



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

---

INSTITUTO DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN  
CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL

**Cuantificación de flavonoides y carotenoides en  
variedades de caléndula (*Calendula officinalis* L.) y  
descriptores varietales**

**MARIANA PALMA TENANGO**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

**Marzo, 2014.**

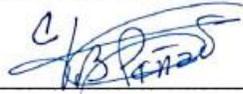
La presente tesis, titulada: **Cuantificación de flavonoides y carotenoides en variedades de caléndula (*Calendula officinalis* L.) y descriptores varietales**, realizada por la alumna: **Mariana Palma Tenango**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
FISIOLOGÍA VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:   
DR. VÍCTOR ARTURO GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

DIRECTOR  
DE TESIS:   
DR. RAMÓN MARCOS SOTO HERNÁNDEZ

ASESORA:   
DRA. CECILIA BEATRIZ PEÑA VALDIVIA

ASESOR:   
DR. AQUILES CARBALLO CARBALLO

ASESOR:   
DR. JOSÉ ALFREDO CARRILLO SALAZAR

Montecillo, Texcoco, México, febrero de 2014.

## **Cuantificación de flavonoides y carotenoides en variedades de caléndula (*Calendula officinalis* L.) y descriptores varietales**

Caléndula (*Calendula officinalis* L.) es una planta herbácea anual que destaca por los usos medicinales de sus capítulos (flores). En esta especie se ha demostrado diversidad genética y de composición química entre variedades. En México no se cultivan diferentes variedades ni se ha investigado la variación posible en el rendimiento de capítulos, concentración de flavonoides y carotenoides en función de la variedad y de cortes, como es el efecto causado por cosechas continuas de los capítulos florales. El objetivo de este estudio fue determinar el rendimiento, concentración de flavonoides y carotenoides en seis variedades de caléndula aquí seleccionadas, cuyos capítulos fueron cosechados a lo largo de siete cortes en 2010 y de nueve cortes en 2011, de plantas cultivadas en campo en el Valle de México. Los capítulos recolectados se secaron a 40 °C por 48 h. El rendimiento se expresa en kilogramos por hectárea ( $\text{kg ha}^{-1}$ ), y la concentración de flavonoides y carotenoides en  $\text{mg g}^{-1}$  MS. Los datos se sometieron a análisis de varianza conforme a un diseño experimental bloques completos al azar con arreglo factorial 6 x 7 (2010) o 6 x 9 (2011), con dos repeticiones. Las medias se compararon con la prueba de Tukey. Se encontraron diferencias ( $P \leq 0.05$ ) entre variedades y entre cortes. La variedad V4 produjo el mayor rendimiento de capítulos en los dos ciclos de cultivo. Las variedades que produjeron la mayor concentración de flavonoides, en promedio de fechas de corte, fueron V5 y V3, y las de menor concentración fueron V4 y V6. Luteolina e isoramnetina fueron los flavonoides predominantes en caléndula, y el primero fue afectado por variedades pero no por cortes, mientras que en isoramnetina fue lo contrario. Las variedades que produjeron la mayor concentración de carotenoides, en promedio de nueve fechas de corte, fueron V4 y V6 de color anaranjado, y las de menor concentración fueron V3 y V5 de color amarillo. En contenido de carotenoides, el efecto varietal fue de mayor magnitud que el efecto de cortes. La producción por hectárea de flavonoides y carotenoides dependió más del rendimiento de capítulos que de sus concentraciones.

**Palabras clave:** Caléndula, flavonoides, carotenoides, descripción varietal.

## **Quantification of flavonoids and carotenoids in pot marigold (*Calendula officinalis* L.) varieties and varietal descriptors**

Pot marigold (*Calendula officinalis* L.) is an annual herb which outstands by the medicinal uses of their flower heads. This species has shown genetic diversity in chemical composition among varieties. Mexican farmers do not grow different varieties, and the effect of variety and number of flower harvests has not been studied regarding flower yield and flavonoids and carotenoids concentrations. The aim of this study was to determine the concentration of flavonoids and carotenoids in six varieties of calendula selected here and grown in the Valley of Mexico, when flower heads were harvested along seven cuts in 2010 and nine cuts in 2011. The collected flower heads were dried at 40 °C for 48 h and then weighed, and the corresponding yields were expressed per hectare ( $\text{kg ha}^{-1}$ ), and their concentrations of flavonoids and carotenoids in  $\text{mg g}^{-1}$ . Data were subjected to analysis of variance according to a randomized complete block design with factorial arrangement 6 x 7 (in 2010) and 6 x 9 (in 2011), with two replications; means were compared with the Tukey test. Differences ( $P \leq 0.05$ ) between varieties and dates of harvest were significant. Variety V4 produced the highest yield in the two growing seasons. Varieties V5 and V3 produced the highest flavonoid concentration, averaged over harvest dates, while the less concentrated varieties were V4 and V6. Luteolin and isorhamnetin were the predominant flavonoids in pot marigold, and the first one was affected by variety but not by cutting dates, while the opposite happened in isorhamnetin. The varieties that contained the highest concentration of carotenoids, on the average of all harvest dates, were V4 and V6 whose flowers are orange colored, whereas the lowest concentration was detected in V3 and V5 which have yellow flowers. In carotenoid content the factor genetic had a larger effect than the environmental factor associated to successive flower harvests. Flavonoid and carotenoid production (in  $\text{kg ha}^{-1}$ ) by flower heads depended more on flower yield than on their chemical concentrations.

**Keywords:** Pot marigold, flavonoids, carotenoids, description varietal.

## *Agradecimientos*

Al Colegio de postgraduados por ser mi segunda *alma mater*, en especial a mi programa Fisiología Vegetal.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por los recursos económicos que me permitieron realizar mis estudios de posgrado.

Al Dr. Víctor González Hernández por todo el apoyo, disposición y enseñanzas en el transcurso de mis estudios, por contagiarme con su pasión a la investigación, al trabajo, a la constante retroalimentación, e indudablemente por la huella que ha dejado en mi persona tanto profesional como personal.

Al Dr. Marcos Soto Hernández por su apoyo y confianza, por permitirme ser parte del grupo “fitoquímica” y poder ampliar mis conocimientos en este tema. Por mostrarme las bondades de la disciplina y la organización. Por ser siempre comprensivo y con la disposición de apoyar al estudiante.

Al Dr. Aquiles Carballo Carballo por su apoyo, sugerencias y orientación en el desarrollo de la investigación y en la tesis.

A la Dra. Cecilia Peña Valdivia por su disposición y apoyo, por las sugerencias y comentarios en la investigación y en la tesis.

Al Dr. Alfredo Carrillo Salazar por sus atinadas observaciones y sugerencias para mejora de este documento, por su amabilidad, disposición y apoyo.

Al M.C Rubén San Miguel Chávez, la Dra. María Elena Ramírez, al Dr. Nicacio Cruz Huerta y al M.C. Iván Ramírez Ramírez por sus sugerencias, comentarios y apoyo en esta investigación.

A Domingo González Meraz, Mercedes Alvarado por su disposición y apoyo en el transcurso de mi estancia en el laboratorio de fitoquímica.

A mis amigos queridos:

Francisco Vicente, Diana, Alfredo, Mara Irais, Erik, Gloria Virginia, Kalina, Víctor David por su cariño y apoyo.

A mis compañeros y amigos del Colegio de Postgraduados, por su compañía y los buenos momentos que compartimos en algún momento.

## *Dedicatoria*

A mí esposo Manuel

Por su confianza, apoyo constante, por su amor y comprensión, por ser la otra mitad de este equipo de vida.

A mí familia querida:

A Fany por ser una mamá excepcional, a mi papá Florencio por su apoyo, a mí hermana Ángeles por su apoyo, cariño y entusiasmo, a mí hermana Laura por sus porras.

# ÍNDICE

Número de página

<b>RESUMEN .....</b>	<b>ii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>iii</b>
<b>CONTENIDO.....</b>	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS.....</b>	<b>viii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
2.1. <i>Calendula officinalis</i> L. ....	4
2.1.1. Clasificación taxonómica .....	4
2.1.2. Descripción botánica .....	4
2.1.3. Propiedades terapéuticas .....	8
2.1.4. Compuestos químicos en caléndula .....	9
2.1.5. Cultivo de caléndula .....	11
2.2. Flavonoides en las plantas.....	15
2.3. Carotenoides en las plantas.....	16
2.4. Descripción varietal.....	18
2.5. Literatura citada .....	19
<b>3. RENDIMIENTO Y DIVERSIDAD FLORAL DE CALÉNDULA (<i>Calendula officinalis</i> L.).....</b>	<b>24</b>
3.1. Introducción.....	26
3.2. Materiales y métodos .....	29
3.3. Resultados y discusión .....	32
3.4. Conclusiones.....	37
3.5. Literatura citada .....	38
<b>4. ESTUDIO FITOQUÍMICO PRELIMINAR DE CALÉNDULA (<i>Calendula officinalis</i> L.) EN MÉXICO.....</b>	<b>41</b>
4.1. Introducción.....	43
4.2. Materiales y métodos .....	44
4.3. Resultados y discusión .....	46
4.4. Conclusiones.....	50
4.5. Literatura citada .....	51

<b>5. EFECTO DE VARIEDAD Y DE FECHA DE CORTE EN EL CONTENIDO DE FLAVONOIDES EN CALÉNDULA (<i>Calendula officinalis</i> L.).....</b>	<b>55</b>
5.1. Introducción.....	57
5.2. Materiales y métodos.....	59
5.2. Resultados y discusión .....	63
5. 4. Conclusiones .....	73
5.5. Literatura citada .....	74
<b>6. EFECTO DE LA VARIEDAD Y FECHA DE CORTE EN EL CONTENIDO DE CAROTENOIDES EN CAPÍTULO FLORALES DE CALÉNDULA (<i>Calendula officinalis</i> L.).....</b>	<b>78</b>
6.1. Introducción .....	80
6.2. Materiales y métodos.....	82
6.3. Resultados y discusión .....	85
6.4. Conclusiones .....	90
6.5. Literatura citada .....	91
<b>7. CARACTERIZACIÓN Y DESCRIPCIÓN VARIETAL DE <i>Caléndula officinalis</i> L. .</b>	<b>94</b>
7.1. Introducción.....	96
7.3. Materiales y métodos.....	97
7.4. Resultados y discusión .....	106
7.5. Conclusiones .....	115
7.6. Literatura citada .....	115
<b>8. DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>118</b>
<b>9. CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>120</b>
<b>10.ANEXO.....</b>	<b>121</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Número de página

Cuadro 2. 1. Ubicación taxonómica de <i>Calendula officinalis</i> L.....	4
Cuadro 2. 2. Porcentajes de carotenoides en inflorescencias de caléndula. ....	10
Cuadro 3.1. Análisis de varianza del rendimiento de capítulos secos de seis variedades de caléndula, cosechados en cortes sucesivos (siete cortes en 2010, y 9 en 2011), Texcoco, Edo. de México.....	32
Cuadro 4.1. Pruebas fitoquímicas preliminares de capítulos de caléndula ( <i>Calendula officinalis</i> L.) .....	46
Cuadro 5.1. Datos climatológicos de los meses de cultivo de los años 2010 y año 2011.....	60
Cuadro 5.2. Análisis de varianza para concentración de flavonoides totales (mg g <sup>-1</sup> MS) en capítulos secos de seis variedades de caléndula, cosechados en cortes sucesivos (siete cortes en 2010, y 9 en 2011), en dos ciclos de producción (2010 y 2011). Texcoco, Edo. de México.....	63
Cuadro 5.3. Producción de flavonoides totales por variedad de caléndula para los ciclos de 2010 (en promedio de siete cosechas sucesivas) y 2011 (en promedio de nueve cosechas).....	67
Cuadro 5.4. Producción de flavonoides totales en diferentes fechas de cosecha, para los ciclos 2010 y 2011 (en promedio de seis variedades de caléndula).....	68
Cuadro 5.5. Matriz de correlación de Pearson entre contenidos de flavonoides específicos y totales en capítulos de caléndula cultivada en el ciclo 2010.....	72
Cuadro 6.1. Producción de carotenoides totales por variedad.....	87
Cuadro 6.2. Producción de carotenoides totales en diferentes fechas de cosecha (en promedio de seis variedades de caléndula).....	89
Cuadro 7.1. Fenología de caléndula. ....	99
Cuadro 7.2. Frecuencias acumuladas de altura de planta (cm) .....	101
Cuadro 10.1. Datos climatológicos de los meses de cultivo del año 2010 y año 2011.....	121
Cuadro 10.2. Análisis de varianza del rendimiento de capítulos secos de seis variedades de caléndula, cosechados en cortes sucesivos	

	(siete cortes en 2010, y 9 en 2011), en dos ciclos de producción (2010 y 2011). Texcoco, Edo. de México. ....	121
Cuadro 10.3.	Comparaciones de medias de Tukey de rendimiento de capítulos secos ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) de seis variedades de caléndula en promedio de siete cosechas sucesivas en 2010 ( $n = 14$ ) y de nueve en 2011 ( $n = 18$ ). Medias con la misma letra son estadísticamente iguales. ....	122
Cuadro 10.4.	Comparaciones de medias de Tukey de rendimiento por corte de capítulos secos ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) a través de siete cosechas para 2010 y nueve para 2011, en promedio de seis variedades de caléndula. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales ( $n = 12$ ). ....	122
Cuadro 10.5.	Análisis de varianza del rendimiento acumulado de capítulos secos de seis variedades de caléndula, cosechados en cortes sucesivos (siete cortes en 2010, y 9 en 2011), en dos ciclos de producción (2010 y 2011). Texcoco, Edo. de México. ....	123
Cuadro 10.6.	Comparaciones de medias de Tukey de rendimiento acumulado de capítulos secos ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) de seis variedades de caléndula en promedio de siete cosechas sucesivas en 2010 ( $n = 14$ ) y de nueve en 2011 ( $n = 18$ ). Medias con la misma letra son estadísticamente iguales. ....	123
Cuadro 10.7.	Comparaciones de medias de Tukey de rendimiento acumulado por corte de capítulos secos ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) a través de siete cosechas para 2010 y nueve para 2011, en promedio de seis variedades de caléndula. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales. ....	124
Cuadro 10.8.	Análisis de varianza para concentración de flavonoides totales ( $\text{mg g}^{-1}$ MS) en capítulos secos de seis variedades de caléndula, cosechados en cortes sucesivos (siete cortes en 2010, y 9 en 2011), en dos ciclos de producción (2010 y 2011). Texcoco, Edo. de México. ....	124
Cuadro 10.9.	Comparaciones de medias de Tukey para concentración de flavonoides totales ( $\text{mg g}^{-1}$ MS) de seis variedades de caléndula en promedio de siete cosechas sucesivas en 2010 ( $n = 42$ ) y de nueve en 2011 ( $n = 54$ ). Medias con la misma letra son estadísticamente iguales. ....	125
Cuadro 10.10.	Comparaciones de medias de Tukey para concentración de flavonoides totales ( $\text{mg g}^{-1}$ MS) a través de siete cosechas para 2010 y nueve para 2011, en promedio de seis variedades de caléndula. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales ( $n = 36$ ). ....	125
Cuadro 10.11.	Comparaciones de medias de Tukey para la interacción de la concentración de flavonoides totales ( $\text{mg g}^{-1}$ MS) de seis variedades de caléndula con número de corte, siete cosechas sucesivas en 2010 ( $n = 6$ ; DMS = 21.6) y de nueve en 2011 ( $n = 6$ ; DMS = 32.8). Medias con la misma letra son estadísticamente iguales. ....	126
Cuadro 10.12.	Análisis de varianza para producción de flavonoides ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) en capítulos secos de seis variedades de caléndula, cosechados en	

	cortes sucesivos (siete cortes en 2010, y 9 en 2011), en dos ciclos de producción (2010 y 2011). Texcoco, Edo. de México. ....	128
Cuadro 10.13.	Comparaciones de medias de Tukey para producción de flavonoides totales ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) de seis variedades de caléndula en promedio de siete cosechas sucesivas en 2010 ( $n = 42$ ) y de nueve en 2011 ( $n = 54$ ). Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.....	128
Cuadro 10.14.	Comparaciones de medias de Tukey para producción de flavonoides ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) a través de siete cosechas para 2010 y nueve para 2011, en promedio de seis variedades de caléndula. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales ( $n = 36$ ).....	129
Cuadro 10.15.	Análisis de varianza para concentración de carotenoides totales ( $\text{mg g}^{-1}$ MS) en capítulos secos de seis variedades de caléndula, cosechados en 9 cortes sucesivos en el ciclo de producción 2011 Texcoco, Edo. de México.....	129
Cuadro 10.16.	Comparaciones de medias de Tukey para concentración de carotenoides totales ( $\text{mg g}^{-1}$ MS) de seis variedades de caléndula en promedio de nueve cosechas sucesivas en el año 2011 ( $n = 27$ ). Medias con la misma letra son estadísticamente iguales. ....	130
Cuadro 10.17.	Comparaciones de medias de Tukey para concentración de carotenoides totales ( $\text{mg g}^{-1}$ MS) a través de nueve cosechas en el año 2011, en promedio de seis variedades de caléndula. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales ( $n = 18$ ). ....	130
Cuadro 10.18.	Comparaciones de medias de Tukey para la concentración de carotenoides totales ( $\text{mg g}^{-1}$ MS) en su interacción de seis variedades de caléndula con el número de corte de nueve cosechas sucesivas en el año 2011. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.....	131
Cuadro 10.19.	Análisis de varianza para producción de carotenoides ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) en capítulos secos de seis variedades de caléndula, cosechados en nueve cortes sucesivos en el ciclo del año 2011. Texcoco, Edo. de México.....	132
Cuadro 10.20.	Comparaciones de medias de Tukey para producción de carotenoides totales ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) de seis variedades de caléndula en promedio de de nueve en el ciclo del año 2011 ( $n = 18$ ). Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.....	133
Cuadro 10.21.	Comparaciones de medias de Tukey para producción de carotenoides ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) a través de nueve cortes para el ciclo 2011, en promedio de seis variedades de caléndula. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales ( $n = 12$ ).....	133

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Número de página
Figura 2. 1. Planta de caléndula.....	4
Figura 2. 2. Capítulo floral y flores de caléndula. ....	5
Figura 2. 3. Polinizadores en caléndula. ....	6
Figura 2. 4. Fruto (aquenio) de caléndula .....	7
Figura 2. 5. Semilla de caléndula .....	7
Figura 2. 6. Raíz de caléndula. ....	8
Figura 2. 7. Almacigo de caléndula en charola de unicel de 112 cavidades. ....	11
Figura 2. 8. Fertilización mineral de caléndula. ....	12
Figura 2. 9. Biosíntesis de los fenil propanoides .....	15
Figura 2. 10. Biosíntesis de carotenoides en las plantas (Hirschberg, 2001). ....	17
Figura 3.1. Variedades de caléndula contrastantes en características florales, seleccionadas mediante selección masal a partir de una variedad comercial heterogénea. ....	27
Figura 3.2. Etapas del desarrollo floral de caléndula.....	28
Figura 3.3. Fases del manejo de caléndula en almacigo. ....	29
Figura 3.4. Plagas en caléndula e insecticida orgánico aplicado. 1) Gusano ( <i>Spodoptera</i> spp.); 2) Pulgón ( <i>Aphis</i> spp.); y 3) Plaguicida orgánico. ....	30
Figura 3.5. Capítulo de caléndula en plena floración, en el que se muestran sus dos tipos de flores individuales. ....	31
Figura 3.6. Rendimiento de capítulos secos ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) de seis variedades de caléndula en promedio de siete cosechas sucesivas en 2010 (DMS = 194.8; n = 14) y de nueve en 2011 (DMS = 116.5; n = 18). Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). Las líneas verticales en cada columna, corresponden a las desviaciones estándar. ....	33
Figura 3.7. Rendimiento por corte de capítulos secos ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) a través de siete cosechas para 2010 (DMS = 173.9) y nueve para 2011 (DMS = 155.9), en promedio de seis variedades de caléndula. Medias con la misma letra son	

estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). Las líneas verticales en cada columna corresponden a las desviaciones estándar (n = 12).....	34
Figura 3.8. Rendimiento acumulado de capítulos secos (kg ha <sup>-1</sup> ) de seis variedades de caléndula en promedio de siete cosechas sucesivas en 2010 (DMS = 501.7; n = 14) y de nueve en 2011 (DMS = 406.2; n = 18). Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). Las líneas verticales en cada columna, corresponden a las desviaciones estándar. ....	35
Figura 3.9. Acumulación del rendimiento de capítulos secos (kg ha <sup>-1</sup> ) a través de siete cosechas para 2010 (DMS = 561.9) y nueve para 2011 (DMS = 544.1), en promedio de seis variedades de caléndula. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). Las líneas verticales en cada columna corresponden a las desviaciones estándar (n = 12). ....	36
Figura 4.1. Cromatogramas obtenidos por cromatografía en capa fina, vistos con iluminación con UV. A) Flavonoides, y B) 1) kaempferol, 2) isoramnetina, 3) luteolina ,4) quercetina, 5) apigenina ,6) ácido clorogénico,7) rutina, 8) desconocido, 9) extracto metanólico en capítulos florales de caléndula ( <i>Calendula officinalis</i> L.). ....	48
Figura 4.2. Cromatograma obtenido por cromatografía en capa fina para terpenoides de caléndula ( <i>Calendula officinalis</i> L.). ....	48
Figura 4.3. Cromatograma obtenido por cromatografía en capa fina para detectar aceites esenciales en capítulos florales de caléndula ( <i>Calendula officinalis</i> L.). ....	49
Figura 4.4. Cromatograma obtenido por cromatografía en capa fina para detectar carotenoides en capítulos florales de caléndula ( <i>Calendula officinalis</i> L.). ....	50
Figura 5.1. Variedades de caléndula evaluadas. ....	59
Figura 5.2. Concentración de flavonoides totales en los capítulos de seis variedades de caléndula, en promedio de siete cosechas hechos en 2010 (n = 42) y de nueve en 2011 (n = 54). Medias con la misma letra son estadísticamente	

	iguales (Tukey, 0.05). Las líneas verticales en cada barra corresponden a las desviaciones estándar .....	64
Figura 5.3.	Concentración de flavonoides totales a través de cortes sucesivos semanales (siete cosechas en 2010 y de nueve en 2011), en promedio de seis variedades de caléndula. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). Las líneas verticales en cada barra corresponden a las desviaciones estándar (n = 36).....	65
Figura 5.4.	Concentración de rutina, quercetina, luteolina, apigenina e isoramnetina, en capítulos de seis variedades de caléndula crecidas en 2010 (en promedio de siete cosechas sucesivas). Medias con la misma letra son estadísticamente iguales entre sí (Tukey, 0.05). Las líneas verticales sobre las barras corresponden a las desviaciones estándar (n = 14). .....	70
Figura 5.5	Concentración de rutina, quercetina, luteolina, apigenina e isoramnetina, en capítulos de caléndula cosechados en siete cortes sucesivos en 2010 (en promedio de seis variedades). Medias con la misma letra son estadísticamente iguales entre sí (Tukey, 0.05). Las líneas verticales sobre las barras corresponden a las desviaciones estándar (n = 12).....	71
Figura 6.1	Variedades de caléndula evaluadas. ....	82
Figura 6.2.	Diagrama del proceso de cuantificación de carotenoides totales.....	84
Figura 6.3.	Concentración de carotenoides totales en los capítulos de seis variedades de caléndula, en promedio de nueve cortes. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05; DMS = 0.041). Las líneas verticales en cada columna corresponden a las desviaciones estándar (n = 27). .....	86
Figura 6.4.	Concentración de carotenoides totales a través de nueve cortes sucesivos, en promedio de seis variedades de caléndula. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05; DMS = 0.055). Las líneas verticales en cada barra corresponden a las desviaciones estándar (n = 18).....	88

Figura 7.1. Materiales de caléndula seleccionados en dos ciclos de producción (2010 y 2011). .....	98
Figura 7.2. Tipos de porte en plantas.....	100
Figura 7.3. Tipos de torsión en las lígulas.....	103
Figura 7.4. Forma del ápice de flores 1) agudo; 2) Mucronado; 3) Partido; 4) Pragmorso; 5) Redondo; 6) Acorazado.....	103
Figura 7.5. Capítulo floral de caléndula, flores liguladas y tubulares. ....	104
Figura 7.6. Tipo de porte de planta de caléndula .....	106
Figura 7.7. Presencia de antocianinas en el tallo de caléndula.....	107
Figura 7.8. Ramificaciones del tallo de caléndula .....	107
Figura 7.9. Forma de hoja de caléndula.....	108
Figura 7.10. Formas del apice de la hoja de caléndula .....	109
Figura 7.11. Distribución del follaje en plantas de caléndula.....	109
Figura 7.12. Tipos de capítulos de caléndula.....	110
Figura 7.13. Presencia de antocianinas en sépalos de capítulos de caléndula .....	111
Figura 7.14. Tipos de torción de lígulas en capítulos de caléndula. ....	112
Figura 7.15. Formas del ápice de lígulas de caléndula. ....	112
Figura 7.16. Número de colores en lígulas de caléndula. ....	113
Figura 7.17. Presencia de antocianinas en flores tubulares de caléndula.....	114
Figura 7.18. Longitud del fruto de caléndula. ....	114

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

En México hay un porcentaje alto de personas que consumen plantas medicinales para tratar diferentes enfermedades; por lo que, su demanda y la de los productos elaborados con ellas es creciente. Esto representa una alternativa económica importante a cultivos tradicionales, y día a día aumenta la superficie de cultivo de estas especies (Rosete *et al.*, 2013). Dentro de este panorama de consumo de hierbas medicinales y aromáticas, se identifica la falta de paquetes agrícolas que permitan un manejo sustentable y garanticen su calidad fitoquímica.

