona (Fig. III.4). Estos tres grupos químicos mantuvieron su identidad de un ciclo de cultivo a otro; a su vez hubo familias que pertenecieron al mismo grupo químico en los tres ciclos: familias 6 y 7 (Dihidrotagetona), familia 5 (Ocimenona) y familias 10, 11 y 12 (OTLO). Si bien los grupos químicos se mantuvieron, se registró una variación en la proporción de dihidrotagetona y *E*-ocimenona

en los tres ciclos de cultivo. En el grupo Dihidrotagetona, este compuesto disminuyó del primer al tercer ciclo de un 67,19 a un 30,33 % respectivamente. Por otro lado, el compuesto *E*-ocimenona aumentó del primer al tercer ciclo de cultivo de 60,12 a 74,75 % en el grupo químico Ocimenona. En los grupos químicos OTLO y Dihidrotagetona el compuesto *E*-ocimenona varió de 45,91 a 63,48 % y de 2,91 a 30,73 % respectivamente (Fig. III.4). Coincidentemente con estos resultados, el análisis de los compuestos corregidos determinó que la dihidrotagetona tuvo correlación negativa significativa con la presencia de los compuestos *Z*- y *E*-ocimenona ($p= 1,2E^{-12}$ y $p= 0$; coeficiente de correlación de Pearson= -0,74 y -0,88 respectivamente).

Los 7 compuestos principales corregidos diferenciaron a las familias en tres grupos (Fig. III.5 a). El primero formado por las familias 6, 7, 8 y 9; el segundo por las familias 10, 11 y 12 y el tercero por las familias 1, 2, 3, 4 y 5. A través del análisis de conglomerados con los compuestos del AE se identificaron aquellos que más influyeron en la clasificación de las familias (Fig. III.5 b). Tanto la *E*-ocimenona como la dihidrotagetona se separaron del resto de los compuestos que constituyeron entre sí el tercer grupo. Las asociaciones entre los dendrogramas de familias (Fig. III.5 a) y de compuestos químicos (Fig. III.5 b) se establecieron según un ACP que separó a las familias en los mismos grupos que el análisis de conglomerados. Los resultados de ambos análisis se combinaron en los dendrogramas (Fig III.5), donde se utilizaron colores para indicar las relaciones entre familias y compuestos químicos.

Mediante otro análisis de conglomerados se identificó a la *Z*-tagetona como el tercer compuesto con mayor peso clasificatorio. *E*-ocimenona, dihidrotagetona y *Z*-tagetona agruparon a las familias de la misma forma que los 7 compuestos juntos (Fig. III.6 a); de esta forma se redujeron a 3 los compuestos con mayor poder explicativo (Fig. III.6 b) y que caracterizan a cada quimiotipo.

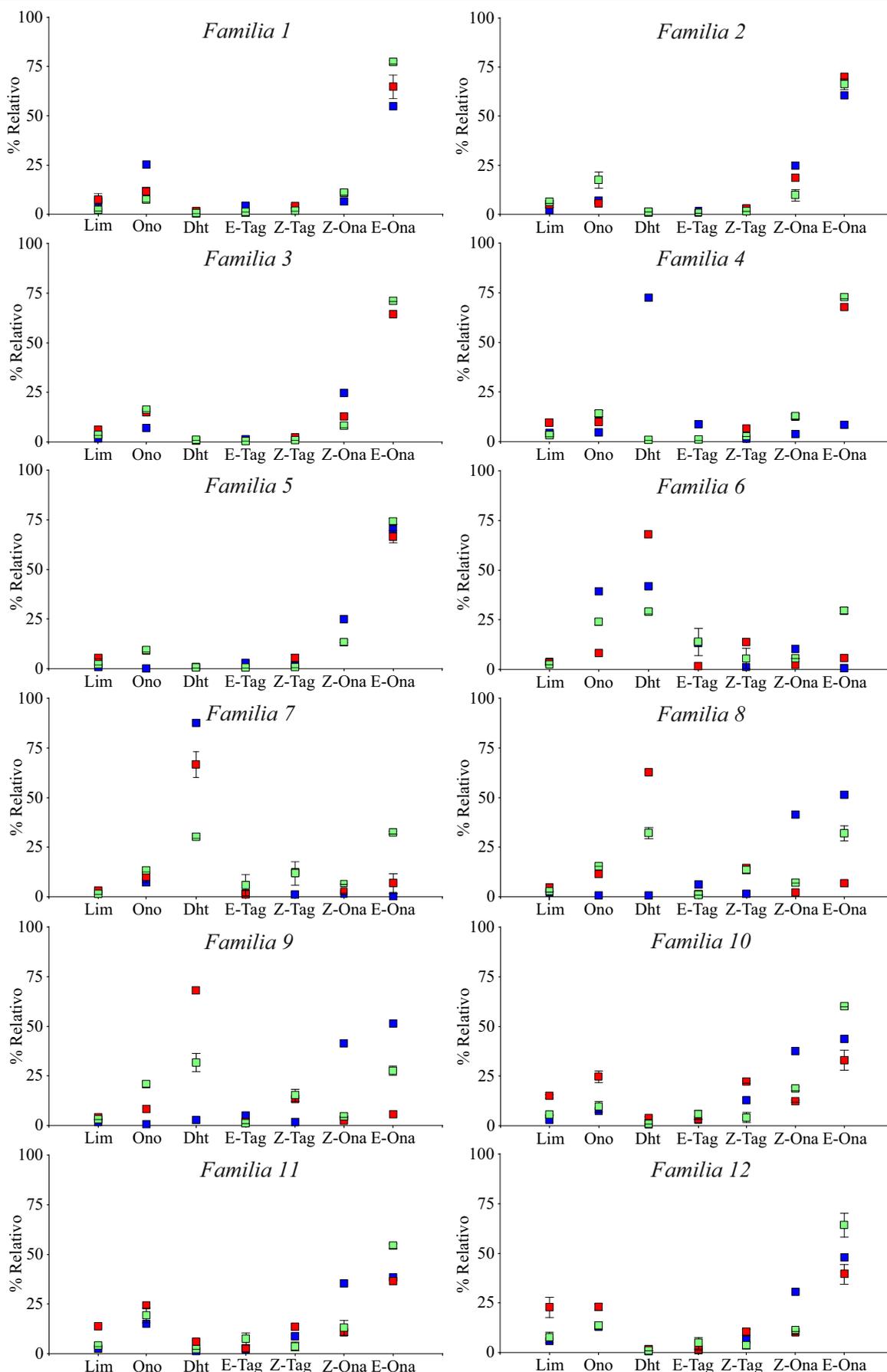


Figura III.3: Perfiles de composición de AE por familia en los tres ciclos de cultivo. Comparación de los 7 compuestos principales. Barras: Error Estándar. ■ 1° Ciclo ■ 2° Ciclo ■ 3° Ciclo
Lim: limoneno; **Ono:** ocimeno; **Dht:** dihidrotagetona; **E-Tag:** E-tagetona; **Z-Tag:** Z-tagetona; **Z-Ona:** E-ocimeno; **E-Ona:** Z-ocimeno.

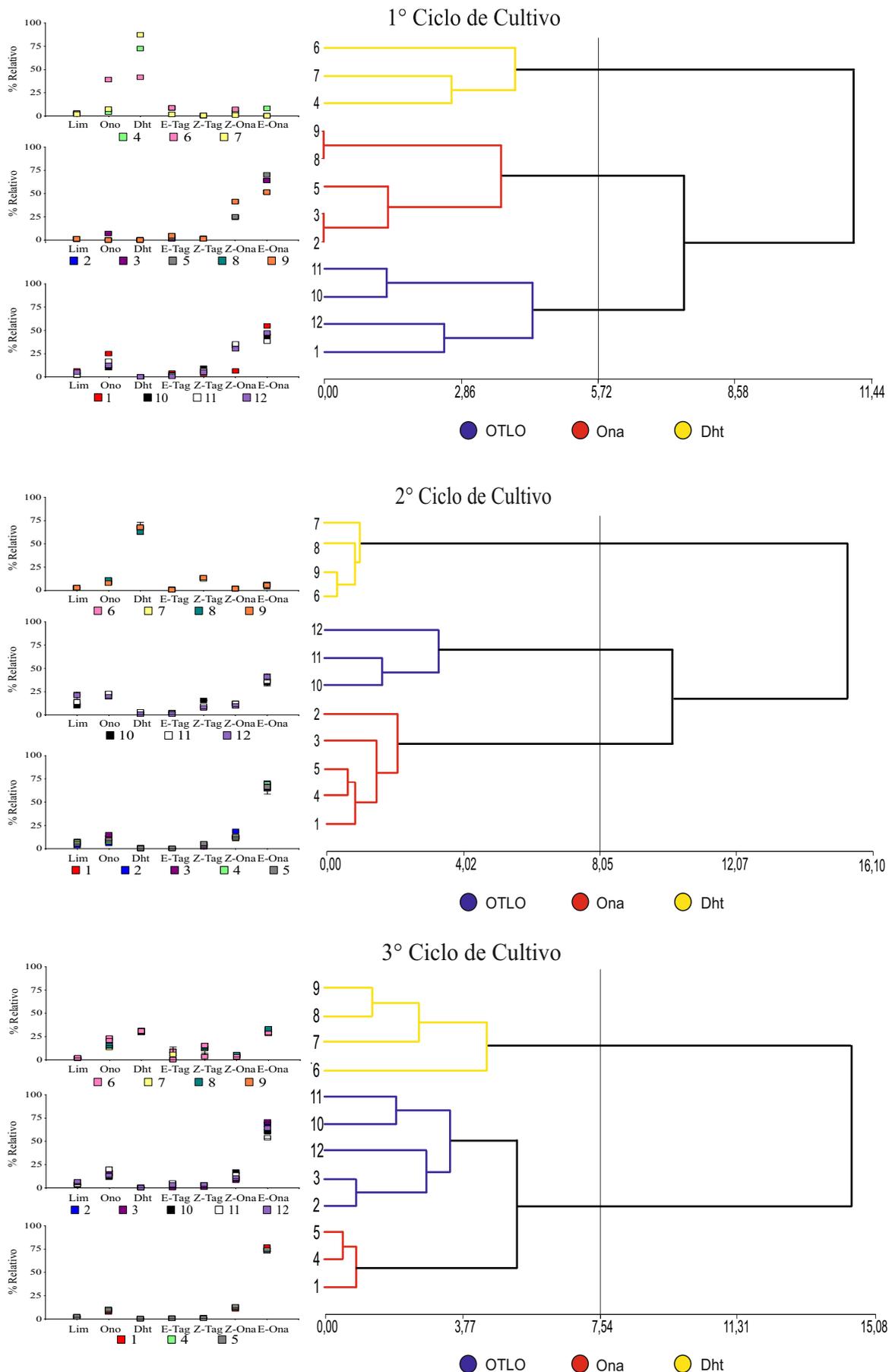


Figura III.4: Perfiles multivariados del AE y dendrogramas de familias para cada ciclo de cultivo. Representación de los 7 compuestos principales del AE y agrupamiento (gDGC) de las 12 familias de *T. minuta* en función de éstos. **Lim:** limoneno; **Ono:** ocimeno; **Dht:** dihidrotagetona; **E-Tag:** E-tagetona; **Z-Tag:** Z-tagetona; **E-Ona:** E-ocimenona; **Z-Ona:** Z-ocimenona.

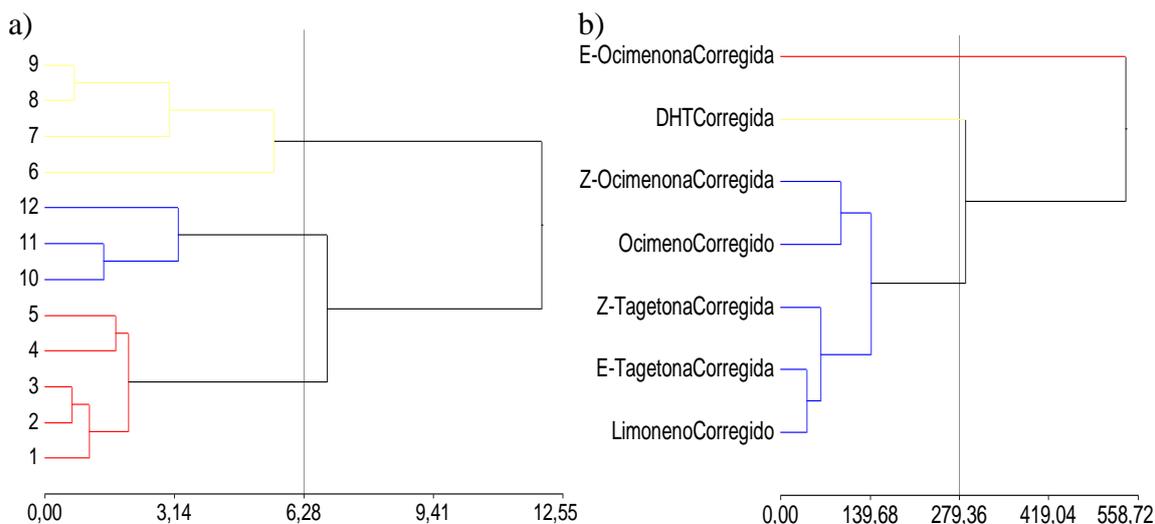


Figura III.5: Análisis de conglomerados con los 7 compuestos principales del AE corregidos. a) agrupamiento de las familias en función de los compuestos, correlación cofenética= 0,826; b) agrupamiento de los compuestos en función de las familias, correlación cofenética= 0,979. Método Ward, distancia Euclídea. Colores: indican relación entre familias y compuestos.

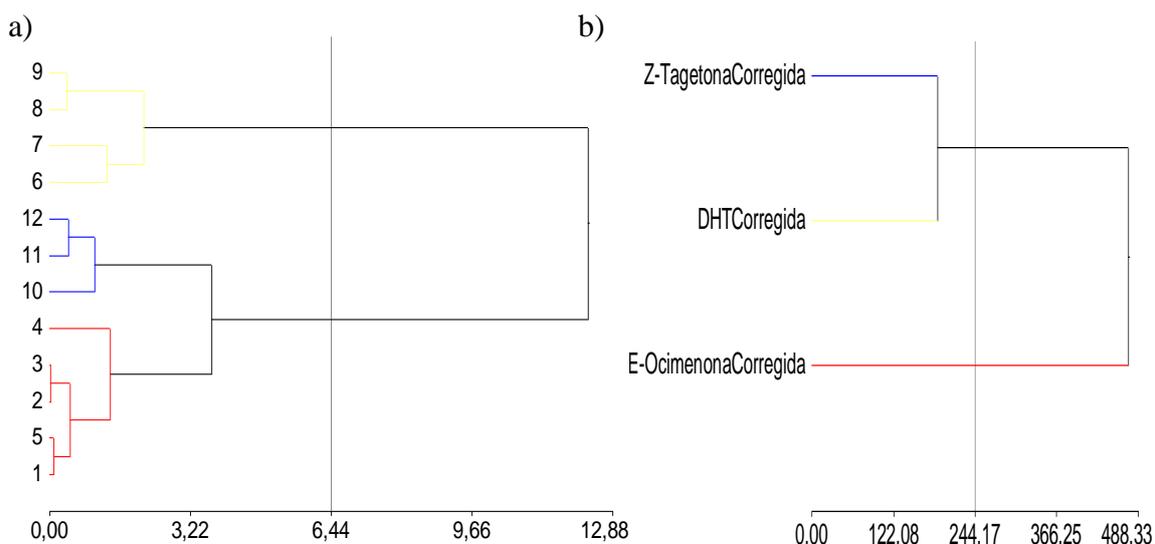


Figura III.6: Análisis de conglomerados con 3 compuestos principales del AE corregidos. a) Agrupamiento entre familias en función de los compuestos, correlación cofenética= 0,917, b) Agrupamiento entre compuestos en función de las familias, correlación cofenética= 0,986. Método Ward, distancia Euclídea. Colores: indican relación entre familias y compuestos.

En el análisis discriminante se consideraron todas las muestras de AE identificadas por familia (teniendo en cuenta las repeticiones), sin diferenciarlas por ciclo de cultivo para dar mayor peso a la clasificación. Las variables independientes fueron los compuestos del AE corregidos y los grupos definidos *a priori* fueron los establecidos en el análisis de conglomerados: Grupo 1 (familias 1, 2, 3, 4 y 5): perfil químico Ocimenona; Grupo 2 (familias 6, 7, 8 y 9): perfil químico Dihidrotagetona y Grupo 3: (familias 10, 11 y 12):

perfil químico OTLO. La representación gráfica de las funciones canónicas del análisis diferenciaron los 3 grupos definidos *a priori* (Fig. III.7). Cada círculo del gráfico representa el AE de una planta, los cuales se diferenciaron en tres nubes correspondientes cada una a un grupo químico. Si bien la conformación de cada nube fue uniforme, el 1,5 % de los casos estuvieron fuera de rango; identificados por los círculos pertenecientes a un grupo que aparecen en la nube de otro y representan la variabilidad química dentro de los grupos. Aun así fueron pocos los casos fuera de rango lo cual indica que los grupos estuvieron químicamente bien definidos y diferenciados.

Las dos primeras funciones de correlación discriminante canónica, representadas en la Figura III.7, explicaron el 100 % de la varianza. La primera explicó un 84 % y la segunda el 16 % restante; ambas fueron estadísticamente significativas (Tablas III.4 y III.5).

Por medio del análisis discriminante se corroboró la existencia de una agrupación a nivel suprafamilia que permitió definir tres quimiotipos en las familias cultivadas de *T. minuta*: Ocimenona, Dihidrotagetona y OTLO. Los nombres de los quimiotipos indican el compuesto mayoritario de ese perfil químico. Si bien en los 3 quimiotipos hubo *E*-ocimenona en proporción variable fue mayoritaria en el quimiotipo Ocimenona y la dihidrotagetona sólo estuvo presente en el quimiotipo homónimo. La Tabla III.6 resume los valores de los 7 compuestos principales que diferenciaron los tres quimiotipos.

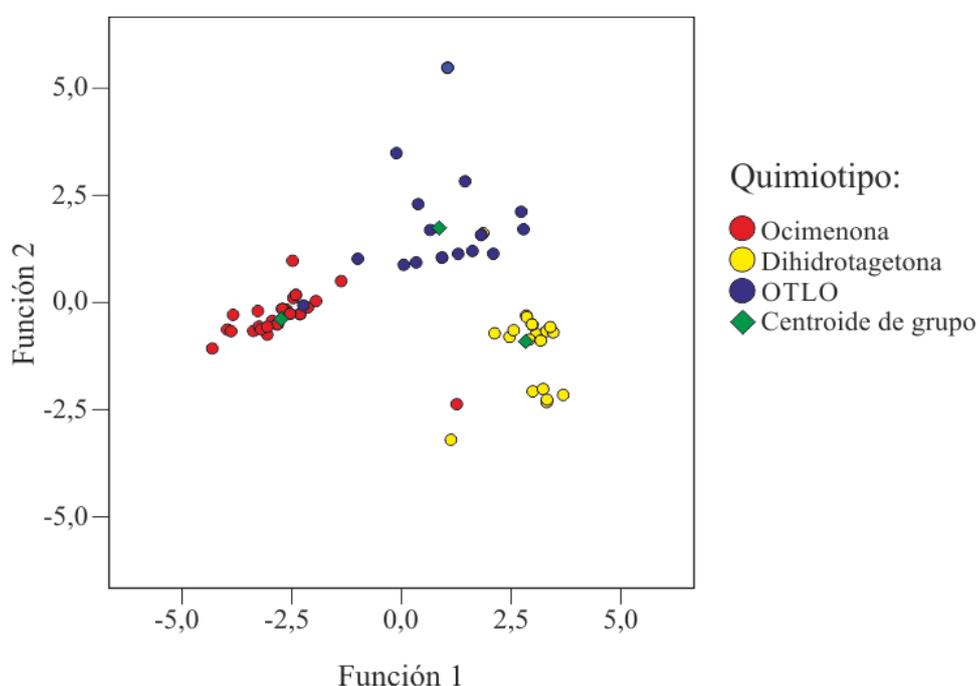


Figura III.7: Diferenciación de los tres quimiotipos. Cada círculo representa el AE de una planta y las nubes de círculos de igual color identifican a un quimiotipo.

Tabla III.4: Autovalores del análisis discriminante.

Función	Autovalor	% de varianza	% acumulado	Correlación canónica
1	6,195 ^a	84,00	84,00	0,928
2	1,176 ^a	16,00	100,00	0,735

a. Se han empleado las dos primeras funciones discriminantes canónicas en el análisis.

Tabla III.5: Valores de Lambda de Wilks del análisis discriminante.

Contraste de las funciones	Lambda de Wilks	Chi-cuadrado	gl	Sig.
1 a la 2	0,064	162,306	14	0,000
2	0,460	45,878	6	0,000

Tabla III.6: Medidas de resumen de los 7 compuestos principales para los quimiotipos definidos.

Compuesto	Medidas (%)	Quimiotipo Ocimenona	Quimiotipo Dihidrotagetona	Quimiotipo OTLO
limoneno	Media	3,59	2,09	7,40
	EE	0,43	0,14	1,53
	Mín.	0,61	1,23	1,63
	Máx.	10,52	3,31	24,62
ocimeno	Media	11,02	16,34	16,34
	EE	1,04	1,80	1,23
	Mín.	0,05	7,10	9,60
	Máx.	25,04	39,10	24,42
dihidrotagetona	Media	0,30	43,42	0,78
	EE	0,08	4,47	0,24
	Mín.	0,00	26,08	0,01
	Máx.	1,44	87,40	3,29
<i>E</i> -tagetona	Media	0,80	3,22	2,92
	EE	0,18	1,27	0,61
	Mín.	0,00	0,00	0,40
	Máx.	4,03	16,55	7,99
<i>Z</i> -tagetona	Media	1,92	10,32	6,13
	EE	0,31	1,51	1,11
	Mín.	0,00	0,00	1,29
	Máx.	7,28	18,95	16,12
<i>Z</i> -ocimenona	Media	12,82	3,73	16,40
	EE	1,01	0,41	2,05
	Mín.	5,96	0,96	8,79
	Máx.	24,91	7,12	35,37
<i>E</i> -ocimenona	Media	69,55	20,88	50,04
	EE	1,11	3,12	2,78
	Mín.	54,67	0,13	31,24
	Máx.	78,76	37,51	71,64

DISCUSIÓN

En cada ciclo de cultivo el AE de cada familia estuvo mayormente conformado por los 7 compuestos principales identificados, los cuales coinciden con los citados como mayoritarios en la bibliografía (Gil *et al.*, 2000; IRAM, 2003; Babu & Kaul, 2007). Los perfiles del AE reflejaron que la composición química se mantuvo poco variable. Aún en los casos en que las proporciones de los compuestos variaron de un ciclo de cultivo a otro, la presencia mayoritaria de aquellos que caracterizaron cada familia se mantuvo. Esta condición posibilitó la identificación de tres quimiotipos: Ocimenona, Dihidrotagetona y OTLO.

Las variaciones en la composición del AE podrían deberse a factores ambientales que afectaron a todas las familias y generaron la misma respuesta en aquellas que presentaron similar perfil. Un ejemplo fue la disminución de la proporción de dihidrotagetona (en el tercer ciclo de cultivo respecto a los dos anteriores) en todas las familias donde estuvo presente dicho compuesto. Otro ejemplo fue la *E*-ocimenona que, por el contrario, aumentó en todas las familias en el tercer ciclo de cultivo. A pesar de estas variaciones en las proporciones de los compuestos, el perfil característico de cada quimiotipo se mantuvo en las sucesivas generaciones. Esto es una evidencia de que la expresión fenotípica “composición de AE” presentó gran influencia genética en las familias evaluadas y constituye la respuesta de las plantas al proceso de selección, mejoramiento y cultivo. A los fines de caracterizar los agrupamientos de las familias que formaron los quimiotipos y establecer una asociación con los compuestos, fue posible identificar que los quimiotipos Ocimenona, Dihidrotagetona y OTLO se diferenciaron por la presencia de *E*-ocimenona, dihidrotagetona y *Z*-tagetona respectivamente.