Entre el grupo de las plantas medicinales usadas en México se encuentra *Calendula officinalis* L. (Palma *et al.*, 2007). Es una planta con origen mediterráneo (Vârban *et al.*, 2008), que fue cultivada desde el siglo 12 por egipcios, griegos, hindúes y árabes (Safdar *et al.*, 2010), y que actualmente se ha extendido a todo el mundo.

Es utilizada como materia prima de productos cosméticos para el cuidado de la piel y para cuidados en personas con acné (Ibrahim *et al.*, 2010), para pigmentar diversos alimentos e incrementar su valor nutracéutico, así como aditivo en los alimentos de animales como gallinas y codornices, ya que aumenta la concentración de carotenoides en la yema de sus huevos (Karadas *et al.*, 2013). Además tiene potencial como oleaginosa, ya que su semilla puede contener de 15 a 20 % de aceite, aceite en que el ácido caléndico es el componente mayoritario. Dicho aceite tiene aplicaciones industriales como agente de secado, debido a su oxidación rápida (Wilén *et al.*, 2004), y como posible sustituto del árbol del Tung (*Vernicia fordii* Hemsl.) que es usado para acelerar el secado de pinturas, recubrimientos y adhesivos (Gesch, 2013; Rozeen *et al.*, 2013), así la caléndula puede evitar la sobreexplotación del árbol del Tung, que actualmente ha causado fuertes deforestaciones.

El uso principal de caléndula es el medicinal, por la presencia de compuestos químicos que le confieren actividades terapéuticas numerosas (Muley *et al.*, 2009) de interés para el sector industrial, cosmético y farmacéutico.

En México la caléndula se usa en una diversidad amplia de productos (Palma *et al.*, 2006), lo que ha generado demanda de esta planta y de sus compuestos químicos. A pesar de esto, no se ha investigado los cambios en el contenido de metabolitos secundarios de esta planta cultivada en diferentes condiciones del país, pues falta información fitoquímica, agronómica, caracterización varietal de las nuevas mezclas genéticas, y la interrelación de las mismas, que impide integrar el conocimiento de esta planta y de su potencial económico y farmacéutico. Por lo anterior, el manejo agrícola de la caléndula, su caracterización varietal y conocer el efecto ambiental, son aspectos importantes de determinar para poder brindar calidad en los principios activos de esta planta medicinal, y lograr la estandarización de la materia prima vegetal.

### **Objetivo general**

Cuantificar la concentración de flavonoides y carotenoides en seis variedades de caléndula, cosechadas en diferentes fechas.

### **Objetivos particulares**

Determinar el rendimiento de seis variedades de caléndula cultivadas en el Valle de México y cosechadas en cortes sucesivos de capítulos, durante dos ciclos de producción.

Hacer un estudio preliminar de metabolitos secundarios en plantas de caléndula cultivadas en México.

Cuantificar la concentración de flavonoides totales, cinco flavonoides específicos (rutina, quercetina, luteolina, apigenina e isoramnetina) y de carotenoides totales en seis variedades de caléndula, en diferentes fechas de cosecha de sus capítulos.

Proponer una guía para la descripción varietal de caléndula.

## **Hipótesis**

El rendimiento y la concentración de flavonoides y carotenoides en caléndula varían independiente del manejo de cultivo y de la diversidad genética de la especie, en particular la diversidad en sus capítulos florales.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. *Calendula officinalis* L.

#### 2.1.1. Clasificación taxonómica

Muley *et al.* (2009) señalo que está planta está ubicada taxonómicamente con la información del Cuadro 2.1.

**Cuadro 2. 1.** Ubicación taxonómica de *Calendula officinalis* L.

Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Tracheobionta</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Asterales</i>
Familia	<i>Asteraceae</i>
Tribu	<i>Calenduleae</i>
Género	<i>Calendula</i>
Especie	<i>officinalis</i>

#### 2.1.2. Descripción botánica

*Calendula officinalis* L. es una planta herbácea, anual, erecta (Figura 2.1) de aproximadamente 60 cm de altura (Khan *et al.*, 2011), con tallos angulares, pubescentes y ramificados; sus hojas son simples, alternas, sésiles, que pueden ser espatuladas o lanceoladas y con márgenes dentados. La hoja entera está cubierta de pelos finos muy cortos (Khalid y Teixeira, 2012).



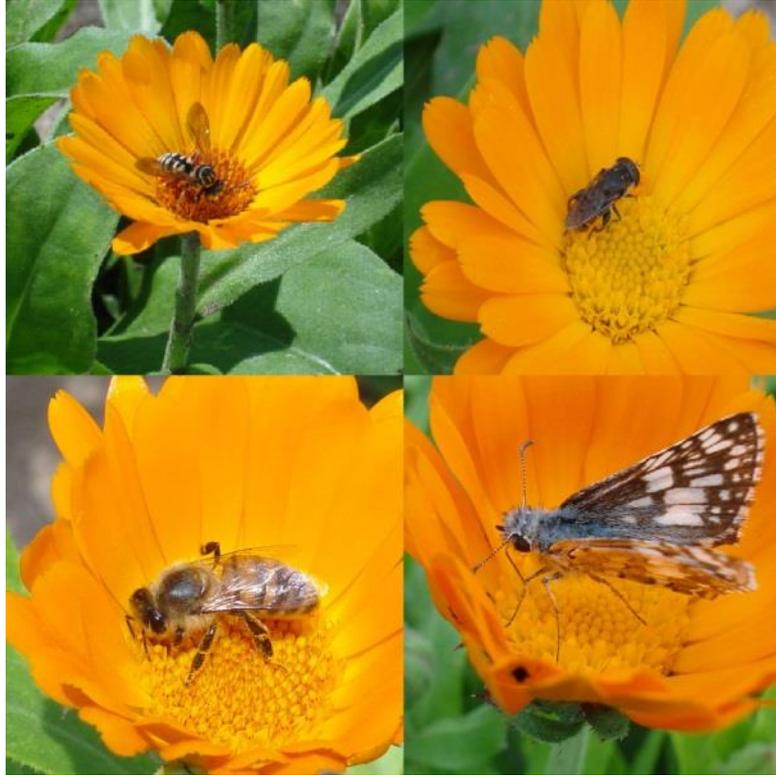
**Figura 2. 1.** Planta de caléndula

El capítulo floral está integrado por una corola con flores liguladas y flores tubulares (Figura 2.2). Las flores que funcionan como masculinas tienen ovarios sólidos o uniloculares sin óvulo. En contraste, los ovarios de flores femeninas son siempre uniloculares con óvulos anátropos, unitégmicos (con un solo tegumento) y tenuinucelados. El desarrollo del saco embrionario sigue el tipo *Polygonum* de origen monospórico. El grano de polen maduro es del tipo de tres células (Ao, 2007).



**Figura 2. 2.** Capitulo floral y flores de caléndula.

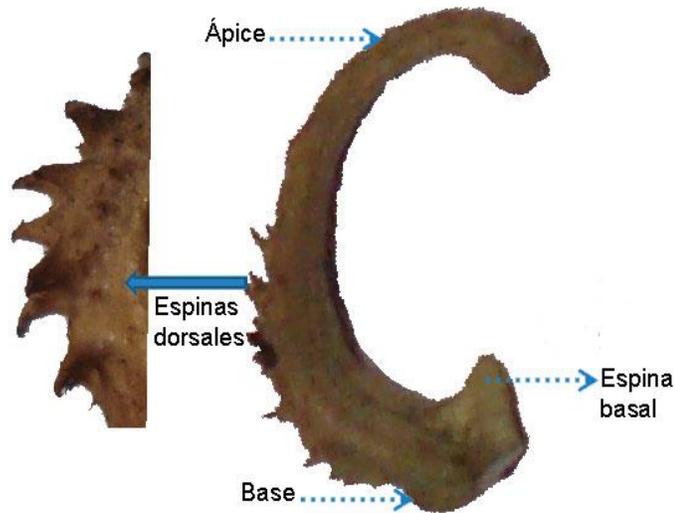
La polinización de caléndula es cruzada, y el transporte de los granos de polen de una planta a otra es realizado por diversos insectos (Figura 2.3), que son atraídos por el aroma o el color de sus flores.



**Figura 2. 3.** Polinizadores en caléndula.

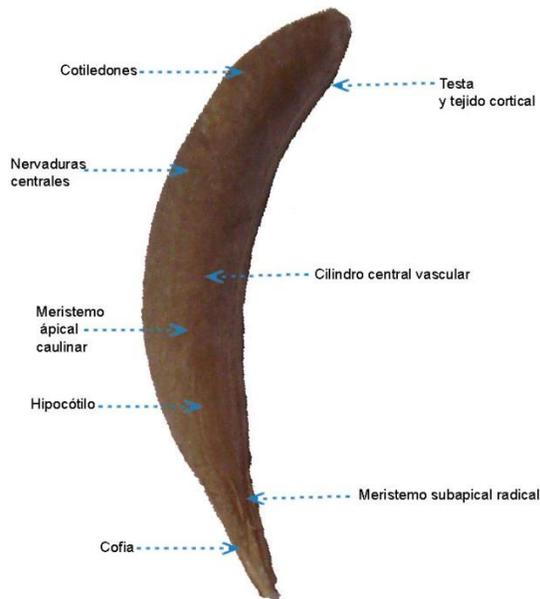
El fruto de caléndula es un aquenio encorvado (Figura 2.4), de 1 a 2 cm de largo, 2 a 3 mm de ancho y de 3 a 4 mm de grosor; con dos caras, una dorsal y una ventral; en la cara ventral se localiza el sitio de emergencia de la radícula durante la germinación, y en el costado dorsal se encuentran una serie de apéndices o espinas dorsales que facilitan su fijación por diferentes agentes dispersores.

Dentro del fruto se encuentra la semilla y el embrión, que poseen una curvatura y forma cónica. El extremo puntiagudo hacia la base del fruto corresponde a la radícula y el redondeado al ápice de los cotiledones (Victoria *et al.*, 2007).



**Figura 2. 4.** Fruto (aquenio) de caléndula.

La semilla (Figura 2.5) es considerada como ortodoxa, cuyo porcentaje de germinación después de 10 años a temperatura ambiente es de 28% (Hong *et al.*, 1998). Está rodeada de una testa delgada y membranosa y de tejidos corticales de protección. Tiene dos cotiledones convexos y en la sección basal se encuentra el eje embrionario que es recto, y que se compone de: meristemo apical caulinar, hipocótilo, meristemo subapical radical y radícula (Victoria *et al.*, 2007).



**Figura 2. 5.** Semilla de caléndula (Modificado de Victoria *et al.*, 2007).

La raíz principal mide aproximadamente 20 cm de largo y tiene numerosas raíces secundarias (Figura 2.6).



**Figura 2. 6.** Raíz de caléndula.

### **2.1.3. Propiedades terapéuticas**

Caléndula es una planta usada para diferentes fines medicinales, por su amplia acción farmacológica. Los órganos de mayor uso son los capítulos florales; que se preparan de diversas formas para administrar por vía oral o tópica.

Entre las actividades terapéuticas que se le atribuyen a caléndula están: antioxidante (Preethi *et al.*, 2006; Chakraborty, 2009), hipoglucemiante, gastroprotectora (Yoshikawa y cols, 2001), espasmolítica (Bashir *et al.*, 2006), antiinflamatoria (Della *et al.*, 1994), inmunoestimulante, antimicótica, hepatoprotectora, antiviral (Muley *et al.*, 2009), y para la prevención de dermatitis en pacientes sometidos a irradiación postoperatoria por cáncer de mama (Pommier *et al.*, 2004).

También se ha demostrado actividad antibacterial de extractos de caléndula, para inhibir a bacterias como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* *Enterococcus pneumoniae*, *Candida albicans* (Safdat *et al.*, 2010; Goyal y Mathur, 2011).

El extracto acuoso de caléndula ha mostrado tener actividad antitumoral al inhibir el crecimiento *in vitro* de diversas líneas de células tumorales y la activación de

linfocitos. Esto es debido a que induce la detención del ciclo celular y la apoptosis (Heping *et al.*, 2013).

#### **2.1.4. Compuestos químicos en caléndula**

##### **Flavonoides**

Raal y Kirsipuu (2011) reportaron en caléndula un contenido de flavonoides totales de 0.21 a 0.68 % en diferentes variedades. Se han identificado por lo menos 22 tipos de flavonoides en las flores (Lara y Márquez, 1996); los más investigados son quercetina, isoramnetina, isoquercetina, glucósidos de isoramnetina, narcisina, calendoflasido, calendoflavósido, kaempferol, rutinósido y rutósido (Komissarenko *et al.*, 1988; Kurkin y Sharova, 2007).

##### **Carotenoides**

El contenido de carotenoides totales puede variar de 0.048 a 2.78 mg g<sup>-1</sup> en flores de caléndula (Pintea *et al.*, 2003). Se han reportado al menos 19 tipos de estos compuestos (Cuadro 2.2). Los carotenoides en caléndula están conformados por dos grupos que se diferencian en su composición de 5-cis carotenoides y cis-to trans, con evidencias de que el color anaranjado en los capítulos está influenciado por la posición 5-cis, que corresponde a (5Z, 9Z)-licopeno, (5Z,9Z,5'Z)-licopeno, (5'Z)-Y-caroteno, (5'Z)- rubixantina y a (5'Z,9'Z)-rubixantina.

**Cuadro 2. 2.** Porcentajes de carotenoides en inflorescencias de caléndula (Adaptado de Kishimoto *et al.*, 2005).

Carotenoide	Carotenoides totales (%)
(8'R)- Luteoxantina	11.0
Luteina-5,6-epoxido	1.6
Flavoxantina	28.5
(8R,8'R)-Auroxantina	7.1
(9'Z)- Luteina-5,6-epoxido	5.0
Luteina	2.0
Antheraxantina	1.0
(9Z)-Luteina	0.6
(5'Z, 9'Z)- Rubixantina (5)	4.0
$\alpha$ -Caroteno	0.8
$\beta$ - Caroteno	3.4
(5'Z)- Rubixantina (6)	3.0
$\delta$ - Caroteno	1.4
(5Z,9z,5'Z, 9'Z)- Licopeno (3)	4.1
$\gamma$ - Caroteno	2.0
(5'Z)- $\gamma$ - Caroteno (4)	4.4
(5Z,9Z,5'Z)- Licopeno (2)	3.5
(5Z,9Z)-Lycopeno (1)	4.1
(all-E)- Lycopeno	8.7

## Terpenoides

Se han identificado ocho terpenoides pentacíclicos en capítulos florales de caléndula: faradiol-3-*o*-palmitato, faradiol-3-*o*-miristato, faradiol-3-*o*-laurato, arnidiol-3-*o*-palmitato, arnidiol-3-*o*-miristato, arnidiol-3-*o*-laurato, calenduladiol-3-*o*-palmitato y calenduladiol-3-*o*-miristato (Neukirch *et al.*, 2004).

También se han identificado triterpenos alcohólicos como arnidiol, faradiol  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, ácido faradiol-3-mirístico, lupeol, taxasterol, ácido faradiol-3-palmítico, calenduladiol, faradiol-3-*o*-laurato, arnidiol-3-*o*-palmítico, arnidiol-3-*o*-mirístico, arnidiol-3-*o*-laurato, calenduladiol-3-*o*-palmitato y calenduladiol-3-*o*-mirístico (Hamburger *et al.*, 2003).

## Aceites esenciales

Se han reportado rendimientos de 0.03 a 0.09 % en hojas y flores de caléndula, con alrededor de 30 tipos pertenecientes a los sesquiterpenoides y monoterpenos.

En las hojas los principales compuestos son  $\alpha$  – tujeno,  $\delta$  – cadineno, 1,8-cineol,  $\gamma$  – terpenene,  $\delta$  – cadineno,  $\beta$  – pineno y  $\alpha$  – tujeno. El aceite esencial de las flores está integrado principalmente por  $\alpha$  – tujeno,  $\delta$  – cadineno y  $\delta$  – cadineno (Okoh *et al.*, 2008).

### 2.1.5. Cultivo de caléndula

#### Siembra y trasplante

La producción de caléndula puede realizarse en campo o bajo invernadero, por siembra directa o por trasplante.

La siembra directa se puede realizar de forma mateada o a chorrillo, lo que requiere un aclareo posterior para evitar la competencia excesiva entre plantas que puede afectar los rendimientos. El establecimiento del cultivo por trasplante, requiere que la siembra se haga en charolas con diferentes cavidades, las cuales pueden ser de plástico o unicel, pero previamente desinfectadas (Figura 2.7.). Cuando la planta tiene un tamaño adecuado, de 10 a 15 cm, se trasplanta a campo (Palma *et al.*, 2007).



**Figura 2. 7.** Almacigo de caléndula en charola de unicel de 112 cavidades.

Se recomienda que la distancia entre surcos sea de 70 a 85 cm y entre plantas 30 a 35 cm para obtener una densidad mayor de 35, 000 plantas ha<sup>-1</sup>. Este diseño se recomienda para lugares de producción bajo temporal y a una hilera, a diferencia de la plantación a tresbolillo (en triángulo) que requiere una separación entre surcos de 100 a 120 cm y entre plantas de 40 a 45 cm, para obtener una densidad aproximada de 55,500 plantas por hectárea. Este último diseño es el que se recomienda más para la producción intensiva bajo invernadero (Palma *et al.*, 2007).

### Labores de cultivo

Los cuidados más frecuentes a tener en cuenta son el riego, la eliminación de malezas y el control de plagas y enfermedades.

Durante su desarrollo en campo el cultivo necesita dos deshierbes y dos aporques. El primer deshierbe se debe realizar a los 20-25 días después de la germinación, y el segundo un mes después. Durante el periodo de floración deben hacerse aporques para disminuir la compactación del suelo y facilitar su aireación (Acosta *et al.*, 2001).

Con respecto a la fertilización, Acosta *et al.* (2001) recomiendan el uso de abonos orgánicos cuando el cultivo se establece en terrenos pobres en materia orgánica, o la combinación de éstos con dosis bajas de fertilizante mineral. Muñoz (1987) menciona que si el terreno es pobre en materia orgánica, un mes antes de la siembra se deben aplicar unas 20 a 30 t ha<sup>-1</sup> de estiércol mineralizado. La fertilización mineral puede variar dependiendo de las necesidades de las plantas.



**Figura 2. 8.** Fertilización mineral de caléndula.

En la siembra en almácigo los riegos se deben aplicar diariamente con regadera fina hasta la emergencia total, cuando las plantas tengan aproximadamente 5 cm la frecuencia de riego se reduce a días alternos. En siembra directa los riegos son diarios y ligeros hasta la germinación completa; a medida que crece el sistema radical y la parte aérea de la planta los riegos se reducen a 2 o 3 veces por semana, pero cada uno de mayor intensidad. Después de esta etapa inicial con plantas jóvenes, los riegos pueden ser cada 15 días o después de cada recolección de flores (Acosta *et al.*, 2001).

### **Plagas y enfermedades**

#### **Pulgones (*Myzys persicae*)**

Esta plaga se presenta, principalmente, en la etapa de floración y afecta los tallos florales. Se alimentan de la savia de la planta y pueden contagiarla de virus. Es una plaga que no causa pérdidas económicas y se puede controlar con insecticidas como Bioinsect ® en dosis de 1 mL L<sup>-1</sup> de agua, pero para plantas destinadas al uso medicinal lo recomendable es el control biológico mediante insectos como *Chrysopa* (Palma *et al.*, 2007).

#### **Gusanos**

Pueden presentarse en las últimas etapas de desarrollo de la cáldula. Son insectos que se alimenta de hojas y tallos, aunque generalmente no representan pérdidas significativas en la producción. Su control se hace con insecticidas orgánicos (Palma *et al.*, 2007).

#### **Minadores (*Liromiza* sp.)**

Estos insectos se alimentan de las hojas y tallos principalmente, en donde hacen galerías para poder alimentarse de la savia de la planta, su control es preventivo; sin embargo, si se presenta el problema pueden aplicarse insecticidas orgánicos como Controlsan o Protek (Palma *et al.*, 2007).

## Hongos

*Oidium* sp. puede causar manchas blancas y algodonosas en las hojas o tallos de la planta. También puede presentarse alternaria (*Alternaria solani*) cuyos síntomas principales se identifican por la presencia de manchas angulares o concéntricas de color café en las hojas, las que después se marchitan (Palma *et al.*, 2007).

## Cosecha de capítulos florales

La cosecha de capítulos florales se hace cuando la inflorescencia está en floración plena (Muñoz, 1987). El corte se hace en el pedúnculo (de 2 a 3 cm), en forma manual y escalonada, es decir, a medida que las flores abren por completo. La cosecha se efectúa cuando el cultivo alcanza 10 % de floración, lo cual ocurre aproximadamente a los 70 días de realizada la siembra directa, o a los 45 días del trasplante, y por lo general se presenta de mediados de junio a mediados de julio (Acosta *et al.*, 2001).