Es interesante que a lo largo de los ciclos de cultivo la presencia y proporción de las ocimenonas fue en desmedro de la de dihidrotagetona lo cual se confirma con la correlación negativa significativa que presentaron ambos compuestos entre sí. Este tipo de relaciones podría ser atribuido al proceso de biosíntesis de los compuestos. En el caso de *T. minuta* dicho proceso no ha sido descrito. Una posibilidad es que el ocimeno sea precursor de las ocimenonas y las tagetonas formándose a partir de reacciones de óxido-reducción debido a las fuertes correlaciones que hay entre estos dos monoterpenos ya que sólo se diferencian por un grupo ceto en C4 (López, 2006). La correlación negativa entre las ocimenonas y la dihidrotagetona podría deberse a diferencias en la biosíntesis

determinando una respuesta fenotípica de la expresión génica; esto, a su vez, daría mayor peso al componente genético de las plantas en la diferenciación de los quimiotipos.

La composición química de una esencia por ser una parte del metabolismo de la planta presenta variaciones; los constituyentes presentan distintas proporciones según la parte de la planta, el momento de su desarrollo, o el momento del día (Thappa & Agarwal, 1993; Bansal *et al.*, 1999, Kuate *et al.*, 2006; López, 2006). Más aún, debe tenerse en cuenta que dada su compleja composición, presenta una alta probabilidad de sufrir modificaciones fisicoquímicas por reacciones entre sus propios constituyentes o entre éstos y el medio (la luz, la temperatura, presencia de enzimas, los componentes del reservorio donde se almacena la esencia, etc). En este contexto la constancia en la presencia de los 7 compuestos principales en las tres generaciones de cada familia es indicador del componente genético que se expresa en el carácter. Se ha demostrado que factores ambientales como la disponibilidad de radiación solar, agua y nutrientes pueden inducir diferencias en el porcentaje y la composición del AE (Halva *et al.*, 1992; Letchamo *et al.*, 1994). Dichos factores no fueron cuantificados en este estudio pero sí considerados al evaluar a todas las familias en las mismas condiciones ambientales. Debido a que todas las familias en cada generación fueron sometidas al mismo ambiente, la “presión” ambiental fue idéntica por lo que las variaciones en la respuesta fenotípica son consecuencia del genotipo y de la interacción genotipo-ambiente.

A su vez, la forma de manejo en cosecha y poscosecha también puede generar cambios en la composición química del AE. Singh *et al.* (2003) establecieron una relación entre el momento de cosecha y la composición del AE en cultivos realizados en la India. Estos autores definieron que para obtener mayor proporción de ocimenona en el AE de *T. minuta* la cosecha debería hacerse en invierno y para que sea rico en dihidrotagetona la cosecha debería hacerse en otoño. A partir de la caracterización química de las familias estudiadas en la presente Tesis se obtuvieron resultados equivalentes a los de Singh *et al.* (2003) en cuanto a la diferenciación del AE pero, a diferencia de estos autores, dicha diferenciación química se logró en un mismo momento de corte y se mantuvo en diferentes años de cultivo. Aun cuando todas las plantas fueron cosechadas a fines del verano y procesadas de igual manera se pudieron diferenciar tres perfiles químicos. Considerando que dichos perfiles se mantuvieron en las tres generaciones de cada familia se puede afirmar que esta forma de obtención de composición química diferencial presenta mayor solidez que la práctica de cosecha estacional.

La variación en la proporción de ocimeno y las ocimenonas durante el desarrollo de las plantas ha sido descripta (Thappa & Agarwal, 1993; López, 2006) evidenciando una tendencia a aumentar en la etapa de floración. En este estudio, las plantas de todas las familias estudiadas fueron cosechadas en plena floración sin embargo la proporción de dichos terpenos fue variable y no siempre la de mayor valor. Esto evidencia que, si bien el AE puede cambiar durante los estadios fenológicos de la planta, también existe una gran variabilidad de respuesta en una misma etapa de desarrollo y podría deberse a diferencias en la expresión genotípica. Este tipo de estudios posibilitan generar patrones para encontrar estas diferencias y así poder realizar un mejor aprovechamiento de las plantas en función de su composición química.

Estudios anteriores también identificaron la presencia de quimiotipos de la especie en Argentina analizando individuos provenientes de semillas silvestres de poblaciones geográficamente distantes (Gil *et al.*, 2000). Dicho estudio constituye un interesante aporte que permite corroborar la variabilidad en la especie particularmente en cuanto a su AE y significa un antecedente de peso respecto a la obtención de quimiotipos en plantas cultivadas a campo y con un seguimiento durante tres generaciones.

Otro antecedente lo constituye la norma IRAM N°18622 (2003) que identifica dos perfiles químicos para *T. minuta*. Debido a que en Argentina la especie sólo se obtiene de recolección silvestre la descripción química refleja parte de la variabilidad natural. Particularmente, los dos quimiotipos caracterizados en la norma citada anteriormente (Variedad Oxigenados y Variedad Dihidrotagetona) son diferentes a los tres identificados en el marco de esta Tesis.

En relación a la caracterización química el aporte diferencial y significativo de esta Tesis radica en la evaluación de la variabilidad fenotípica de *T. minuta* en condiciones de cultivo a campo en distintos ambientes; con un seguimiento generacional y un abordaje desde la expresión génica y la heredabilidad de caracteres.

Es importante destacar la gran variabilidad que presenta *T. minuta* y el hecho que las diferencias químicas expresadas se mantengan en la descendencia. Esto último le aporta una significación mayor de la que implica el concepto de quimiotipo. En este sentido, no solamente se confirmó la existencia de quimiotipos sino que se determinó la influencia genética en las diferencias químicas del AE de la especie.

En la producción de AE se demanda estabilidad en la composición química por lo que las esencias que se obtienen en el mercado en algunos casos se someten a una serie de

procesos industriales con el objetivo de mejorar sus características (de la Fuente *et al.*, 2006); la identificación de quimiotipos representa una posibilidad de simplificar procesos industriales. Por otro lado, la identificación de tres compuestos del AE de *T. minuta* (dihidrotagetona, *Z*-tagetona y *E*-ocimenona) que diferenciaron los quimiotipos y que presentaron valor predictivo es de gran importancia ya que posibilitará identificar el quimiotipo al que corresponde una nueva muestra de AE de cualquier procedencia a partir de la comparación estadística con los perfiles químicos caracterizados en esta Tesis.

CONCLUSIÓN

Los perfiles químicos del AE de las familias fueron poco variables en las tres generaciones. En cada ciclo de cultivo se identificaron los mismos tres grupos químicos que, a su vez, se diferenciaron entre sí.

Entre las familias cultivadas de *T. minuta* se diferenciaron tres quimiotipos nombrados por el compuesto mayoritario: Ocimenona, Dihidrotagetona, OTLO (ocimenonas-tagetonas-ocimeno-limoneno). El hecho de que los quimiotipos tengan una base genética fuerte es de gran importancia ante la necesidad de obtener un AE poco variable en cuanto a su composición y poco afectado por el ambiente. Esto favorece significativamente la producción en cultivo para satisfacer demandas industriales con calidad homogénea.

La caracterización de los quimiotipos aporta tres nuevos perfiles químicos susceptibles a ser inscriptos como normas IRAM. Por otro lado, la identificación de tres compuestos del AE de *T. minuta* (dihidrotagetona, *Z*-tagetona y *E*-ocimenona) que diferenciaron los quimiotipos y que presentaron valor predictivo constituye un importante aporte para la identificación de muestras de AE de diferentes procedencias.

CAPÍTULO IV

**Bioactividad del aceite esencial de los
quimiotipos de *Tagetes minuta***

INTRODUCCIÓN

Las plantas generan una variedad de compuestos producto de su metabolismo secundario que están relacionados en su interacción con el ambiente; teniendo, entre otras funciones, la de defenderlas contra insectos herbívoros, contra otros vegetales, bacterias y hongos (López, 2006; Bakkali *et al.*, 2008). Los AEs son producto de ese metabolismo secundario en las plantas y, entre otros efectos bioactivos, poseen propiedad antimicrobiana, insecticida y repelente de insectos (Trongtokit *et al.*, 2005; Bakkali *et al.*, 2008; Gleiser & Zygadlo, 2009; Palacios, *et al.*, 2009; Shaaban *et al.* 2012). La importancia de los AEs continúa incrementándose, entre otros motivos, por la necesidad de identificar nuevos compuestos químicos como biocidas.

Con mayor frecuencia se encuentra resistencia de los organismos a los biocidas sintéticos (Brogdon & McAllister, 1998; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2005), por esto es necesario encontrar alternativas naturales e igualmente eficientes. La resistencia es definida como el desarrollo de la habilidad de tolerar dosis de tóxicos, las cuales resultarían letales a la mayoría de los individuos en una población normal de la misma especie (OMS, 1957). Según la FAO (1970), es una respuesta disminuida de la población de una especie de animales o plantas a un plaguicida o agente de control como resultado de su aplicación. Hasta el momento, debido a su modo de acción que afecta diferentes blancos al mismo tiempo, los productos naturales no generan resistencia o, en su defecto, ésta es de más lenta aparición respecto a los productos sintéticos (Bakkali *et al.*, 2008). Además los productos vegetales se biodegradan a compuestos no tóxicos, por lo que se consideran menos agresivos para el medio ambiente (Perez & Iannacone, 2004). Las plantas aromáticas son buscadas como fuente de nuevos compuestos químicos para el control de insectos, especialmente aquellos de importancia médica.

Los mosquitos presentan importancia a nivel mundial desde el punto de vista sanitario como vectores de agentes patógenos (Gubler, 2002). *Stegomyia aegypti* (ex *Aedes aegypti*; Harbach, 2014) es el principal vector de los virus que causan la fiebre amarilla y el dengue, enfermedades ampliamente distribuidas en regiones tropicales y subtropicales. Se calcula que cada año se producen en el mundo 200.000 casos de fiebre amarilla, de los cuales 30.000 son mortales. En los últimos siglos se registraron brotes de fiebre amarilla en EE. UU. y en Europa (Irlanda, Inglaterra, Francia, Italia, España y Portugal) mientras que Asia constituye una zona de riesgo debido a que existen las condiciones necesarias para la

transmisión (OMS, 2011a). Según informes de la OMS (2011b) los brotes de dengue también están aumentando y extendiéndose geográficamente y llegando a zonas templadas. Cada año se producen entre 50 y 100 millones de infecciones en el mundo y más del 40 % de la población mundial está en riesgo de contraer la enfermedad (OMS, 2012).

En Argentina, tanto la fiebre amarilla como el dengue están presentes principalmente en la región norte y centro. En el año 2009, Argentina vivió uno de los mayores brotes de dengue de las últimas décadas con 26.000 casos autóctonos confirmados que llegaron a la provincia de Córdoba (Ministerio de Salud de Córdoba, 2009). Para ambas enfermedades y en particular para el dengue, la permanencia y dinámica depende de variables ecológicas, climáticas, socioeconómicas, políticas y culturales que favorecen la expansión del vector (Beceyro, 2009). La prevención y el control de estas enfermedades dependen principalmente de las medidas eficaces de lucha antivectorial, que incluye protección personal, medidas constantes de control del vector y control químico (OMS, 2012). En este sentido, la aplicación de larvicidas es más eficiente que el control de adultos debido a que implica menores áreas de aplicación donde las larvas están concentradas, por lo tanto se reduce el volumen de insecticida requerido (Gleiser & Zygadlo, 2009).

El incremento en la aplicación de insecticidas sintéticos ocasionó la aparición de resistencia en *St. aegypti* en diferentes partes del mundo, particularmente en las regiones con mayor incidencia del dengue (OMS, 1992; Hemingway & Ranson, 2000; Macoris *et al.*, 2003; Jirakanjanakit *et al.*, 2007; Poupardin *et al.*, 2008; Pereira Lima *et al.*, 2009; Ranson *et al.*, 2009; Galvis & Soto-Giraldo, 2010). Incluso en Argentina ya está documentado un nivel incipiente de resistencia en ciudades del centro y norte del país (Biber *et al.*, 2006; Albrieu Linás *et al.*, 2010). Ante esta situación, la necesidad de encontrar alternativas a los insecticidas sintéticos es de gran relevancia.

Se han estudiado ampliamente diversas especies de plantas aromáticas para utilizar su AE como larvicida; en el caso de *St. aegypti* las respuestas bioactivas resultan muy diversas (Tabla IV.1). A su vez, es notoria la variación en el efecto letal de una misma especie evaluada por diferentes autores (Tabla IV.1).

Tabla IV.1: Bioactividad del AE de diferentes especies aromáticas sobre larvas de *Stegomyia aegypti*.

Especie Vegetal	DL₅₀ (ppm)	Referencia Bibliográfica
<i>Ageratum conyzoides</i>	61.550,00	Furtado <i>et al.</i> , 2005
<i>Alpinia purpurata</i> var roja	80,70	Santos <i>et al.</i> , 2012
<i>Alpinia purpurata</i> var rosa	71,50	Santos <i>et al.</i> , 2012
<i>Alpinia zerumbet</i>	313,00	Cavalcanti <i>et al.</i> , 2004
<i>Anethum graveolans</i>	50,00	Amer & Mehlhorn, 2006
<i>Boswellia carteri</i>	10,00	Amer & Mehlhorn, 2006
<i>Chenopodium ambrosoide</i>	35,00	Leyva <i>et al.</i> , 2009
<i>Chloroxylon swietenia</i> (hoja)	16,50	Ravi Kiran <i>et al.</i> , 2006
(tallo)	20,40	Ravi Kiran <i>et al.</i> , 2006
<i>Cinnamomum camphora</i>	10,00	Amer & Mehlhorn, 2006
<i>Citrus limón</i>	10,00	Amer & Mehlhorn, 2006
	95.800,00	Furtado <i>et al.</i> , 2005
<i>Citrus limonia</i>	519,00	Cavalcanti <i>et al.</i> , 2004
<i>Citrus paradisi</i>	47,30	Morales-Saldaña <i>et al.</i> , 2007
<i>Citrus sinensis</i>	538,00	Cavalcanti <i>et al.</i> , 2004
<i>Clausena anisata</i>	130,19	Govindarajan, 2010
<i>Cymbopogon citratus</i>	69,00	Cavalcanti <i>et al.</i> , 2004
	63.890,00	Furtado <i>et al.</i> , 2005
<i>Cymbopogon winterianus</i>	54.690,00	Furtado <i>et al.</i> , 2005
<i>Eucalyptus grandis</i>	32,40	Lucia <i>et al.</i> , 2007
<i>Guatteria hispida</i>	85,74	Aciole <i>et al.</i> , 2011
<i>Guatteria blepharophylla</i>	58,72	Aciole <i>et al.</i> , 2011
<i>Guatteria friesiana</i>	52,60	Aciole <i>et al.</i> , 2011
<i>Hyptis martiusii</i>	500.000,00*	Araujo <i>et al.</i> , 2003
<i>Helichrysum italicum</i>	100.000,00	Amer & Mehlhorn, 2006
<i>Hyptis fruticosa</i>	502,00	Silva <i>et al.</i> , 2008
<i>Hyptis pectinata</i>	366,00	Silva <i>et al.</i> , 2008
<i>Hyptis suaveolens</i>	261,00	Cavalcanti <i>et al.</i> , 2004
<i>Juniperus commuis</i>	50,00	Amer & Mehlhorn, 2006
<i>Lippia citriodora</i>	100,00	Amer & Mehlhorn, 2006
<i>Lippia gracilis</i>	98,00	Silva <i>et al.</i> , 2008
<i>Lippia sidoides</i>	63,00	Cavalcanti <i>et al.</i> , 2004
	45.490,00	Furtado <i>et al.</i> , 2005
<i>Mentha pulegium</i>	16.000,00	Morales-Saldaña <i>et al.</i> , 2007
<i>Murraya koenigii</i>	29,97	Morales-Saldaña <i>et al.</i> , 2007

Tabla IV.1: Continuación.

Especie Vegetal	DL₅₀ (ppm)	Referencia Bibliográfica
<i>Ocimum gratissimum</i>	60,00	Cavalcanti <i>et al.</i> , 2004
	104.580,00	Furtado <i>et al.</i> , 2005
<i>Ocimum sanctum</i>	29,76	Pathak <i>et al.</i> , 2000
<i>Ocimum tenuiflorum</i>	71.270,00	Furtado <i>et al.</i> , 2005
<i>Pimenta racemosa</i>	27,00	Leyva <i>et al.</i> , 2009
<i>Pinus</i> (Turpentine)	14,70	Lucia <i>et al.</i> , 2007
<i>Piper aduncum</i>	57,00	Leyva <i>et al.</i> , 2009
<i>Piper auritum</i>	17,00	Leyva <i>et al.</i> , 2009
<i>Piper nigrum</i>	50,00	Amer & Mehlhorn, 2006
<i>Santalum album</i>	10,00	Amer & Mehlhorn, 2006
<i>Syzygium jambolana</i>	433,00	Cavalcanti <i>et al.</i> , 2004
<i>Tagetes erecta</i>	15,38	Pathak <i>et al.</i> , 2000
<i>Tagetes minuta</i>	72.850,00	Furtado <i>et al.</i> , 2005
	10,00	Maradufu <i>et al.</i> , 1978
	240,00 ¹	Pereira Lima <i>et al.</i> , 2009
	250,00 ²	Pereira Lima <i>et al.</i> , 2009
	210,00 ³	Pereira Lima <i>et al.</i> , 2009
<i>Tagetes patula</i>	13,57	Dharmagadda <i>et al.</i> , 2005
<i>Vanillosmopsis arborea</i>	15.610,00	Furtado <i>et al.</i> , 2005

Tabla modificada de Bonino (2009).

^{1,2,3} Variedad/procedencia de *St. Aegypti*: ¹Rockefeller (EE.UU.); ²Bauru y ³San Jose de Río Negro (Brasil).

*DL₉₀ (ppm)

El AE de *T. minuta* presenta actividad biológica sobre diferentes tipos de organismos. Se ha estudiado su actividad farmacológica, antimicrobiana (Fuselli *et al.*, 2005), antimicótica (Camm *et al.*, 1975; Ríos *et al.*, 1987; Figueroa *et al.*, 1995; Tereschuk *et al.*, 2002), antiviral (Babbar *et al.*, 1972; Singh *et al.*, 2002) y antiprotozoaria contra *T. cruzi* y *T. brucei* (Al-Musayeib *et al.*, 2012). Además, posee cualidades como repelente (Boeke *et al.*, 2004), inhibidor de la eclosión de huevos y de la emergencia de adultos de *Callosobruchus maculatus* (Coleópteros) (Keita *et al.*, 2000), como pediculicida (Cestari *et al.*, 2004), como varroicida (Ruffinengo *et al.*, 2007) e insecticida contra larvas de los géneros *Stegomyia*, *Aedes*, *Anopheles* y ninfas de *Triatoma* (Jacobson *et al.*, 1975; Maradufu *et al.*, 1978; Green *et al.*, 1991; Macedo *et al.*, 1997; Furtado *et al.*, 2005). Adicionalmente, el género *Tagetes* presenta también actividad nematicida (Ball-Coelho *et al.*, 2003).

La composición química de los AEs puede variar con la localidad geográfica, condiciones de crecimiento y parte de la planta, solvente y métodos de extracción y aislamiento del AE (Koroch *et al.*, 2007). Aun así existen quimiotipos que consisten en grupos de individuos de la misma especie que pueden diferenciarse significativamente de los demás por su composición química (Soria *et al.*, 2008). La actividad biológica de un AE también puede variar en función de su composición química. La bioactividad de los AE y sus aplicaciones han sido ampliamente estudiadas (Aslan *et al.*, 2004; El-Zemity *et al.*, 2006; Bakkali, *et al.*, 2008; Damiani *et al.*, 2009; Shaaban *et al.*, 2012), pero poco se abordó desde la genética de las plantas estudiando sucesivas generaciones. En este contexto, se evaluó si variaciones intraespecíficas en la composición del AE de *T. minuta* (quimiotipos) se podrían traducir en cambios en su efecto bioactivo. Para ello se tomó como modelo biológico a larvas de *St. aegypti* por ser un insecto de importancia sanitaria presente en Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aceite esencial. A partir de los quimiotipos identificados (Tabla IV.2) se evaluó la bioactividad de las muestras del segundo y tercer ciclo de cultivo (Fig. IV.1 *a* y *b* respectivamente). También se evaluó la composición (Tabla IV.2, Fig. IV.1 *c*) y bioactividad del AE de una población silvestre a fin de comparar los efectos bioactivos de la selección química. La población silvestre se seleccionó de la localidad de Copina, Córdoba (31° 39' 23,8'' S; 64° 35' 53,4'' O) por estar situada dentro del área de distribución de las poblaciones que dieron origen a la población base con la que se inició la selección.

Para obtener el volumen de AE requerido en los bioensayos se trabajó con muestras compuestas por AE de diferentes plantas del mismo ciclo de cultivo con el mismo perfil químico. De esta manera se generaron muestras por quimiotipo de las que se hicieron cromatografías gaseosas para corroborar el perfil del AE.

Tabla IV.2: Quimiotipos identificados y perfil químico de la población silvestre.

Procedencia	Quimiotipo	Perfil químico
2° Ciclo de Cultivo	Ocimenona	ocimenona
	OTLO	ocimenonas-tagetonas-limoneno-ocimeno
	Dihidrotagetona	dihidrotagetona
3° Ciclo de Cultivo	Ocimenona	ocimenona
	OTLO	ocimenona-ocimeno
	Dihidrotagetona	dihidrotagetona-ocimenona
Población Silvestre		ocimeno-cimenona

Larvas de mosquitos. En los ensayos de actividad biológica del AE de *T. minuta*, se utilizaron larvas de III estadio de *St. aegypti*. Se seleccionó ese estadio debido a que las larvas tienen menor probabilidad de muerte por otros factores y no hay riesgo de que se transformen en pupa durante el ensayo. Las larvas fueron obtenidas del criadero del Instituto de Virología Dr. José María Vanella (InViV) (Facultad de Ciencias Médicas - UNC). El mismo fue mantenido siguiendo las pautas generales de Gerber *et al.* (1994). Los adultos fueron colocados en jaulas entomológicas de 30 x 60 x 30 cm y alimentados con agua azucarada al 10 %. Se utilizaron ratas inmovilizadas como fuente de sangre para las hembras. Las larvas fueron criadas en bandejas plásticas de 1000 ml de capacidad y alimentadas diariamente con hígado en polvo (0,25 mg/larva/día).