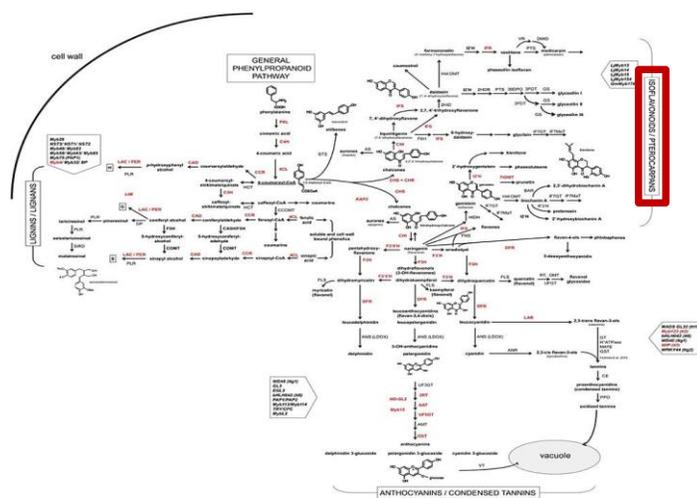
## Número de cortes y rendimiento

Los rendimientos varían dependiendo del lugar y manejo del cultivo. En Alemania se han reportado cortes durante 60 a 70 días con un rendimiento promedio de capítulos secos de 1,200 a 2,000 kg ha<sup>-1</sup>, resultado que se atribuye a siembra se efectuada en el mes de junio que favorece la floración temprana, lo que hace posible estimular la inducción de nuevas flores y obtener un mayor número de cortes (Berti *et al.*, 2003). En Chile han documentado cortes durante 142 días, con un rendimiento acumulado de 3685 kg ha<sup>-1</sup> de capítulos secos (Berti *et al.*, 2003). En Cuba se han realizado de 10 a 12 cortes de capítulos y obtenido un rendimiento de 1.3-2.0 t ha<sup>-1</sup> (Acosta *et al.*, 2001).

## 2.2. Flavonoides en las plantas

Las plantas producen pigmentos de color, y entre los principales están los flavonoides, que son compuestos fenólicos que se encuentran en plantas, semillas y frutos, y de los que se han identificado más de 5000 diferentes (Martínez *et al.*, 2002). Son compuestos derivados de los fenil propanoides (Vogt, 2010), una vía ramificada que produce color y diversidad de compuestos como flavonoles, antocianinas y los flobafenos poliméricos y proantocianidinas (Koes *et al.*, 2005).

La ruta de biosíntesis de los fenil propanoides inicia con el ácido shikímico, que es el camino biosintético principal de compuestos aromáticos (Razal *et al.*, 1996). La vía central en la síntesis de fenil propanoides consta de tres pasos: desaminación de fenilalanina con formación de ácido trans-cinámico (catalizada por la fenilalanina amonioliasa (PAL), la hidroxilación de cinamato con formación de ácido p-cumárico (ácido 4-cumárico), catalizada por cinamato 4-hidroxilasa (C4H), y la formación dependiente de ATP de la CoA tioéster 4-cumaroil CoA (p-cumaroil CoA), catalizada por 4-cumarato: CoA ligasa (4CL). Este compuesto es el sustrato para varias ramas de la vía que conduce a la biosíntesis de flavonoides, antocianinas e isoflavonoides (Figura 2.7).



**Figura 2. 9.** Biosíntesis de los fenil propanoides (Tomado de: Reinprecht *et al.*, 2013). Para ampliar la figura seguir el link [aquí](#).

Se estima que una persona consume en promedio 23 mg de flavonoides al día, y que esas sustancias hacen una multitud de funciones biológicas. En la planta, los flavonoides la protegen de los daños causados por los rayos ultravioleta (Middleton y Teramura, 1993), y también participan en la pigmentación de algunos frutos durante su madurez (Kanijiro *et al.*, 1992), en la protección contra la luz UV y fitopatógenos (como fitoalexinas), en la señalización durante la nodulación, en la fertilidad masculina, y en el transporte de auxinas. Desde hace tiempo se ha planteado la posibilidad de que la coloración de las flores es una señal visual para atraer animales polinizadores.

Las agliconas flavonas y flavonoles contribuyen a la pigmentación de flores, con tonalidades diversas, desde blancas marfil o crema a colores anaranjados, escarlatas y azules (Cartaya y Reynaldo, 2001). Las flavonas pueden inhibir la respiración mitocondrial (Valdameri *et al.*, 2010) y participan en la adaptación de las plantas al estrés ya que pueden acumularse como reservorios de fitoalexinas, como forma de defensa (Zhang *et al.*, 2007).

### **2.3. Carotenoides en las plantas**

Los carotenoides son pigmentos con 40 átomos de carbono que pueden contener hasta 15 enlaces dobles conjugados (Hirschberg, 2001). Son compuestos derivados biosintéticamente a partir de dos unidades de geranil pirofosfato (Figura 2.10), y en su mayoría son solubles en solventes apolares y de coloraciones que oscilan entre el amarillo y el rojo. Aunque existen cientos de estructuras de carotenoides en la naturaleza, se pueden agrupar en dos clases principales: los carotenos (hidrocarburos) y las xantofilas (derivados oxigenados de carotenos); ambos son abundantes en los centros de reacción de los dos fotosistemas en las tilacoides, donde participan como antenas captadoras de luz de los cloroplastos y son capaces de transferir energía a las clorofilas.



## 2.4. Descripción varietal

Una descripción varietal se define como el informe técnico mediante el cual se especifican los rasgos (caracteres) pertinentes de la variedad vegetal, conforme a su guía específica, y que permite evaluar la identidad genética mediante una caracterización integrada constituida por el conjunto de observaciones que distinguen a una población de plantas de una variedad vegetal (Bourgoin y Lallemand, 1993).

Dicha caracterización es necesaria para efectuar depuraciones en diferentes fases de crecimiento, y permite distinguir y caracterizar a una población de plantas que constituyen una variedad (Muñoz, 1983).

La caracterización varietal, la certificación y la protección de variedades, se establecen mediante una serie de descriptores morfológicos, químicos y fisiológicos, llamados descriptores varietales. Esto permite el cumplimiento de los requisitos de los ensayos de distinción, homogeneidad y estabilidad (DHE), para el registro de nuevas variedades por la Unión Internacional para la Protección de Nuevas Variedades, UPOV (<http://www.upov.int/portal/index.html.en>).

## 2.5. Literatura citada

Ao, C. 2007. Comparative anatomy of bisexual and female florets, embryology in *Calendula officinalis* (Asteraceae), a naturalized horticultural plant *Scientia Horticulturae* 114:214–219.

Bashir, S., K. H. Janbaz, Q. A. Jabeen and H. Gilani. 2006. Studies on spasmogenic and spasmolytic activities of *Calendula officinalis* flowers. *Phytotherapy Research* 20:906-910.

Cartaya, O. y I. Reynaldo. 2001. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Reseña bibliográfica. Cultivos Tropicales* 22:5-14.

Chakraborty, G. S. 2009. Antioxidant activity of the successive extracts of *Calendula officinalis* leaves. *Asian Journal of Chemistry* 21:4957–4959.

Della, L.R., A. Tubaro, S. Sosa, H. Becker, S. Saar, O. Isaac. 1994. The role of triterpenoids in topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Medica* 60:516- 520.

Gesch, R. W. 2013. Growth and yield response of calendula (*Calendula officinalis*) to sowing date in the northern US. *Industrial Crops and Products*. 45: 248-252.

Goyal, G. and R. Mathur. 2011. Antimicrobial effects of *Calendula officinalis* against human pathogenic microorganisms. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology* 5:97-101.

Hamburger, M., S. Adler, D. Baumann, A. Förg and B. Weinreich. 2003. Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis* L.). *Fitoterapia* 74:328-338.

Heping, C., F. Cao, T. Klasson. 2013. Characterization of reference gene expression in Tung tree. *Industrial Crops and Products* 50: 248-255.

Ibrahim, Z., Z. Dimitrova, S. Georgiev, V. Madzharov and S. Titeva. 2010. Use of cosmetic products containing extract of marigold (*Calendula officinalis*) in cases of acne problem at the educational and beauty center “top beauty”- sofia. *Trakia Journal of Sciences* 8:353-357.

Hirschberg, J. 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Plant Biology*: 210-218.

Jiménez-Medina, E., A. Garcia-Lora, L. Paco, I. Algarra, A. Collado and F. Garrido. 2006. A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *BMC Cancer* 6:119-133.

Karadas, F., E. Grammenidis, F. Surai, T. Acamovic, N. Sparks. 2006. Effects of carotenoids from lucerne, marigold and tomato on egg yolk pigmentation and carotenoid composition. *British Poultry Science* 47:561–566.

Khalid, K. A. and J. S. Teixeira. 2012. Biology of *Calendula officinalis* Linn focus on pharmacology, biological activities and agronomic practices. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* 6:12–27.

Khan, M. U., A. Rohilla, D. Bhatt, S. Afrin, S. Rohilla, S. Ansari. 2011. Review article diverse belongings of *Calendula officinalis*. *An Overview* 3:173-177.

Kishimoto, S., T. Maoka, K. Sumitomo, A. Ohmiya. 2005. Analysis of carotenoid composition in petals of calendula (*Calendula officinalis* L.). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 69:2122-2128.

Koes, R., W. Verweij, F. Quattrocchio. 2005. Flavonoids: A colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Plant Model Systems*. 10:236- 241.

Komissarenko, N.Y., V. T. Chernobai, A. I. Derkach. 1989. Flavonoids of inflorescences of *Calendula officinalis*. *Chemistry of natural compounds* 6:675-680.

Kunijiro, Y., I. Neruyuki, T. Fuleki, S. Nakamura. 1992. Effect of anthocyanin, flavonol co-pigmentation and pH on the color of the berries of *Ampelopsis brevipedunculata*. *Plant Physiology* 139:513-518.

Kurkin, V. A. and V. Sharova O. 2007. Flavonoids from *Calendula officinalis* flowers. *Chemistry of Natural Compounds* 43:179–180.

Lara, O. F. y C. A. Márquez. 1996. Plantas medicinales en México Composición, usos y actividad biológica. UNAM México D.F. pág. 68-78.

Martínez, F. S., J. G. González, J. M. Culebras, J. M. Tuñón. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. 6:271-278.

Middleton, M.E. and H. A. Teramura.1993. The role of flavonol glycosides and carotenoids in protecting soybean from ultraviolet-B damage. *Plant Physiology* 103:741-752.

Muley, B. P., S. S. Khadabadi, B. N. Banarase, G. College, K. Naka, M. State. 2009. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *calendula officinalis* linn (asteraceae): a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 8:455-465.

Neukirch, H., M. D'Ambrosio, J. V. Dalla, A. Guerriero. 2004. Simultaneous quantitative determination of eight triterpenoid monoesters from flowers of 10 varieties of *Calendula officinalis* L. and characterisation of a new triterpenoid monoester. *Phytochemical Analysis* 15:30-35.

Okoh, O. O., A. P. Sadimenko, O. T. Asekun, A. J. Afolayan. 2008. The effects of drying on the chemical components of essential oils of *Calendula officinalis* L. *African Journal of Biotechnology* 7:1500–1502.

Pintea, A., C. Bele, S. Andrei, C. Socaciu. 2003. HPLC analysis of carotenoids in four varieties of *Calendula officinalis* L. flowers. *Acta Biologica Szegediensis* 47:37-40.

Pommier, P., F. Gomez, M. Sunyach. 2004. Phase III randomized trial of *Calendula Officinalis* compared with trolamine for the prevention of acute dermatitis during irradiation for breast cancer. *Journal Clinical Oncological*. 22:1447-1453.

Preethi, K. C., G. Kuttan, R. Kuttan. 2006. Antioxidant potential of an extract of *Calendula officinalis* flowers in vitro and in vivo . *Pharmaceutical Biology* 44:691-697.

Raal, A., and K. Kirsipuu. 2011. Total flavonoid content in varieties of *Calendula officinalis* L. originating from different countries and cultivated in Estonia. *Natural Product Research* 25, 658–62.

Razal, R. A., S. Ellis, S. Singh, N. G. Lewis, G. H. Towers.1996. Nitrogen recycling in phenylpropanoid metabolism. *Phytochemistry* 41:31–35.

Reinprecht, Y., Yadegari Z., E. Perry G., Siddiqua M., C. Wright L., E. McClean P. and P. Pauls K. 2013. In silico comparison of genomic regions containing genes coding for enzymes and transcription factors for the phenylpropanoid pathway in *Phaseolus vulgaris* L. and *Glycine max* L. Merr. *Frontiers in plant science* 4:317.

Reinprecht, Y., Z. Yadegari, G. E. Perry, M. Siddiqua, L.C. Wright, P.E. McClean, K. P. Pauls. 2013. In silico comparison of genomic regions containing genes coding for enzymes and transcription factors for the phenylpropanoid pathway in *Phaseolus vulgaris* L. and *Glycine max* L. Merr. *Frontiers in plant science* 4:317.

Rosete, J., J. A. Castillo, M. J. Rosete. 2013. Hierbas aromáticas y medicinales en México: Tradición e innovación. *Bio Ciencias* 52:119-129.

Rozenn, J., F. Forcella, D. Peterson, J. Eklund. 2013. Planting depth for oilseed calendula. *Industrial Crops and Products*. 42:133-136.

Ruiz-Sola, M. Á. and M. Rodríguez-Concepción. 2012. Carotenoid biosynthesis in *Arabidopsis*: a colorful pathway. *American Society of Plant Biologists* 10:2–28.

Safdar, W., H. Majeed, I. Naveed, K. W. Kayani, H. Ahmed, S. Hussain, A. Kamal . 2010. Pharmacognostical study of the medicinal plant *Calendula officinalis* L. (family compositae). *International Journal of Cell & Molecular Biology* 1:108–116.

Valdameri, G., T. Herrerias, E. G. Carnieri, S. M. Cadena, C. R. Martinez and M. E. Rocha. 2010. Importance of the core structure of flavones in promoting inhibition of the mitochondrial respiratory chain. *Chemical Biology Interaction* 1:52-58.

Victoria, J.T., C. C. Bonilla, O. M. Sanchez. 2007. Morfo anatomía y efecto del secado en la germinación de semillas de caléndula y eneldo. *Acta Agronómica*. 56:61-68.

Vogt, T. 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant* 3:2-20.

Wilen, R. W., B. Barl, E. A. Slinkard. 2004. Feasibility of cultivation calendula as a dual purpose industrial oilseed and medicinal crop. *Acta Horticulture* 629:199-206.

Yoshikawa, M., T. Murakami, A. Kishi. 2001. Medical flowers III. Marigold: hipoglycemic, gastric emptying inhibitory and gastroprotective principles and new oleanane-type triterpene oligoglycosides, calendosaponins A, B, C and D from Egiptian *Calendula officinalis*. *Chemical Pharmaceutical Bull.* 49: 863-870.

Zhang J., S. Subramanian, Y. Zhang, O. Yu. 2007. Flavone synthase from *Medicago truncatula* are flavanone-2-hydroxylases and important for nodulation. *Plant Physiology* 144:741-751.

### 3. RENDIMIENTO Y DIVERSIDAD FLORAL DE CALÉNDULA

#### (*Calendula officinalis* L.)

Mariana Palma-Tenango<sup>1</sup>, Víctor A. González-Hernández<sup>1</sup>, R. Marcos Soto-Hernández<sup>2</sup>, Cecilia B. Peña-Valdivia<sup>2</sup>, Alfredo Carrillo-Salazar<sup>2</sup> Aquiles Carballo-Carballo<sup>3</sup> y Manuel Jiménez-Vasquez<sup>4</sup>

Coordinaciones Académicas de <sup>1</sup>Fisiología Vegetal, <sup>2</sup>Botánica, <sup>3</sup>Semillas, <sup>4</sup>Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

Autores de correspondencia: [vagh@colpos.mx](mailto:vagh@colpos.mx) [anairam@colpos.mx](mailto:anairam@colpos.mx)

#### RESUMEN

Caléndula (*Calendula officinalis* L.) es una planta herbácea anual de la familia Asteraceae, originaria del Mediterráneo, que destaca por los usos medicinales de sus capítulos (flores). En esta especie se ha demostrado diversidad genética y de composición química entre variedades, pero en México no se ha investigado la variación en el rendimiento en función de la variedad y de cortes, como es el efecto causado por cosechas continuas de los capítulos florales. El objetivo de este estudio fue determinar los rendimientos, en promedio por corte y acumulado a lo largo de la estación, en seis variedades de caléndula aquí seleccionadas, cuyos capítulos fueron cosechados a lo largo de siete cortes en 2010 y de nueve cortes en 2011, de plantas cultivadas en campo en el Valle de México. Los capítulos recolectados se secaron a 40 ° C por 48 h y los rendimientos se expresaron en kilogramos por hectárea (kg ha<sup>-1</sup>). Los datos se sometieron a análisis de varianza conforme a un diseño experimental bloques completos al azar con arreglo factorial 6 x 7 (2010) y 6 x 9 (2011), con dos repeticiones. Las medias se compararon con la prueba de Tukey. Se encontraron diferencias ( $P \leq 0.05$ ) entre variedades y entre cortes, pero su interacción no fue significativa. La variedad V4 produjo el mayor rendimiento promedio en los dos ciclos de cultivo. Las primeras tres o cuatro fechas de corte dieron rendimientos bajos (< 200 kg MS ha<sup>-1</sup>), pero son indispensables de hacer para llegar a los siguientes cortes que rinden entre 350 y 600 kg MS ha<sup>-1</sup> en cada corte. En magnitud de efectos, el factor ambiental asociado con fechas de corte superó al genético asociado con variedades.

**Palabras clave:** *Calendula officinalis*, rendimiento, variedades, cosechas sucesivas.

## ABSTRACT

Pot marigold (*Calendula officinalis* L.) is an annual herb native to the Mediterranean region. This plant species of the Asteraceae family, outstands by the medicinal uses of its capitulum (flowers). This species has shown genetic and chemical composition diversity among varieties, but in México the effects of variety and successive flower harvests has not been investigated. The aim of this study was to determine the flower yield, both average per harvest and accumulated through the season, in six varieties of pot marigold harvested along seven flower harvests in 2010 and nine harvests in 2011, when grown under field conditions at the Valley of México. The collected capitulum were dried at 40 °C for 48 h and then weighed, and the corresponding yields were expressed per hectare (kg DM ha<sup>-1</sup>). Data were subjected to analysis of variance according to a randomized complete block design with factorial arrangement 6 x 7 (2010) and 6 x 9 (2011), with two replications, and the means were compared with the Tukey test. Differences ( $P \leq 0.05$ ) between varieties and harvests were found, but not in their interaction. Variety V4 produced the higher yield in the two growing cycles. The first three or four harvest dates rendered low yields (< 200 kg DM ha<sup>-1</sup>), but these initial cuts are essential in order to reach the following harvests which may yield between 350 and 600 kg DM ha<sup>-1</sup> per cut. Considering the magnitude of effects on flower yield, the environmental factor associated to successive flower harvests was higher than the genetic factor associated to varieties.

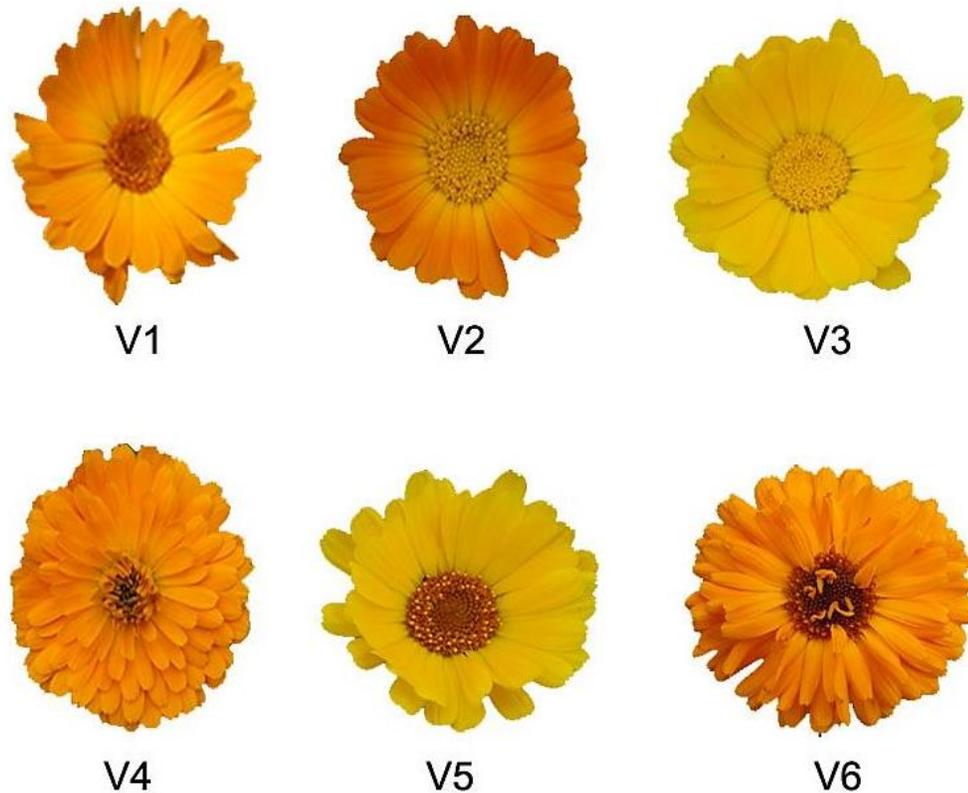
**Index words:** *Calendula officinalis*, varieties, successive harvests, yield.

### 3.1. INTRODUCCIÓN

Caléndula (*Calendula officinalis* L.) es una planta herbácea anual de la familia Asteraceae, originaria de la región del Mediterráneo (Vârban *et al.*, 2008), de donde se ha extendido a muchos países. El órgano de mayor uso es el capítulo floral utilizado para fines ornamentales, medicinales, cosméticos y alimenticios (Wilén *et al.*, 2004; Safdar *et al.*, 2009; Andersen *et al.*, 2011).

Existen diferentes variedades que se comercializan en el mundo, plantadas ampliamente en jardines por el popular y diverso color en sus flores (Bayat *et al.*, 2012). Además, sus capítulos florales son ampliamente usados y conocidos por la diversidad de compuestos químicos que poseen y por sus actividades terapéuticas; entre estos compuestos están: flavonoides (Kurkin y Sharova, 2007), carotenoides (Kishimoto *et al.*, 2005), terpenoides (Neukirch *et al.*, 2004), aceites esenciales (Kaškonienė *et al.*, 2011), taninos, cumarinas, carbohidratos y ácidos grasos (Muley *et al.*, 2009).

No obstante, las variedades de caléndula no han sido debidamente descritas y certificadas de modo que se desconoce cómo conseguirlas de manera formal. Por otro lado, en una variedad de caléndula que se cultiva comercialmente en Ozumba, Edo. de México, Palma *et al.* (2007) encontraron que no es homogénea sino que está compuesta de una gama amplia de plantas con características florales diversas, lo que les permitió seleccionar a seis variedades contrastantes en tamaño, forma de capítulo y color de sus flores liguladas y tubulares, las cuales se ilustran en la Figura 3.1.