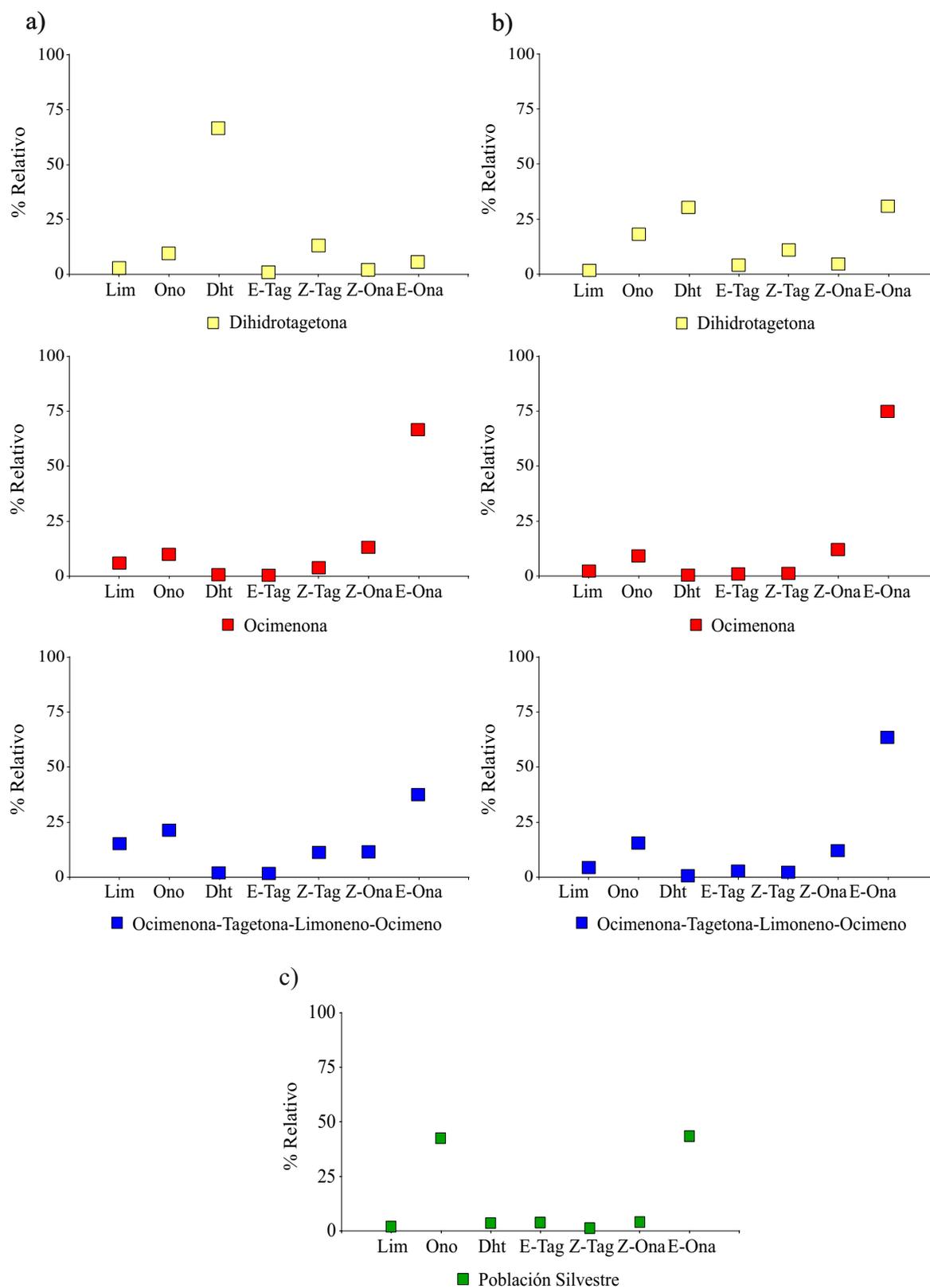


Figura IV.1: Compuestos principales (%) del AE utilizado en bioensayos. a y b) Perfiles del segundo y tercer ciclo de cultivo respectivamente; **c)** Perfil de la población silvestre.

Lim: limoneno; Ono: ocimeno; Dht: dihidrotagetona; E-Tag: E-tagetona; Z-Tag: Z-tagetona; E-Ona: E-ocimenona; Z-Ona: Z-ocimenona.

Las condiciones ambientales en la cámara de cría fueron de 25 ± 2 °C y 12 hs de fotoperíodo. A partir de las colonias se obtuvieron las larvas necesarias para cada ensayo.

Bioensayos. Para la realización de los ensayos se colocaron 30 larvas en bandejas que contenían agua destilada a las que posteriormente se les agregó la solución madre (SM) dando un volumen final de 100 ml (Fig. IV.2 *a* y *b*). La SM se preparó con agua destilada, AE y dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente. El DMSO se colocó al 1 % de volumen final de la bandeja en el tratamiento de máxima concentración, en los tratamientos más diluidos la concentración fue proporcionalmente menor. Se agregó SM a las bandejas en cantidad necesaria para obtener la concentración de AE requerida para cada tratamiento (Fig. IV.2 *c* y *d*). El control sólo tuvo agua destilada y DMSO (al 1 %). Además se realizó otro control sólo con agua para descartar que la mortalidad de larvas fuera debido al estrés causado por su manipulación.

En cada bandeja se colocaron 30 larvas y se realizaron 4 réplicas para cada tratamiento. La mortalidad se registró a las 24 hs, considerándose muertos los individuos completamente inmóviles. Se registró también si ocurrían cambios morfológicos o en el comportamiento de las larvas. Las bandejas de los tratamientos se mantuvieron en ambiente controlado: 25 ± 2 °C y 12 hs de fotoperíodo.

Todos los ensayos fueron realizados en un mismo período para evitar diferencias en las cohortes de larvas de mosquitos. El AE de los individuos selectos de *T. minuta* (primer ciclo de cultivo) no fue bioensayado. Se realizaron ensayos preliminares para determinar las concentraciones de AE a evaluar tanto para la población silvestre como para los quimiotipos del segundo y tercer ciclo de cultivo. Para la población silvestre se definieron las siguientes concentraciones: 15, 20, 25, 30, 50, 70 y 80 ppm. Los quimiotipos del segundo ciclo de cultivo se evaluaron a 20, 30, 50, 60 y 80 ppm y los del tercer ciclo a 10, 20, 30, 50 y 80 ppm.

Análisis estadísticos. Mediante el análisis de regresión probit se calculó la dosis letal media (DL_{50}) y sus límites de confianza (95 %) utilizando el programa estadístico *SPSS* (2008). Se analizaron sólo los quimiotipos que causaron el 100 % de la mortalidad para calcular la DL_{50} , los valores se expresaron en ppm. Debido a que la mortalidad de larvas en los tratamientos control no superó el 5 %, no fue necesario corregir los valores con la fórmula de Abbott (Abbott, 1925).

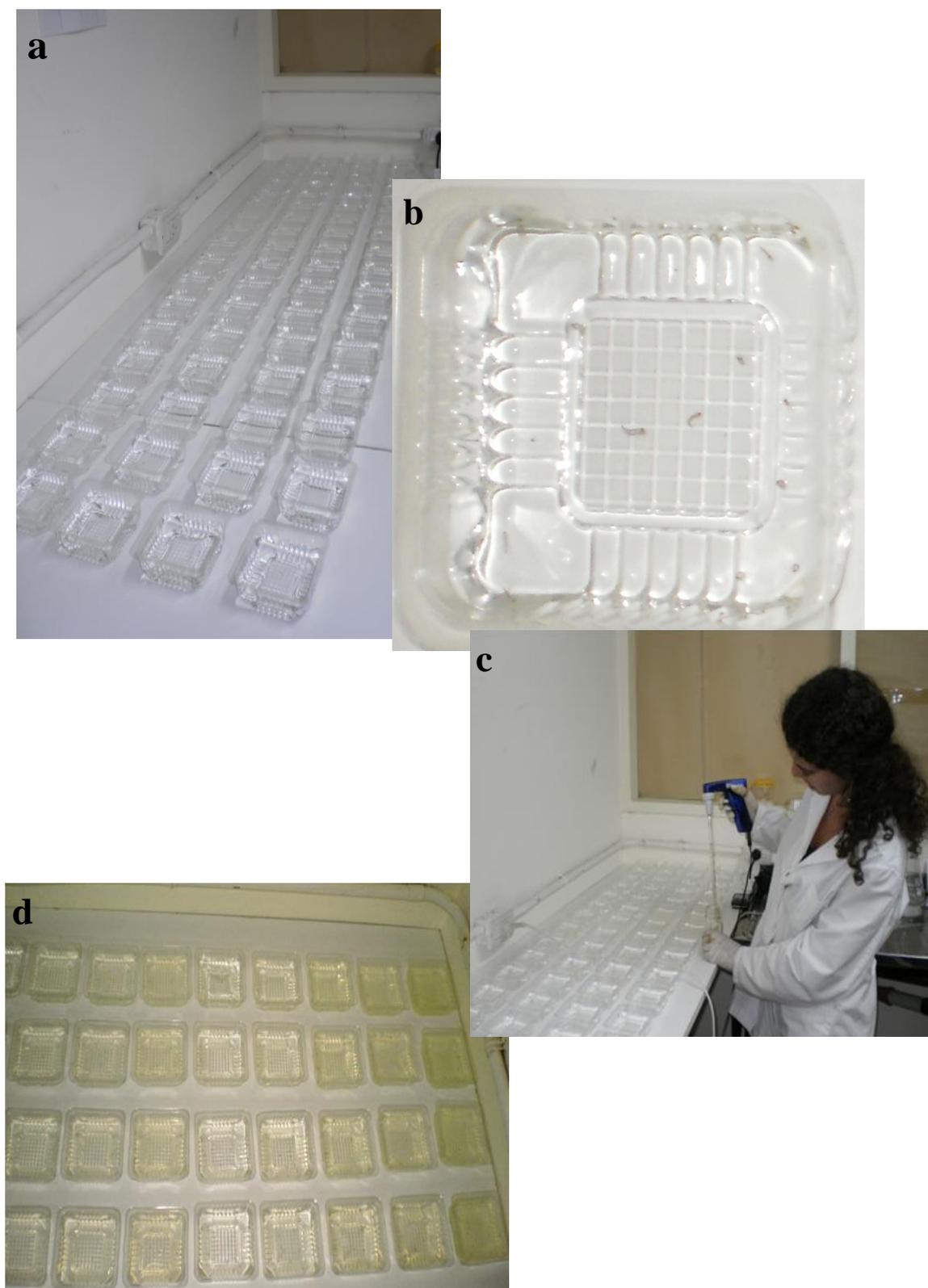


Figura IV.2: Secuencia explicativa del bioensayo. a) Preparación de las bandejas con el volumen de agua correspondiente a cada tratamiento; b) incorporación de 30 larvas de estadio III de *St. aegypti*; c) Incorporación de la solución madre de cada quimiotipo; d) Bandejas con larvas y tratamientos asignados.

RESULTADOS

Los tres quimiotipos de *T. minuta* en cada ciclo de cultivo presentaron actividad larvicida con diferente poder letal al igual que la población silvestre (Figs. IV.3, 4 y 5). En todos los bioensayos realizados se observó que a mayor concentración de AE hubo mayor mortalidad de larvas.

Los valores de DL_{50} de los perfiles químicos oscilaron en un rango de 25 a 49 ppm (Tabla IV.3). En algunos de los quimiotipos no se pudo calcular la DL_{50} ya que no presentaron respuesta lineal en la relación dosis/letalidad.

Los quimiotipos de AE del segundo ciclo de cultivo presentaron menor efecto letal sobre las larvas que los del tercero (Tabla IV.3). A su vez, las muestras con mayor proporción de ocimenona (tanto en los quimiotipos como en la población silvestre) fueron más letales que las demás. El quimiotipo con dihidrotagetona en el tercer ciclo de cultivo fue más activo que en el segundo ciclo. Esta diferencia podría deberse a que en el tercer ciclo dicho quimiotipo presentó cinco veces más ocimenona que en el segundo (Fig. IV.1 *a* y *b*). Si bien el quimiotipo OTLO no llegó al 100 % de mortalidad los valores del tercer ciclo fueron mayores que los del segundo, coincidiendo también con una mayor proporción de ocimenonas en el AE.

En función de la superposición de los intervalos de confianza de la DL_{50} de cada quimiotipo y de la población silvestre se definieron dos grupos. El primero de los grupos presentó el menor valor de DL_{50} y correspondió a los perfiles de AE con mayor proporción de ocimenona: quimiotipo Ocimenona (tercer ciclo de cultivo) y población silvestre. El segundo grupo estuvo formado por los quimiotipos Ocimenona y Dihidrotagetona del segundo y tercer ciclo de cultivo respectivamente (Tabla IV.3).

En los bioensayos no se observaron alteraciones morfológicas en las larvas, pero sí cambios de comportamiento. El efecto del AE en concentraciones bajas o medias (entre 10 y 30 ppm) provocó una marcada disminución en la capacidad de nado de las larvas, haciéndolas más lentas en comparación con las del control. Si bien no fue cuantificado, también se observó una modificación en el patrón del movimiento de las larvas, perdiendo la capacidad de sumergirse y salir a superficie para tomar aire, reduciendo sus movimientos de permanentes y controlados a espasmódicos.

Tabla IV.3: DL₅₀ del AE de *T. minuta* sobre larvas de *St. aegypti*. Comparación entre quimiotipos en dos ciclos de cultivo y una población silvestre por análisis de regresión probit.

Procedencia	Quimiotipo/Perfil Químico	DL ₅₀ (ppm)	Límites de Confianza (95 %)	Grupo	Ecuación de Regresión	Chi ²
2º Ciclo de Cultivo	Ocimenona	48,92	40,79 - 57,13	2	y= -3,66 + 0,08x	274,57
	OTLO	NC	-----	-----	-----	-----
	Dihidrotagetona	NC	-----	-----	-----	-----
3º Ciclo de Cultivo	Ocimenona	25,00	22,42 - 27,95	1	y= -2,60 + 0,10x	52,12
	OTLO	NC	-----	-----	-----	-----
	Dihidrotagetona	41,34	38,87 - 44,13	2	y= -3,42 + 0,08x	31,18
Población Silvestre	Ocimenona-Ocimeno	29,53	25,21 - 34,21	1	y= -1,61 + 0,05x	76,86

NC: No calculada.

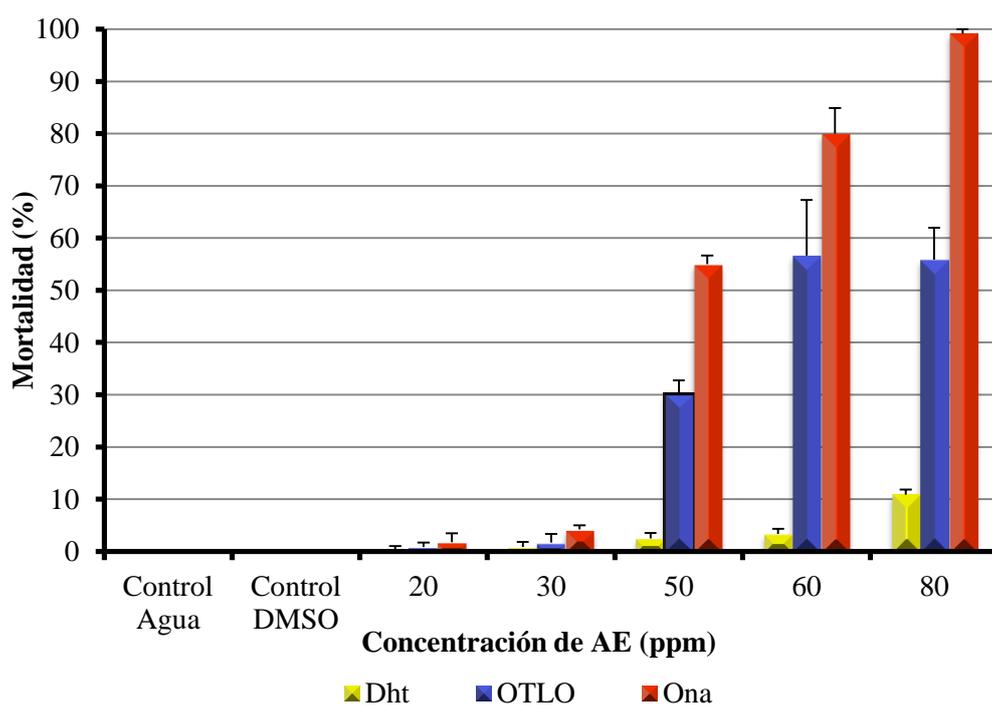


Figura IV.3: Mortalidad de larvas de *St. aegypti* ante quimiotipos del segundo ciclo de cultivo. Se evaluaron 5 concentraciones de cada quimiotipo. Dht: dihidrotagetona; OTLO: ocimenona-tagetona-limoneno-ocimeno; Ona: ocimenona. Los segmentos sobre las barras representan el EE.

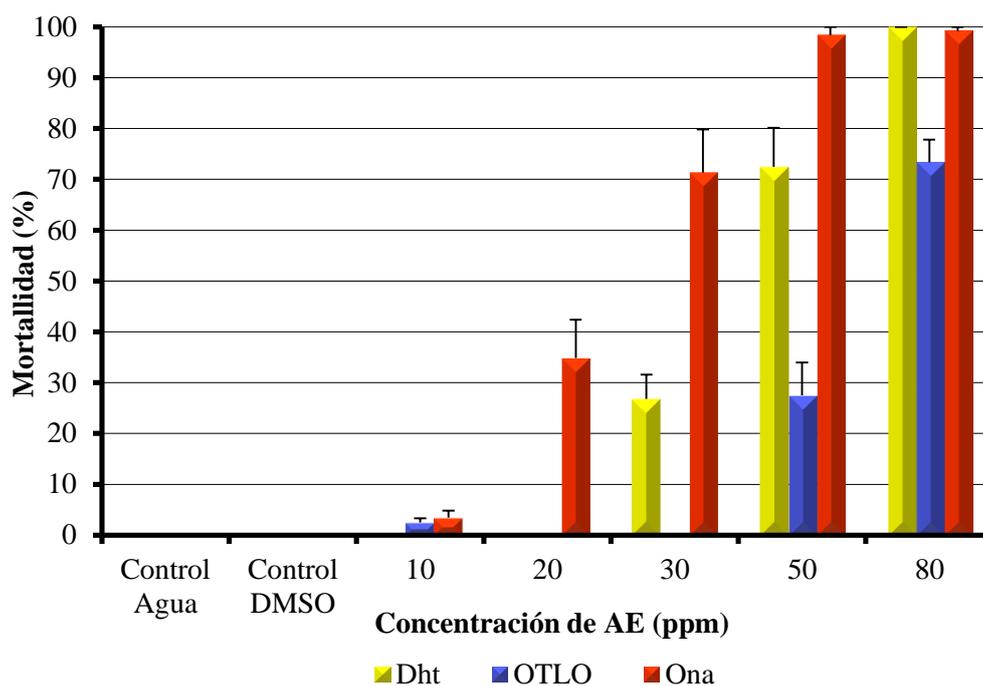


Figura IV.4: Mortalidad de larvas de *St. aegypti* ante quimiotipos del tercer ciclo de cultivo. Se evaluaron 5 concentraciones de cada quimiotipo. Dht: dihidrotagetona; OTLO: ocimenona-tagetona-limoneno-ocimeno; Ona: ocimenona. Los segmentos sobre las barras representan el EE.

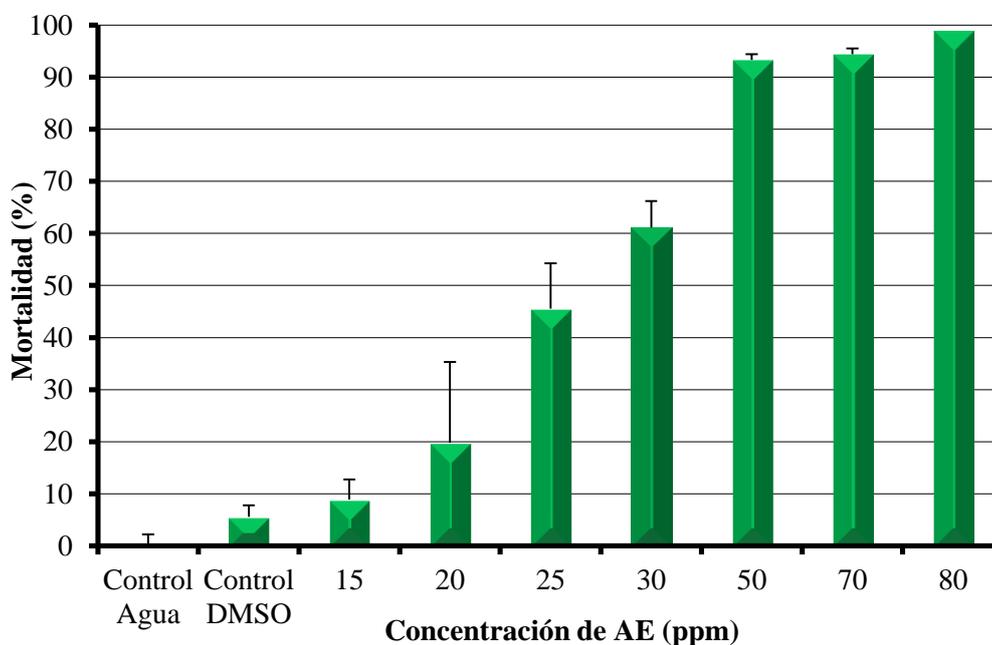


Figura IV.5: Mortalidad de larvas de *St. aegypti* ante el AE de una población silvestre de *T. minuta*. Se evaluaron 7 concentraciones. Los segmentos sobre las barras representan el EE.

DISCUSIÓN

Los quimiotipos de *T. minuta* identificados en esta Tesis presentaron efecto letal diferencial sobre las larvas de *St. aegypti*. Los perfiles químicos de los quimiotipos en los dos ciclos de cultivo evaluados fueron equivalentes pero no exactamente iguales por lo que probablemente las diferencias en las DL₅₀ se deban a ello. Las diferencias en la composición de AE en la especie forman parte de su variabilidad química; el efecto letal diferencial encontrado en los quimiotipos es consecuencia de esa variabilidad fenotípica.

Los valores de DL₅₀ en larvas de *St. aegypti* obtenidos en los quimiotipos estudiados fueron al menos 2914,00 y 9,60 veces inferiores a los presentados por Furtado *et al.* (2005) y Pereira Lima *et al.* (2009): 72850,00 ppm y 240,00 ppm respectivamente. Amer & Mehlhorn (2006) también evaluaron el AE de *T. minuta* en una concentración de 50 ppm y obtuvieron una mortalidad del 3,3 % mientras que para Maradufu *et al.* (1978) la DL₅₀ fue de 10 ppm y, en la presente Tesis, el quimiotipo Ocimenona en el tercer ciclo de cultivo presentó una DL₅₀ de 25 ppm en larvas de *St. aegypti*. Cabe destacar que en los trabajos citados anteriormente se evaluó el efecto larvicida del AE de *T. minuta* pero sin considerar las variaciones en su composición química. Por otro lado Pereira Lima *et al.* (2009) compararon el efecto del AE de *T. minuta* en larvas con y sin resistencia a temefos y demostraron que la existencia de resistencia a dicho larvicida organofosforado no interfiere en la acción del AE lo cual le aporta mayor valor como potencial larvicida.

En cada ciclo de cultivo el quimiotipo Ocimenona, en el cual los demás compuestos estuvieron escasos o ausentes, presentó mayor bioactividad que los demás perfiles lo que se vio reflejado en los menores valores de DL₅₀. Este resultado coincide con los obtenidos por Maradufu *et al.* (1978) quienes identificaron a la ocimenona como el principio activo del AE de *T. minuta* contra larvas de *St. aegypti*. Además, se observó mayor bioactividad en los quimiotipos OTLO y Dht en los que aumentó la proporción de ocimenona del segundo al tercer ciclo de cultivo. Los compuestos principales de un AE, generalmente, son los responsables del efecto bioactivo (Ipek *et al.*, 2005) y depende de la proporción en la que éstos se encuentran. El compuesto ocimenona es uno de los mayoritarios del AE de *T. minuta* y su efecto letal sido demostrado en otros insectos (Herrera *et al.* 2014). El incremento de la bioactividad del AE de los quimiotipos de *T. minuta* en el tercer ciclo de cultivo respecto al segundo sobre larvas de *St. aegypti* podría atribuirse a que estos presentaron una mayor proporción de dicho compuesto. Por otro lado, la bioactividad de

los compuestos principales puede ser moderada por la presencia de otros que se encuentran en menor proporción (Franzios *et al.*, 1997; Santana-Rios *et al.*, 2001; Hoet *et al.*, 2006). Al relacionar las DL₅₀ con la composición de la población silvestre y los quimiotipos ensayados se observaron resultados que podrían deberse a la existencia de relaciones de tipo sinérgica o aditiva entre los compuestos que ameritan ser evaluadas.

El quimiotipo Dihidrotagetona en el segundo ciclo de cultivo presentó muy baja bioactividad. Al analizar la composición de su perfil químico se observa que la dihidrotagetona se encontró en una proporción superior al 65 % y los demás compuestos tuvieron concentraciones inferiores al 10 %. El AE evaluado por Furtado *et al.* (2005) presentó dihidrotagetona en un 91,5 % y su DL₅₀ fue de 72.850,00 ppm. Estos resultados indicarían que la dihidrotagetona, cuando se encuentra como componente mayoritario tendría leve efecto bioactivo sobre larvas de *St. aegypti*.

El AE de la población silvestre, con ocimenona y ocimeno como compuestos mayoritarios, presentó alta letalidad. Si se considera que el AE constituye un metabolito secundario implicado en la defensa de la planta (Banchio *et al.*, 2005) y que las especies aromáticas nativas al desarrollarse en su ambiente natural están más expuestas a las presiones de predación y a condiciones de competencia interespecíficas, climáticas y ambientales que cuando lo hacen bajo condiciones de cultivo; es de esperar que presenten niveles mayores de compuestos activos (Schippmann *et al.*, 2006). Aun así, la superposición de los intervalos de confianza para la DL₅₀ de la población silvestre y el quimiotipo Ocimenona en el tercer año de cultivo indica que no hubo diferencias significativas en el efecto bioactivo de ambos AE. Estos resultados demuestran que plantas crecidas en ambientes naturales y plantas cultivadas pueden tener el mismo potencial bioactivo lo cual va a depender principalmente de la composición química del AE.

Las larvas que sobrevivieron en los tratamientos de mayor concentración (50 - 80 ppm) en los tres quimiotipos y de la población silvestre, quedaron moribundas y casi inmóviles. En los tratamientos de concentraciones bajas e intermedias (10 - 30 ppm), si bien la mayoría de las larvas no murieron presentaron cambios en su comportamiento observándose menor velocidad de nado y la imposibilidad de realizar el movimiento ascendente-descendente (para tomar aire). Este cambio en las características de la natación de las larvas también fue descrito por Green *et al.* (1991) quienes además observaron que la mortalidad ante diferentes concentraciones de AE de *T. minuta* (4 y 10 ppm) se iguala en 100 % a las 96 hs de iniciado el bioensayo. Estos resultados indicarían que ante un mayor

tiempo de exposición el efecto letal no varía entre tratamientos de menor concentración de AE en relación a los más concentrados cuando los organismos ya manifiestan alteraciones en su comportamiento. Sería de interés evaluar si exposiciones más prolongadas a bajas concentraciones del AE de los quimiotipos aumentan la mortalidad de larvas de *St. aegypti* reduciendo así la cantidad de producto a aplicar.

CONCLUSIÓN

Tagetes minuta presentó actividad letal contra larvas de III estadio de *St. aegypti*; y ese efecto varió en función de la composición química y de la dosis de AE evaluada.

Se encontró un efecto diferencial en la bioactividad de los quimiotipos. Según los valores de DL_{50} , los perfiles con ocimenona fueron más letales contra larvas de *St. aegypti*. El perfil con mayor proporción de dihidrotagetona presentó baja bioactividad, por el contrario, cuando dicho compuesto estuvo en igual proporción que la ocimenona la bioactividad del quimiotipo se incrementó notablemente. La relación observada entre la presencia conjunta de algunos compuestos y la bioactividad abren nuevos interrogantes para evaluar específicamente compuestos puros y efectos sinérgicos o aditivos entre éstos.

Un importante aporte de este trabajo es la determinación de la bioactividad diferencial de los quimiotipos identificados en plantas cultivadas de *T. minuta*. Estos resultados resaltan el potencial del cultivo de plantas de *T. minuta* con un perfil químico determinado, poco variable y con bioactividad comprobada evitando así la presión de extracción sobre el recurso silvestre. Los aportes de este trabajo constituyen un importante avance en la búsqueda de nuevos biocidas naturales para el control de insectos de importancia médica.

CAPÍTULO V

**Relaciones entre caracteres morfológicos,
químicos y bioactividad: Caracteres
discriminantes**

INTRODUCCIÓN

En Argentina está muy difundido el uso de hierbas aromáticas nativas tanto para aperitivos, yerbas compuestas, infusiones como para aplicaciones medicinales. Este elevado consumo requiere una gran cantidad de material vegetal. Un punto crítico es que para satisfacer dicha demanda sólo se cuenta con plantas cosechables de poblaciones silvestres. Esta situación pone en riesgo la continuidad de las especies aromáticas nativas debido a la presión de extracción a la que se ven sometidas. Sumado a esto, el cambio de uso de la tierra con el consecuente desmonte y los incendios también ponen en riesgo a las aromáticas nativas. Ante esta realidad es necesario que estas especies se estudien y caractericen para desarrollar prácticas de manejo en cultivo y así poder abastecer a la industria reduciendo la presión sobre las poblaciones silvestres.

Algunas especies aromáticas nativas de Argentina se han estudiado y caracterizado con el fin de conocer su variabilidad y establecer pautas de manejo; tal es el caso de la “peperina” *Mintostachys verticillata*, la “carqueja” *Baccharis crispa*, el “incayuyo” *Lippia integrifolia* y el “suico” *Tagetes minuta*. Cada especie se encuentra en diferente estado de avance: la peperina ya ha sido introducida a cultivo (Ojeda, 2004), tiene registrado un cultivar (Ojeda, 2008) y está en etapa de mejoramiento por características organolépticas (Ocaño, datos no publicados); de la carqueja se han realizado descripciones *in situ* de poblaciones de las provincias de Córdoba y San Luis y se está iniciando el proceso de introducción a cultivo (Chaves, 2012); del incayuyo se estudiaron poblaciones *in situ* y se están evaluando plantas en condiciones de cultivo (Brunetti, 2014) y del suico se caracterizaron plantas obtenidas de semillas silvestres comparadas en parcelas experimentales (Massuh, 2007) (estudios que tienen continuidad y se profundizaron con la presente Tesis). Considerando la riqueza, el uso y la potencialidad económica de las aromáticas nativas en Argentina es imperioso avanzar en su caracterización para poder hacer un mejor aprovechamiento del recurso y ofrecer al mercado una producción de calidad. Dicha caracterización implica un relevamiento de diferentes aspectos (morfológicos, fenológicos, químicos, de rendimiento) que deben ser relacionados para tener un conocimiento integral de la especie. Es importante determinar las variaciones tanto morfológicas como químicas ya que pueden existir correlaciones entre las características morfológicas y la presencia de quimiotipos específicos (Villamil, 2010).

En el marco de esta Tesis con un amplio estudio y descripción tanto morfológica como química de las familias evaluadas de *T. minuta*, es necesario un abordaje conjunto de estos aspectos para lograr una mejor caracterización y un mayor alcance de los resultados obtenidos. Esta práctica de integración de resultados ya ha sido aplicada para caracterizar otras especies aromáticas de amplio uso en Argentina, *Origanum vulgare* (Torres, 2011) y *Baccharis crispa* (Chaves, 2012) como ejemplos de especies cultivada y silvestre respectivamente.

En los capítulos anteriores se realizó la caracterización morfológica, química y de bioactividad del AE de las familias de *T. minuta* estudiadas. También se diferenciaron tres quimiotipos que constituyeron una agrupación a nivel de suprafamilia. En este capítulo se integran todos los resultados parciales para describir las relaciones entre los caracteres morfológicos (cualitativos y cuantitativos), de bioactividad y de composición química de los tres quimiotipos identificados en esta Tesis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los 14 caracteres considerados en éste capítulo para realizar los análisis fueron identificados en los capítulos anteriores de la Tesis como los de mayor peso y que mejor explicaron la variabilidad, éstos se agruparon en:

- ❖ morfológicos cuantitativos: altura final, crecimiento, PSPC, %EP/Planta, %H₂O/Planta y N° de ramas;
- ❖ morfológicos cualitativos: inflorescencia blanca, inflorescencia intercalar, glándulas abundantes, estructura selecta y presencia de eje principal;
- ❖ de composición del AE: Z-tagetona, dihidrotagetona y E-ocimenona.

A partir de estos 14 caracteres incorporados conjuntamente en los análisis, se identificaron aquellos que mejor explicaron la variabilidad y diferenciaron las familias. A su vez, se complementó la descripción fenotípica de las familias con el perfil químico de su AE y su bioactividad.

Análisis estadístico. Con los caracteres cuantitativos corregidos y los cualitativos (expresados como porcentaje) se realizaron análisis multivariados de procrustes generalizado, componentes principales y discriminante. Con el primero se determinó el grado de consenso entre las configuraciones obtenidas para cada grupo de caracteres en la separación de las familias y con los dos últimos se diferenció a las familias relacionándolas con los caracteres. Inicialmente se utilizaron los 14 caracteres cuantitativos y cualitativos de mayor peso; por medio de ACP se identificaron y redujeron a 3 los caracteres de mayor peso y poder explicativo de la variabilidad. Los caracteres con mayor inercia fueron utilizados en el análisis discriminante, donde el agrupamiento de las familias es definido *a priori* y, por su valor predictivo, constituye una herramienta importante para la asignación de quimiotipo a nuevas plantas.

Los resultados de este capítulo se procesaron mediante dos programas estadísticos *SPSS Statistics* (2008) para el análisis discriminante e *InfoStat* (Di Rienzo *et al.*, 2011) para los demás. En todos los análisis se trabajó con los datos estandarizados.

RESULTADOS

El análisis de procrustes generalizado, que consideró conjuntamente los 14 caracteres de mayor peso, explicó el 100 % de la variabilidad entre las familias y presentó un 73,8 % de consenso en el ordenamiento generado por los tres grupos de variables (Tablas V.1 y V.2). Las familias formaron dos grupos, 6, 7, 8 y 9 por un lado y 1, 2, 3, 4, 5, 10, 11 y 12 por el otro (Fig. V.1).

Tabla V.1: Autovalores del análisis de procrustes generalizado.

Lambda	Valor	Proporción	Proporción Acumulada
1	0,456	0,618	0,618
2	0,282	0,382	1,000

Tabla V.2: Sumas de cuadrado por grupo del análisis de procrustes generalizado.

	Consenso	Residuo	Total	Proporción de Consenso
Componentes del AE	0,711	0,271	0,983	0,724
Caracteres morfológicos cualitativos	0,843	0,225	1,068	0,790
Caracteres morfológicos cuantitativos	0,660	0,290	0,950	0,695
Total	2,214	0,786	3,000	0,738

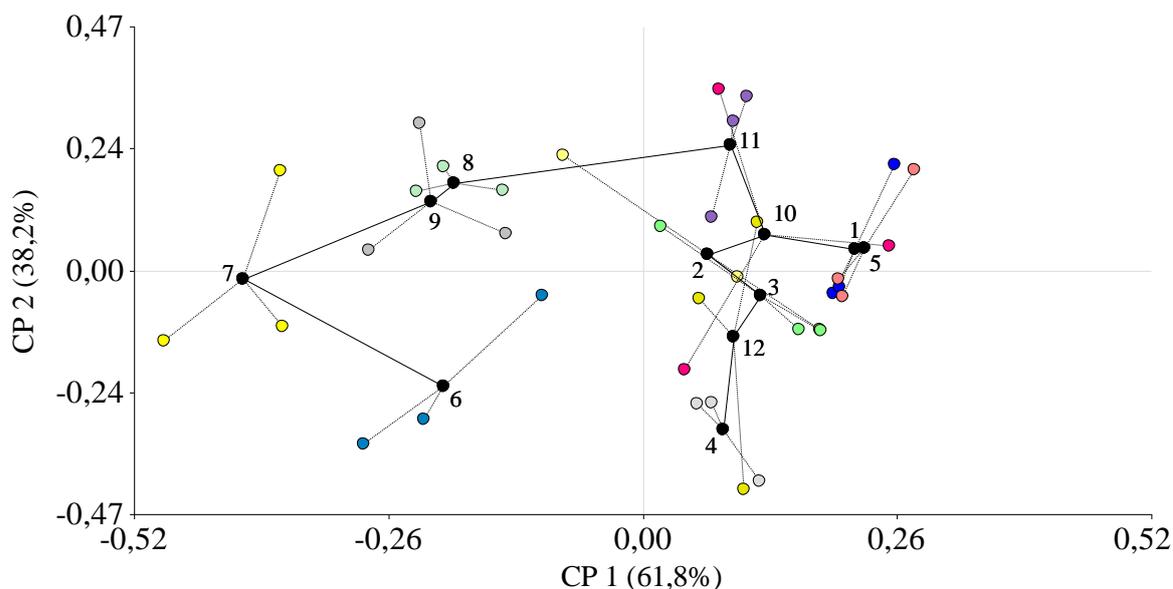


Figura V.1: Configuración de consenso del análisis de procrustes generalizado con casos graficados. Datos estandarizados. Suma de cuadrados del árbol de recorridos mínimos= 0,331. Círculos negros: familias; círculos de color (que rodean a cada uno negro): grupo de caracteres: morfológicos cuantitativos, morfológicos cualitativos y de composición de AE.

El ACP con las 12 familias y los 14 caracteres de mayor peso (cuantitativos - morfológicos y de AE- y cualitativos) identificados en los capítulos anteriores de esta Tesis delimitó dos grupos (Fig. V.2):

- ◆ Grupo 1: formado por las familias 6, 7, 8 y 9 que se relacionaron con los caracteres altura final, peso seco de planta completa, crecimiento, % de eje principal/planta, Z-tagetona, dihidrotagetona y estructura selecta.
- ◆ Grupo 2: formado por las familias 1, 2, 3, 4, 5, 10, 11 y 12 que se relacionaron con los caracteres N° de ramas, % de agua/planta, E-ocimenona, presencia de eje principal, inflorescencia blanca e intercalar y glándulas abundantes.

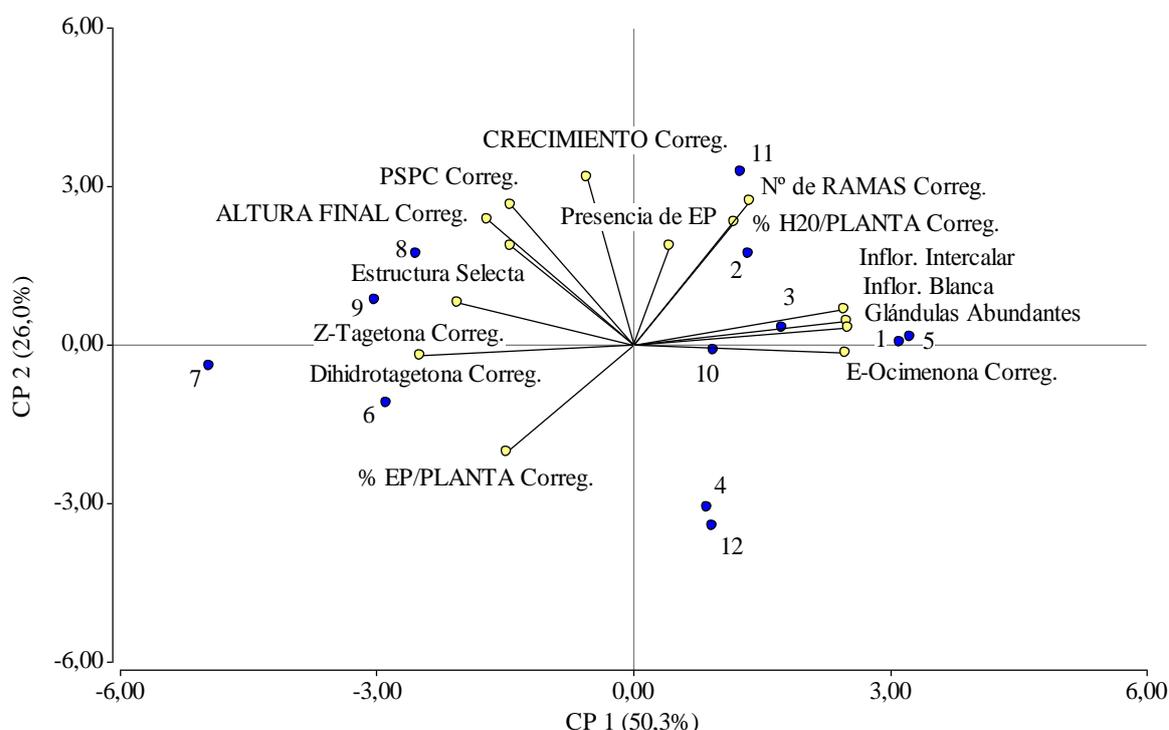


Figura V.2: Análisis de componentes principales con los caracteres cualitativos y cuantitativos corregidos. Se consideraron los caracteres de mayor peso, los cualitativos fueron expresados como porcentaje. Los dos primeros ejes explicaron un 76,3 % de la variabilidad entre las familias. Círculos azules: familias; vectores con círculos amarillos: caracteres.

A partir de nuevos ACP se redujeron los caracteres de 14 a 3 (peso seco de planta completa, inflorescencia blanca y E-ocimenona) manteniendo el agrupamiento de las familias y con un 96,3 % de la variabilidad explicada (Fig. V.3).

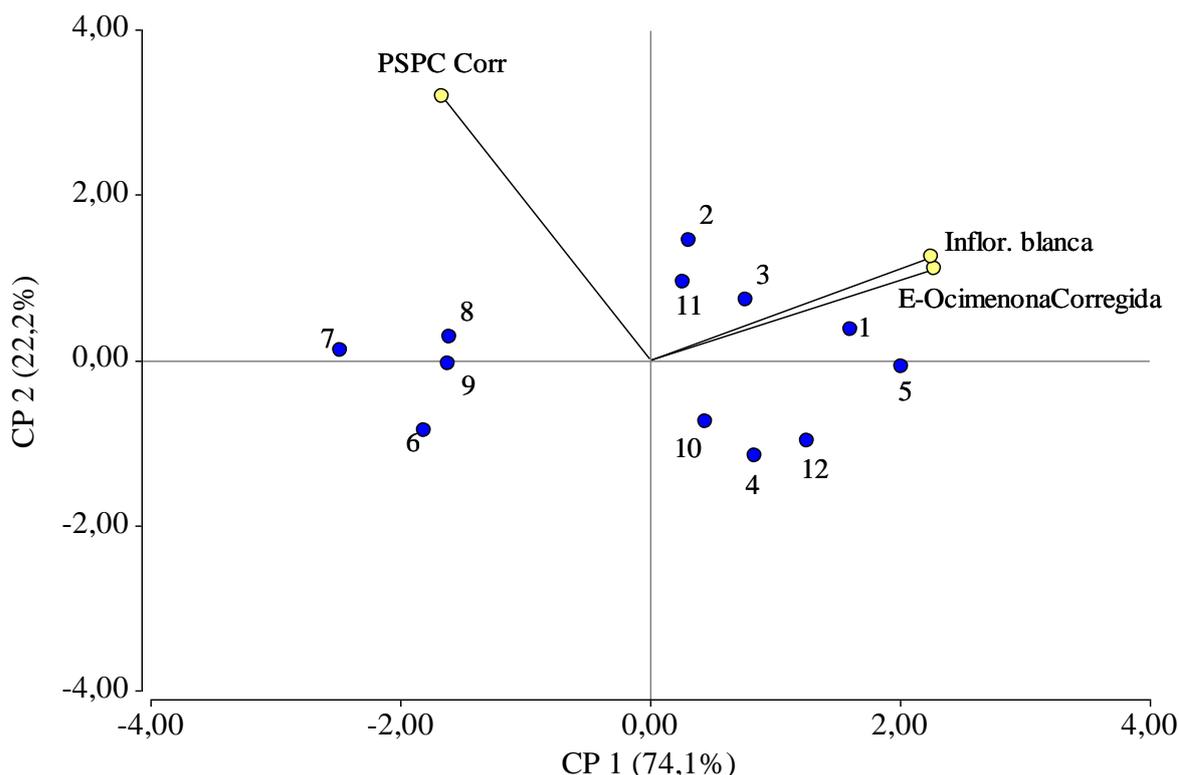


Figura V.3: Análisis de componentes principales con los tres caracteres de mayor peso. Dos caracteres cuantitativos y uno cualitativo. Los dos primeros ejes explican un 96,3 % de la variabilidad entre las familias. Círculos azules: familias; vectores con círculos amarillos: caracteres.

Estos tres caracteres de mayor peso fueron incorporados en un análisis discriminante donde los grupos definidos *a priori* fueron “Ocimenona” (familias 1, 2, 3, 4 y 5); “Dihidrotagetona” (familias 6, 7, 8 y 9) y “OTLO” (familias 10, 11 y 12) (Fig. V.4). Se consideró a los grupos delimitados por el análisis como morfo-quimiotipos debido a que las variables clasificatorias fueron caracteres morfológicos y de composición de AE. Las dos primeras funciones de correlación discriminante canónica explicaron el 100 % de la varianza. La primera explicó un 95,1 % y fue estadísticamente significativa, no así la segunda función que explicó el 4,9 % restante (Tablas V.3 y V.4).

Tabla V.3: Autovalores del análisis discriminante.

Función	Autovalor	Varianza (%)	Varianza acumulada (%)	Correlación canónica
1	16,820 ^a	95,10	95,10	0,972
2	0,869 ^a	4,90	100,00	0,682

^aSe han empleado las dos primeras funciones discriminantes canónicas en el análisis.

Tabla V.4: Valores de Lambda de Wilks del análisis discriminante.

Contraste de las funciones	Lambda de Wilks	Chi-cuadrado	gl	Sig.
1 a la 2	0,030	28,047	6	0,000
2	0,535	5,005	2	0,082

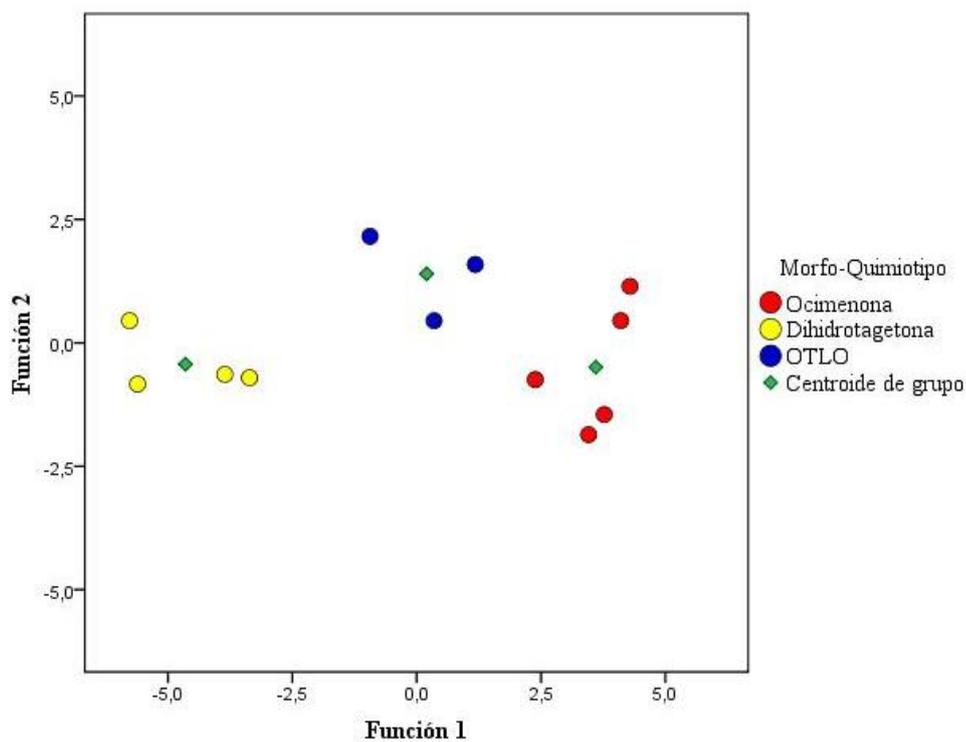


Figura V.4: Análisis discriminante con caracteres morfológicos y de composición de AE. Los morfo-quimiotipos identificados *a priori* confirmaron la agrupación de las familias y, a su vez, la diferenciación de los grupos. Cada punto representa una familia.