**Figura 3. 1.** Variedades de caléndula contrastantes en características florales, seleccionadas mediante selección masal a partir de una variedad comercial heterogénea.

Debido a la demanda amplia de capítulos de esta planta, en algunos países se trabaja constantemente para incrementar su rendimiento mediante selección de genotipos, y realizando ensayos para optimizar su manejo agronómico, usando densidades de población, fechas de siembra y formas de fertilización (Berti *et al.*, 2003; Ganjali *et al.*, 2010).

Los rendimientos de caléndula pueden variar considerablemente debido en gran medida a una serie de factores que afectan su crecimiento y desarrollo floral; tales como latitud, época del año, manejo del cultivo, calidad de la semilla (Coradini *et al.*, 2011), calidad del suelo (Vârban *et al.*, 2008) y otros factores. Sin embargo, en México no se ha documentado el efecto del manejo en su rendimiento.

La caléndula puede generar nuevos capítulos florales cuando se cosechan los ya formados (Berti *et al.*, 2003). Esta capacidad permite hacer varios cortes de capítulos y prolongar así la cosecha. Acerca del estado de desarrollo floral (Figura 3.2.) más conveniente para cosechar capítulos, Palma (2009) reporto que el mejor para obtener el peso seco mayor de capítulos en una planta es el de floración plena, que se distingue porque las flores liguladas han abierto completamente y dejan ver todas las flores tubulares; antes y después de esta etapa los capítulos pesan menos y tienen menor concentración de flavonoides totales.



**Figura 3. 2.** Etapas del desarrollo floral de caléndula (adaptado de Palma, 2009).

Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar el rendimiento de seis variedades de caléndula cultivadas en el Valle de México y cosechadas en cortes sucesivos de capítulos, durante dos ciclos de producción.

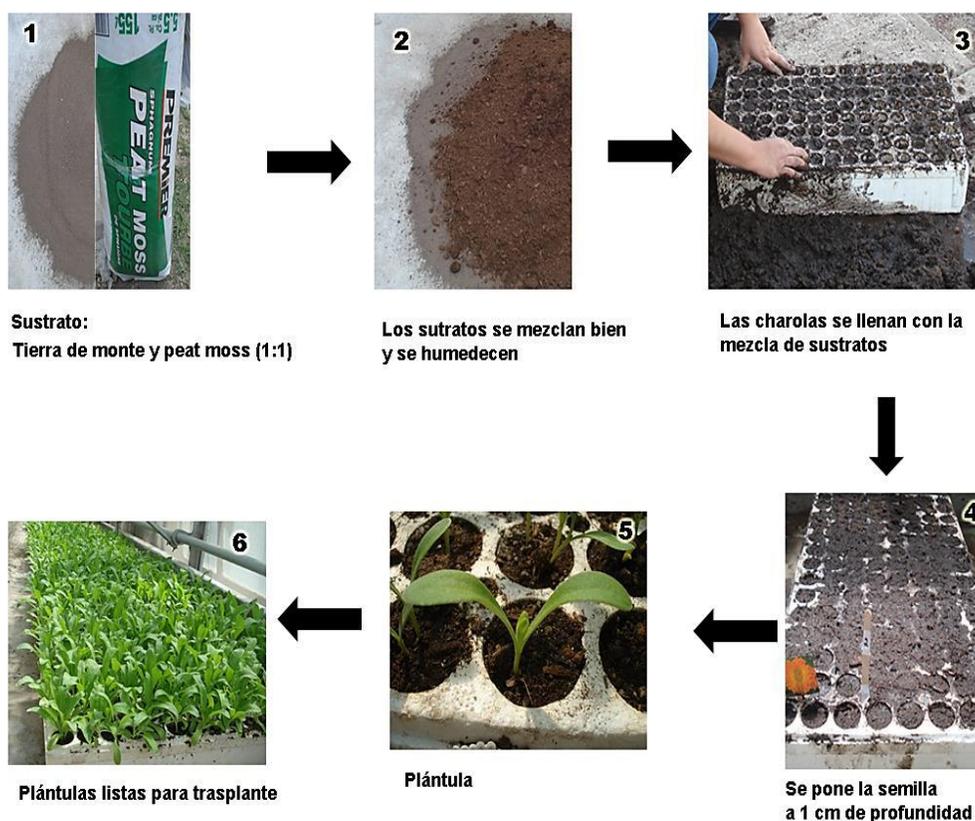
### 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### Origen de las seis variedades

El germoplasma fue colectado en cultivos del municipio de Ozumba, Estado de México (19°41'N, 98°45' W y altitud de 2365 m); mismo que se cultivó en dos años consecutivos 2008 y 2009, y posteriormente se hizo la selección de tipos de plantas contrastantes en sus características florales, las cuales se denominaron variedades y se ilustran en la Figura 3.1 Estas seis variedades se cultivaron en campo durante dos ciclos de producción (2010 y 2011), en Texcoco, Estado de México (19°29' N, 98°54' W y altitud de 2250 m).

#### Manejo agronómico

La siembra en almácigo en ambos años se hizo en condiciones de invernadero; las fechas del primero y segundo ciclo fueron el 23 de abril del 2010 y 3 de mayo del 2011. En la Figura 3.3 se ilustran las diferentes fases de manejo en vivero.



**Figura 3. 3.** Fases del manejo de caléndula en almácigo.

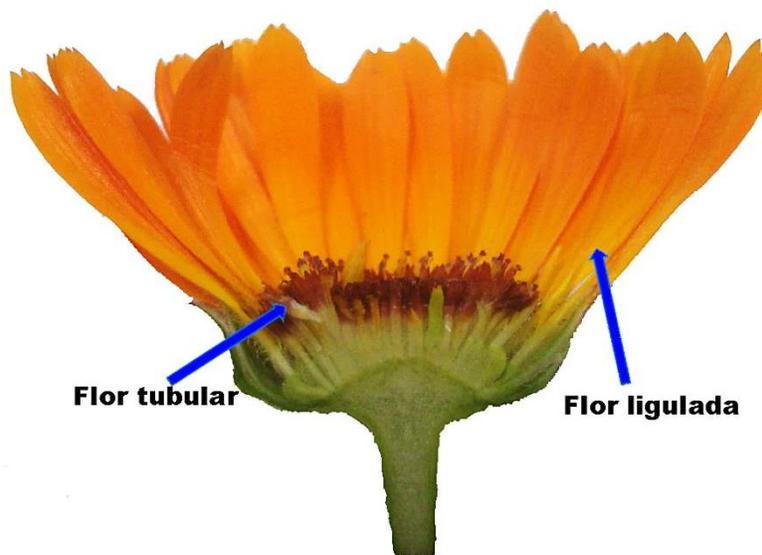
La siembra en almácigo en ambos años se hizo en condiciones de invernadero; las fechas del primero y segundo ciclo fueron el 23 de abril del 2010 y 3 de mayo del 2011. Durante su desarrollo las plántulas se fertilizaron dos veces con la fórmula comercial 12N-16P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-12K<sub>2</sub>O (PCH® Healthy Start®), aplicada en solución de 0.208 g L<sup>-1</sup> de agua. Cuando las plántulas alcanzaron una altura promedio de 10 cm se trasladaron a campo, lo cual ocurrió a los 48 días después de la siembra en 2010, y a los 38 días en 2011. El trasplante al campo se hizo en suelo húmedo en un lote de 1000 m<sup>2</sup>, con surcos de 80 cm de anchura y con una separación de 50 cm entre plantas, para obtener una densidad de población de 40,000 plantas por ha<sup>-1</sup>. Cada 15 d, hasta el final del ciclo, se aplicó un riego por gravedad, con excepción del periodo de lluvias.

Para el control de pulgones (*Aphis* spp.), de trips transmisores de enfermedades, y de gusanos (*Aphis* spp.) que se alimentaban de los capítulos (Figura 3.4), se hicieron cuatro aplicaciones con el insecticida Bug Clean<sup>®</sup> a una dosis de 2 mL L<sup>-1</sup>.



**Figura 3. 4.** Plagas en caléndula e insecticida orgánico aplicado. 1) Gusano (*Spodoptera* spp.); 2) Pulgón (*Aphis* spp.); y 3) Plaguicida orgánico.

En este estudio manualmente se hicieron cortes, periódicos de capítulos, cada 6 a 8 d, de cada variedad, a partir de los 50 a 60 d después del trasplante, cuando los capítulos estaban en plena floración, hasta que la planta dejó de producirlos. Se obtuvieron siete cortes en 2010, y nueve en el 2011. Los capítulos cortados de cada muestra se desecaron en una estufa con recirculación de aire a 70 °C durante 48 h, y los capítulos secos se pesaron en una balanza analítica con precisión de 0.1 mg



**Figura 3. 5.** Capítulo de caléndula en plena floración, en el que se muestran sus dos tipos de flores individuales.

### **Variables medidas y análisis estadísticos**

Los datos de la biomasa seca promedio de cada corte y de cada variedad, así como de la biomasa acumulada a lo largo de todos los cortes en cada variedad, se sometieron a análisis de varianza conforme a un diseño experimental bloques completos al azar con arreglo factorial (6 variedades x 7 cortes en 2010, y 6 x 9 en 2011), con dos repeticiones en cada año, cuya unidad experimental fue una planta completa. La comparación de medias de rendimiento de capítulos por planta se hizo mediante la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). Los análisis estadísticos se hicieron con los paquetes SAS (SAS Institute, 2002) o InFostat (Di Rienzo *et al.*, 2013); al final los datos promedio por planta se transformaron a rendimiento por hectárea ( $\text{kg ha}^{-1}$ ).

### 3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Diferencias varietales y entre cosechas (cortes)

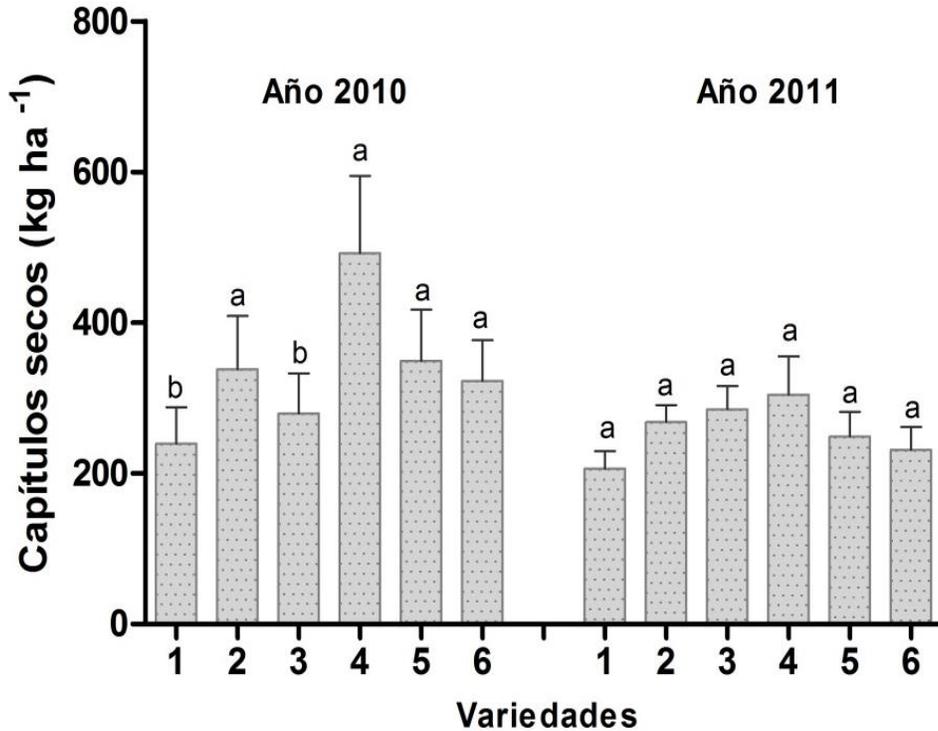
En ambos ciclos de cultivo, 2010 y 2011, se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ) en el rendimiento de capítulos secos entre cortes (en promedio de variedades) (Cuadro 3.1), mientras que entre variedades (en promedio de cortes) solamente hubo diferencias significativas en el 2010 ( $P = 0.0026$ ). La interacción entre variedades y cortes no fue significativa en ningún ciclo ( $P \leq 0.05$ ).

**Cuadro 3. 1.** Análisis de varianza del rendimiento de capítulos secos de seis variedades de caléndula, cosechados en cortes sucesivos (siete cortes en 2010, y 9 en 2011), Texcoco, Edo. de México.

2010						2011					
	FV	SC	gl	CM	F		P	SC	gl	CM	F
<b>Modelo</b>	5290224	41	129029	5.43	<0.0001	2016020	53	38038	2.72	0.0002	
<b>C</b>	4211143	6	701857	29.54	<0.0001	1261546	8	157693	11.28	<0.0001	
<b>Var</b>	521914	5	104382	4.39	0.0026	115270	5	230541	1.65	0.163	
<b>C x Var</b>	557167	30	18572	0.78	0.7575	639204	40	15980	1.14	0.3208	
<b>Error</b>	997736	42	23755			755200	54	13985			
<b>Total</b>	6287960	83				2771220	107				
$R^2 = 0.84$						$R^2 = 0.73$					

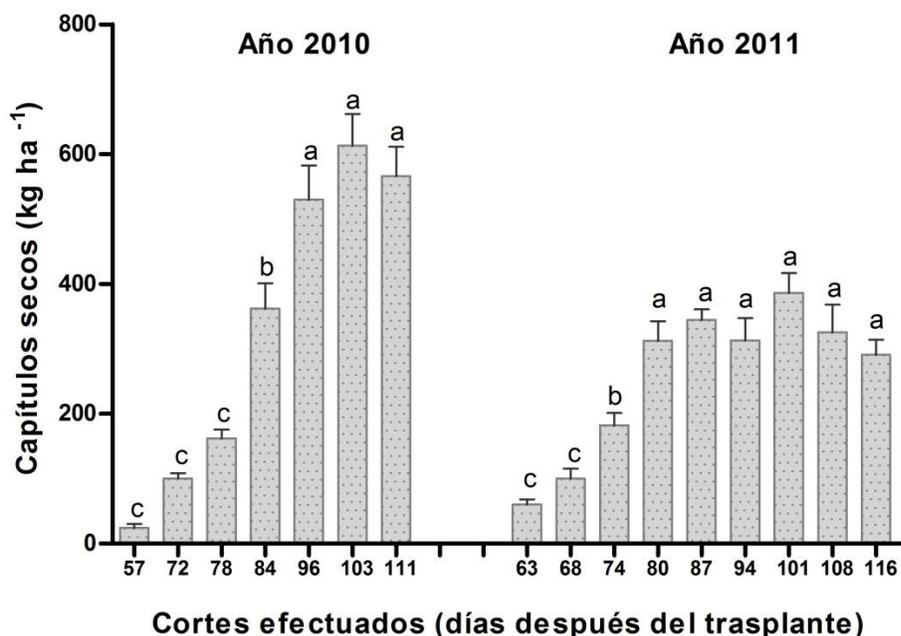
C: cortes; Var: variedad; gl: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios; F: F calculada; P: probabilidad.

En 2010, las variedades V2, V4, V5 y V6 superaron a V1 y V3 en el rendimiento promedio por corte ( $P = 0.05$ ), mientras que en 2011 no hubo diferencias varietales en esta variable (Figura 3.6).



**Figura 3. 6.** Rendimiento de capítulos secos (kg ha<sup>-1</sup>) de seis variedades de caléndula en promedio de siete cosechas sucesivas en 2010 (DMS = 194.8; n = 14) y de nueve en 2011 (DMS = 116.5; n = 18). Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). Las líneas verticales en cada columna, corresponden a las desviaciones estándar.

Los cortes con mayor rendimiento (promedio de las seis variedades), fueron los últimos tres en 2010 y los últimos seis en 2011 (Figura 3.7), ya que los primeros tres o cuatro cortes fueron los de menor producción de capítulos. También fue evidente que el rendimiento obtenido en 2010 fue superior al del 2011, aunque en este último se hayan podido hacer dos cortes más (nueve) que en el 2010 (siete).



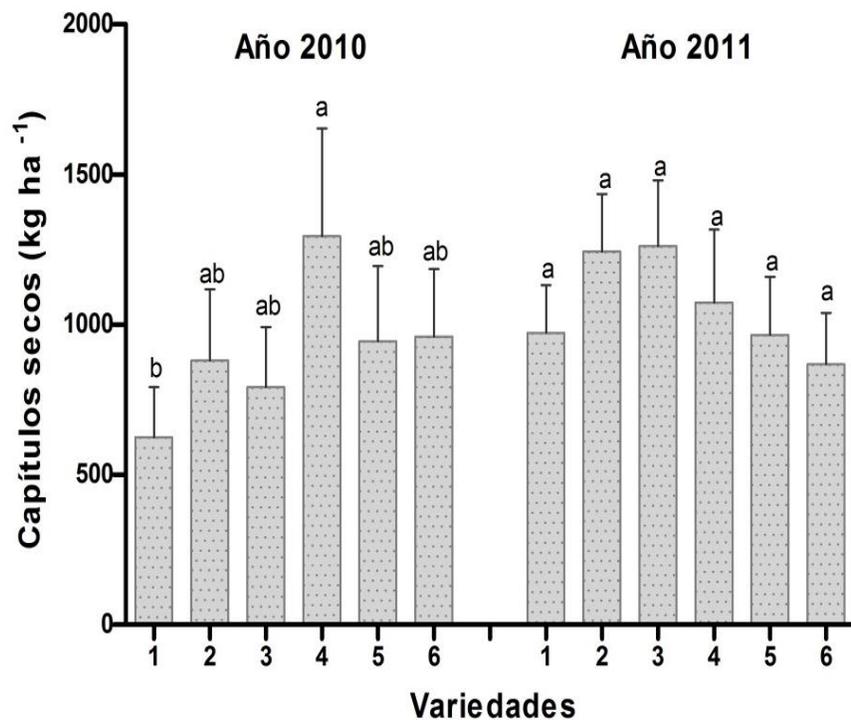
**Figura 3. 7.** Rendimiento por corte de capítulos secos ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) a través de siete cosechas para 2010 (DMS = 173.9) y nueve para 2011 (DMS = 155.9), en promedio de seis variedades de caléndula. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). Las líneas verticales en cada columna corresponden a las desviaciones estándar ( $n = 12$ ).

Estos datos de rendimiento por corte confirman la capacidad de caléndula para formar nuevos capítulos florales después de cada corte, capacidad que también fue documentada por Piccaglia *et al.* (1997) y Berti *et al.* (2003). Esta capacidad contribuye al aumento del rendimiento floral, probablemente debido a que la poda elimina temporalmente la dominancia del meristemo apical, como ocurre en frutales y otras especies (Álvarez *et al.*, 2013), que en caléndula estimula la brotación de yemas laterales que darán lugar a nuevas ramas en cuyos ápices se formará un nuevo capítulo floral (Rao y Ram, 1985).

En ambos años, el rendimiento tendió a decrecer en los últimos cortes (en el séptimo corte en 2010, y el octavo en 2011), lo cual podría deberse a que la tasa relativa de crecimiento de caléndula, tanto de la planta completa como de sus órganos individuales, decrece con la edad del cultivo, como previamente lo reportaron Palma *et al.* (2009).

## Rendimiento acumulado

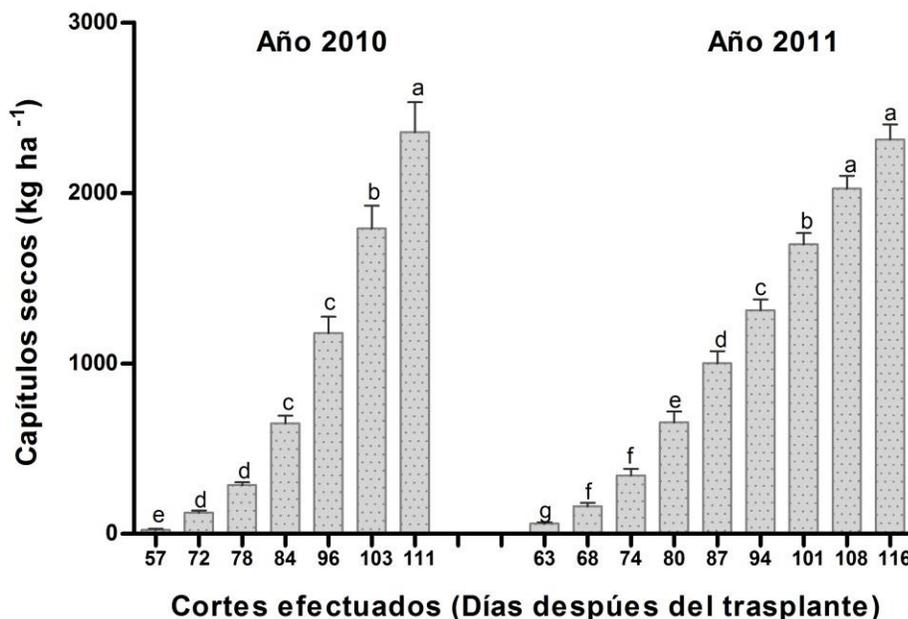
En cuanto al rendimiento acumulado por ciclo, que corresponde a la suma de todos los cortes efectuados en cada estación anual, las variedades mostraron diferencias significativas solamente en el año 2010 ( $P = 0.0099$ ), donde la V4 destacó por haber producido el mayor rendimiento acumulado (Figura 3.8). Por su parte, la variedad V3 tendió a producir el mayor rendimiento acumulado en 2011, pero sin diferencias significativas con las demás variedades. La interacción entre variedades y cortes no fue significativa en ambos ciclos ( $P > 0.05$ ).



**Figura 3. 8.** Rendimiento acumulado de capítulos secos ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) de seis variedades de caléndula en promedio de siete cosechas sucesivas en 2010 (DMS = 501.7;  $n = 14$ ) y de nueve en 2011 (DMS = 406.2;  $n = 18$ ). Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). Las líneas verticales en cada columna, corresponden a las desviaciones estándar.

La cinética de acumulación de biomasa asignada a capítulos de caléndula en cada año, para el promedio de las seis variedades evaluadas (Figura 3.9) permite ver que en ambos años el rendimiento acumulado aumentaba significativamente ( $P \leq 0.05$ ) conforme se hacían más cosechas de capítulos, pero solamente hasta el corte ocho, ya que el corte nueve del 2011 no produjo ganancia significativa. La cinética también

evidenció que para cosechar al menos 2000 kg ha<sup>-1</sup> de capítulos secos, es necesario hacer siete cortes sucesivos en un año con lluvia suficiente como la de 2010, u ocho cortes en un año con lluvia escasa como en 2011.



**Figura 3. 9.** Acumulación del rendimiento de capítulos secos (kg ha<sup>-1</sup>) a través de siete cosechas para 2010 (DMS = 561.9) y nueve para 2011 (DMS = 544.1), en promedio de seis variedades de caléndula. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). Las líneas verticales en cada columna corresponden a las desviaciones estándar (n = 12).