DISCUSIÓN

Si bien la dihidrotagetona presentó baja actividad larvicida cuando se encontró en alta proporción y como único componente mayoritario, tiene importancia por ser un compuesto utilizado industrialmente. Está patentado el procedimiento a partir del cual de dihidrotagetona se obtiene el compuesto 5-isobutil-3-metil-4,5-dihidro-2(3H)-furanona utilizado en las industrias de aromatizantes, alimentos, perfumes, cosméticos, refrescos, bebidas alcohólicas y farmacéutica por sus actividades biológicas (Arun Kumar *et al.*, 2004). Por lo antedicho cobra mayor relevancia la existencia del quimiotipo Dihidrotagetona que, además, es distinguible de los demás a nivel morfológico por sus inflorescencias densas y amarillas y sus glándulas oleíferas foliares escasas y de tipo alargado.

Los grupos definidos por caracteres morfológicos y químicos (morfo-quimiotipos) fueron coincidentes con los grupos clasificados por la composición del AE (quimiotipos), observándose una clara separación entre dichos grupos y una relativa homogeneidad dentro de ellos. Esta congruencia en la clasificación permite asociar la presencia de determinados caracteres morfológicos con compuestos químicos: inflorescencias amarillas y dihidrotagetona. La relación encontrada refleja en la práctica lo afirmado por Villamil (2010) respecto a las correlaciones que pueden existir entre caracteres morfológicos y químicos, donde los descriptores (color de la inflorescencia y compuesto químico) constituyen las herramientas para evidenciarla. Por otro lado, esa relación entre caracteres es de gran importancia para realizar un proceso de selección indirecta (Cubero, 2003) donde plantas que presenten inflorescencias amarillas tendrán AE constituido principalmente por dihidrotagetona.

La agrupación de las familias en función de su perfil químico de AE, bioactividad y caracterización morfológica permitió identificar los morfoquimiotipos (Fig. V.5). Los quimiotipos del segundo y tercer ciclo de cultivo presentaron diferencias en la bioactividad. La DL_{50} fue menor en las muestras que tuvieron mayor proporción de ocimenona. A su vez, las plantas de las que fue extraído el AE de cada muestra manifestaron diferencias a nivel morfológico (Fig. V.5). Particularmente los caracteres relacionados con las inflorescencias y las glándulas foliares permitieron distinguir las familias con dihidrotagetona de las que no presentaron el compuesto en su AE. Esta

caracterización posibilita una producción diferencial en función del interés de utilización del AE.

Es meritorio hacer referencia a una tendencia observada en el quimiotipo Dihidrotagetona en el que las plantas presentaron inflorescencias densas, amarillas y de disposición terminal; glándulas foliares escasas y sólo de tipo alargado y dihidrotagetona en su AE. Esta relación entre todos los caracteres no se pudo demostrar estadísticamente debido a que el tamaño muestral no fue lo suficientemente grande para el análisis requerido; pero amerita que se continúe con el estudio de posibles asociaciones.

Los quimiotipos OTLO y Ocimenona presentaron plantas de menor tamaño, con mayor proporción de agua pero, por otro lado, tuvieron más ramificaciones y menor proporción de eje principal respecto al peso de la planta. A nivel de estructura de planta estas características se compensan en cuanto a la producción de AE y el mayor interés recae en la presencia de más ramificaciones. Si bien no tuvieron una marcada diferenciación morfológica, la bioactividad sí distinguió a estas 8 familias destacándose aquellas con mayor proporción de ocimenona en el AE por ser las más letales.

Las diferencias observadas en cuanto a composición del AE y su respuesta bioactiva permiten inferir que ante la variabilidad natural de la especie, los efectos bioactivos también van a ser variables. Teniendo en cuenta esta realidad, es más necesario aún caracterizar y cultivar las plantas utilizadas como medicinales o como biocidas para garantizar una respuesta estable de su efecto.

Considerando la riqueza de la flora aromática y medicinal Argentina es todavía pobre el grado de estudio y avance en la caracterización, tanto a nivel morfológico como químico. Es necesario poner en relieve la urgencia de desarrollar un plan de acción para promover el manejo sustentable de las especies aromáticas silvestres mientras se desarrollan investigaciones orientadas al cultivo y la generación de bancos de germoplasma que posibiliten preservar el recurso.

Bandoni (2002) establece criterios para la selección de nuevos materiales aromáticos con el fin de promover su aprovechamiento y cultivo; *T. minuta* por sus características y según su forma de obtención actual entra en la clasificación de “especie silvestre aprovechada”. Las especies silvestres se destacan por su gran variabilidad lo cual constituye la base para obtener nuevas y valiosas composiciones de AE. Esta característica se evidenció al abordar el estudio de *T. minuta* de modo integral, a nivel morfológico y químico.

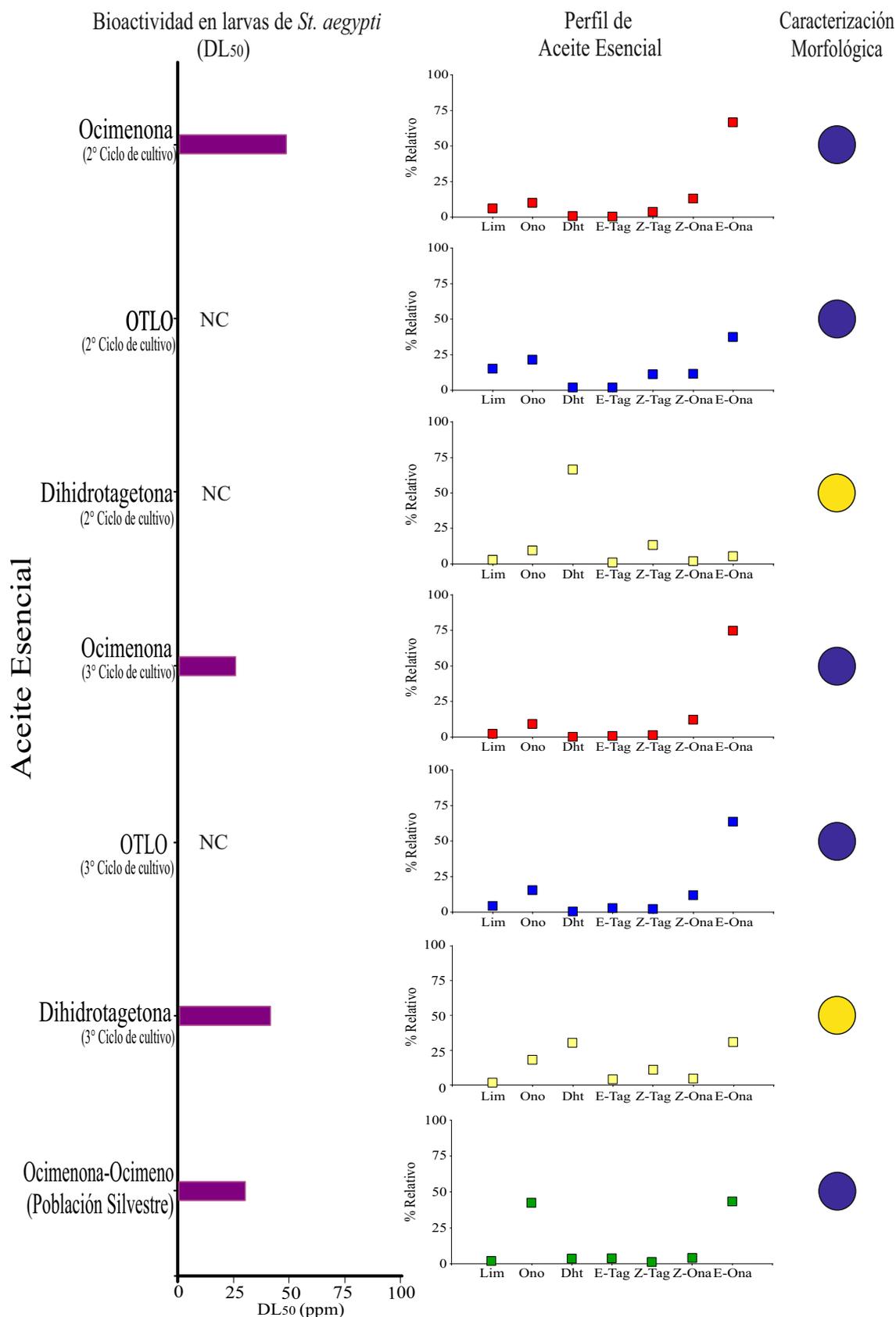


Figura V.5: Comparación de bioactividad, composición de AE y características morfológicas de las familias de *T. minuta* con un mismo perfil químico.

Lim: limoneno; Ono: ocimeno; Dht: dihidrotagetona; E-Tag: E-tagetona; Z-Tag: Z-tagetona; E-Ona: E-ocimeno; Z-Ona: Z-ocimeno.
 Referencias morfológicas: ● Inflorescencias blancas, laxas e intercalares. Glándulas foliares abundantes y de tipo alargado y redondo.
 ● Inflorescencias amarillas, densas y terminales. Glándulas foliares escasas y de tipo alargado.

CONCLUSIÓN

Las familias que formaron el quimiotipo Dihidrotagetona presentaron plantas de mayor tamaño, distinguibles por caracteres morfológicos relacionados con las inflorescencias y con las glándulas foliares y asociadas a la presencia del compuesto dihidrotagetona. Estos caracteres son de temprana aparición en la planta y de fácil observación lo que permite identificar a individuos con estas características en una etapa inicial de cultivo. El valor inferencial de esta asociación morfológica y química es de gran importancia para planificar y definir el destino del AE que se obtenga.

Los caracteres peso seco de planta completa, inflorescencia blanca y *E*-ocimenona fueron discriminantes, lo cual posibilita identificar individuos y clasificarlos en los grupos de morfo-quimiotipos establecidos: Ocimenona, Dihidrotagetona y OTLO.

La bioactividad del AE de los tres morfo-quimiotipos identificados varía en función su composición química. El hecho de poder diferenciar los grupos químicos más bioactivos permite producirlos específicamente, logrando la calidad y homogeneidad en el AE que es altamente demandada por la industria.

El avance en la caracterización de las especies aromáticas nativas es un aporte de gran importancia tanto para el aprovechamiento de los recursos como para su preservación. Dada la diversidad de plantas aromáticas nativas en Argentina, estudiar integradamente diferentes aspectos (morfológicos, químicos y de bioactividad) de estas especies constituye una actividad con gran alcance.

CAPÍTULO VI

Conclusiones finales

CONCLUSIONES FINALES

Las poblaciones silvestres constituyeron la primera fuente de variabilidad genética de la población de base genética amplia de *T. minuta*; esa variabilidad fue imprescindible para iniciar el proceso de selección y domesticación. Aun cuando dichas poblaciones se ubicaron en un área relativamente pequeña respecto al rango de distribución de la especie, esa distancia fue suficiente para encontrar diferenciación morfológica, química y de actividad biológica en la descendencia.

Se puede concluir que no se rechazaron las hipótesis planteadas en esta Tesis: tanto la de conservación en la progenie de caracteres diferenciales morfológicos, fenológicos y químicos como la de variación en la bioactividad sobre insectos en función de los quimiotipos.

Los caracteres cuantitativos morfológicos tuvieron menor heredabilidad que los de composición de AE por lo que fueron menos estables en la descendencia. Esto implica, por un lado, que la componente genética en la expresión fenotípica “composición del AE” es de gran peso y, por otro, que el ambiente donde se desarrolla la planta tiene mayor influencia sobre los caracteres cuantitativos morfológicos.

Los caracteres cualitativos fueron altamente heredables, se mantuvieron estables en gran porcentaje en cada familia en las tres generaciones por lo que constituyeron indicadores muy apropiados para comparar la progenie. Además, por ser de fácil identificación y de temprana aparición en el desarrollo de la planta posibilitan un mejor manejo y aprovechamiento del cultivo.

A nivel morfológico las 12 familias se diferenciaron en dos grupos:

- ◆ Plantas con inflorescencias amarillas, densas y dispuestas terminalmente en las ramas y con escasas glándulas foliares y de tipo alargadas.
- ◆ Plantas con inflorescencias blancas, laxas y dispuestas intercaladamente en las ramas; con glándulas foliares abundantes de tipo redondas y alargadas.

A nivel químico las 12 familias se diferenciaron en tres grupos:

- ◆ Perfil con mayor proporción de ocimenona.
- ◆ Perfil con mayor proporción de dihidrotagetona.
- ◆ Perfil con presencia de ocimeno, limoneno, *E*- y *Z*-tagetona y *E*- y *Z*-ocimenona.

La nueva descripción de tres quimiotipos para la especie es material de interés para ser registrado como norma IRAM, más aún si se considera que la composición del AE mantuvo en gran medida su diferenciación a lo largo de los tres ciclos de cultivo.

A nivel bioactivo los diferentes quimiotipos descritos para *T. minuta* presentaron alta actividad larvicida para *St. aegypti* en concentraciones que pueden considerarse bajas al compararlas con otras especies vegetales. Por su bioactividad se destacaron los perfiles de AE con mayor presencia de ocimenona; quedando en nivel intermedio el perfil OTLO y en último lugar el perfil con dihidrotagetona como único compuesto mayoritario cuya letalidad fue baja en comparación con la de los demás. En este apartado cabe resaltar el incremento de la bioactividad del quimiotipo Dihidrotagetona cuando también presentó ocimeno y ocimenona. Esta diferencia indicaría la existencia de algún tipo de efecto ya sea sinérgico o aditivo entre los compuestos. La posible interacción amerita continuar con nuevos experimentos para comparar los compuestos principales aislados y en estado puro y diferentes combinaciones entre ellos.

Como síntesis de la caracterización morfológica y química, se identificaron tres caracteres discriminantes que permitieron la separación en grupos a nivel suprafamilia, los cuales presentan valor predictivo para la futura clasificación de individuos de la especie. Dichos caracteres fueron el color de inflorescencia blanco, el compuesto *E*-ocimenona en el AE y el peso seco de la planta completa. A partir de estos caracteres se definió un agrupamiento de las familias en morfo-quimiotipos que fueron nombrados por su composición característica del AE:

- ◆ Ocimenona (incluye a las familias 1, 2, 3, 4 y 5)
- ◆ Dihidrotagetona (incluye a las familias 6, 7, 8 y 9)
- ◆ OTLO (incluye a las familias 10, 11 y 12)

Es importante destacar el alto valor de heredabilidad que presentaron los compuestos dihidrotagetona y ocimenona en las tres generaciones ya que esto permitirá continuar el proceso de selección y direccionarlo en función de la utilización del AE. Particularmente con estos compuestos obtenidos de *T. minuta* se patentaron productos antivirales (Singh *et al.*, 2002) y saborizantes de alimentos (Arun Kumar *et al.*, 2004) por lo que presentan un interés específico.

Si bien *T. minuta* es considerada una maleza en el contexto de cultivos tradicionales, es importante poner en valor la utilidad y el potencial económico que presenta.

Considerando por un lado las características de la especie de ser ruderal y pionera en la colonización de campos abandonados o que presentan condiciones desfavorables que no son aprovechables para cultivos tradicionales y, por otro lado su valor para la producción de AE demandando industrialmente y que constituye un producto de valor agregado; *T. minuta* podría incorporarse en el cultivo como una alternativa económica para zonas productiva y socialmente marginadas. La utilización y producción de especies aromáticas silvestres constituye un importante recurso para el desarrollo de economías regionales. Más aun considerando que en muchas ocasiones los ambientes que para otras especies presentan condiciones sub-óptimas y generan estrés en las plantas son los más apropiados para el desarrollo de las aromáticas.

El cultivo de las especies aromáticas, en oposición a la extracción a partir de poblaciones silvestres, garantiza calidad en el producto final sin atentar contra la diversidad genética de poblaciones naturales. La introducción al cultivo de especies silvestres se ha transformado en una necesidad de forma de asegurar un abastecimiento continuo de plantas, material vegetal homogéneo y de buena calidad.

La diferenciación morfológica, química y bioactiva encontrada en las familias de *T. minuta* posibilita que se oriente la producción de AE hacia una mayor obtención de los principios activos que sean de interés. Esta característica es de gran importancia para generar material homogéneo y de calidad, respondiendo así a demandas industriales.

Uno de los aportes originales de esta Tesis fue la identificación y caracterización de quimiotipos de *T. minuta* y la posibilidad de cultivar plantas con una composición química y bioactividad definida. Otro aporte de importancia es la generación de una metodología aplicable a otras especies aromáticas silvestres orientada a su incorporación a cultivo. Además esta Tesis constituye un aporte a la caracterización y puesta en valor de la flora aromática nativa de Argentina y a su conocimiento para establecer pautas de manejo orientadas hacia la producción de calidad y con valor agregado.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.
- Aciole, S.D.G.; Piccoli, C.F.; Duque L., J.E.; Costa, E.V.; Navarro-Silva, M.A.; Marques, F.A.; Sales Maia, B.H.L.N.; Pinheiro, M.L.B. and Rebelo, M.T. 2011. Insecticidal activity of three species of *Guatteria* (Annonaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Rev. Colomb. Entomol. 37 (2): 262-268.
- Adams, R.P. 2007. Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4th Edition. Allured Publishing Co.
- Albrieu Linás, G.; Seccacini, E.; Gardenal, C.N. and Licastro, S. 2010. Current resistance status to temephos in *Aedes aegypti* from different regions of Agetnina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 105 (1) 113-116.
- Al-Musayeib, N.M.; Mothana, R.A.; Matheeussen A.; Cos, P. and Maes, L. 2012. *In vitro* antiplasmodial, antileishmanial and antitrypanosomal activities of selected medicinal plants used in the traditional Arabian Peninsular region. BMC Complementary & Alternative Medicine 12 (1): 49.
- Alonso, J. 2004. Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos. 1^a edición; Editorial Corpus Libros, Rosario, Argentina.
- Amer, A. & Mehlhorn, H. 2006. Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). Parasitol. Res. 99: 466-472.
- Amujoyegbe, B.J.; Agbedahunsi, J.M. and Amujoyegbe, O.O. 2012. Cultivation of medicinal plants in developing nations: menas of conservation and poverty alleviation. Int. J. Med. Arom. Plants 2 (2): 345-353.
- Araujo, E.; Silveira, E.; Lima, M.; Neto, M.; de Andrade, I. and Lima, M. 2003. Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martiusii* Benth. J. Agric. Food Chem. 54: 3760-3762.
- Ariza Espinar, L. 1967. Las especies de *Tagetes* (Compositae) de la región central argentina. Kurtziana 4: 51-71.
- Arora, R.; Mathur, A. and Mathur, A.K. 2010. Emerging Trends in Medicinal Plant Biotechnology in Medicinal Plant Biotechnology. Ed. Arora, R. ISBN-13: 9781845936785; pp 46.
- Arun Kumar, S.; Bhupendra Prasad, J. y Ruchi, D. 2004. Patente de invención: Procedimiento para convertir dihidrotagetonona en un compuesto con dos centros quirales con sabor a coco. Oficina española de patentes y marcas, N° de publicación: ES 2 187 344 B1.
- Aslan, I.; Ozbek, H.; Çalmasur, O. and Sahin, F. 2004. Toxicity of essential oil vapours to two greenhouse pests, *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn. Ind. Crop. Prod. 19: 167-

- 73.
- Babbar, O.; Joshi, P. and Madan, A. 1972. Evaluation of plants for antiviral activity. *Indian J. Med. Res. Suppl.* 76: 54-65.
- Babu, K.G.D & Kaul, V.K. 2007. Variations in quantitative and qualitative characteristics of wild marigold (*Tagetes minuta* L.) oils distilled under vacuum and at NTP. *Ind. Crop. Prod.* 26: 241–251.
- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D. and Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils. A review. *Food Chem. Toxicol.* 46 (2): 446-475.
- Ball-Coelho, B.; Bruin, A.J.; Roy, R.C. and Riga, E. 2003. Forage Pearl Millet and Marigold as Rotation Crops for Biological Control of Root-Lesion Nematodes in Potato. *Agron. J.* 95: 282-292.
- Banchio, E.; Zygadlo, J.A. and Valladares, G.R. 2005. Quantitative variations in the essential oil of *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb. in response to insects with different feeding habits. *J. Agric. Food Chem.* 53: 6903-6906.
- 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; pp 418.
- Bansal, R.P.; Bahl, J.R.; Garg, S.N.; Nagvi, A.A.; Sharma, S.; Ram, M. and Kumar, S. 1999. Variation in quality of essential oil distilled from vegetative and reproductive stages of *Tagetes minuta* crop grown in north Indian plains. *J. Essent. Oil Res.* 11: 747-752.
- Barboza, G.E.; Cantero J.J.; Núñez, C.O. y Ariza Espinar, L. 2006. Flora Medicinal de la Provincia de Córdoba (Argentina): Pteridófitas y Antófitas silvestres o naturalizadas. Primera Edición. Museo Botánico Córdoba, Argentina; pp 1252.
- Baser, K.H.C. & Buchbauer, G. 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; pp 994.
- Beceyro, A.C. 2009. Distribución geográfica del dengue en Argentina. *Boletín de la Sociedad Entomológica Argentina* 20: 1-2. ISBN 1666-4612.
- Bernáth, J. 2002. Strategies and Recent Achievements in Selection of Medicinal and Aromatic Plants. *Acta Hort.* 576.
- Biber, P.A.; Rondán Dueñas, J.; Ludueña Almeida, F. Gardenal, C.N. and Almirón W. 2006. Laboratory evaluation of susceptibility of natural subpopulations of *Aedes aegypti* larvae to temephos. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 22 (3): 408-411.
- Bicchi, C.; Fresia, M.; Rubiolo, P.; Monti, D.; Franz, C. and Goehler, I. 1997. Constituents of *Tagetes lucida* Cav. ssp. *lucida* essential oil. *Flavour Fragr. J.* 12: 47-52.
- Boeke, S.; Barnaud, C.; van Loon, J.; Kossou, D.; van Huis, A. and Dicke, M. 2004. Efficacy of

- plant extracts against the cowpea beetle, *Callosobruchus maculatus*. Int. J. Pest Manag. 50 (4): 251-258.
- Bonino, M.A. 2009. Bioactividad larvicida de aceites esenciales en mosquitos (Diptera: Culicidae). Trabajo Final, Carrera de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba; pp 38.
- Brogdon, W.G. & McAllister, J.C. 1998. Insecticide resistance and vector control. Emerg. Infect. Dis. 4: 605-613.
- Brunetti, P.C.; Bruno, C.; Zapata, R.; Torres, L.; Barboza, G. y Ojeda, M. 2014. Estimación del tamaño muestral para estudios de variabilidad morfológica *in situ* de *Lippia integrifolia* (Verbenaceae) en el Parque Nacional Talampaya, La Rioja (Argentina). Bonplandia 23 (1): 15-23.
- Camm, E.; Towers, G. and Mitchell, J. 1975. UV-mediated antibiotic activity of some Compositae species. Phytochemistry 14: 2007-2011.
- Cavalcanti, E.; de Moraes, S.; Lima, M. and Santana, E. 2004. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 99: 541-544.
- Cestari, I.M.; Sarti, S.J.; Waib, C.M. and Castello Branco (Jr.), A. 2004. Evaluation of the potential insecticide activity of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil against the head lice *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). Neotrop. Entomol. 33 (6), 805-807.
- Chamorro, E.R.; Ballerini, G.; Sequeira, A.F.; Velasco, G.A. and Zalazar, M.F. 2008. Chemical composition of essential oil from *Tagetes minuta* L. leaves and flowers. J. Argent. Chem. Soc. 96 (1-2): 80-86.
- Chamorro, E.R.; Zambón, S.N.; Morales, W.G.; Sequeira, A.F. and Velasco, G.A. 2012. Study of the chemical composition of essential oils by gas chromatography, gas chromatography in plant science, wine technology, toxicology and some specific applications, Dr. Bekir Salih (Ed.), ISBN: 978-953-51-0127-7, InTech, Available from: URL: <http://www.intechopen.com/books/gas-chromatography-in-plant-science-wine-technology-toxicology-and-some-specific-applications/study-of-the-chemical-composition-of-essential-oils-by-gas-chromatography>.
- Chaves, G. 2012. Variabilidad morfológica de poblaciones de *Baccharis spp.*, “carquejas” (Asteraceae) de las Sierras de Córdoba y San Luis (Argentina). Tesis para optar al título de Magister en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba; pp 77.
- Cheng, S.S.; Huang, Ch.; Chen, Y.; Yu, J.J.; Chen, W.J. and Chang, S.T. 2009. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. Bioresour. Technol. 100: 452–456.
- Correa, C.M. 2002. Protection and promotion of traditional medicine: implications for public health in developing countries. Available from (Acceded December 2013):