Como en este estudio se aplicó riego al cultivo en ambos ciclos, se podría inferir que la diferencia entre años no se debe directamente a la cantidad de agua disponible en el suelo, sino tal vez a otros factores climáticos como la humedad relativa, aspecto que convendría ser investigado en más detalle. No obstante las diferencias entre años, en ambos se alcanzó un rendimiento total similar (14,146 kg ha<sup>-1</sup> en el 2010, y 13,892 kg ha<sup>-1</sup> en el 2011), aunque en el 2011 requirió hacer dos cortes más que en el 2010.

Cabe destacar que en el ciclo 2010 el rendimiento total promedio fue de 2357 kg ha<sup>-1</sup>, y el de 2011 fue de 2315 kg ha<sup>-1</sup>, cantidades que se ubican en el rango de rendimiento que reportaron Cromack y Smith (1998) para la misma especie cultivada en Inglaterra, pero más elevadas que el rendimiento de 1.3 t ha<sup>-1</sup> registrado por Berti *et al.* (2003) en caléndula establecida en Chile. Esto evidencia que la caléndula cultivada

en el Valle de México produce rendimientos competitivos con los de otros lugares en el mundo.

### 3.4. CONCLUSIONES

Existe variación genética en potencial de rendimiento de capítulos entre las seis variedades de caléndula evaluadas, lo que es posible la selección por esta característica agronómica y, en general la conducción de un programa el mejoramiento genético de la especie.

La variedad V4 destacó en ambos años de evaluación por producir el mayor rendimiento durante la estación de crecimiento de caléndula, sobre todo cuando además del riego también cae suficiente lluvia, como es el caso del año 2010 con 501 mm registrados durante el ciclo de cultivo, con un rendimiento promedio de 492 kg MS ha<sup>-1</sup> y un rendimiento acumulado promedio de 1293 kg MS ha<sup>-1</sup>.

Aunque el cultivo de caléndula se haga en riego, en un año con lluvia suficiente se pueden obtener siete cortes sucesivos durante la estación de crecimiento, mientras que en un año con escasez de lluvia se pueden obtener dos cortes más pero de menor rendimiento por corte. Los primeros tres o cuatro cortes son los de menor rendimiento por corte (hasta 200 kg MS ha<sup>-1</sup>), pero estos cortes deben hacerse para llegar a los siguientes en los cuales se cosecha entre 350 y 600 kg MS ha<sup>-1</sup>, fluctuación que depende del año y de la variedad.

En magnitud de efectos que causan variación en el rendimiento de capítulos, el ambiental asociado con fechas de corte es más importante que el factor genético asociado con variedades.

Los rendimientos indican que, en términos de biomasa floral, las condiciones del Valle de México son adecuadas para el cultivo de caléndula, en comparación con los rendimientos obtenidos en otros países.

### 3.5. LITERATURA CITADA

Álvarez, J. A., P. E. Villagra, R. Villalba and G. Debandi. 2013. Effects of the pruning intensity and tree size on multi-stemmed (*Prosopis flexuosa*) trees in the Central Monte, Argentina. *Forest Ecology and Management* 310:857-864.

Andersen, F. A., F. W. Bergfeld, V. D. Belsito, A. R. Hill, D. C. Klaassen, C. D. Liebler, G.J. Marks, C. R. Shank, J. T. Slaga and W. P. Snyder. 2011. Final report of the Cosmetic Ingredient Review Expert Panel amended safety assessment of *Calendula officinalis* derived cosmetic ingredients. *International Journal of Toxicology* 29:221–243.

Bayat, H., M. Alirezaie, H. Neamati. 2012. Impact of exogenous salicylic acid on growth and ornamental characteristics of calendula (*Calendula officinalis* L.) under salinity stress. *Journal Stress Physiology and Biochemistry* 81:258–267.

Berti, M. D., W. E. Rosemarie, H. H. Felicitas y A. Montecinos. 2003. Influencia de la fecha de siembra y de la procedencia de la semilla en el rendimiento de capítulos de *Calendula officinalis* L. durante dos temporadas en Chillan. *Agricultura Técnica* 63:3–9.

Coradini, C. Z., V. Tabără, I. Petrescu and C. Giuchici. 2011. Correlative bindings between mmb and seeds number germinated to *Calendula officinalis* L. *Research Journal of Agricultural Science* 43:31-36.

Ganjali, H. R., A. A. Band, H. S. Abad, M. Nik. 2010. Effects of sowing date, plant density and nitrogen fertilizer on yield, yield components and carious traits of *Calendula officinalis*. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences* 9:149-155.

Kaškonienė, V., P. Kaškonas, M. Jalinskaitė, A. Maruška. 2011. Chemical Composition and Chemometric Analysis of Variation in Essential Oils of *Calendula officinalis* L. during Vegetation Stages. *Chromatographia* 73:163-169.

Kishimoto, S., T. Maoka, K. Sumitomo, A. Ohmiya. 2005. Analysis of carotenoid composition in petals of calendula (*Calendula officinalis* L.). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 69:2122-2128.

Kurkin, V. A. and V. Sharova O. 2007. Flavonoids from *Calendula officinalis* flowers. *Chemistry of Natural Compounds* 43:179–180.

Muley, B. P., S. S. Khadabadi, B. N. Banarase, G. College, K. Naka, M. State. 2009. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *calendula officinalis* linn (asteraceae): a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 8:455-465.

Neukirch, H., M. D'Ambrosio, J. V. Dalla, A. Guerriero. 2004. Simultaneous quantitative determination of eight triterpenoid monoesters from flowers of 10 varieties of *Calendula officinalis* L. and characterisation of a new triterpenoid monoester. *Phytochemical Analysis* 15:30-35.

Rao, I.U., and M. H. Ram. 1985. Floral differentiation and its modification. *Plant Sciences* 94:525-537.

Palma, T. M., M. G. Cuevas, G. V. Cano, G. C. Mendoza. 2007. Mercadela cultivo y usos terapéuticos. Primera edición. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Fitotecnia. 133 p.

Palma, T. M. 2009. Cinética del crecimiento, desarrollo floral y acumulación de flavonoides en Caléndula (*Calendula officinalis* L.). Tesis presentada como requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados.

Safdar, W., H. Majeed, I. Naveed, K. W. Kayani, H. Ahmed, S. Hussain, A. Kamal . 2010. Pharmacognostical study of the medicinal plant *Calendula officinalis* L. (family compositae). *International Journal of Cell & Molecular Biology* 1:108–116.

Vârban, D. A., M. M. Duda, R. Vârban, S. Muntean. 2008. The influence of the nutrition space upon the production, at *Calendula officinalis* L. in the conditions of Cluj Napoca. Journal of Agricultural Science: 235–238.

Wilen, R. W., B. Barl, E. A. Slinkard. 2004. Feasibility of cultivation calendula as a dual purpose industrial oilseed and medicinal crop. Acta Horticulture 629:199-206.

#### 4. ESTUDIO FITOQUÍMICO PRELIMINAR DE CALÉNDULA (*Calendula officinalis* L.) EN MÉXICO

Mariana Palma-Tenango<sup>1</sup>, R. Marcos Soto-Hernández<sup>2</sup>, Víctor A. González-Hernández<sup>1</sup>, Cecilia B. Peña-Valdivia<sup>2</sup>, Aquiles Carballo-Carballo<sup>3</sup> y Alfredo Carrillo-Salazar<sup>1</sup>

Coordinaciones Académicas de <sup>1</sup>Fisiología Vegetal, <sup>2</sup>Botánica, <sup>3</sup>Semillas. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

Autores de correspondencia: [vagh@colpos.mx](mailto:vagh@colpos.mx) [anairam@colpos.mx](mailto:anairam@colpos.mx)

#### RESUMEN

En caléndula (*Calendula officinalis* L.) el capítulo floral es el órgano más importante por su uso en medicina herbolaria. El color de sus flores, amarillo y anaranjado, se debe a varios pigmentos, como flavonoides, antocianinas y carotenoides. Su valor nutracéutico ha sido cuantificado en otros países, pero se desconoce su riqueza en esos metabolitos en variedades que se cultivan el país. El objetivo de este estudio fue realizar una evaluación preliminar de metabolitos secundarios, para identificar su presencia en plantas de esta especie cultivadas en los Valles Altos de México. Se confirmó que la caléndula cultivada en estos valles sintetizan los metabolitos de interés farmacéutico, nutracéutico y medicinal, por contener flavonoides (quercetina, kaempferol, isoramnetina, apigenina, rutina), terpenoides, carotenoides, aceites esenciales, saponinas y ácido clorogénico.

**Palabras clave:** Caléndula, capítulos florales, flavonoides, fitoquímicos, terpenoides, variación floral.

## ABSTRACT

In Pot marigold (*Calendula officinalis* L.) floral capitulum is the most important organ for use in herbal medicine. The color of its flowers, yellow and orange, is due to several pigments such as flavonoids, anthocyanins and carotenoids. Your nutraceutical value has been quantified in other countries, but their wealth of these metabolites is unknown in the country. The aim of this study was to make a preliminary study of secondary metabolites, to identify its presence in cultivated plants of this species in the high valleys of Mexico. It was confirmed that these valleys cultivated marigold metabolites synthesized pharmaceutical, nutraceutical and medicinal interest, contain flavonoids (quercetin, kaempferol, isorhamnetin, apigenin, rutin), terpenoids, carotenoids, essential oils, saponins and chlorogenic acid.

**Keywords:** Calendula flower heads, flavonoids, phytochemicals, terpenoids, floral variation.

## 4.1. INTRODUCCIÓN

Caléndula (*Calendula officinalis* L.) es una planta originaria del mediterráneo (Naguib *et al.*, 2005) y tiene usos múltiples: como planta ornamental, y como materia prima para la elaboración de productos de cosmetología (Ibrahim *et al.*, 2007; Andersen *et al.*, 2011), para la producción de tintes (Pauline *et al.*, 2008) o de aceites (Wilén *et al.*, 2004), y para fines terapéuticos (Safdar *et al.*, 2009).

Los capítulos florales de esta especie destacan por su riqueza en fitoquímicos, como flavonoides (Komissarenko *et al.*, 1989; Kurkin y Sharova, 2007; Shaghaghi *et al.*, 2009), terpenoides (Neukirch *et al.*, 2004), aceites esenciales, carotenoides, saponinas, cumarinas, quinonas y aminoácidos no proteicos (Muley *et al.*, 2009). La diversidad de la composición química de los capítulos florales les confiere también diversidad de usos terapéuticos, como: antimicrobianos (Chakraborty, 2008), antiinflamatorios (Della *et al.*, 1994) y gastroprotectores (Mota *et al.*, 2009). Además, se ha reconocido su carácter nutracéutico por el contenido y tipo de antioxidantes (Preeti *et al.*, 2007; Četković *et al.*, 2004).

En México se comercia actualmente una diversidad de productos elaborados con caléndula, como jabones, cremas, champús, extractos, suplementos alimenticios, desodorantes y tintes (Palma *et al.*, 2006); además, su demanda va en aumento por su uso en medicinal herbolaria.

A pesar de la demanda creciente de los capítulos florales, el cultivo de caléndula en México es incipiente y se carece de información técnica para optimizar su aprovechamiento bajo cultivo. El objetivo de esta investigación fue hacer un estudio preliminar de metabolitos secundarios en caléndula, para identificar su presencia en plantas de caléndula cultivadas en México. La hipótesis es que esta especie es rica en diferentes compuestos fitoquímicos cuando es cultivada en condiciones de campo en el Valle de México.

## 4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

El cultivo y la fase de laboratorio se hicieron en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en el municipio de Texcoco, Estado de México (19°29' N, 98°54' W, a una altitud de 2250 m).

Para obtener las muestras de capítulos florales, se hizo una siembra en condiciones de campo durante el año 2010 (Capítulo 1). Los capítulos se cosecharon manualmente cuando habían alcanzado plena floración; es decir, se recolectaron capítulos florales abiertos por completo, cuando mostraban tanto las flores tubulares como las liguladas maduras.

Los capítulos florales recolectados se congelaron con nitrógeno líquido y se trituraron en mortero de porcelana, para su molienda. Para hacer las pruebas fitoquímicas, el material seco y molido se guardó en sobres de papel kraft a temperatura de congelación (-5 °C) hasta el momento de hacer el análisis.

El análisis preliminar de metabolitos secundarios se hizo mediante dos técnicas. La primera fue una cualitativa propuesta por Bhandary *et al.* (2012), que consiste en preparar diferentes extractos y usar diferentes soluciones reveladoras para observar la presencia o ausencia de compuestos. Para esta técnica se prepararon extractos crudos, que se obtuvieron a partir de 10 g de tejido seco con 20 mL de cada uno de los siguientes tres solventes de grado analítico (Merck®): hexano, acetato de etilo y metanol. Cada extracto se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente, y luego se filtró a través de papel filtro Watman N° 4. A cada extracto se le hicieron pruebas específicas para reconocer la presencia de cada uno de los siguientes grupos de compuestos: flavonoides, terpenoides, saponinas, taninos y alcaloides.

La segunda técnica fue mediante cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés), en la que se usaron disolventes grado analítico (Merck®) y placas de sílica gel (ALUGRAM® Xtra SIL G/UV), con capa de 0.20 mm, de 20 por 20 cm, Los extractos y reveladores usados se describen a continuación, en función del tipo de compuesto a detectar:

## Flavonoides y terpenoides

A partir de 500 g de tejido seco se obtuvieron tres extractos, y a cada uno se le hicieron tres lavados con 1 L de solvente: el primero con hexano, el segundo con acetato de etilo, y el tercero con metanol. Luego, cada extracto se dejó en reposo por 24 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Después, los sobrenadantes se filtraron a través de papel filtro Watman N° 4 y se concentraron en un rotavapor (Büchi R-114®; Slawil, Switzerland).

En cada placa de gel de sílica se aplicó 20 µL de cada extracto re suspendido en el disolvente correspondiente. Los extractos se eluyeron con una mezcla de acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético y agua destilada (25, 2.75, 2.75 y 6.5 mL) (Gordana *et al.*, 2003). Los terpenoides fueron detectados con vainillina (1 %) más ácido sulfúrico (10 %), y exposición a 110 °C (Sindhu, 2010). Los flavonoides (Barrón *et al.*, 2011) fueron detectados con reactivo NP (ácido 2-amino-etil éster difenilbórico, a 1 % en metanol, p/v) y polietileno glicol 4000 con metanol (5 %). Después de confirmar la presencia de flavonoides en los extractos con metanol, en placas similares a las descritas antes se aplicaron estándares de quercetina (337951), kaempferol (K0133), rutina (R5143), isorhamnetina (17794), ácido clorogénico (C3878) y luteolina (L9283), donde el número corresponde al número de catálogo de SIGMA-ALDRICH®, para confirmar la presencia de estos compuestos en los extractos de capítulos de caléndula.

## Carotenoides

A partir de 1 g de tejido seco se obtuvo un extracto al que se le hicieron cinco lavados con 15 mL de acetona. El sobrenadante obtenido se filtró a través de papel filtro y se concentró en un rotavapor (Büchi R-114®; Slawil, Switzerland). El residuo se lavó tres veces con éter de petróleo (15 mL cada vez). Al extracto etéreo se le agregó Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (para quitar trazas de agua), luego se filtró y se llevó a sequedad en el rotavapor y enseguida se resuspendió en 2 mL de metanol. En la placa de sílica gel se

aplicaron 20 µL de este extracto, y se desarrolló con una mezcla de hexano: acetato de etilo: etanol: acetona (27:4:2:2, v/v), como lo hicieron Ren y Zhang (2008).

### Aceite esencial

De 100 g de tejido seco y de 100 g de tejido fresco, se extrajo su aceite esencial mediante hidrodestilación por 3 h (Khalid y Teixeira, 2010) con un aparato tipo Clevenger (Clevenger, 1928). La detección de aceites se hizo después de separar los compuestos en placas de sílica gel, con tolueno y acetato de etilo (93:7 v/v) como eluyente, y luego tratados con vainillina a 2 % seguido de calentamiento en horno a 110 °C por 4 min (Sindhu, 2010).

## 4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis preliminar

Con la primera técnica (Bhandary *et al.*, 2012) se observó que ninguno de los extractos contenía alcaloides o taninos. Este resultado indica que esos fitoquímicos están ausentes en los capítulos florales o que sus concentraciones son notablemente bajas y, por lo tanto, son indetectables con esta metodología (Cuadro 4.1). En contraste, otros autores (Chakraborty, 2008; Sindhu, 2010), han señalado la presencia de taninos y alcaloides en extractos de caléndula.

**Cuadro 4. 1.** Pruebas fitoquímicas preliminares de capítulos de caléndula (*Calendula officinalis* L.) con el método de Bhandary *et al.* (2012).

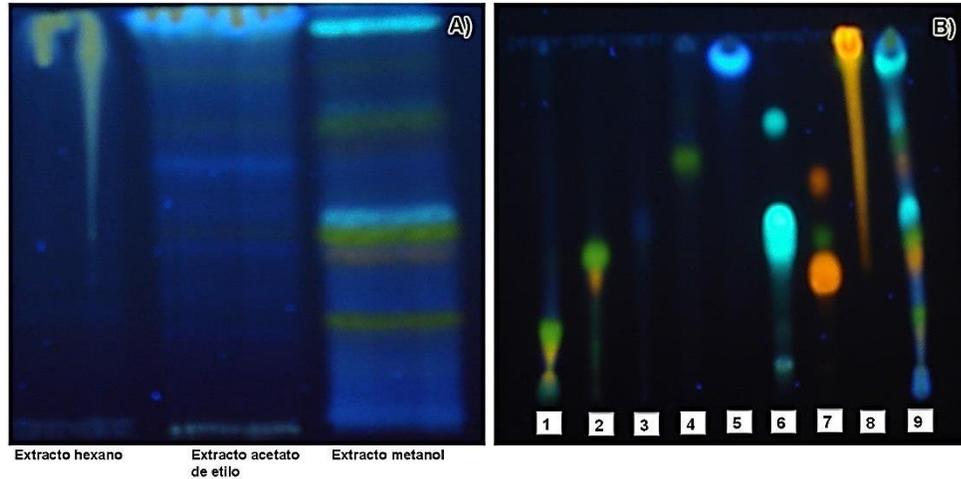
Prueba	Extracto de hexano	Extracto de acetato de etilo	Extracto de metanol
Taninos	–	–	–
Alcaloides	–	–	–
Flavonoides	–	++	+++
Saponinas	–	–	+
Aceite esencial	+	+++	+
Terpenoides	+	+++	+

+++ Presencia abundante, ++ Presencia moderada, + Presencia mínima y – Ausencia

Los flavonoides fueron detectados en los tres extractos, lo que muestra que puede haber una gama amplia e identidad diversa de estos compuestos para identificarse con disolventes de polaridad diferente. Esto concuerda con varios autores (Kurkin y Sharova 2007; Guinot *et al.*, 2008; Raal y Kirsipuu, 2011) quienes han demostrado la presencia de una gama amplia de flavonoides en capítulos de caléndula.

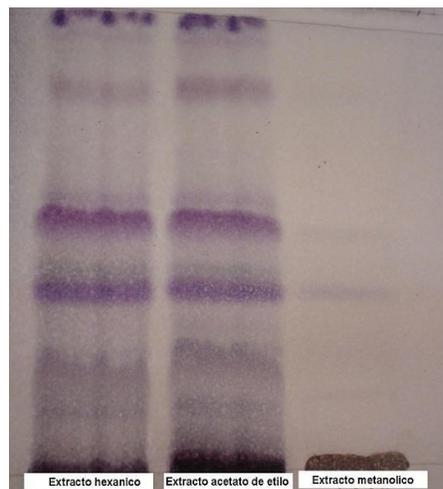
Las saponinas se denominan así por su capacidad para formar espuma, y fueron extraídas únicamente con metanol. En este estudio no fueron clasificados estos compuestos. Sin embargo, otros autores han señalado que son del tipo terpénico en caléndula, específicamente han identificado al ácido aoleanólico y faradiol como componentes principales (Szakiel *et al.*, 2005). Por su parte, los grupos de los aceites esenciales y los terpenoides estuvieron en los tres extractos, lo que indica que la diversidad de compuestos de cada uno de los dos grupos es amplia. Al respecto, se han identificado alrededor de 150 aceites esenciales en las plantas, los cuales son descritos como mezclas de varias sustancias volátiles que confieren el aroma característico a algunas flores, frutos, semillas y otros tejidos (Judd *et al.*, 2002). Entre los terpenoides se ha identificado una gama amplia de estos compuestos en caléndula, principalmente del tipo pentacíclicos, como son los monoésteres de triterpendiol (Neukirch *et al.*, 2004).

Con la técnica de cromatografía en capa fina, la extracción con metanol fue la más adecuada para extraer flavonoides que el hexano y de acetato de etilo, como se ilustra en la Figura 4.1. Gordana *et al.* (2003) también señalaron la efectividad de este disolvente cuando compararon extractos de caléndula preparados con diferentes disolventes. Además, en la placa cromatográfica del presente estudio se observó la presencia de por lo menos 16 diferentes flavonoides (16 bandas). Esta cantidad es superior a la detectada en los extractos con acetato de etilo (tres bandas) y hexano (ninguna banda). En este grupo de numerosos flavonoides hubo coincidencia con los estándares empleados, lo que permitió confirmar la presencia de quercetina, isoramnetina, luteolina, apigenina, rutina, kaemferol y ácido clorogénico.



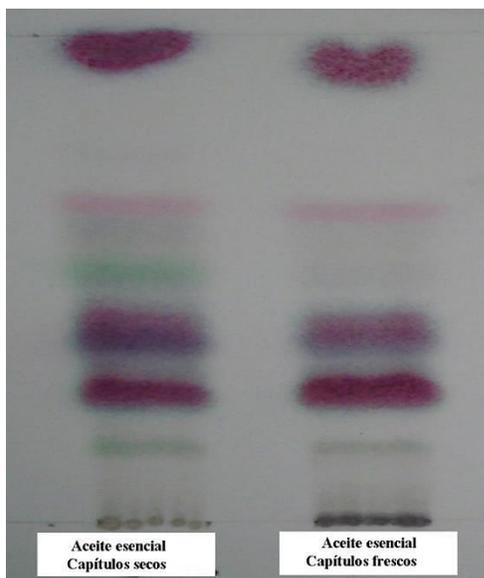
**Figura 4. 1.** Cromatogramas obtenidos por cromatografía en capa fina, vistos con iluminación con UV. A) Flavonoides, y B) 1) kaempferol, 2) isoramnetina, 3) luteolina ,4) quercetina, 5) apigenina ,6) ácido clorogénico,7) rutina, 8) desconocido, 9) extracto metanólico en capítulos florales de caléndula (*Calendula officinalis* L.).

En el caso de los terpenoides, el acetato de etilo fue reconocido como el disolvente que extrajo la mayor cantidad de este tipo de compuestos (Figura 4.2), con al menos 12 componentes (bandas en la placa por TLC). Esto indica que su presencia es abundante en la caléndula cultivada en el Valle de México, ya que en otros sitios se han reportado 13 diferentes terpenoides en la misma especie (Muley *et al.*, 2009).



**Figura 4. 2.** Cromatograma obtenido por cromatografía en capa fina para terpenoides de caléndula (*Calendula officinalis* L.).