- <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s4917e/s4917e.pdf>
- Cubero, J.I. 2003. Introducción a la Mejora Genética Vegetal. 2ª Edición; Mundi-Prensa, España; pp 567.
- Damiani, N.; Gende, L.B.; Bailac, P.; Marcangeli, J.A. and Eguaras, M.J. 2009. Acaricidal and insecticidal activity of essential oils on *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Parasitol. Res. 1: 45-52.
- de la Fuente, E.; Gil, A.; Jiménez, P.; Kantolic, A.G.; López Pereira, M.; Ploschuk, E.L.; Sorlino, D.M.; Vilariño, P.; Wassner, D.F. y Windauer, L.B. (Ed). 2006. Cultivos Industriales, Capítulos 1 y 4. Primera Edición; Editorial Facultad de Agronomía; Universidad de Buenos Aires; Buenos Aires; Argentina; pp 800.
- De Martino, L.; De Feo, V.; Formisano, C.; Mignola, E. and Senatore, F. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from three chemotypes of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) ietswaart growing wild in Campania (southern Italy). Molecules 14: 2735-2746.
- Dharmagadda, V.S.; Naik, S.N.; Mittal, P.K. and Vasudevan, P. 2005. Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. Biores Technol. 96: 1235-1240.
- Di Rienzo, J.; Guzmán, W.; y F. Casanoves. 2001. D.G.C., Test de Comparación de Medias. InfoStat Versión 1.1/Profesional. Grupo *InfoStat*. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M. y Robledo, C.W. InfoStat versión 2011. Grupo *InfoStat*. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Edris, A.E.; Shalaby, A.S.; Fadel, H.M. and Abdel-Wahab, M.A. 2003. Evaluation of a chemotype of spearmint (*Mentha spicata* L.) grown in Siwa Oasis, Egypt. Eur. Food Res. Technol. 218:74-78.
- El-Zemity, S.R.; Rezk, H.A. and Zaitoon, A.A. 2006. Acaricidal activity of some essential oils and their monoterpenoidal constituents against the parasitic bee mites, *Varroa destructor* (Acari: varroidae). J. Appl. Sci. Res. 2 (11): 1032-1036.
- Erler, F.; Ulug, I. and Yalcinkaya, B. 2006. Repellent activity of five essential oils against *Culex pipiens*. Fitoterapia 77: 491-494.
- Esquinas Alcazar, J. 1981. Los recursos filogenéticos, una inversión segura para el futuro. Consejo Nacional de Recursos Filogenéticos. INIA. Madrid; pp 44.
- Falconer, D.S. & Mackay, T.F.C. 2001. Introducción a la Genética Cuantitativa. 4ª edición; Editorial Acribia, Zaragoza, España; pp 469.
- FAO. 1970. Pest resistance to pesticide in agriculture. Importance, recognition and

- countermeasures. Rome: FAO; pp 32.
- Farshbaf Moghaddam, M.; Omibdeigi, R.; Sefidkon, F. 2004. Chemical composition of essential oil *Tagetes minuta* from Iran. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 3 (2): 83-84.
- Ferraro, M. 1955. Las especies argentinas del género *Tagetes* (Cmpositae). Bol. Soc. Argent. Bot. 6: 30-39.
- Figuroa, N.; Estévez, T. y Giménez, A. 1995. Propiedades antibacterianas, antimicóticas e insecticidas de aceites esenciales de especies vegetales aromáticas y nativas. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad de San Andrés. Congreso Internacional de Medicina Alternativa. La Paz, Bolivia.
- Fischer, U.; López, R.; Pöll, E.; Vetter, S.; Novak, J. and Franz, C. 2004. Two chemotypes within *Lippia alba* populations in Guatemala. Flavour Fragr. J. 19: 333-335.
- Franz, C. & Novak, J. 2010. Sources of essential oils. In K. H. C. Baser & G. Buchbauer (Eds.), Handbook of Essential Oils Science, Technology, and Applications. New York, NY: CRC Press; pp 39-81.
- Franzios, G.; Mirotsoú, M.; Hatziapostolou, E.; Kral, J.; Scouras, Z.G. and Mavragani-Tsipidou, P. 1997. Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. J. Agric. Food Chem. 45: 2690-2694.
- Furtado, R.F.; de Lima, M.G., Neto, M.; Bezera, J.N. e Silva, M.G. 2005. Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). Neotropical Ent. 34: 843-847.
- Fuselli, S.R.; Gende, L.B.; García de la Rosa, S.B.; Eguaras, M.J. and Fritz, R. 2005. Inhibition of *Paenibacillus larvae* subsp *larvae* by the essential oils of two wild plants and their emulsifying agents. Span. J. Agric. Res. 3 (2): 220-224.
- Galvis, M. & Soto-Giraldo, A. 2010. Niveles de resistencia de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) al insecticida temephos en el departamento de Caldas. Agron. 18 (1): 7-18. ISSN 0568-3076
- Gerber, E.J., Barnard, D.R. and Ward, R.A., 1994. Manual for mosquito rearing and experimental techniques. Bull. J. Am. Mosq. Control Assoc. 1: 1-98.
- Gil, A. 2000. Variabilidad intraespecífica de la composición química de *Tagetes minuta*, su relación con la competencia y la herbivoría. Tesis para optar al título de Magister en Recursos Naturales de la Universidad de Buenos Aires; pp 147.
- Gil, A.; Ghersa, C.M. and Leicach, S. 2000. Essential oil yield and composition of *Tagetes minuta* accessions from Argentina. Biochem. Syst. Ecol. 28: 261-274.
- Gillij, Y.G.; Gleiser, R.M. and Zygadlo, J.A. 2008. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. Bioresour. Technol. 99: 2507-2515.
- Gleiser, R.M. & Zygadlo, J.A. 2009. Essential oils as potential bioactive compounds against mosquitoes. In: Recent Advances in Phytochemistry, Ed. F. Imperato. Research Signpost. Kerala; pp 53-76.

- Govindarajan, M. 2010. Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausena anisata* (Willd.) Hook. f. ex Benth (Rutaceae) against three mosquito species. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 3 (11), 874-877.
- Green, M.; Singer, J.; Sutherland, D. and Hibben, C. 1991. Larvicidal activity of *Tagetes minuta* toward *Aedes aegypti*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 7 (2): 282-286.
- Gubler, D.J. 2002. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch. Med. Res.* 33: 330-342.
- Halva, S.; Craker, L.E.; Simon, J.E. and Charles, D.J. 1992. Light levels, growth and essential oil in Dill (*Anethum graveolens* L.). *J. Herbs. Spices Med. Plants.* 1(1/2): 47-57.
- Harbach, R. 2014. Mosquito Taxonomic Inventory. http://mosquito-taxonomic-inventory.info/sites/mosquito-taxonomic-inventory.info/files/Valid%20Species%20List_16.pdf
- Hemingway, J. & Ranson, H. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Ann. Rev. Entomol.* 45: 371-391.
- Herrera, J.M.; Zunino, M.P.; Massuh, Y.; Pizzollito, R.P.; Dambolena, J.S.; Gañan, N.A. y J.A. Zygadlo. 2014. Fumigant toxicity of five essential oils rich in ketones against *Sitophilus zeamais* (Motschulsky). *Agriscientia* 31 (1): 35-41.
- Hoet, S.; Stévigny, C.; Hérent, M.F. and Quetin-Leclercq, J. 2006. Antitrypanosomal compounds from leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. *Planta Med.* 72: 480-482.
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S1726-22162004000100009&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Ipek, E.; Zeytinoglu, H.; Okay, S.; Tuylu, B.A.; Kurkcuoglu, M.; Husnu Can Baser, K. 2005. Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chem.* 93: 551-556.
- IRAM-SAIPA N18622. 2003. Norma Argentina. Productos aromatizantes, Aceites esenciales. Aceite de tagetes, tipo argentino (*Tagetes minuta* L.). Segunda edición.
- Isman, M.B. 2002. Insect antifeedants. *Pestic. Outlook* 13: 152-157.
- Jacobson, N.; Redfern, R. and Millis (Jr), G. 1975. Naturally occurring insect growth regulators. II. *Lloydia* 38: 455-472.
- Jaramillo, S.M. & Baena, M. 2000. Material de apoyo a la capacitación en conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. Cali, Colombia.
- Jirakanjanakit, N.; Rongnoparu, T. P.; Saengtharatip, S.; Chareonviriyaphap, T.; Duchon, S.; Bellec, C. and Yoksan, S. 2007. Insecticide susceptible/resistance status in *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* and *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand during 2003-2005. *J. Econ. Entomol.* 100: 545-550.

- Jordano, D. & Ocana, M. 1955. Catálogo del herbario de botánicos cordobeses Rafael de León y Galvez, Fr. José de Jesús Muñoz Capilla, Rafael Entrenas y Antonio Cabrera. *Anales Inst. Bot. Cavanilles* 14: 597-720.
- Juliani, H.R.; Koroch, A.R.; Juliani, H.R.; Trippi, V.S. and Zygadlo, J.A. 2002. Intraspecific variation in leaf oils of *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc. *Biochem. Syst. Ecol.* 30: 163-170.
- 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.
- Kaul, P.N.; Bhattacharya, A.K.; Rajeswara Rao, B.R.; Syamasundar, K.V. and Ramesh, S. 2005. Essential oil composition of *Tagetes minuta* L. fruits. *J. Essent. Oil. Res.* 17 (2): 184-185.
- Keita, S.; Vincent, C.; Schmit, J.; Ramaswamy, S. and Belanger, A. 2000. Effect of various essential oils on *Callosobruchus maculatus* (F) Coleoptera: Bruchidae. *J. Stored Prod. Res.* 36 (4): 355-364.
- Kokkini, S. & Vokou, D. 1989. *Mentha spicata* (Lamiaceae) Chemotypes growing wild in Greece. *Econ. Bot.* 43 (2): 192-202.
- Koroch, A.R.; Zygadlo, J.A. and Juliani, H.R. 2007. Bioactivity of essential oils and their components. In: Berger, R.G. (Ed.), *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany; pp. 87–115.
- Kuiate, J.R.; Bessièrè, J.M.; Vilarem, G. & Amvam Zollo, P.H. 2006. Chemical composition and antidermatophytic properties of the essential oils from leaves, flowers and fruits of *Cupressus lusitanica* Mill. from Cameroon. *Flavour Frag. J.* 21 (4): 693 – 697.
- Laird, S.A. & Pierce, A.R. 2002. Promoting sustainable and ethical botanicals: strategies to improve commercial raw material sourcing: results from the sustainable botanicals pilot project industry surveys, case studies and standards collection. Rainforest Alliance, New York.
- Langenheim, J.H. 1994. Higher plant terpenoids: a phyto-centric overview of their ecological roles. *J. Chem. Ecol.* 20: 1223-1280.
- Larrán, S.; Ringuet, J.A.; Carranza, M.R.; Henning, C.P.; Re, M.S.; Cerimele, E. and Urrutia, M. 2001. In vitro fungistic effect of essential oils against *Ascosphaera apis*. *J. Essent. Oil. Res.* 13 (2): 122-124.
- Lawrence, B. 1995. *Essential Oils 1992-1994*. Ed. Allured Publ. Corp., Illinois; pp 219.
- Letchamo, W.; Marquard, R.; Holzl, J. and Gosselin, A. 1994. Effects of water supply and light intensity on growth and essential oil of two *Tymus vulgaris* selections. *Angew Bot.* 68: 83-88.
- Leung, A. & Foster, S. 1996. *Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics*. John Wiley & Sons. N. York. USA.
- Leyva, M.; Marquetti, M.C.; Tacoronte, J.E.; Scull, R.; Tiomno, O.; Mesa, A. y Montada, D. 2009.

Bibliografía

- Actividad larvicida de aceites esenciales de plantas contra *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). Rev. Biomed. 20: 5-13.
- López, L. 2006. Dinámica de los terpenos de *Tagetes minuta* L. su potencial como agentes alelopáticos en la germinación y crecimiento de especies del área. Tesis para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Córdoba; pp 139.
- Lubbe, A. & Verpoorte, R. 2011. Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. Ind. Crop. Prod. 34: 785-801.
- Lucia, A.; González Audino, P; Seccacini, E.; Licastro, S.; Zerba, E. and Massuh, H. 2007. Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and turpentine and their major components on *Aedes aegypti* larvae. J. Am. Mosq. Control Assoc. 23: 299-303.
- Macedo, M.; Consoli, R.; Grandi, T.; Dos Anjos, M.; De Olivera, A.; Mendes, N.; Queiros, R. and Zani, C. 1997. Screening of Asteraceae plants extracts for larvicidal activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 92 (4): 565-570.
- Macoris, M.L.G.; Andrighetti, M.T.M.; Takaku, L.; Glasser, C.M.; Garbeloto, V.C. and Bracco, J.E. 2003. Resistance of *Aedes aegypti* from the State of São Paulo, Brazil, to Organophosphates Insecticides. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98 (5): 703-708.
- Maestri, D.M.; Zygadlo, J.A.; Grosso, N.R.; Abburra, R.E. y Guzmán, C.A. 1991. Composición del aceite esencial en poblaciones de *Tagetes filifolia* Lag. (Compositae). Anales de Biología (Murcia) 17: 131-134.
- Maradufu, A.; Lubega, R. and Dorn, F. 1978. Isolation of (5E)-ocimene, a mosquito larvicide from *Tagetes minuta*. Llyodia 41 (2): 181-182.
- Mariotti, J.A. 1986. Fundamentos de Genética Biométrica. Aplicaciones al Mejoramiento Genético Vegetal. Monografía N° 32 Serie de Biología. Departamento de Asuntos Científicos y Tecnológicos de la Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Washington D.C.; pp 152.
- Marotti, M.; Piccaglia, R.; Biavati, B. and Marotti, I. 2004. Characterization and yield evaluation of essential oils from different *Tagetes* species. Jor. Essent. Oil Res. 16:440-444.
- 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; pp 248.
- Martínez-Ghersa, M.A.; Ghersa, C.L.; Benech-Arnold, R.L.; Mac Donough, R. and Sanchez, R. 2000. Adaptive traits regulating dormancy and germination of invasive species. Plant Species Biol. 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; pp 54.
- McCaleb, R. 1993. Herb Safety Report. Herb Reserach Foundation. USA.
- Meshkatsadat, M.H.; Safaei-Ghomi, J.; Moharramipour, S. and Nasser, M. 2010. Chemical characterization of volatile components of *Tagetes minuta* L. cultivated in south west of Iran by nano scale injection. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures 5 (1): 101-106.
- Ministerio de Salud de Córdoba. 2009. Reporte Epidemiológico SiVECor; pp 290.
- Morales-Saldaña, J.; Gómez, N.; Rovira, J. y Abrahams, M. 2007. Actividad larvívora de toronja, *Citrus paradisi* (Rutaceae) sobre dos vectores del dengue. Rev. Peru. Biol. 14: 297-299.
- Muñoz, F. 2000. Plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado. Mundi-Prensa; España; pp 336.
- Neher, R.T. 1968. The ethnobotany of *Tagetes*. Econ. Bot. 22: 317-325.
- 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; pp 132.
- Ojeda, M.S. 2008. Inscripción en el Registro Nacional de Cultivares, del cultivar de peperina: CHAMPAQUÍ FCA. Resolución N° 407 de INASE y en el Registro Nacional de Propiedad de Cultivares con resolución N° 9803 de INASE.
- OMS. 1957. Seventh report Expert Committee on insecticides. WHO Tech Report Ser. 125: 37.
- OMS. 1992. Expert Committee on Vector Biology and Control. Vector resistance to pesticides, 818 report, unpublished document. WHO technical report series; pp 63.
- OMS. 2011a. Fiebre amarilla - Nota descriptiva N° 100. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/es/>
- OMS. 2011b. Informe: Estadísticas Sanitarias Mundiales. ISBN 9789243564197.
- OMS. 2012. Dengue y dengue hemorrágico - Nota descriptiva N° 117. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/index.html>
- Ordóñez, A.; Massuh, Y. y Ojeda, M. 2006. Variabilidad fenotípica entre poblaciones de *Tagetes minuta* L. de la Provincia de Córdoba. XXXV Congreso Argentino de Genética. San Luis – Argentina.
- Palacios, S.M; Bertoni, A.; Rossi, Y.; Santander, R. Urzúa, A. 2009. Insecticidal activity of essential oils from native medicinal plants of Central Argentina against the house fly, *Musca domestica* (L.). Parasitol. Res. 106: 207-212.
- Pathak, N.; Mittal, P.K.; Singh, O.P.; Vidya Sagar and Vasudevan, P. 2000. Larvicidal action of essential oils from plants against the vector mosquitoes *Anopheles stephensi* (Liston) *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Aedes aegypti* (L). Int. Pest. Cont. 42: 54-55.
- Pereira Lima, W.; Chiaravalloti Neto, F.; Macoris, M.L.G.; Pires de Campos Zuccari, D.A.; Dibo, M.R. 2009. Estabelecimento de metodologia para alimentação de *Aedes aegypti* (Diptera-

- Culicidae) em camundongos swiss e avaliação da toxicidade e do efeito residual do óleo essencial de *Tagetes minuta* L (Asteraceae) em populações de *Aedes aegypti*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 42 (6): 638-641.
- Perez, D. & Iannacone, J. 2004. Efecto insecticida de sachá yoco (*Paullinea clavigera* var. *bullata* Simpson) y oreja de tigre (*Tradescantia zebrina* Hort ex Bosse) (Commelinaceae) en el control de *Anopheles benarrochi* Gabaldon, Cova García y López, 1941, principal vector de malaria en Ucayali, Perú. Ecol. Apl. [online]. 3 (1-2):64-72. ISSN 1726-2216.
- Petenatti, E.M. & Ariza Espinar, L. 1997. Tribu VI. Helenieae. En A. T. Hunziker (Ed), Flora Fanerogámica Argentina 45: 3-35.
- Poupardin, R.; Reynaud, S.; Strode, C.; Ranson, H.; Vontas, J.; David, J.P. 2008. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: impact on larval tolerance to chemical insecticides. Insect. Biochem. Mol. Biol. 38: 540-551.
- R Development Core Team. 2011. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. URL <http://www.R-project.org>
- Ranson, H.; Burhani, J.; Lumjuan, N. and Blanck, I.V.W.C. 2009. Insecticide resistance in dengue vectors. TropIKA Reviews 1-9.
- Ravi Kiran, S.; Bhavani, K.; Sita Devi, P., Rajeswara Rao, B.R. and Janardhan Reddy, K. 2006. Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. Biores. Technol. 99: 3251-3255.
- Regnault-Roger, C.; Vincent, C. and Arnason, J.T. 2012. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. Annu. Rev. Entomol. 57: 405-424.
- Ríos, J.; Recio, M. and Villar, A. 1987. Antimicrobial activity of selected plants employed in the Spanish Mediterranean area. J. Ethnopharmacol. 21 (2), 139-152.
- Rodríguez-Vivas, R.I.; Alonso-Díaz, M.A.; Rodríguez-Arévalo, F.; Fragoso-Sánchez, H.; Santamaría, V.M. and Rosario-Cruz, R. 2005. Prevalence and potential risk factors for organophosphates and pyrethroids resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. Vet. Parasitol, 136: 335-342.
- Ruffinengo, S.; Maggi, M.; Faverin, C.; García de la Rosa, S.B.; Bailac, P.; Principal, J. and Eguaras, M. 2007. Essential oils toxicity related to *Varroa destructor* and *Apis mellifera* under laboratory conditions. Zootec. Trop. 25: 63-69.
- Salamon, I.; Ghanavati, M. and Khzaei, H. 2010. Chamomile biodiversity and essential oil qualitative-quantitative characteristics in Egyptian production and Iranian landraces. Emir. J. Food Agric. 22 (1): 59-64.

- Sangwan, N.S.; Farooqi, A.H.A.; Shabih, F. and Sangwan, R.S. 2001. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation* 34 (1): 3-21.
- Santana-Rios, G.; Orner, G.A.; Amantana, A.; Provost, C.; Wu, S.Y. and Dashwood, R.H. 2001. Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the *Salmonella* assay. *Mutat. Res.* 495: 61-74.
- Santos, G.K.N.; Dutra, K.A.; Barros, R.A.; da Camara, C.A.G.; Lira, D.D.; Gusmao, N.B. and Navarro, D.M.A.F. 2012. Essential oils from *Alpinia purpurata* (Zingibaceae): Chemical composition, oviposition deterrence, larvicidal and antibacterial activity. *Ind. Crop. Prod.* 40: 254-260.
- Schippmann, U.; Leaman, D. and Cunningham, A.B. 2006. A comparison of cultivation and wild collection of medicinal and aromatic plants under sustainability aspects. En R.J. Bogers, L.E. Craker and D. Lange (Eds.). *Medicinal and Aromatic Plants*. Springer, the Netherlands; pp 75-95.
- Seeley, T.D. 1985. *Honeybee ecology: a study of adaptation in social life*. Princeton University Press., Princeton, NJ, ISBN 0-691-08391-6; pp 201.
- Serrato Cruz, M.A.; Juárez, O.G. y Gonzáles Hernandez, V.A. 1998. Análisis de crecimiento y evolutivo bajo domesticación en dos especies de cempoalxóchitl (*Tagetes erecta* y *Tagetes patula*). *Revista Chapingo Serie Horticultura* Vol. IV Núm. 2.
- Serrato Cruz, M.A. 2002. Efectos del ambiente de domesticación en dos especies silvestres del género *Tagetes* en México. *PGR Newsletter FAO Bioersity* 142: 21-28.
- Serrato Cruz, M.A. 2009. Información documental sobre el taxa *Tagetes* para dimensionar su centro de origen y diversidad genética en México. Área Metodología de Investigación - Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo; pp 22.
- Shaaban, H.A.E.; El-Ghorab, A.H. and Shibamoto, T. 2012. Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. *J. Essent. Oil. Res.* 24 (2): 203-212.
- Silva, W.J.; Dória, G.A.A.; Maia, R.T.; Nunes, R.S.; Carvalho, G.A.; Blank, A.F., Alves, P.B.; Marcal, R.M. and Cavalcanti, S.C.H. 2008. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. *Biores. Technol.* 99: 3251-3255.
- Singh, B.; Joshi, V.P.; Ram, Raja; Sharma, A. and Zaidi, A.A. 2002. Use of *Tagetes minuta* oil and its components as antiviral agents. United State patent N° US 6.444.458 B1.
- Singh, V.; Singh, B. and Kaul, V.K. 2003. Domestication of wild marigold (*Tagetes minuta* L.) as a potential economic crop in Western Himalaya and North Indian plains. *Econ. Bot.* 57 (4): 535-544.
- Soria, A.C.; Esteban, J.; Morales, R.; Martín-Álvarez, P.J. and Sanz, J. 2008. Validación estadística de la presencia en plantas de quimiotipos caracterizados por la concentración de componentes volátiles obtenida mediante GC-MS. *Botanica Complutensis* 32: 225-236.

- SPSS Statistics 17.0. 2008. SPSS Inc., 233 South Wacker Drive, 11th Floor, Chicago, IL 60606-6412, EE.UU.
- Stojanova, A.; Primova, T. and Anastassov, C. 2000. Effect of mineral fertilization on the essential oil composition of *Tagetes patula* L. from Bulgaria. J. Essent. Oil Res. 12: 609-612.
- Tavares, E.S.; Julião, L.S.; Lopes, D.; Bizzo, H.R.; Lage, C.L.S.; Leitão, S.G. 2005. Analysis of the essential oil from leaves of three *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) chemotypes cultivated on the same conditions. Revista Brasileira de Farmacognosia 15:1-5.
- Ten Kate, K. & Laird, S. 1999. The commercial use of biodiversity: Access to genetic resources and benefit-sharing. Commission of the European Communities and Earthscan Publications Ltd. London.
- Tereschuk, M.; Vázquez, A.; Pezaroglo, H.; Baigori, M. y Abdala, L. 2002. Determinación estructural de un flavonol con actividad antibacteriana aislado de especies de *Tagetes* del noroeste argentino. 1er Congreso Latinoamericano de Fitoquímica. Abstract. Buenos Aires, Argentina.
- Thappa, R.K. & Agarwal, S.G. 1993. Changes in chemical composition of *Tagetes minuta* oil at various stages of flowering and fruiting. J. Essent. Oil Res. 5: 375-379.
- Thompson, J.D.; Gauthier, P.; Amiot, J.; Ehlers, B.K.; Collin, C.; Fossat, J.; Barrios, V.; Ois Arnaud-Miramont, F.; Keefover-Ring, K. and Linhart, Y.B. 2007. Ongoing adaptation to mediterranean climate extremes in a chemically polymorphic plant. Ecol. Monograph. 77 (3): 421-439.
- Tolozza, A.C.; Zygadlo, J.; Mougabure Cueto, G.; Biurrun, F.; Zerba, E. and Picollo, M.I. 2006. Fumigant and repellent properties of essential oils and component compounds against permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis*. Anoplura: Pediculidae, from Argentina. J. Med. Entomol. 43: 889-895.
- Torres, C. y Galetto, L. 2008. Importancia de los polinizadores en la reproducción de Asteraceae de Argentina central. Acta Botánica Venezolana 31 (2): 473-494.
- Torres, L.E. 2011. Caracterización y evaluación de genotipos de orégano cultivados en las principales zonas de producción de Argentina. Tesis para optar al título de Doctora en Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba; pp 123.
- Trongtokit, Y.; Rongsriyam, Y.; Komalamisra, N. and Apiwathnasorn, C. 2005. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. Phytotherapy Res. 19: 303-309.
- Tunc, I.; Berger, B.M.; Erler, F. and Dag'li, F. 2000. Ovicidal activity of essential oils from five plants against two stored-product insects. J. Stored Prod. Res. 36: 161-168.
- Vázquez, A.M.; Demmel, G.I.; Criado, S.G.; Aimar, M.L.; Cantero, J.J.; Rossi, L.I. and Velasco, M.I. 2011. Phytochemistry of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) from Córdoba, Argentina: Comparative study between essential oil and HS-SPME analyses. BLACPMA 10 (4): 351-362.

- Villamil, J. 2010. Capítulo 5: El modelo *Lippia alba*. En Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la flora aromática latinoamericana: proyecto CYTED IV.20, Dellacassa E. (organizador). Editor EDIPUCRS – Porto Alegre. ISBN 8539700549, 9788539700547; pp 334.
- Vines, G. 2004. Herbal harvests with a future: towards sustainable sources for medicinal plants, Plantlife International; www.plantlife.org.uk
- Visintin, A.M & Bernardello, G. 2005. Morfología y anatomía floral de *Tagetes minuta* L. (Asteraceae). *Arnaldoa* 12 (1-2): 8-15.
- Wang, C-M., Chen, C-H. 2006. *Tagetes minuta* L. (Asteraceae), a newly naturalized plant in Taiwan. *Taiwania* 51(1): 32-35.
- Wanzala, W. 2009. Ethnobotanicals for management of the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus* in western Kenya. Tesis Doctoral. ISBN 978-90-8585-317-6.
- Weiss, E.A. 1997. Essential Oil Crops. CAB International, Oxford; pp. 24–58.
- Zygodlo, J.A.; Grosso, N.R.; Aburra, R.E. and Guzmán, C.A. 1990. Essential Oil Variation in *Tagetes minuta* Populations. *Biochem. Syst. Ecol.* 18 (6): 405-407.
- Zygodlo, J.A.; Aburra, R.E.; Maestri, D.M.; Guzmán, C.A.; Grosso, N.R. and Ariza Espinar, L. 1993a. Essential oil composition of *Tagetes triflora* H. B. K. and *Tagetes laxa* Cabrera. *Flavour Fragr. J.* 8: 273-375.
- Zygodlo, J.A.; Lamarque, A.L.; Maestri, D.M.; Guzmán, C.A. and Grosso, N.R. 1993b. Composition of the inflorescence oils of some *Tagetes* species from Argentina. *J. Essent. Oil Res.* 5: 679-681.
- Zygodlo, J.A.; Maestri, D.M. and Ariza Espinar, L. 1993c. The volatile oil of *Tagetes argentina* Cabrera. *J. Essent. Oil Res.* 5: 85-86.
- Zygodlo, J.A. 2011. Capítulo 1: Los aceites esenciales. Aspectos básicos de su química y biosíntesis. Composición de los aceites esenciales de plantas aromáticas argentinas. En *Aceites esenciales. Química, ecología, comercio, producción y salud*. Editorial Universitas. Córdoba, Argentina. ISBN: 978-987-1457-63-2; pp 192.

APÉNDICE I

Tablas de caracteres cuantitativos por familia en cada ciclo de cultivo

Familia 1				
Variable	Medidas	Valores por Ciclo de Cultivo		
		1°	2°	3°
ALTURA FINAL (cm)	Media	161,00	134,83	136,25
	E.E.	0,00	4,83	3,36
	Mín	161,00	93,00	108,00
	Máx	161,00	171,00	166,00
CRECIMIENTO (cm)	Media	111,00	112,72	109,00
	E.E.	0,00	4,78	3,34
	Mín	111,00	71,00	78,00
	Máx	111,00	146,00	135,00
PFPCs/EP (g)	Media	196,00	316,33	287,73
	E.E.	0,00	34,89	20,09
	Mín	196,00	114,50	142,38
	Máx	196,00	651,50	536,88
PFEP (g)	Media	49,50	55,39	2,73
	E.E.	0,00	5,30	1,49
	Mín	49,50	15,00	0,00
	Máx	49,50	96,00	19,50
PFPC (g)	Media	245,50	371,72	290,46
	E.E.	0,00	38,22	21,11
	Mín	245,50	131,00	142,38
	Máx	245,50	721,50	556,38
PSPCs/EP (g)	Media	74,50	101,81	124,76
	E.E.	0,00	9,67	8,36
	Mín	74,50	39,00	61,38
	Máx	74,50	176,50	232,38
PSEP (g)	Media	19,00	18,86	1,43
	E.E.	0,00	1,77	0,78
	Mín	19,00	4,50	0,00
	Máx	19,00	33,00	10,00
PSPC (g)	Media	93,50	115,14	126,18
	E.E.	0,00	9,87	8,91
	Mín	93,50	49,00	61,38
	Máx	93,50	194,00	242,38
% EP/PLANTA	Media	20,16	15,63	0,64
	E.E.	0,00	1,16	0,35
	Mín	20,16	7,80	0,00
	Máx	20,16	22,27	4,89
% de H2O/PLANTA	Media	61,91	67,47	56,35
	E.E.	0,00	1,39	0,67
	Mín	61,91	61,68	51,69
	Máx	61,91	86,69	60,62
N° de RAMAS	Media	28,00	17,89	15,70
	E.E.	0,00	1,15	0,53
	Mín	28,00	7,00	11,00
	Máx	28,00	25,00	19,00

Familia 2				
Variable	Medidas	Valores por Ciclo de Cultivo		
		1°	2°	3°
ALTURA FINAL (cm)	Media	148,00	165,88	163,94
	E.E.	0,00	6,48	3,59
	Mín	148,00	141,00	128,00
	Máx	148,00	197,00	186,00
CRECIMIENTO (cm)	Media	130,00	139,88	129,44
	E.E.	0,00	5,78	3,17
	Mín	130,00	117,00	105,00
	Máx	130,00	158,00	159,00
PFPCs/EP (g)	Media	276,00	345,44	517,44
	E.E.	0,00	39,44	30,62
	Mín	276,00	166,50	211,88
	Máx	276,00	483,00	724,38
PFEP (g)	Media	143,50	80,19	16,60
	E.E.	0,00	11,16	3,61
	Mín	143,50	34,50	0,00
	Máx	143,50	133,50	39,00
PFPC (g)	Media	419,50	425,63	534,04
	E.E.	0,00	49,49	31,80
	Mín	419,50	226,00	211,88
	Máx	419,50	616,50	741,38
PSPCs/EP (g)	Media	111,50	122,31	199,47
	E.E.	0,00	15,78	8,37
	Mín	111,50	59,00	148,88
	Máx	111,50	191,00	268,88
PSEP (g)	Media	58,00	26,44	7,94
	E.E.	0,00	4,30	1,74
	Mín	58,00	10,00	0,00
	Máx	58,00	48,00	18,00
PSPC (g)	Media	169,50	148,75	207,41
	E.E.	0,00	19,90	8,60
	Mín	169,50	69,00	156,88
	Máx	169,50	239,00	277,38
% EP/PLANTA	Media	34,21	18,84	2,96
	E.E.	0,00	1,35	0,65
	Mín	34,21	14,47	0,00
	Máx	34,21	26,33	6,47
% de H2O/PLANTA	Media	59,59	65,53	58,97
	E.E.	0,00	0,97	3,44
	Mín	59,59	61,23	9,20
	Máx	59,59	71,07	70,31
N° de RAMAS	Media	28,00	21,25	21,94
	E.E.	0,00	2,70	0,70
	Mín	28,00	6,00	15,00
	Máx	28,00	32,00	26,00

Familia 3				
Variable	Medidas	Valores por Ciclo de Cultivo		
		1°	2°	3°
ALTURA FINAL (cm)	Media	148,00	169,00	145,74
	E.E.	0,00	5,44	7,06
	Mín	148,00	148,00	54,00
	Máx	148,00	197,00	192,00
CRECIMIENTO (cm)	Media	130,00	141,75	116,26
	E.E.	0,00	5,08	6,57
	Mín	130,00	117,00	24,00
	Máx	130,00	158,00	154,00
PFPCs/EP (g)	Media	276,00	369,19	362,77
	E.E.	0,00	34,05	31,45
	Mín	276,00	166,50	20,88
	Máx	276,00	483,00	577,38
PFEP (g)	Media	143,50	84,06	9,84
	E.E.	0,00	9,43	3,00
	Mín	143,50	59,50	0,00
	Máx	143,50	133,50	36,50
PFPC (g)	Media	419,50	453,25	372,62
	E.E.	0,00	41,66	33,21
	Mín	419,50	226,00	20,88
	Máx	419,50	616,50	577,38
PSPCs/EP (g)	Media	111,50	129,88	142,35
	E.E.	0,00	13,02	10,62
	Mín	111,50	64,00	7,38
	Máx	111,50	191,00	230,88
PSEP (g)	Media	58,00	27,69	4,50
	E.E.	0,00	3,77	1,41
	Mín	58,00	17,50	0,00
	Máx	58,00	48,00	18,50
PSPC (g)	Media	169,50	157,56	146,85
	E.E.	0,00	16,52	11,38
	Mín	169,50	81,50	7,38
	Máx	169,50	239,00	244,38
% EP/PLANTA	Media	34,21	18,82	2,06
	E.E.	0,00	1,37	0,62
	Mín	34,21	14,25	0,00
	Máx	34,21	26,33	6,34
% de H2O/PLANTA	Media	59,59	65,35	59,47
	E.E.	0,00	0,83	1,48
	Mín	59,59	61,23	49,72
	Máx	59,59	69,64	74,21
N° de RAMAS	Media	28,00	21,75	16,26
	E.E.	0,00	2,31	0,95
	Mín	28,00	10,00	6,00
	Máx	28,00	32,00	21,00

Familia 4				
Variable	Medidas	Valores por Ciclo de Cultivo		
		1°	2°	3°
ALTURA FINAL (cm)	Media	150,00	145,00	128,69
	E.E.	0,00	0,00	4,87
	Mín	150,00	145,00	90,00
	Máx	150,00	145,00	163,00
CRECIMIENTO (cm)	Media	104,00	87,00	112,31
	E.E.	0,00	0,00	5,01
	Mín	104,00	87,00	68,00
	Máx	104,00	87,00	142,00
PFPCs/EP (g)	Media	132,00	368,50	156,72
	E.E.	0,00	0,00	16,20
	Mín	132,00	368,50	60,88
	Máx	132,00	368,50	269,38
PFEP (g)	Media	66,00	133,50	4,31
	E.E.	0,00	0,00	1,71
	Mín	66,00	133,50	0,00
	Máx	66,00	133,50	16,50
PFPC (g)	Media	300,00	502,00	161,04
	E.E.	0,00	0,00	17,54
	Mín	300,00	502,00	60,88
	Máx	300,00	502,00	282,88
PSPCs/EP (g)	Media	128,00	111,50	64,94
	E.E.	0,00	0,00	6,25
	Mín	128,00	111,50	21,38
	Máx	128,00	111,50	101,38
PSEP (g)	Media	64,00	40,50	2,16
	E.E.	0,00	0,00	0,85
	Mín	64,00	40,50	0,00
	Máx	64,00	40,50	8,00
PSPC (g)	Media	192,00	152,00	67,10
	E.E.	0,00	0,00	6,92
	Mín	192,00	152,00	21,38
	Máx	192,00	152,00	107,88
% EP/PLANTA	Media	33,33	26,59	1,81
	E.E.	0,00	0,00	0,71
	Mín	33,33	26,59	0,00
	Máx	33,33	26,59	7,25
% de H2O/PLANTA	Media	36,00	69,72	57,91
	E.E.	0,00	0,00	1,19
	Mín	36,00	69,72	52,17
	Máx	36,00	69,72	64,88
N° de RAMAS	Media	14,00	18,00	11,88
	E.E.	0,00	0,00	1,34
	Mín	14,00	18,00	5,00
	Máx	14,00	18,00	27,00

Familia 5				
Variable	Medidas	Valores por Ciclo de Cultivo		
		1°	2°	3°
ALTURA FINAL (cm)	Media	122,00	145,74	133,67
	E.E.	0,00	5,25	3,61
	Mín	122,00	109,00	108,00
	Máx	122,00	186,00	161,00
CRECIMIENTO (cm)	Media	79,00	126,00	120,67
	E.E.	0,00	4,90	3,25
	Mín	79,00	88,00	96,00
	Máx	79,00	165,00	145,00
PFPCs/EP (g)	Media	140,00	280,26	186,17
	E.E.	0,00	18,48	14,99
	Mín	140,00	140,50	67,88
	Máx	140,00	413,50	298,38
PFEP (g)	Media	54,00	58,76	0,52
	E.E.	0,00	4,41	0,52
	Mín	54,00	30,00	0,00
	Máx	54,00	88,00	11,00
PFPC (g)	Media	194,00	339,03	186,69
	E.E.	0,00	20,93	15,19
	Mín	194,00	170,50	67,88
	Máx	194,00	485,50	309,38
PSPCs/EP (g)	Media	64,50	97,05	77,43
	E.E.	0,00	6,57	6,05
	Mín	64,50	46,00	31,88
	Máx	64,50	143,00	125,88
PSEP (g)	Media	25,00	17,76	0,26
	E.E.	0,00	1,55	0,26
	Mín	25,00	8,00	0,00
	Máx	25,00	28,50	5,50
PSPC (g)	Media	89,50	114,82	77,69
	E.E.	0,00	7,73	6,13
	Mín	89,50	55,00	31,88
	Máx	89,50	166,00	125,88
%EP/PLANTA	Media	27,84	17,58	0,17
	E.E.	0,00	1,04	0,17
	Mín	27,84	10,42	0,00
	Máx	27,84	26,85	3,56
% de H2O/PLANTA	Media	53,87	66,24	57,95
	E.E.	0,00	0,67	0,76
	Mín	53,87	62,37	51,73
	Máx	53,87	71,85	64,54
N° de RAMAS	Media	14,00	22,16	12,71
	E.E.	0,00	1,17	1,17
	Mín	14,00	14,00	4,00
	Máx	14,00	33,00	23,00

Familia 6				
Variable	Medidas	Valores por Ciclo de Cultivo		
		1°	2°	3°
ALTURA FINAL (cm)	Media	181,00	155,88	149,29
	E.E.	0,00	9,11	8,92
	Mín	181,00	119,00	74,00
	Máx	181,00	195,00	187,00
CRECIMIENTO (cm)	Media	133,00	143,88	121,07
	E.E.	0,00	10,47	8,26
	Mín	133,00	92,00	38,00
	Máx	133,00	184,00	156,00
PFPCs/EP (g)	Media	209,00	257,75	364,09
	E.E.	0,00	38,43	58,75
	Mín	209,00	104,00	17,38
	Máx	209,00	383,50	782,88
PFEP (g)	Media	104,50	80,25	14,75
	E.E.	0,00	13,90	6,28
	Mín	104,50	0,00	0,00
	Máx	104,50	118,00	74,50
PFPC (g)	Media	313,50	338,00	378,84
	E.E.	0,00	43,06	62,59
	Mín	313,50	158,50	17,38
	Máx	313,50	497,00	782,88
PSPCs/EP (g)	Media	112,00	99,75	140,81
	E.E.	0,00	14,29	22,51
	Mín	112,00	43,00	6,88
	Máx	112,00	154,00	284,88
PSEP (g)	Media	56,00	24,63	8,07
	E.E.	0,00	4,39	3,39
	Mín	56,00	0,00	0,00
	Máx	56,00	37,50	38,00
PSPC (g)	Media	168,00	124,38	148,88
	E.E.	0,00	16,88	24,81
	Mín	168,00	58,50	6,88
	Máx	168,00	191,50	284,88
% EP/PLANTA	Media	33,33	25,20	2,48
	E.E.	0,00	4,08	1,01
	Mín	33,33	0,00	0,00
	Máx	33,33	36,09	10,78
% de H2O/PLANTA	Media	46,41	63,22	60,65
	E.E.	0,00	1,17	1,02
	Mín	46,41	58,51	55,31
	Máx	46,41	68,44	67,42
N° de RAMAS	Media	21,00	11,38	11,71
	E.E.	0,00	2,23	1,69
	Mín	21,00	2,00	2,00
	Máx	21,00	19,00	18,00

Familia 7				
Variable	Medidas	Valores por Ciclo de Cultivo		
		1°	2°	3°
ALTURA FINAL (cm)	Media	176,00	186,75	159,83
	E.E.	0,00	6,18	4,81
	Mín	176,00	140,00	99,00
	Máx	176,00	230,00	195,00
CRECIMIENTO (cm)	Media	115,00	126,25	120,28
	E.E.	0,00	6,84	4,67
	Mín	115,00	79,00	59,00
	Máx	115,00	179,00	151,00
PFPCs/EP (g)	Media	584,00	344,97	357,69
	E.E.	0,00	41,86	29,05
	Mín	584,00	120,00	214,88
	Máx	584,00	608,50	636,38
PFEP (g)	Media	190,00	169,72	23,47
	E.E.	0,00	35,08	1,81
	Mín	190,00	35,50	13,00
	Máx	190,00	608,50	38,50
PFPC (g)	Media	774,00	514,69	381,16
	E.E.	0,00	72,45	30,64
	Mín	774,00	159,50	228,88
	Máx	774,00	1217,00	674,88
PSPCs/EP (g)	Media	254,50	157,00	146,07
	E.E.	0,00	14,32	9,86
	Mín	254,50	67,00	95,38
	Máx	254,50	272,00	254,88
PSEP (g)	Media	83,00	62,25	12,58
	E.E.	0,00	11,56	0,99
	Mín	83,00	17,00	7,00
	Máx	83,00	210,00	21,50
PSPC (g)	Media	337,50	219,25	158,66
	E.E.	0,00	23,21	10,75
	Mín	337,50	84,00	104,38
	Máx	337,50	420,00	276,38
% EP/PLANTA	Media	24,55	30,71	6,23
	E.E.	0,00	2,23	0,23
	Mín	24,55	15,94	4,93
	Máx	24,55	50,00	8,18
% de H2O/PLANTA	Media	56,40	52,74	57,63
	E.E.	0,00	3,64	0,72
	Mín	56,40	4,40	52,91
	Máx	56,40	66,87	63,61
N° de RAMAS	Media	22,00	9,25	15,61
	E.E.	0,00	0,75	0,90
	Mín	22,00	5,00	6,00
	Máx	22,00	14,00	21,00

Familia 8				
Variable	Medidas	Valores por Ciclo de Cultivo		
		1°	2°	3°
ALTURA FINAL (cm)	Media	145,00	163,92	169,70
	E.E.	0,00	8,83	2,99
	Mín	145,00	105,00	135,00
	Máx	145,00	218,00	191,00
CRECIMIENTO (cm)	Media	129,00	140,75	132,15
	E.E.	0,00	7,97	2,87
	Mín	129,00	87,00	114,00
	Máx	129,00	187,00	158,00
PFPCs/EP (g)	Media	246,00	361,46	460,11
	E.E.	0,00	54,38	35,33
	Mín	246,00	141,50	131,38
	Máx	246,00	638,50	829,88
PFEP (g)	Media	83,50	82,17	24,05
	E.E.	0,00	19,15	3,75
	Mín	83,50	0,00	0,00
	Máx	83,50	247,00	69,50
PFPC (g)	Media	329,50	443,63	484,16
	E.E.	0,00	66,81	37,76
	Mín	329,50	141,50	131,38
	Máx	329,50	874,50	899,38
PSPCs/EP (g)	Media	97,00	128,79	185,01
	E.E.	0,00	17,21	13,79
	Mín	97,00	36,50	46,88
	Máx	97,00	201,50	341,38
PSEP (g)	Media	33,00	26,29	12,20
	E.E.	0,00	6,24	1,90
	Mín	33,00	0,00	0,00
	Máx	33,00	76,00	35,50
PSPC (g)	Media	130,00	155,08	197,21
	E.E.	0,00	21,62	15,11
	Mín	130,00	36,50	46,88
	Máx	130,00	269,00	376,88
% EP/PLANTA	Media	25,34	17,21	4,75
	E.E.	0,00	3,19	0,61
	Mín	25,34	0,00	0,00
	Máx	25,34	28,24	9,76
% de H2O/PLANTA	Media	60,55	64,73	58,89
	E.E.	0,00	2,17	1,56
	Mín	60,55	49,67	31,85
	Máx	60,55	74,20	66,01
N° de RAMAS	Media	25,00	16,67	17,80
	E.E.	0,00	1,38	0,52
	Mín	25,00	10,00	14,00
	Máx	25,00	23,00	22,00