Los aceites esenciales representaron únicamente 0.022 % de los capítulos secos y en 0.016 % de los capítulos frescos. Mediante TLC se detectaron al menos 12 de estos compuestos (Figura 4.3), 10 menos que los 22 reportados en caléndula por Gazim *et al.* (2008) y que los 28 reportados por Khalid y Teixeira (2010).



**Figura 4. 3.** Cromatograma obtenido por cromatografía en capa fina para detectar aceites esenciales en capítulos florales de caléndula (*Calendula officinalis* L.).

El cromatograma con carotenoides mostró la presencia de seis de estos compuestos (Figura 4.4). La diferencia con los 19 reportados por Kishimoto *et al.* (2005), podría deberse al tiempo transcurrido entre la cosecha y la aplicación de la prueba en laboratorio, ya que estos compuestos se van degradando con el tiempo.



**Figura 4. 4.** Cromatograma obtenido por cromatografía en capa fina para detectar carotenoides en capítulos florales de caléndula (*Calendula officinalis* L.).

La mayoría de los compuestos aquí encontrados en capítulos de caléndula crecida en los Valles Altos del estado de México, son compuestos que han sido reportados como biológicamente activos y con propiedades terapéuticas (Muley *et al.*, 2009), lo que demuestra que la caléndula cultivada en este ambiente tiene potencial amplio para ser aprovechada como planta medicinal.

#### **4.4. CONCLUSIONES**

Se demostró la presencia y diversidad de metabolitos de interés medicinal y nutracéutico en capítulos florales de caléndula cultivada en los Valles Altos del Estado México, como son los flavonoides, terpenoides, carotenoides y aceites esenciales, lo que sustenta su uso en México.

Cromatografía en capa fina, es una técnica rápida y sencilla con la que se puede identificar la presencia de diferentes compuestos de caléndula.

El extracto metanólico es el que presento mayor diversidad de compuestos, esto puede deberse a que es un disolvente polar y a que la mayoría de los compuestos de caléndula, también lo sean.

#### 4.5. LITERATURA CITADA

Andersen, F. A., F. W. Bergfeld, V. D. Belsito, A. R. Hill, D. C. Klaassen, C. D. Liebler, G.J. Marks, C. R. Shank, J. T. Slaga and W. P. Snyder. 2011. Final report of the Cosmetic Ingredient Review Expert Panel amended safety assessment of *Calendula officinalis* derived cosmetic ingredients. *International Journal of Toxicology* 29:221–243.

Barrón-Yáñez, R., M. García-Mateos, M. R. Soto-Hernández y T. Colinas-León. 2011. Flavonoides y actividad antioxidante de *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovlev. *Revista Fitotecnica Mexicana* 34:151–157.

Bhandary, S. K., S. V. Bhat, P. K. Sharmil, P. M. Bekal. 2012. Preliminary phytochemical screening of various extracts of *Punica granatum peel*, whole fruit and seeds. *Journal of Health Science* 2:34-38.

Ćetković, G. S., M. S. Djilas, M. J. Čanadanović-Brunet, T. V. Tumbas. 2004. Antioxidant properties of marigold extracts. *Food Research International* 37:643-650.

Chakraborty, G.S. 2008. Antimicrobial activity of the leaf extracts of *Calendula officinalis* (Linn.). *Journal of Herbal Medicine and Toxicology* 2:65–66.

Clevenger, J.F., 1928. Aparatus for determination of essential oil. *Journal of the American Pharmacist Association* 17:346-349

Della, L.R., A. Tubaro, S. Sosa, H. Becker, S. Saar, O. Isaac.1994. The role of triterpenoids in topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Medica* 60:516- 520.

Gazim, Z. C., M. C. Rezende, R. S. Fraga, P. B. Días, V. C. Nakamura and G. D. Cortez. 2008. Analysis of the essential oils from *Calendula officinalis* growing in Brazil using three different extraction procedures. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 44:391-395.

Gordana, S. Ć., D. M. Sonja and Č. M. Jasna. 2003. Thin-layer chromatography analysis and scavenging activity of marigold. *Act. Periódic Technology* 48: 93-102.

Guinot, P., A. Gargadennec, G. Valette, A. Fruchier and C. Andary. 2008. Primary flavonoids in marigold dye: Extraction, structure and involvement in the dyeing process. *Phytochemical Analysis* 19:46-51.

Ibrahim, Z., Z. Dimitrova, S. Georgiev, V. Madzharov and S. Titeva. 2010. Use of cosmetic products containing extract of marigold (*Calendula officinalis*) in cases of acne problem at the educational and beauty center “top beauty”- sofia. *Trakia Journal of Sciences* 8:353-357.

Judd, W. S., C. S. Campbell, E. A. Kellogg, P.F. Stevens, M.J. Donoghue. 2002. *Plant systematics: a phylogenetic approach*. Sinauer Associates. Sunderland, USA.

Khalid, K. A. and J.S. Teixeira. 2010. Yield, essential oil and pigment content of *Calendula officinalis* L. flower heads cultivated under salt stress conditions. *Scientia Horticulturae* 126:297–305.

Kishimoto, S., T. Maoka, K. Sumitomo, A. Ohmiya. 2005. Analysis of carotenoid composition in petals of calendula (*Calendula officinalis* L.). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 69:2122-2128.

Komissarenko, N.Y., V. T. Chernobai, A. I. Derkach. 1989. Flavonoids of inflorescences of *Calendula officinalis*. *Chemistry of natural compounds* 6:675-680.

Kurkin, V. A. and V. Sharova O. 2007. Flavonoids from *Calendula officinalis* flowers. *Chemistry of Natural Compounds* 43:179–180.

Mota, K., N. G. Días, E. M. Pinto, A. L. Ferreira, A. M. Souza-Brito, C. Hiruma-Lima, J. M. Barbosa-Filho, M. L. Batista. 2009. Flavonoids with gastroprotective activity. *Journal Molecules* 14:979-1012.

Muley, B. P., S. S. Khadabadi, B. N. Banarase, G. College, K. Naka, M. State. 2009. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *calendula officinalis* linn (asteraceae): a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 8:455-465.

Naguib, N.Y., Y. M. Khalil, E. S. Sherbeny. 2005. A comparative study on the productivity and chemical constituents of various sources and species of calendula plants as affected by two foliar fertilizers. *Journal of Applied Sciences* 1:176-189.

Neukirch, H., M. D'Ambrosio, J. V. Dalla, A. Guerriero. 2004. Simultaneous quantitative determination of eight triterpenoid monoesters from flowers of 10 varieties of *Calendula officinalis* L. and characterisation of a new triterpenoid monoester. *Phytochemical Analysis* 15:30-35.

Palma, T. M., M. G. Cuevas, G. V. Cano, G. C. Mendoza. 2007. *Mercadela cultivo y usos terapéuticos*. Primera edición. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Fitotecnia. 133 p.

Raal, A., and K. Kirsipuu. 2011. Total flavonoid content in varieties of *Calendula officinalis* L. originating from different countries and cultivated in Estonia. *Natural Product Research* 25, 658–62.

Ren, D. and S. Zhang. 2008. Separation and identification of the yellow carotenoids in *Potamogeton crispus* L. *Food Chemistry* 106:410–414.

Safdar, W., H. Majeed, I. Naveed, K. W. Kayani, H. Ahmed, S. Hussain, A. Kamal . 2010. Pharmacognostical study of the medicinal plant *Calendula officinalis* L. (family compositae). *International Journal of Cell and Molecular Biology* 1:108–116.

Shaghghi, M., L. J. Manzoori, J. D. Afshar, A. Jouyban. 2009. Determination of flavonoids in pharmaceutical preparations using Terbium sensitized fluorescence method. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 17:264–268.

Sindhu, C. G. 2010. Phytochemical screening of *calendula officinalis* linn leaf extract by TLC. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy* 1:131-134.

Szakiel, A., D. Ruszkowski, W. Janiszowska. 2005. Saponins in *Calendula officinalis* L. Structure, Biosynthesis, Transport and Biological Activity. *Phytochemistry Reviews* 4:151–158.

Wilen, R. W., B. Barl, E. A. Slinkard. 2004. Feasibility of cultivation calendula as a dual purpose industrial oilseed and medicinal crop. *Acta Horticulture* 629:199-206.

## 5. EFECTO DE VARIEDAD Y DE FECHA DE CORTE EN EL CONTENIDO DE FLAVONOIDES EN CALÉNDULA (*Calendula officinalis* L.)

Mariana Palma Tenango<sup>1</sup>, Víctor A. González Hernández<sup>1</sup>, R. Marcos Soto Hernández<sup>2</sup>, Rubén San Miguel Chávez<sup>2</sup>, Cecilia B. Peña-Valdivia<sup>2</sup>, Aquiles Carballo-Carballo<sup>3</sup>, Alfredo Carrillo Salazar<sup>1</sup>, Iván Ramírez Ramírez<sup>1</sup>, y Nicasio Cruz Huerta<sup>1</sup>

Coordinaciones Académicas de <sup>1</sup>Fisiología Vegetal, <sup>2</sup>Botánica, y <sup>3</sup>Semillas. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillos.

Autores de correspondencia: [vagh@colpos.mx](mailto:vagh@colpos.mx) [anairam@colpos.mx](mailto:anairam@colpos.mx)

### RESUMEN

Caléndula (*Calendula officinalis* L.) destaca por los usos medicinales de sus capítulos (flores). En esta especie se ha demostrado diversidad genética en la composición química de sus capítulos. Sus flores, de color amarillo a anaranjado, contienen varios pigmentos de valor nutracéutico como los flavonoides, en los que no se ha investigado la variación en contenido en función de la variedad y de la fecha de corte de capítulos, ya que éstos se cosechan periódicamente durante el ciclo de crecimiento. El objetivo de este estudio fue determinar la concentración de flavonoides totales y de rutina, quercetina, luteolina, apigenina e isoramnetina, en capítulos florales de seis variedades de caléndula cosechadas en diferentes cortes sucesivos, en dos ciclos de cultivo. Se encontraron diferencias ( $P \leq 0.05$ ) entre variedades, entre fechas de corte y en su respectiva interacción, en cuanto a la concentración de flavonoides totales en los capítulos. Las variedades que produjeron la mayor concentración de flavonoides, en promedio de fechas de corte, fueron V5 y V3, y las de menor concentración fueron V4 y V6. También hubo diferencias significativas por efecto de fecha de cosecha, en rutina, quercetina, luteolina, apigenina e isoramnetina.

**Palabras clave:** flavonoides, caléndula, variedades, fechas de cosecha.

## ABSTRACT

Marigold (*Calendula officinalis* L.) stands out for the medicinal uses of its chapters (flowers). This species has demonstrated genetic diversity in the chemical composition of its chapters. Its flowers, colored from yellow to orange, contain several pigments with nutraceutical value, such as flavonoids. The flavonoid content has not been investigated regarding its variation among varieties and among harvest dates, since in marigold the capitulum can be harvested periodically during the growth cycle. The aim of this study was to determine the concentration of total flavonoids and rutin, quercetin, luteolin, apigenin and isorhamnetin, in flower heads of six marigold varieties when harvested periodically throughout the season, in two growing cycles. Differences ( $P \leq 0.05$ ) between varieties, harvesting dates and their respective interaction, were found in terms of the concentration of total flavonoids. The varieties that produced the highest concentration of flavonoids, in the average of harvest dates, were V5 and V3, while varieties V4 and V6 showed the lowest flavonoid concentration. The harvest date affected significantly the content of rutin, quercetin, luteolin, apigenin and isorhamnetin.

**Keywords:** flavonoids, calendula, genotypes, harvest dates.

## 5.1. INTRODUCCIÓN

Los flavonoides son compuestos derivados de la ruta biosintética de los fenil propanoides (Vogt, 2010). Se presentan en diferentes órganos vegetales, en cantidades y tipos que dependen de factores bióticos y abióticos. Sus funciones en las plantas son variadas: las protegen de fitopatógenos, participan como protectores solares (radiación UV) al acumularse en las capas epidérmicas de las hojas y tallos y absorber la luz UV-B (Lake *et al.*, 2009). También se ha reportado una relación entre flores y frutos con estos compuestos, ya que pueden participar en su pigmentación y como atrayentes de polinizadores (Koes *et al.*, 2005; Laitinen *et al.*, 2008).

*Calendula* (*Calendula officinalis* L.) es una especie con presencia y abundancia de flavonoides, especie en la que se han reportado 22 tipos (Komissarenko *et al.*; 1989, Kurkin y Sharova, 2007; Shaghaghi *et al.*, 2009), entre ellos están quercetina, apigenina, kaempferol, etc., que son de interés farmacéutico (Kurkin y Sharova, 2007). *Caléndula* pertenece a la familia Asterácea y es originaria del Mediterráneo (Naguib *et al.*, 2005). Y se cultiva en diferentes partes del mundo por su potencial oleaginoso (Angelini *et al.*, 1997) ornamental, alimenticio y medicinal (Cromack y Smith, 1998).

Los capítulos florales de *caléndula* son los órganos de mayor interés, debido a sus compuestos químicos como aceites esenciales, carotenoides, saponinas, cumarinas, quinonas y aminoácidos no proteicos (Muley *et al.*, 2009) y a actividades farmacológicas como: antimicrobiana (Chakraborty, 2008; Goyal y Mathur, 2011), antiinflamatoria (Della *et al.*, 1994) y gastroprotectora (Mota *et al.*, 2009); además, se ha reconocido su carácter nutracéutico por el contenido y tipo de antioxidantes (Ćetković *et al.*, 2004; Preeti *et al.*, 2007).

En México la caléndula se usa en una diversidad de productos (Palma *et al.*, 2007), lo que ha generado demanda de esta planta y de sus compuestos químicos. A pesar de ello el cultivo en el México es incipiente y se carece de información que integre el manejo agrícola para optimizar la concentración de fitoquímicos.

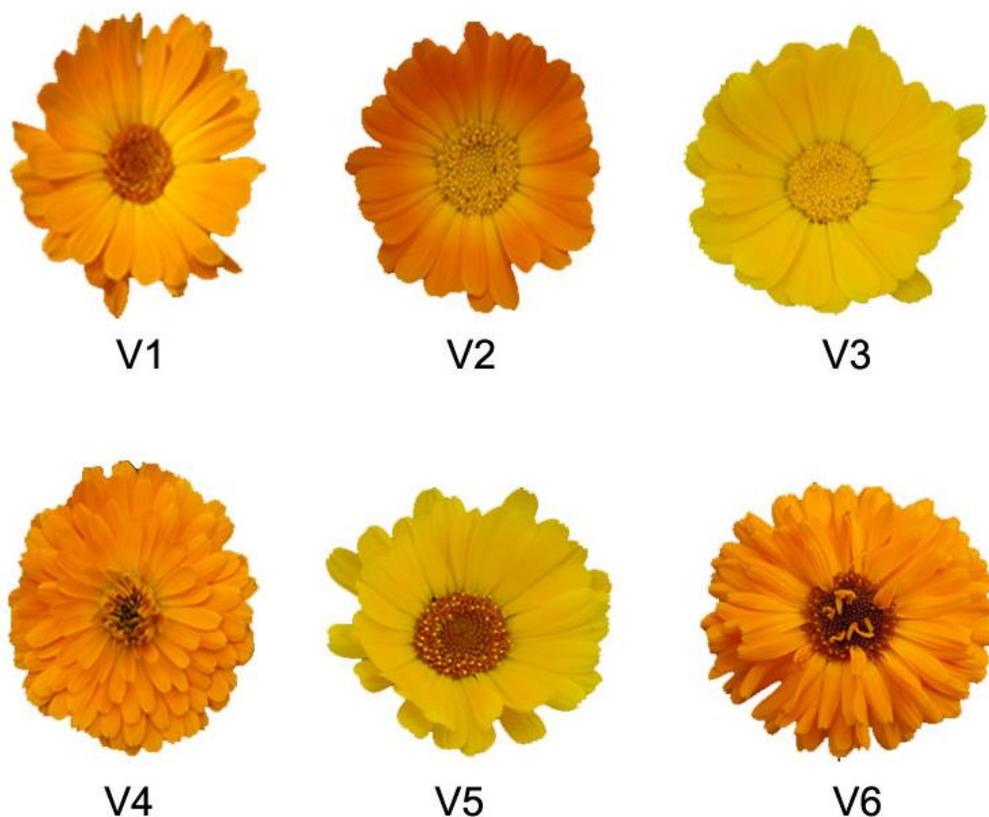
La caléndula puede generar nuevos capítulos florales cuando se cosechan los ya formados (Berti *et al.*, 2003). Esta capacidad permite hacerle varios cortes y prolongar la cosecha; sin embargo no se sabe si este manejo afecta la concentración de flavonoides.

Por el alto contenido de flavonoides en los capítulos florales de caléndula, de sus usos medicinales y la importancia de estandarizar estos pigmentos y obtener material vegetal de calidad, el objetivo de esta investigación fue cuantificar la concentración de flavonoides totales y cinco flavonoides específicos (rutina, quercetina, luteolina, apigenina e isoramnetina) en seis variedades experimentales de caléndula derivadas de una variedad comercial heterogénea, en diferentes fechas de cosecha de sus capítulos florales.

## 5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se hizo colecta de semillas en plantas de caléndula establecidos en cultivos comerciales del municipio de Ozumba, Estado de México (19°41' N, 98 45' W y altitud de 2365 m). Después de varios años de observación y selección masal se obtuvieron seis variedades (Figura 5.1), que se establecieron en dos ciclos de cultivo a campo en los años 2010 y 2011, con diferentes condiciones ambientales (Cuadro 5.1), en lotes experimentales ubicados en Texcoco, Estado de México (19°29' N, 98°54' W y altitud de 2250 m).



**Figura 5. 1.** Variedades de caléndula evaluadas.

**Cuadro 5. 1.** Datos climatológicos de los meses de cultivo de los años 2010 y año 2011.

Meses	Año 2010			Año 2011		
	Temperatura máxima promedio (°C)	Temperatura mínima promedio (°C)	Precipitación pluvial (mm)	Temperatura máxima promedio (°C)	Temperatura mínima promedio (°C)	Precipitación pluvial (mm)
Abril	30.8	4.5	39.5	-	-	-
Mayo	33.9	6	10.5	33.4	7.6	22.4
Junio	32.5	8.7	47.8	29.6	7	5
Julio	27.3	9.9	208.5	26.7	9.9	0
Agosto	26.9	7.4	154.9	27.2	8.2	6.1
Sep.	26.3	7.7	38.9	26.3	6.3	27.4
Octubre	25.5	3.5	0	26	2.5	14.4

### Condiciones de siembra y manejo en campo

Se sembraron seis variedades (Figura 5.1) de caléndula en dos ciclos de cultivo. En el primero la siembra fue el 23 de abril del 2010, y para el segundo el 03 de mayo del 2011. Ambas siembras se hicieron en charolas de 112 cavidades, con una mezcla de tierra de monte y turba (“peat moss”, Tourbe®) en proporción 1:1. El almácigo se fertilizó dos veces con la fórmula comercial 12-16-12 de N-P2O5-K2O (PCH® Healthy Start®) a una dosis 0.208 g L<sup>-1</sup>. Cuando las plántulas alcanzaron alrededor de 10 cm de altura, que ocurrió entre los 30 a 45 d después de la siembra, se trasplantaron a campo. Las plantas se distribuyeron a lo largo de los surcos con 60 cm de separación entre plantas, para una densidad de población de 40,000 plantas por ha<sup>-1</sup>. Los riegos por gravedad se aplicaron cada dos semanas, excepto en la temporada de lluvias. En campo se hicieron tres deshierbes, dos aporques; y para control de plagas se hicieron cuatro aplicaciones del insecticida Bug Clean® a una dosis de 2 mL L<sup>-1</sup>.

### Cosecha de capítulos

La cosecha de los capítulos fue manual y en cortes consecutivos a partir de los 50 a 60 días después del trasplante (ddt), cuando alcanzaron plena floración, con flores tubulares y liguladas maduras, hasta que la planta dejó de producirlas. Se obtuvieron siete cortes en 2010, y nueve en 2011.

Los capítulos cosechados fueron secados en estufa de aire forzado (Precisión 17® GCA Corp.) a 40 °C por 48 h, pesados en una balanza analítica, luego congelados con con nitrógeno líquido y triturados y molidos en un mortero de porcelana para su análisis químico posterior en laboratorio.

Los datos obtenidos de biomasa de capítulos se transformaron a rendimiento (kg ha<sup>-1</sup>), y se sometieron a análisis de varianza conforme a un diseño experimental de bloques completos al azar con arreglo factorial (6 variedades x 7 cortes en 2010, y 6 x 9 en 2011), con dos repeticiones, cuya unidad experimental fue una planta completa. La comparación de medias de rendimiento de capítulos por planta se hizo mediante la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). Los análisis estadísticos se hicieron con los paquetes SAS (SAS Institute, 2002) o InFostat (Di Rienzo *et al.*, 2013).

### **Determinación de flavonoides totales**

El contenido de flavonoides totales se cuantificó con el método colorimétrico de cloruro de aluminio (Chang *et al.*, 2002; modificado por Meneses *et al.*, 2008). Las muestras de 25 mg de capítulos secos se incubaron con 500 µL de metanol 80 %, durante 1 h a 70 °C, luego la mezcla se centrifugó a 731 Xg durante 13 min. Del sobrenadante se tomaron alícuotas de 150 µL a las que se agregaron 37 µL de metanol 80 %, a otros 50 µL del extracto se les agregaron 100 µL de acetato de potasio 1 M y 100 µL de cloruro de aluminio 10 %, y luego se aforo a 5 mL. La solución se dejó reposar durante 40 min, y enseguida se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro (Multiskan Thermo scientific ®) a 415 nm.

Para obtener la curva de calibración se disolvieron 10 mg de quercetina en metanol 80% y la mezcla se diluyó para formar las siguientes concentraciones: 2.5, 5, 10, 25, 50 y 100 µg mL<sup>-1</sup>. Estas soluciones diluidas del estándar se mezclaron por separado con 1.5 mL de metanol 80 %, 100 µL de acetato de potasio 1 M, 100 µL de cloruro de aluminio 10 % y 2.8 a agua destilada. Las mezclas se incubaron 30 min a temperatura ambiente y se leyó sus absorbancias en un espectrofotómetro (Multiskan Thermo scientific ®) a 415 nm.

Los datos obtenidos de concentración de flavonoides totales ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) se sometieron a análisis de varianza conforme a un diseño experimental bloques completos al azar con arreglo factorial (6 variedades x 7 cortes en 2010, y 6 x 9 en 2011), con seis repeticiones. La comparación de medias de flavonoides totales se hizo mediante la prueba de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ). Los análisis estadísticos se hicieron con los paquetes SAS (SAS Institute, 2002) o InFostat (Di Rienzo *et al.*, 2013).

### **Análisis de flavonoides mediante cromatografía de líquidos**

#### Hidrólisis de flavonoides

Muestras de 500 mg de capítulos molidos se incubaron con 10 mL de metanol acuoso (60:40, v/v), y el extracto obtenido se incubó por 2 h a 90 °C. Luego a una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  se le agregaron 250  $\mu\text{L}$  de agua acidificada con ácido trifluoroacético con pH de 2.5; se centrifugó a 731 Xg, el extracto se filtró y de él se inyectaron 100  $\mu\text{L}$  en el HPLC.