Familia 9				
Variable	Medidas	Valores por Ciclo de Cultivo		
		1°	2°	3°
ALTURA FINAL (cm)	Media	145,00	160,58	168,39
	E.E.	0,00	7,51	4,34
	Mín	145,00	105,00	135,00
	Máx	145,00	202,00	211,00
CRECIMIENTO (cm)	Media	129,00	138,25	124,22
	E.E.	0,00	6,99	4,31
	Mín	129,00	87,00	85,00
	Máx	129,00	176,00	164,00
PFPCs/EP (g)	Media	246,00	344,88	420,30
	E.E.	0,00	49,29	48,35
	Mín	246,00	141,50	158,38
	Máx	246,00	638,50	893,88
PFEP (g)	Media	83,50	74,75	26,92
	E.E.	0,00	14,13	6,47
	Mín	83,50	0,00	0,00
	Máx	83,50	158,00	85,00
PFPC (g)	Media	329,50	419,63	447,21
	E.E.	0,00	56,21	53,18
	Mín	329,50	141,50	158,38
	Máx	329,50	687,50	973,88
PSPCs/EP (g)	Media	97,00	123,21	168,91
	E.E.	0,00	16,19	16,67
	Mín	97,00	36,50	53,88
	Máx	97,00	201,50	336,38
PSEP (g)	Media	33,00	23,83	14,67
	E.E.	0,00	4,78	3,56
	Mín	33,00	0,00	0,00
	Máx	33,00	49,50	46,50
PSPC (g)	Media	130,00	147,04	183,57
	E.E.	0,00	19,12	19,40
	Mín	130,00	36,50	53,88
	Máx	130,00	251,00	382,88
% EP/PLANTA	Media	25,34	17,10	4,93
	E.E.	0,00	3,16	1,13
	Mín	25,34	0,00	0,00
	Máx	25,34	27,53	13,72
% de H2O/PLANTA	Media	60,55	64,85	58,00
	E.E.	0,00	2,19	0,99
	Mín	60,55	49,67	50,03
	Máx	60,55	74,20	65,98
N° de RAMAS	Media	25,00	16,17	14,17
	E.E.	0,00	1,25	1,25
	Mín	25,00	10,00	7,00
	Máx	25,00	23,00	22,00

Familia 10				
Variable	Medidas	Valores por Ciclo de Cultivo		
		1°	2°	3°
ALTURA FINAL (cm)	Media	161,00	168,33	134,56
	E.E.	0,00	17,33	5,82
	Mín	161,00	139,00	85,00
	Máx	161,00	199,00	175,00
CRECIMIENTO (cm)	Media	120,00	132,33	114,22
	E.E.	0,00	9,26	5,58
	Mín	120,00	117,00	73,00
	Máx	120,00	149,00	148,00
PFPCs/EP (g)	Media	299,00	444,50	232,91
	E.E.	0,00	46,52	25,43
	Mín	299,00	366,00	63,38
	Máx	299,00	527,00	460,38
PFEP (g)	Media	0,00	114,17	0,00
	E.E.	0,00	15,11	0,00
	Mín	0,00	84,50	0,00
	Máx	0,00	134,00	0,00
PFPC (g)	Media	299,00	558,67	232,91
	E.E.	0,00	52,15	25,43
	Mín	299,00	490,00	63,38
	Máx	299,00	661,00	460,38
PSPCs/EP (g)	Media	78,00	149,17	89,21
	E.E.	0,00	15,40	9,12
	Mín	78,00	118,50	30,38
	Máx	78,00	167,00	168,38
PSEP (g)	Media	0,00	31,83	0,00
	E.E.	0,00	6,21	0,00
	Mín	0,00	21,00	0,00
	Máx	0,00	42,50	0,00
PSPC (g)	Media	78,00	181,00	89,21
	E.E.	0,00	17,06	9,12
	Mín	78,00	150,50	30,38
	Máx	78,00	209,50	168,38
% EP/PLANTA	Media	0,00	20,56	0,00
	E.E.	0,00	2,66	0,00
	Mín	0,00	16,10	0,00
	Máx	0,00	25,31	0,00
% de H2O/PLANTA	Media	73,91	67,58	60,68
	E.E.	0,00	1,25	1,00
	Mín	73,91	65,14	52,07
	Máx	73,91	69,29	65,84
N° de RAMAS	Media	28,00	26,67	15,44
	E.E.	0,00	3,48	1,28
	Mín	28,00	21,00	5,00
	Máx	28,00	33,00	27,00

Familia 11				
Variable	Medidas	Valores por Ciclo de Cultivo		
		1°	2°	3°
ALTURA FINAL (cm)	Media	191,00	156,73	150,50
	E.E.	0,00	5,40	5,19
	Mín	191,00	115,00	120,00
	Máx	191,00	196,00	184,00
CRECIMIENTO (cm)	Media	146,00	127,73	177,22
	E.E.	0,00	4,78	62,49
	Mín	146,00	93,00	81,00
	Máx	146,00	155,00	1237,00
PFPCs/EP (g)	Media	327,00	408,40	468,71
	E.E.	0,00	27,87	44,33
	Mín	327,00	255,00	150,88
	Máx	327,00	574,00	930,88
PFEP (g)	Media	77,00	55,13	17,22
	E.E.	0,00	12,09	3,26
	Mín	77,00	0,00	0,00
	Máx	77,00	151,00	48,50
PFPC (g)	Media	404,00	463,53	485,94
	E.E.	0,00	35,19	45,95
	Mín	404,00	270,50	150,88
	Máx	404,00	708,00	979,38
PSPCs/EP (g)	Media	114,50	136,63	172,16
	E.E.	0,00	10,57	16,33
	Mín	114,50	66,00	49,88
	Máx	114,50	235,00	323,88
PSEP (g)	Media	27,00	16,70	7,64
	E.E.	0,00	3,83	1,50
	Mín	27,00	0,00	0,00
	Máx	27,00	45,00	24,00
PSPC (g)	Media	141,50	153,33	179,80
	E.E.	0,00	13,67	16,85
	Mín	141,50	66,00	49,88
	Máx	141,50	279,00	347,88
% EP/PLANTA	Media	19,06	11,04	3,54
	E.E.	0,00	1,88	0,56
	Mín	19,06	0,00	0,00
	Máx	19,06	21,33	6,37
% de H2O/PLANTA	Media	64,98	67,09	62,89
	E.E.	0,00	1,13	1,03
	Mín	64,98	60,48	55,85
	Máx	64,98	75,60	70,57
N° de RAMAS	Media	28,00	21,73	20,00
	E.E.	0,00	1,91	0,79
	Mín	28,00	12,00	14,00
	Máx	28,00	32,00	27,00

Familia 12				
Variable	Medidas	Valores por Ciclo de Cultivo		
		1°	2°	3°
ALTURA FINAL (cm)	Media	124,00	147,13	81,20
	E.E.	0,00	5,43	9,56
	Mín	124,00	107,00	40,00
	Máx	124,00	181,00	135,00
CRECIMIENTO (cm)	Media	78,00	94,19	68,90
	E.E.	0,00	3,94	7,93
	Mín	78,00	73,00	33,00
	Máx	78,00	125,00	106,00
PFPCs/EP (g)	Media	118,00	161,16	109,58
	E.E.	0,00	23,16	26,89
	Mín	118,00	64,00	26,38
	Máx	118,00	402,50	311,38
PFEP (g)	Media	41,00	79,41	0,00
	E.E.	0,00	9,22	0,00
	Mín	41,00	30,00	0,00
	Máx	41,00	151,00	0,00
PFPC (g)	Media	159,00	240,56	109,58
	E.E.	0,00	30,11	26,89
	Mín	159,00	120,50	26,38
	Máx	159,00	507,50	311,38
PSPCs/EP (g)	Media	77,00	64,25	38,58
	E.E.	0,00	7,76	9,15
	Mín	77,00	33,50	9,88
	Máx	77,00	131,00	103,88
PSEP (g)	Media	27,00	33,84	0,00
	E.E.	0,00	4,24	0,00
	Mín	27,00	10,00	0,00
	Máx	27,00	61,50	0,00
PSPC (g)	Media	104,00	98,09	38,58
	E.E.	0,00	10,93	9,15
	Mín	104,00	44,50	9,88
	Máx	104,00	192,50	103,88
% EP/PLANTA	Media	25,79	34,07	0,00
	E.E.	0,00	2,50	0,00
	Mín	25,79	20,69	0,00
	Máx	25,79	53,96	0,00
% de H2O/PLANTA	Media	34,59	57,91	64,57
	E.E.	0,00	2,37	1,01
	Mín	34,59	37,05	57,73
	Máx	34,59	68,90	67,70
N° de RAMAS	Media	17,00	19,38	7,60
	E.E.	0,00	1,63	2,43
	Mín	17,00	11,00	2,00
	Máx	17,00	33,00	25,00

APÉNDICE II

**Tablas de caracteres cualitativos por
familia en cada ciclo de cultivo**

Familia 1			
Variable	Presencia por Ciclo de Cultivo (%)		
	1°*	2°	3°
ESTRUCTURA SELECTA	100,00	77,78	4,76
PRESENCIA DE EJE PRINCIPAL	100,00	100,00	100,00
FLORACIÓN PRECOZ	0,00	0,00	66,67
PREVALENCIA DE BOT. FLOR. Y PIMPOLLOS	0,00	100,00	95,24
PREVALENCIA DE FLORES	100,00	0,00	4,76
PRESENCIA DE FRUTOS	0,00	0,00	0,00
INFLORESCENCIA LAXA	100,00	100,00	100,00
INFLORESCENCIA DENSA	0,00	0,00	0,00
INFLORESCENCIA BLANCA	100,00	100,00	100,00
INFLORESCENCIA AMARILLA	0,00	0,00	0,00
INFLOR. INTERCALAR	0,00	66,67	100,00
INFLOR. TERMINAL	100,00	33,33	0,00
GLÁNDULAS DE DOS TIPOS	sd	100,00	100,00
GLÁNDULAS DE UN TIPO	sd	0,00	0,00
GLÁNDULAS ABUNDANTES	sd	100,00	100,00
GLÁNDULAS ESCASAS	sd	0,00	0,00

*representado sólo por el individuo selecto. 100: presencia del caracter; 0: ausencia del caracter; sd: sin dato.

Familia 2			
Variable	Presencia por Ciclo de Cultivo (%)		
	1°*	2°	3°
ESTRUCTURA SELECTA	100,00	88,89	45,00
PRESENCIA DE EJE PRINCIPAL	100,00	100,00	95,00
FLORACIÓN PRECOZ	0,00	0,00	10,00
PREVALENCIA DE BOT. FLOR. Y PIMPOLLOS	0,00	88,89	75,00
PREVALENCIA DE FLORES	100,00	11,11	25,00
PRESENCIA DE FRUTOS	0,00	0,00	0,00
INFLORESCENCIA LAXA	0,00	100,00	100,00
INFLORESCENCIA DENSA	100,00	0,00	0,00
INFLORESCENCIA BLANCA	0,00	100,00	100,00
INFLORESCENCIA AMARILLA	100,00	0,00	0,00
INFLOR. INTERCALAR	100,00	33,33	100,00
INFLOR. TERMINAL	0,00	66,67	0,00
GLÁNDULAS DE DOS TIPOS	sd	100,00	100,00
GLÁNDULAS DE UN TIPO	sd	0,00	0,00
GLÁNDULAS ABUNDANTES	sd	100,00	100,00
GLÁNDULAS ESCASAS	sd	0,00	0,00

*representado sólo por el individuo selecto. 100: presencia del caracter; 0: ausencia del caracter; sd: sin dato.

Familia 3			
Variable	Presencia por Ciclo de Cultivo (%)		
	1°*	2°	3°
ESTRUCTURA SELECTA	100,00	88,89	14,29
PRESENCIA DE EJE PRINCIPAL	100,00	100,00	80,95
FLORACIÓN PRECOZ	0,00	0,00	23,81
PREVALENCIA DE BOT. FLOR. Y PIMPOLLOS	0,00	88,89	90,48
PREVALENCIA DE FLORES	100,00	11,11	9,52
PRESENCIA DE FRUTOS	0,00	0,00	0,00
INFLORESCENCIA LAXA	0,00	100,00	100,00
INFLORESCENCIA DENSA	100,00	0,00	0,00
INFLORESCENCIA BLANCA	0,00	100,00	100,00
INFLORESCENCIA AMARILLA	100,00	0,00	0,00
INFLOR. INTERCALAR	100,00	33,33	100,00
INFLOR. TERMINAL	0,00	66,67	0,00
GLÁNDULAS DE DOS TIPOS	sd	100,00	100,00
GLÁNDULAS DE UN TIPO	sd	0,00	0,00
GLÁNDULAS ABUNDANTES	sd	100,00	95,24
GLÁNDULAS ESCASAS	sd	0,00	4,76

*representado sólo por el individuo selecto. 100: presencia del caracter; 0: ausencia del caracter; sd: sin dato.

Familia 4			
Variable	Presencia por Ciclo de Cultivo (%)		
	1°*	2°	3°
ESTRUCTURA SELECTA	100,00	100,00	100,00
PRESENCIA DE EJE PRINCIPAL	100,00	100,00	100,00
FLORACIÓN PRECOZ	0,00	0,00	0,00
PREVALENCIA DE BOT. FLOR. Y PIMPOLLOS	100,00	100,00	100,00
PREVALENCIA DE FLORES	0,00	0,00	0,00
PRESENCIA DE FRUTOS	0,00	0,00	0,00
INFLORESCENCIA LAXA	0,00	100,00	100,00
INFLORESCENCIA DENSA	100,00	0,00	0,00
INFLORESCENCIA BLANCA	100,00	100,00	100,00
INFLORESCENCIA AMARILLA	0,00	0,00	0,00
INFLOR. INTERCALAR	0,00	100,00	100,00
INFLOR. TERMINAL	100,00	0,00	0,00
GLÁNDULAS DE DOS TIPOS	sd	100,00	100,00
GLÁNDULAS DE UN TIPO	sd	0,00	0,00
GLÁNDULAS ABUNDANTES	sd	100,00	100,00
GLÁNDULAS ESCASAS	sd	0,00	0,00

*representado sólo por el individuo selecto. 100: presencia del caracter; 0: ausencia del caracter; sd: sin dato.

Familia 5			
Variable	Presencia por Ciclo de Cultivo (%)		
	1°*	2°	3°
ESTRUCTURA SELECTA	100,00	65,00	4,76
PRESENCIA DE EJE PRINCIPAL	100,00	100,00	90,48
FLORACIÓN PRECOZ	0,00	0,00	4,76
PREVALENCIA DE BOT. FLOR. Y PIMPOLLOS	0,00	100,00	100,00
PREVALENCIA DE FLORES	100,00	0,00	0,00
PRESENCIA DE FRUTOS	0,00	0,00	0,00
INFLORESCENCIA LAXA	100,00	100,00	100,00
INFLORESCENCIA DENSA	0,00	0,00	0,00
INFLORESCENCIA BLANCA	100,00	100,00	100,00
INFLORESCENCIA AMARILLA	0,00	0,00	0,00
INFLOR. INTERCALAR	100,00	55,00	100,00
INFLOR. TERMINAL	0,00	45,00	0,00
GLÁNDULAS DE DOS TIPOS	sd	100,00	100,00
GLÁNDULAS DE UN TIPO	sd	0,00	0,00
GLÁNDULAS ABUNDANTES	sd	100,00	100,00
GLÁNDULAS ESCASAS	sd	0,00	0,00

*representado sólo por el individuo selecto. 100: presencia del caracter; 0: ausencia del caracter; sd: sin dato.

Familia 6			
Variable	Presencia por Ciclo de Cultivo (%)		
	1°*	2°	3°
ESTRUCTURA SELECTA	100,00	55,56	68,75
PRESENCIA DE EJE PRINCIPAL	100,00	100,00	56,25
FLORACIÓN PRECOZ	0,00	0,00	50,00
PREVALENCIA DE BOT. FLOR. Y PIMPOLLOS	100,00	100,00	100,00
PREVALENCIA DE FLORES	0,00	0,00	0,00
PRESENCIA DE FRUTOS	0,00	0,00	0,00
INFLORESCENCIA LAXA	100,00	0,00	18,75
INFLORESCENCIA DENSA	0,00	100,00	81,25
INFLORESCENCIA BLANCA	100,00	0,00	18,75
INFLORESCENCIA AMARILLA	0,00	100,00	81,25
INFLOR. INTERCALAR	0,00	0,00	18,75
INFLOR. TERMINAL	100,00	100,00	81,25
GLÁNDULAS DE DOS TIPOS	sd	12,50	18,75
GLÁNDULAS DE UN TIPO	sd	87,50	81,25
GLÁNDULAS ABUNDANTES	sd	0,00	18,75
GLÁNDULAS ESCASAS	sd	100,00	81,25

*representado sólo por el individuo selecto. 100: presencia del caracter; 0: ausencia del caracter; sd: sin dato.

Familia 7			
Variable	Presencia por Ciclo de Cultivo (%)		
	1°*	2°	3°
ESTRUCTURA SELECTA	100,00	76,47	85,71
PRESENCIA DE EJE PRINCIPAL	100,00	100,00	85,71
FLORACIÓN PRECOZ	0,00	23,53	90,48
PREVALENCIA DE BOT. FLOR. Y PIMPOLLOS	100,00	100,00	100,00
PREVALENCIA DE FLORES	0,00	0,00	0,00
PRESENCIA DE FRUTOS	0,00	0,00	0,00
INFLORESCENCIA LAXA	0,00	0,00	5,00
INFLORESCENCIA DENSA	100,00	100,00	95,00
INFLORESCENCIA BLANCA	0,00	0,00	0,00
INFLORESCENCIA AMARILLA	100,00	100,00	100,00
INFLOR. INTERCALAR	100,00	5,88	0,00
INFLOR. TERMINAL	0,00	94,12	100,00
GLÁNDULAS DE DOS TIPOS	sd	0,00	0,00
GLÁNDULAS DE UN TIPO	sd	100,00	100,00
GLÁNDULAS ABUNDANTES	sd	0,00	0,00
GLÁNDULAS ESCASAS	sd	100,00	100,00

*representado sólo por el individuo selecto. 100: presencia del caracter; 0: ausencia del caracter; sd: sin dato.

Familia 8			
Variable	Presencia por Ciclo de Cultivo (%)		
	1°*	2°	3°
ESTRUCTURA SELECTA	100,00	80,00	90,48
PRESENCIA DE EJE PRINCIPAL	100,00	100,00	90,48
FLORACIÓN PRECOZ	0,00	20,00	90,48
PREVALENCIA DE BOT. FLOR. Y PIMPOLLOS	0,00	100,00	95,24
PREVALENCIA DE FLORES	100,00	0,00	4,76
PRESENCIA DE FRUTOS	0,00	0,00	0,00
INFLORESCENCIA LAXA	100,00	26,67	4,76
INFLORESCENCIA DENSA	0,00	73,33	95,24
INFLORESCENCIA BLANCA	100,00	50,00	4,76
INFLORESCENCIA AMARILLA	0,00	50,00	95,24
INFLOR. INTERCALAR	100,00	40,00	38,10
INFLOR. TERMINAL	0,00	60,00	61,90
GLÁNDULAS DE DOS TIPOS	sd	42,86	4,76
GLÁNDULAS DE UN TIPO	sd	57,14	95,24
GLÁNDULAS ABUNDANTES	sd	35,71	4,76
GLÁNDULAS ESCASAS	sd	64,29	95,24

*representado sólo por el individuo selecto. 100: presencia del caracter; 0: ausencia del caracter; sd: sin dato.

Familia 9			
Variable	Presencia por Ciclo de Cultivo (%)		
	1°*	2°	3°
ESTRUCTURA SELECTA	100,00	80,00	84,21
PRESENCIA DE EJE PRINCIPAL	100,00	100,00	84,21
FLORACIÓN PRECOZ	0,00	20,00	94,74
PREVALENCIA DE BOT. FLOR. Y PIMPOLLOS	0,00	100,00	100,00
PREVALENCIA DE FLORES	100,00	0,00	0,00
PRESENCIA DE FRUTOS	0,00	0,00	0,00
INFLORESCENCIA LAXA	100,00	26,67	0,00
INFLORESCENCIA DENSA	0,00	73,33	100,00
INFLORESCENCIA BLANCA	100,00	50,00	0,00
INFLORESCENCIA AMARILLA	0,00	50,00	100,00
INFLOR. INTERCALAR	100,00	40,00	0,00
INFLOR. TERMINAL	0,00	60,00	100,00
GLÁNDULAS DE DOS TIPOS	sd	46,15	0,00
GLÁNDULAS DE UN TIPO	sd	53,85	100,00
GLÁNDULAS ABUNDANTES	sd	38,46	0,00
GLÁNDULAS ESCASAS	sd	61,54	100,00

*representado sólo por el individuo selecto. 100: presencia del caracter; 0: ausencia del caracter; sd: sin dato.

Familia 10			
Variable	Presencia por Ciclo de Cultivo (%)		
	1°*	2°	3°
ESTRUCTURA SELECTA	100,00	100,00	60,00
PRESENCIA DE EJE PRINCIPAL	0,00	100,00	85,00
FLORACIÓN PRECOZ	0,00	0,00	5,00
PREVALENCIA DE BOT. FLOR. Y PIMPOLLOS	0,00	100,00	100,00
PREVALENCIA DE FLORES	100,00	0,00	0,00
PRESENCIA DE FRUTOS	0,00	0,00	0,00
INFLORESCENCIA LAXA	100,00	66,67	100,00
INFLORESCENCIA DENSA	0,00	33,33	0,00
INFLORESCENCIA BLANCA	100,00	100,00	100,00
INFLORESCENCIA AMARILLA	0,00	0,00	0,00
INFLOR. INTERCALAR	100,00	33,33	90,00
INFLOR. TERMINAL	0,00	66,67	10,00
GLÁNDULAS DE DOS TIPOS	sd	100,00	100,00
GLÁNDULAS DE UN TIPO	sd	0,00	0,00
GLÁNDULAS ABUNDANTES	sd	100,00	94,74
GLÁNDULAS ESCASAS	sd	0,00	5,26

*representado sólo por el individuo selecto. 100: presencia del caracter; 0: ausencia del caracter; sd: sin dato.

Familia 11			
Variable	Presencia por Ciclo de Cultivo (%)		
	1°*	2°	3°
ESTRUCTURA SELECTA	100,00	88,24	85,00
PRESENCIA DE EJE PRINCIPAL	100,00	100,00	95,00
FLORACIÓN PRECOZ	0,00	0,00	40,00
PREVALENCIA DE BOT. FLOR. Y PIMPOLLOS	0,00	100,00	100,00
PREVALENCIA DE FLORES	100,00	0,00	0,00
PRESENCIA DE FRUTOS	0,00	0,00	0,00
INFLORESCENCIA LAXA	100,00	100,00	100,00
INFLORESCENCIA DENSA	0,00	0,00	0,00
INFLORESCENCIA BLANCA	100,00	100,00	100,00
INFLORESCENCIA AMARILLA	0,00	0,00	0,00
INFLOR. INTERCALAR	100,00	58,82	100,00
INFLOR. TERMINAL	0,00	41,18	0,00
GLÁNDULAS DE DOS TIPOS	sd	100,00	100,00
GLÁNDULAS DE UN TIPO	sd	0,00	0,00
GLÁNDULAS ABUNDANTES	sd	100,00	30,00
GLÁNDULAS ESCASAS	sd	0,00	70,00

*representado sólo por el individuo selecto. 100: presencia del caracter; 0: ausencia del caracter; sd: sin dato.

Familia 12			
Variable	Presencia por Ciclo de Cultivo (%)		
	1°*	2°	3°
ESTRUCTURA SELECTA	100,00	82,35	60,00
PRESENCIA DE EJE PRINCIPAL	100,00	100,00	20,00
FLORACIÓN PRECOZ	100,00	100,00	100,00
PREVALENCIA DE BOT. FLOR. Y PIMPOLLOS	0,00	0,00	6,67
PREVALENCIA DE FLORES	0,00	100,00	93,33
PRESENCIA DE FRUTOS	100,00	0,00	60,00
INFLORESCENCIA LAXA	0,00	82,35	100,00
INFLORESCENCIA DENSA	100,00	17,65	0,00
INFLORESCENCIA BLANCA	0,00	100,00	100,00
INFLORESCENCIA AMARILLA	100,00	0,00	0,00
INFLOR. INTERCALAR	100,00	52,94	100,00
INFLOR. TERMINAL	0,00	47,06	0,00
GLÁNDULAS DE DOS TIPOS	sd	100,00	46,67
GLÁNDULAS DE UN TIPO	sd	0,00	53,33
GLÁNDULAS ABUNDANTES	sd	100,00	6,67
GLÁNDULAS ESCASAS	sd	0,00	93,33

*representado sólo por el individuo selecto. 100: presencia del caracter; 0: ausencia del caracter; sd: sin dato.