#### Cromatografía de líquidos (HPLC)

Se usó un cromatógrafo Agilent Technologies® provisto con detector de arreglo de diodos, columna hypersil ODS marca HP® de 125 mm de longitud, 4 mm de diámetro interno y 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula. Los estándares externos fueron calibrados a una longitud de onda de 350 nm, con un flujo de 1.0  $\text{mL min}^{-1}$  con un gradiente isocrático (85:15) acetonitrilo-agua acidulada a pH 2.5 con ácido trifluoroacético. Una vez estandarizada la técnica, se hizo la curva de calibración para la identificación de rutina, quercetina, luteína, apigenina e isoramnetina, y se hizo la referencia a la concentración de dichos compuestos.

Los datos obtenidos de concentración de rutina, quercetina, luteína, apigenina e isoramnetina ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) se sometieron a análisis de varianza conforme a un diseño experimental bloques completos al azar con arreglo factorial (6 variedades x 7 cortes en 2010, y 6 x 9 en 2011), con dos repeticiones. La comparación de medias se hizo mediante la prueba de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ). Los análisis estadísticos se hicieron con los paquetes SAS (SAS Institute, 2002) o InFostat (Di Rienzo *et al.*, 2013).

También se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson para las variables concentración de flavonoides totales y flavonoides específicos (rutina, quercetina, luteína, apigenina e isoramnetina), para identificar la asociación entre estas dos variables.

## 5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Concentración de flavonoides totales

#### Diferencias varietales

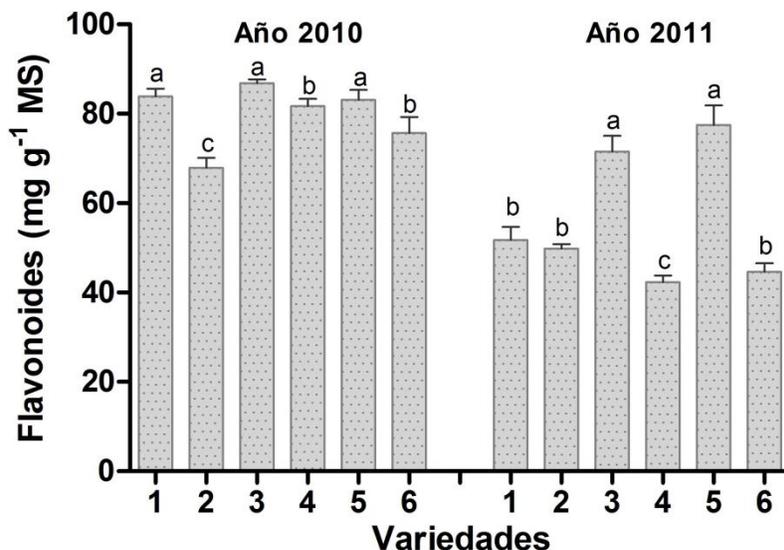
En ambos ciclos de cultivo, 2010 y 2011, se encontraron diferencias significativas en la concentración de flavonoides totales (Cuadro 5.2) entre variedades (promedio de cortes), entre cortes (promedio de variedades) y en la interacción de las mismas en ambos ciclos ( $P \leq 0.05$ ).

**Cuadro 5. 2.** Análisis de varianza para concentración de flavonoides totales ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) en capítulos secos de seis variedades de caléndula, cosechados en cortes sucesivos (siete cortes en 2010, y 9 en 2011), en dos ciclos de producción (2010 y 2011). Texcoco, Edo. de México.

FV	2010					2011					
	SC	gl	CM	F	P	SC	gl	CM	F	P	
	55301.4	41	1348.82	14.77	<0.0001	179044.95	53	3378.21	17	<0.0001	
<b>C</b>	12065.4	6	2010.9	22.01	<0.0001	32858.53	8	4107.32	20.67	<0.0001	
<b>Var.</b>	10041.9	5	2008.39	21.99	<0.0001	58136.79	5	11627.3	58.53	<0.0001	
<b>C X Var.</b>	33194.1	30	1106.47	12.11	<0.0001	88049.64	40	2201.24	11.08	<0.0001	
<b>Error</b>	19183.7	210	91.35			53638.72	270	198.66			
<b>Total</b>	74485.2	251				232683.67	323				
$R^2 = 0.74$	N = 252					$R^2 = 0.77$	N = 324				

C: Cortes; Var: variedad;  $\alpha = 0.05$ . gl: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios; F: F calculada; P: probabilidad.

Las variedades V3 y V5 (Figura 5.2) sobresalieron en ambos años al resultar superiores a los demás, haciendo evidente la variación genética de esta especie y su potencial para seleccionar las mejores variedades para uso medicinal.



**Figura 5. 2.** Concentración de flavonoides totales en los capítulos de seis variedades de caléndula, en promedio de siete cosechas hechos en 2010 (n = 42) y de nueve en 2011 (n = 54). Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). Las líneas verticales en cada barra corresponden a las desviaciones estándar

También hubo diferencia significativa entre los dos ciclos de cultivo, ya que en promedio de las seis variedades el año 2010 superó en 15 % al año 2011. Esta diferencia anual en contenido de flavonoides totales puede atribuirse a diferencias ambientales (meteorológicas), como temperaturas, la humedad relativa, precipitación, radiación, salinidad que puede causar deshidratación celular, lo que provoca estrés osmótico y eliminación de agua desde el citoplasma que resulta en una reducción de los volúmenes citosólicos y vacuolares. El estrés salino a menudo crea estrés iónico y osmótico en las plantas, factores que pueden afectar la acumulación de flavonoides (Ramakrishna y Ravishankar, 2011). En el el año 2010 hubo mayor precipitación (Cuadro 5.1) que puede haber lavado sales presentes en el suelo y favorecer la acumulación de flavonoides, respecto al año 2011 donde llovió menos y quizá había mayor cantidad de sales en el suelo, aspectos que convendrían ser investigados.

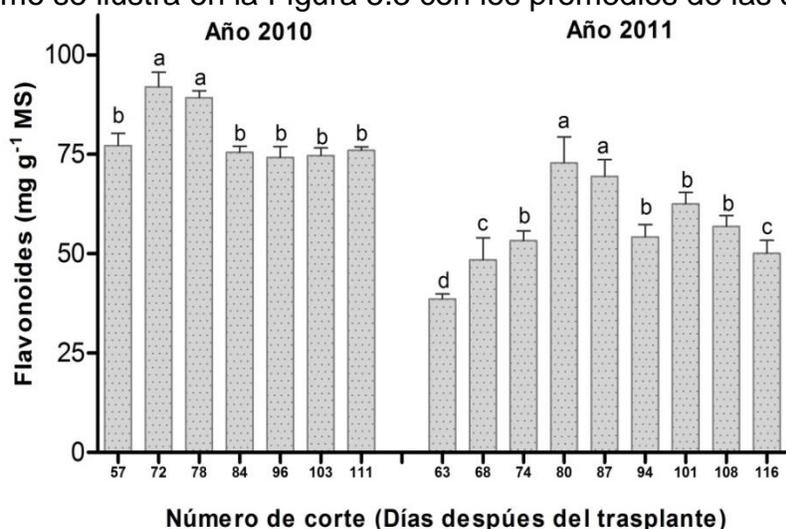
A pesar de estos cambios anuales, es de destacar que las variedades V3 y V5 mantuvieron los valores más elevados, aun en el año en el que las plantas tuvieron menor acumulación de flavonoides, lo que muestra mejor estabilidad de estas dos variedades en comparación con el resto.

También Wilen *et al.* (2004) encontraron variación en flavonoides totales debida a la variedad y a las condiciones climáticas del lugar donde se cultive, lo que coincide con los resultados aquí obtenidos.

Por otro lado, cabe señalar que las variedades con tonalidades amarillas en los capítulos sobresalieron en contenido de flavonoides en ambos ciclos de cultivo, al igual que Raal y Kirsipuu (2010), quienes reportaron que las variedades con inflorescencias amarillas tuvieron mayor contenido de flavonoides que otras con diferentes tonalidades. Lo anterior sugiere que puede haber una relación directa entre el contenido de estos compuestos y el color de la inflorescencia.

### Diferencias entre cortes o cosechas

El contenido de flavonoides totales varió significativamente ( $P \leq 0.05$ ) (Anexo, Cuadro 9.10) entre las cosechas o cortes sucesivos, de forma diferente en los dos años de cultivo, como se ilustra en la Figura 5.3 con los promedios de las seis variedades.



**Figura 5. 3.** Concentración de flavonoides totales a través de cortes sucesivos semanales (siete cosechas en 2010 y de nueve en 2011), en promedio de seis variedades de caléndula. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). Las líneas verticales en cada corresponden a las desviaciones estándar ( $n = 36$ ).

Así, en 2010 (con más lluvia) los mayores contenidos se obtuvieron en los cortes 2 y 3, pero con diferencias relativamente pequeñas con los demás cortes. En cambio, en 2011 (con poca lluvia) los mejores cortes fueron el 4 y el 5, que superaron notoriamente a los cortes anteriores y posteriores, lo que pudiera estar parcialmente

asociado con el hecho de que en los cortes iniciales el mecanismo de síntesis aún no estuviera tan desarrollado, mientras que en los cortes finales haya ocurrido la senescencia de la planta por ser un año 'seco'.

Además, el número de cortes varió entre años, ya que en el 2010 se pudieron hacer siete fechas de corte mientras que en el 2011 se lograron nueve cortes. Esto implica que un año con mayor número de cortes de capítulos, como el 2011, no conlleva a lograr mayor acumulación de flavonoides en los capítulos.

Estos resultados confirman que en caléndula se pueden hacer varias cosechas de capítulos conforme van alcanzando la plena floración, para aprovechar la capacidad de esta planta de generar nuevos capítulos después de un corte, así como conocer las fechas de corte en las que las inflorescencias tienen mayor concentración de flavonoides totales.

Además de las diferencias varietales, estacionales y de fecha de corte en concentración de flavonoides totales, en caléndula también hay variaciones significativas ( $P \leq 0.05$ ) por efecto de esos mismos factores, en el rendimiento de capítulos cosechados y, consecuentemente, en la cantidad de flavonoides producidos por hectárea (Anexo, Cuadro 9.2), como se muestra en el Cuadro 5.3. En este sentido, en 2010 destacaron las variedades V4 y V5 como las mejores en acumulación de biomasa asignada a capítulos, concentración de flavonoides y producción de flavonoides por hectárea; en 2011, destacaron las variedades V3 y V5. Por tanto, este conocimiento puede servir para lograr un mayor aprovechamiento comercial de la caléndula cultivada para fines terapéuticos.

Entre cortes también hubo diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en el rendimiento por hectárea de capítulos y de flavonoides, en ambos ciclos de cultivo. En las dos variables, los mejores cortes fueron los últimos tres en 2010, y los últimos seis en 2011 (Cuadro 5.4).

**Cuadro 5. 3.** Producción de flavonoides totales por variedad de caléndula para los ciclos de 2010 (en promedio de siete cosechas sucesivas) y 2011 (en promedio de nueve cosechas).

Variedad	Año 2010			Año 2011		
	Rendimiento de capítulos (kg ha <sup>-1</sup> )	Concentración de flavonoides (g kg <sup>-1</sup> de MS)	Producción de flavonoides (kg ha <sup>-1</sup> )	Rendimiento de capítulos (kg ha <sup>-1</sup> )	Concentración de flavonoides (g kg <sup>-1</sup> de MS)	Producción de flavonoides (kg ha <sup>-1</sup> )
1	239.14 b	83.84 a	18.36 b	206.44 a	51.78 b	10.95c
2	338.28 a	67.90 c	23.33b	267.78 a	49.84 b	13.49 b
3	279.43 b	86.84 a	23.69b	284.89 a	71.51 a	22.11 a
4	492.00 a	81.71 a	37.69a	304.22 a	42.30 c	12.23 c
5	349.43 a	83.11 a	26.98a	248.89 a	77.53 a	20.31 a
6	322.57 a	75.67 b	23.11b	231.33 a	44.62 b	12.41c

Medias con la misma letra en una columna, son estadísticamente iguales entre sí (Tukey, 0.05).

**Cuadro 5. 4.** Producción de flavonoides totales en diferentes fechas de cosecha, para los ciclos 2010 y 2011 (en promedio de seis variedades de caléndula).

Año 2010					Año 2011				
Días después del trasplante	Número de cosecha	Rend. de capítulos (kg ha <sup>-1</sup> )	Conc. de flavonoides (g kg <sup>-1</sup> de MS)	Prod. de flavonoides (kg ha <sup>-1</sup> )	Días después del trasplante	Número de cosecha	Rend. de capítulos (kg ha <sup>-1</sup> )	Conc. de flavonoides (g kg <sup>-1</sup> de MS)	Prod. de flavonoides (kg ha <sup>-1</sup> )
57	1	24.33 d	77.23 b	1.62 d	63	1	60.67 c	38.59 d	2.45 d
72	2	100.00 c	92.00 a	9.11 d	68	2	100.33 c	48.44 c	4.84 c
78	3	162.33 c	89.27 a	14.08 c	74	3	182.00 b	53.28 b	10.06 b
84	4	362.00 b	75.49 b	27.54 b	80	4	312.33 a	72.87 a	23.24 a
96	5	530.00 a	74.23 b	38.48 a	87	5	344.67 a	69.42 a	23.59 a
103	6	613.00 a	74.66 b	45.19 a	94	6	313.00 a	54.28 b	17.34 a
111	7	566.00 a	76.02 b	42.66 a	101	7	386.33 a	62.52 a	23.79 a
					108	8	325.33 a	56.85 b	17.67 a
					116	9	290.67 a	50.11 c	14.27 a

Medias con la misma letra en una columna, son estadísticamente iguales entre sí (Tukey, 0.05).

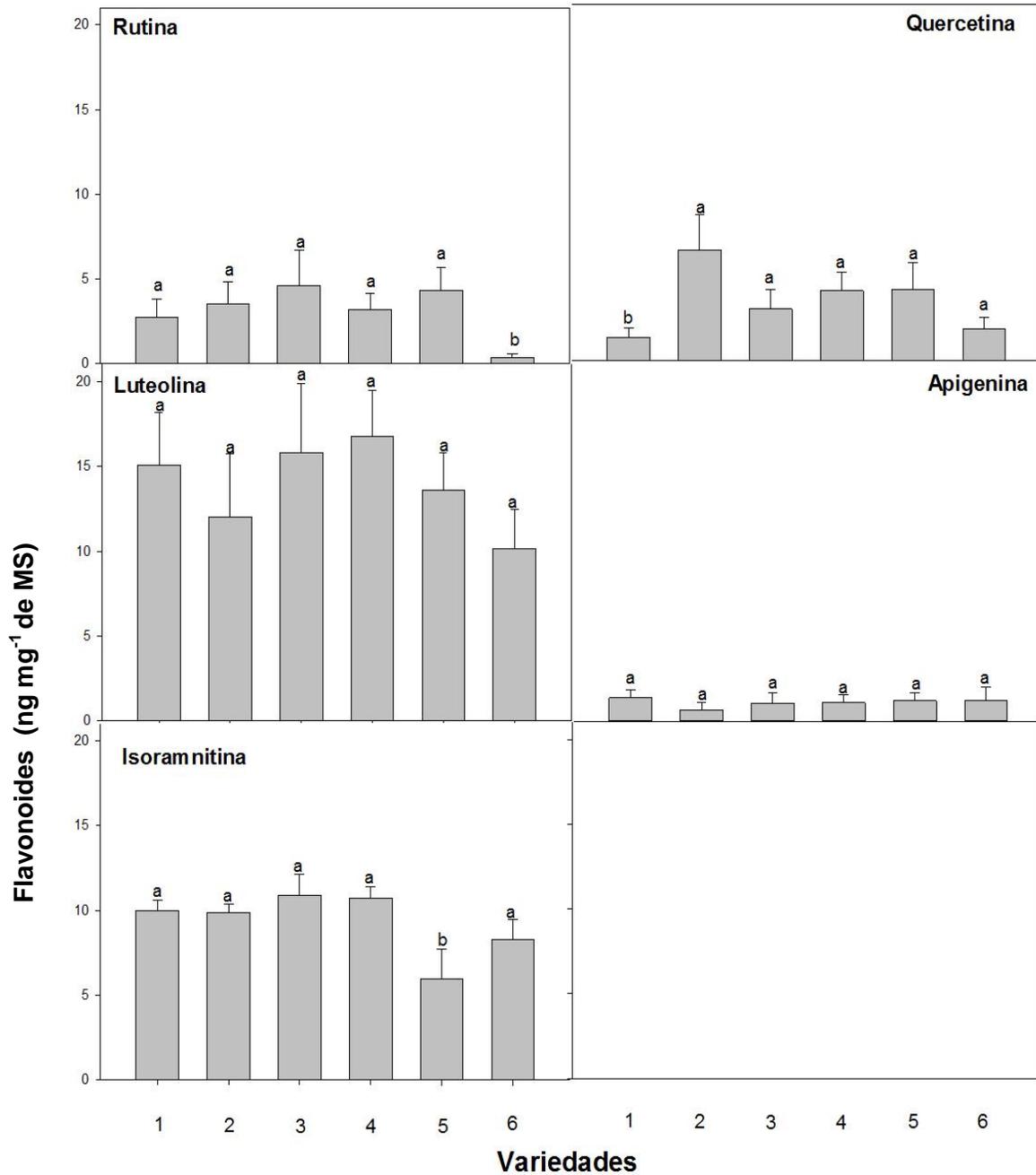
Los primeros tres o cuatro cortes resultaron los de menor rendimiento de flavonoides, lo cual posiblemente se deba a diferencias en estado de desarrollo o madurez de la planta de caléndula al momento de cada cosecha. Es de hacer notar que las diferencias en rendimiento de flavonoides estuvieron más estrechamente asociadas con el rendimiento de capítulos que con la concentración de los mismos.

### **Flavonoides específicos**

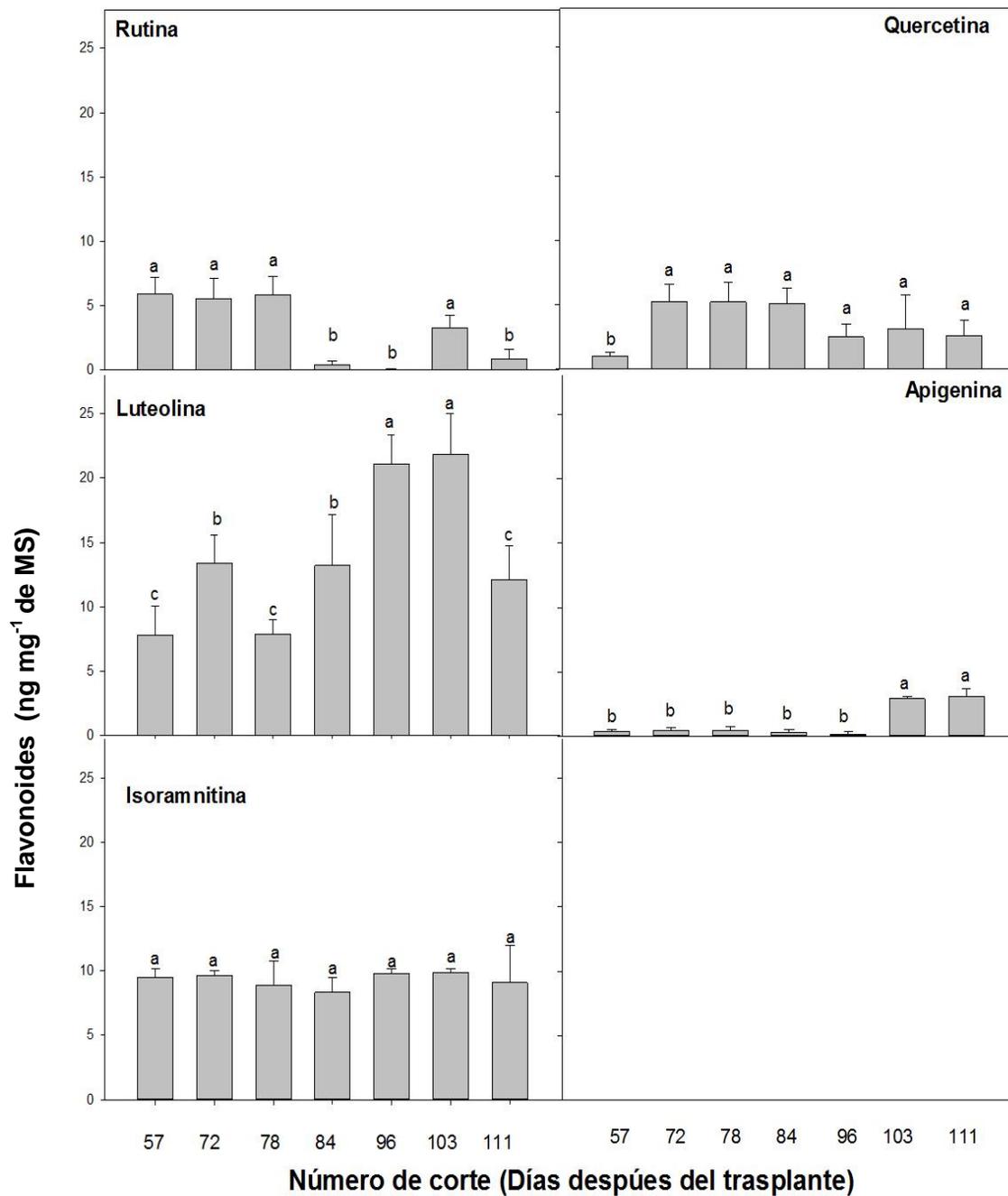
El análisis químico por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), permitió detectar que los capítulos cosechados en el ciclo 2010 (no se analizó el año 2011), contienen los siguientes cinco flavonoides ordenados con base en su concentración en los capítulos de caléndula: luteolina > isoramnetina > rutina = quercetina > apigenina. No hubo diferencias entre variedades en concentración de luteolina ni de apigenina, pero sí las hubo en los demás compuestos (Figura 5. 4). Las diferencias varietales (en promedio de cortes), consistieron principalmente en que la V6 fue la más baja en rutina, V1 fue la más baja en quercetina, y V5 fue la más baja en isoramnetina. Esta variación genética detectada confirma que existe diversidad genética que se puede aprovechar para seleccionar las variedades sobresalientes en función del compuesto de interés.

Entre cortes se encontró más variación que entre variedades, lo que sugiere que el efecto ambiental puede ser mayor que el genético en la concentración de flavonoides totales, como se ilustra en la Figura 5.5. Así, en rutina los cortes de menor concentración que los demás fueron los efectuados a los 84, 96 y 103 días; en quercetina el corte con menos contenido fue el hecho a los 57 días; en luteolina los cortes más bajos fueron los de 57, 78 y 111 días; en apigenina los más bajos fueron los primeros cinco cortes (57, 72, 78, 84 y 96 días); mientras que en isoramnetina no hubo diferencias entre cortes.

Estos resultados muestran que los compuestos menos estables a través de cortes fueron rutina, luteolina y apigenina, y los más estables y menor variación entre cortes fueron quercetina e isora-mnetina, sobre todo este último.



**Figura 5. 4.** Concentración de rutina, quercetina, luteolina, apigenina e isoramnetina, en capítulos de seis variedades de caléndula crecidas en 2010 (en promedio de siete cosechas sucesivas). Medias con la misma letra son estadísticamente iguales entre sí (Tukey, 0.05). Las líneas verticales sobre las barras corresponden a las desviaciones estándar (n = 14).



**Figura 5. 5** Concentración de rutina, quercetina, luteolina, apigenina e isoramnetina, en capítulos de caléndula cosechados en siete cortes sucesivos en 2010 (en promedio de seis variedades). Medias con la misma letra son estadísticamente iguales entre sí (Tukey, 0.05). Las líneas verticales sobre las barras corresponden a las desviaciones estándar (n = 12).

El análisis de correlación (Cuadro 5.5) entre la concentración de flavonoides totales y las concentraciones de flavonoides específicos (rutina, quercetina, luteolina, apigenina e isoramnetina) mostró que entre rutina y quercetina y entre flavonoides totales y rutina ocurrieron las correlaciones positivas mayores, con  $r = 0.21$  y  $0.23$ . Esto sugiere que más flavonoides en el capítulo van acompañados con más rutina, y que a mayor contenido de rutina habrá más quercetina. En contraste, entre rutina y luteolina hubo correlación negativa ( $-0.19$ ), que sugiere que a mayor contenido de luteolina en los capítulos habrá menos rutina. Las demás correlaciones no fueron significativas, y con importancia predictiva limitada.

**Cuadro 5. 5.** Matriz de correlación de Pearson entre contenidos de flavonoides específicos y totales en capítulos de caléndula cultivada en el ciclo 2010.

Coeficientes/ Probabilidades	Flavonoides totales	Rutina	Quercetina	Luteolina	Apigenina	Isoramnetina
Flavonoides totales	1	0.03	0.5	0.75	0.6	0.75
Rutina	0.23	1	0.05	0.09	0.4	0.23
Quercetina	-0.08	0.21	1	0.41	0.86	0.31
Luteolina	0.03	-0.19	-0.09	1	0.07	0.47
Apigenina	-0.06	-0.09	-0.02	0.2	1	0.71
Isoramnetina	-0.03	-0.13	-0.11	0.08	-0.04	1

N = 84

## 5. 4.CONCLUSIONES

La concentración de flavonoides totales varía entre fechas de corte de los capítulos y más aún entre años de producción de la planta en campo, hubo pocas diferencias entre cortes, mientras que en 2011 los primeros cuatro cortes tuvieron concentración menor de flavonoides.

El rendimiento de flavonoides en los capítulos es más afectado por la acumulación de biomasa en los propios capítulos que por la concentración de esos compuestos. Por tanto, parece más conveniente aumentar el rendimiento de capítulos que la concentración de flavonoides.

Los cinco los flavonoides específicos en capítulos de caléndula, en orden de abundancia son: luteolina > isoramnetina > rutina  $\geq$  quercetina > apigenina. dela concentración de estos compuestos varía entre las variedades, pero ninguna variedad superó a las demás en más de dos compuestos específicos, lo que indica que cada variedad puede ser de interés para algún compuesto en particular. También la concentración de los compuestos específicos varía entre las fechas de corte, excepto isoramnetina y quercetina, cuyos contenidos no cambiaron significativamente entre cortes.

## 5.5. LITERATURA CITADA

Angelini, L. G., E. G. Moscheni, P. Colonna and E. Belloni. 1997. Variation in agronomic characteristics and seed oil composition of new oilseed crops in central Italy. *Industrial Crops and Products* 6:313–323.

Berti, M. D., W. E. Rosemarie, H. H. Felicitas y A. Montecinos. 2003. Influencia de la fecha de siembra y de la procedencia de la semilla en el rendimiento de capítulos de *Calendula officinalis* L. durante dos temporadas en Chillan. *Agricultura Técnica* 63:3–9.

Chang, C., M. Yang, H. Wen and J. Chern. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10:178–182.

Cromack, H. T. and M. J. Smith. 1998. *Calendula officinalis*-Production potential and crop agronomy in southern England. *Industrial Crops and products* 7: 223-229.

Goyal, G. and R. Mathur. 2011. Antimicrobial effects of *Calendula officinalis* against human pathogenic microorganisms. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology* 5:97-101.

Irving, H.R, A. C. Gehring, W. R. Parish. 1992. Changes in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 89:1790-1794.

Jagendorf, A.T. 1967. Acid base transition and photophosphorylation by chloroplast. *Federation Proceedings* 26:1361-1369.

Johnson, R., J. Narvaez, G. An C. Ryan. 1989. Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: Effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 86: 9871-9875.

Kang, Z., H. Buchenauer, 2003. Immunocytochemical localization of cell wall-bound thionins and hydroxyproline rich glycoproteins in *Fusarium culmorum* infected wheat spikes. *Journal of Phytopathology* 151:120-129.

Kang, S.Y. and C. Y. Kim. 2007. Decursinol and decursin protect primary cultured rat cortical cells from glutamate-induced neurotoxicity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 59: 863-870.

Karban, R., T. Baldwin I. 1997. Induced responses to herbivory. Chicago: University of Chicago Press.

Kaškonienė, V., P. Kaškonas, M. Jalinskaitė, A. Maruška. 2011. Chemical Composition and Chemometric Analysis of Variation in Essential Oils of *Calendula officinalis* L. during Vegetation Stages. *Chromatographia* 73:163-169.

Keeler, R.F., 1975. Toxins and teratogens of higher plants. *Lloydia* 38:56-86.

Keen, N.T., B. W. Kennedy. 1974. Hydroxyphaseollin and related isoflavonoids in the hypersensitive resistance reaction of soybeans to *Pseudomonas glycinea*. *Physiological Plant Pathology* 4:173-185.

Kishimoto, S., T. Maoka, K. Sumitomo, A. Ohmiya. 2005. Analysis of carotenoid composition in petals of calendula (*Calendula officinalis* L.). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 69:2122-2128.

Klein, R.M., 1987. The green world: An introduction to plants and people. New York: Harper and Row.

Knoff, D.B., 1991. Regulatory phosphorylation of chloroplast antenna proteins. *Trends Biochemical Sciences* 16: 82-83.

Koch, J., 1989. Breeding developments in double low oilseed rape: Looking to the future. In *Proceedings of the Double Low Oilseed Rape for the 1990's Conference*. Cambridge: Semundo/BASF.

Kondo, T., K. Yoshida, A. Nakagawa, T. Kawai, H. Tamura, T. Goto. 1992. Structural basis of blue- color development in flower petals from *Commelina communis*. Nature 358: 515-518.

Kusnieczyk, A., P. Winge, H. Midelfart, S. Armbruster, T. Rossiter, M. Bones. 2007. Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* ecotypes with different glucosinolate profiles after attack by polyphagous myzus persicae and oligophagous brevicoryne brassicae. Journal of Experimental Botany 58: 2537-2552.

Lake, J., J. K. Field, P. M. Davey, J. D. Beerling, H. B. Lomax. 2009. Metabolomic and physiological responses reveal multiphasic acclimation of *Arabidopsis thaliana* to chronic UV radiation. Plant cell and environment 32:1377-1389.

Meneses, J. C., R. M. H. Soto, T. S. Espinosa, M. E. Rámirez. 2008 .Optimización del proceso de extracción de flavonoides de flor de manzanilla (*Matricaria recutita* L.). Agrociencia 42: 425–433.

Muley, B. P., S. S. Khadabadi, B. N. Banarase, G. College, K. Naka, M. State. 2009. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *calendula officinalis* linn (asteraceae): a review. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 8:455-465.

Naguib, N.Y., Y. M. Khalil, E. S. Sherbeny. 2005. A comparative study on the productivity and chemical constituents of carious sources and species of calendula plants as affected by two foliar fertilizers. Journal of Applied Sciences 1:176-189.

Palma, T. M. 2009. Cinética del crecimiento, desarrollo floral y acumulación de flavonoides en Caléndula (*Calendula officinalis* L.). Tesis presentada como requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados.

Palma, T. M., M. G. Cuevas, G. V. Cano, G. C. Mendoza. 2007. Mercadela cultivo y usos terapéuticos. Primera edición. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Fitotecnia. 133 p.

Piccaglia, R. M. Marotti, G. A. Chi , N. Gandini. 1997 Effects of harvesting date and climate on the flavonoid and carotenoid contents of marigold (*Calendula officinalis* L.). *Flavour and Fragrance Journal* 12:85-90.

Raal, A., and K. Kirsipuu. 2011. Total flavonoid content in varieties of *Calendula officinalis* L. originating from different countries and cultivated in Estonia. *Natural Product Research* 25, 658–62.SAS. 2002. Copyright (c) SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. Versión 9.0.

Ramakrishna, A. and Ravishankar, G. A. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling and behavior* 6:1720-1731.

Vogt, T. 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular plant*, 3: 2–20.

Wilen, R. W., B. Barl, E. A. Slinkard. 2004. Feasibility of cultivation calendula as a dual purpose industrial oilseed and medicinal crop. *Acta Horticulture* 629:199-206.

**6. EFECTO DE LA VARIEDAD Y FECHA DE CORTE EN EL CONTENIDO DE CAROTENOIDES EN CAPÍTULOS FLORALES DE CALÉNDULA (*Calendula officinalis* L.)**

Mariana Palma-Tenango<sup>1</sup>, R. Marcos Soto-Hernández<sup>2</sup>, Víctor A. González-Hernández<sup>1</sup>, Cecilia B. Peña-Valdivia<sup>2</sup>, Aquiles Carballo-Carballo<sup>3</sup> y Alfredo Carrillo-Salazar<sup>1</sup>

Postgrados en <sup>1</sup>Fisiología Vegetal, <sup>2</sup>Botánica y <sup>3</sup> Semillas. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillos. ( [vagh@colpos.mx](mailto:vagh@colpos.mx) [anairam@colpos.mx](mailto:anairam@colpos.mx) )

**RESUMEN**

Caléndula (*Calendula officinalis* L.) es una planta herbácea anual de la familia Asteraceae, originaria del Mediterráneo. El color de sus flores va de amarillo a anaranjado, según la variedad. Dicho color se origina a partir de varios pigmentos, entre ellos los carotenoides. También se ha demostrado diversidad varietal en su composición química. Sin embargo, no se ha investigado el efecto del manejo agronómico, como es el estrés causado por cosechas continuas de los capítulos florales, en el contenido de estos pigmentos. El objetivo de este estudio fue determinar la concentración de carotenoides totales en capítulos florales de seis variedades seleccionadas de caléndula cuyos capítulos florales fueron cosechados a los largo de nueve cortes sucesivos. La extracción de carotenoides totales se basó en el método colorimétrico. Se encontraron diferencias ( $P \leq 0.05$ ) entre materiales genéticos, entre fechas de corte y en su respectiva interacción, en cuanto a la concentración de carotenoides totales en los capítulos. Las variedades que produjeron la mayor concentración de carotenoides, en promedio de nueve fechas de corte, fueron V4 y V6, y las de menor concentración fueron V3 y V5. Los cortes óptimos con mayor concentración de carotenoides, en promedio de las nueve fechas de cosecha, fueron el 1, 3, 4, 7 y 9. En magnitud de efectos, el genético resultó mayor que el de fechas.

**Palabras clave:** Carotenoides, *Caléndula officinalis*, cosechas, cortes, variedades.

## ABSTRACT

Pot marigold (*Calendula officinalis* L.) is an annual herbaceous plant from the Asteraceae family, native to the Mediterranean. Its flowers vary in color from orange to yellow depending on the variety. In this species the flower color is due to various pigments including the carotenoids. Color diversity has been demonstrated in different varieties, and also in chemical composition. However, pot marigold has not been investigated regarding the carotenoid content as affected by agronomic management, such as the stress caused by continuous harvesting of the flower heads. The aim of this study was to determine the concentration of total carotenoids in six floral capitulum of six marigold varieties selected and harvested over nine cuts. Extraction of total carotenoids was done with a colorimetric method. Differences ( $P < 0.05$ ) were found among genetic materials, as well as among harvesting dates and in their respective interaction, in terms of the concentration of total carotenoids. The varieties that produced the largest concentration of carotenoids, on the average of nine harvest dates were V4 and V6, while varieties with the lowest concentration were V3 and V5. The optimal harvest dates for obtaining higher concentrations of carotenoids, averaged over nine harvest dates, were 1, 3, 4, 7 and 9. In magnitude of effects, the varietal one was greater than that of harvest dates.

**Keywords:** Carotenoids, *Calendula officinalis*, crops, cuts, varieties.

## 6.1. INTRODUCCIÓN

Los carotenoides son compuestos isoprenoides, que están presentes en todos los tejidos de las plantas, absorben energía de la luz en el intervalo de 420 a 500 nm, y funcionan como pigmentos captadores de luz en los organismos fotótrofos, disminuyen la fluidez de las membranas biológicas, y juegan un papel importante como fotoprotectores; también participan en la eliminación de radicales libres (Bouvier *et al.*, 2005).

Los carotenoides en los tejidos de las plantas, en particular flores y frutos, varían ampliamente en su contenido, incluso dentro de la misma especie vegetal. Hay evidencia de que su acumulación en tejidos vegetales está regulada predominantemente en el nivel transcripcional (Sandmann *et al.*, 2006).

Son considerados pigmentos debido a su color característico que va desde el amarillo hasta el rojo. Ha aumentado el uso comercial de estos compuestos y su investigación científica (Liu, 2009) debido a las múltiples funciones biológicas que presentan como: antioxidantes, en la regulación de la inmunidad, en la inhibición de la proliferación de células tumorales, combaten enfermedades cardiovasculares (Liu, 2009); como colorantes de alimentos naturales, como suplementos de nutrientes y sus aplicaciones en medicina, cosmética y aditivos de alimentos (Rao y Rao, 2007).

Caléndula es una planta originaria del Mediterráneo (Vârban *et al.*, 2008), de tipo herbácea, anual, de aproximadamente 50 cm de altura (Khan *et al.*, 2011), rica en varios compuestos fitoquímicos como flavonoides, aceites esenciales, y terpenoides entre otros. Destacan los carotenoides porque participan en la pigmentación de sus inflorescencias, que van desde amarillo al anaranjado, y donde se han reportado 19 diferentes tipos (Kishimoto *et al.*, 2005), variaciones de color que están influenciadas por los niveles en la acumulación del carotenoides, principalmente de luteína y betacaroteno (Moehs *et al.*, 2001).

Los carotenoides de caléndula tienen actividad antioxidante (Butnariu *et al.*, 2012) y son usados para pigmentar e incrementar el valor nutracéutico de alimentos

como los huevos de gallina y de codorniz (Karadas *et al.*, 2013), ya que se ha demostrado que al incluir esta planta en la dieta de los animales, aumentan su concentración de carotenoides en la yema de huevo.

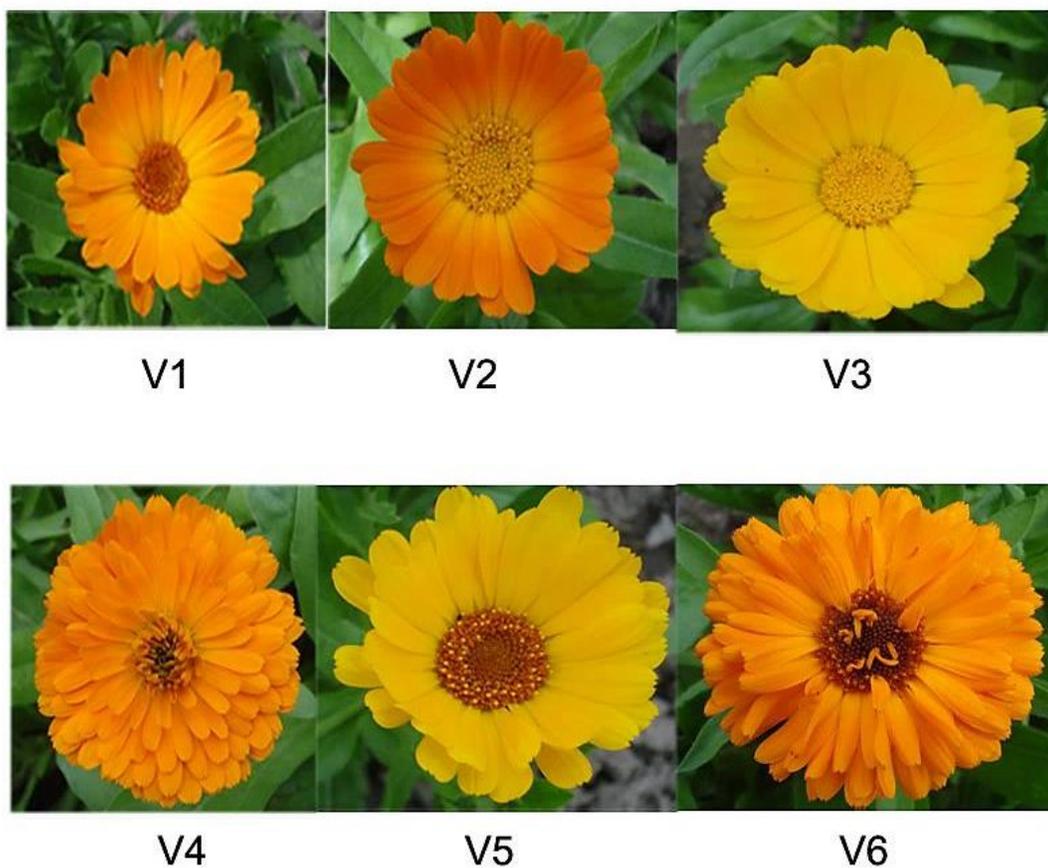
Con la finalidad de aprovechar al máximo la producción de capítulos florales de caléndula, ya que esta planta genera nuevos capítulos cuando se cosechan los formados (Berti *et al.*, 2003), lo que permite hacer varios cortes sucesivos y así prolongar su cosecha. Por ello es necesario identificar la capacidad de la planta para acumular carotenoides con este manejo agrícola de podas continuas en variedades con inflorescencias de tonalidad amarilla y anaranjado. El objetivo de este estudio fue determinar la concentración de carotenoides totales en capítulos florales de seis variedades seleccionadas de caléndula, cuyos capítulos fueron cosechados a lo largo de nueve cortes sucesivos.

## 6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Este estudio se realizó en Texcoco, Estado de México (19°29' N, 98°54' W y altitud de 2250 m).

Palma *et al.* (2007) hicieron una colecta a partir de semillas de plantas de caléndula en cultivos comerciales del municipio de Ozumba, Estado de México (19° 41' 49" N, 98° 45' 17" W y altitud de 2365 m). Después de varios ciclos de selección masal se seleccionaron las seis variedades utilizadas en este estudio (Figura 6.1).



**Figura 6. 1.** Variedades de caléndula evaluadas.

## **Siembra y manejo del cultivo**

La siembra se hizo el 03 de Mayo del 2011, en charolas de 112 cavidades rellenas con una mezcla de tierra de monte y peat moss Tourbe® (1:1). El almácigo se fertilizó dos veces con fórmula comercial 12-16-12 de N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O (PCH® Healthy Start®), a una dosis 0.208 g L<sup>-1</sup>. Cuando las plántulas tuvieron alrededor de 10 cm de altura se trasplantaron a campo, esto ocurrió a los 45 días después de la siembra, a una distancia de 60 cm entre plantas, para una densidad de población de 40,000 plantas ha<sup>-1</sup>. Los riegos fueron quincenales. En campo se hicieron tres deshierbes, dos aporques y para control de plagas cuatro aplicaciones con Bug Clean® (2 ml L<sup>-1</sup>).

La cosecha de los capítulos fue en forma manual y en cortes periódicos (cada 6 a 8 días), cuando alcanzaban la plena floración con flores tubulares y liguladas maduras. Se hicieron nueve cortes (cosechas) en total, que iniciaron a los 60 días después del trasplante.

Los capítulos recolectados fueron secados en estufa de aire forzado (Precisión 17® GCA Corp.) a 40 °C por 48 h, pesados en una balanza analítica, con nitrógeno líquido triturados y molidos en un mortero de porcelana para su posterior análisis químico en laboratorio.

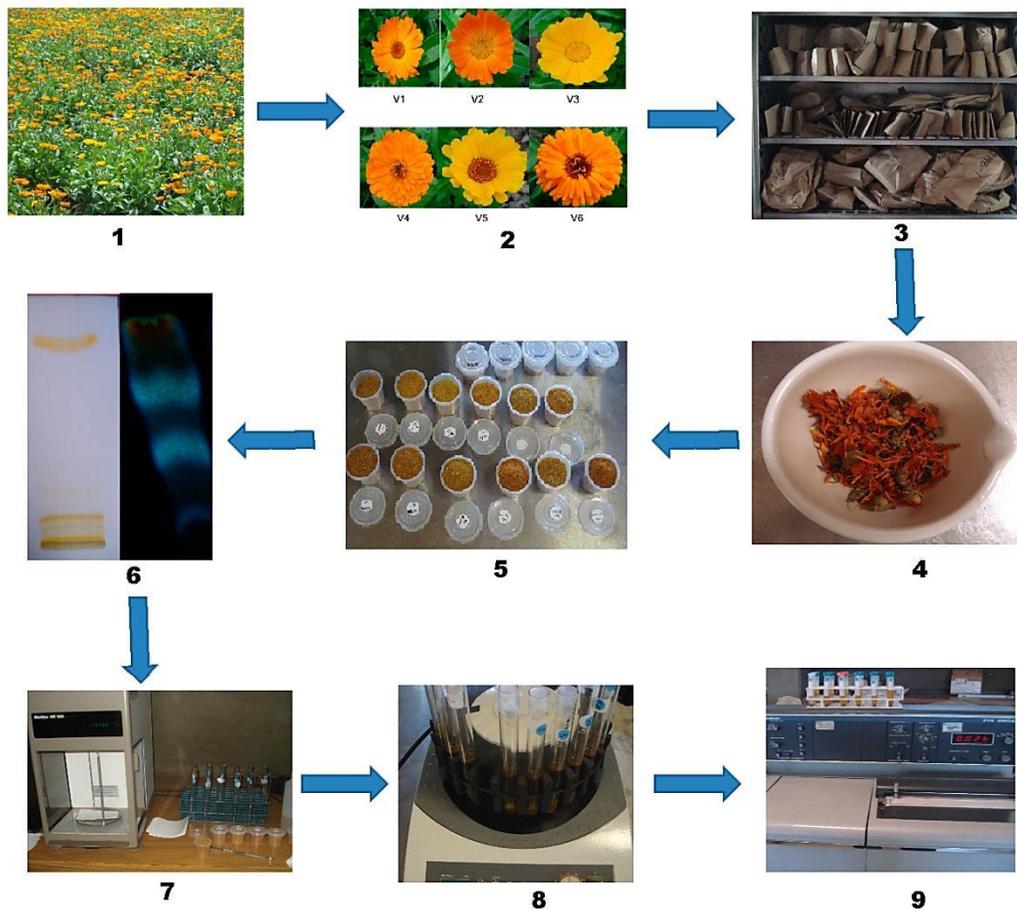
Los datos obtenidos de biomasa de capítulos se transformaron a rendimiento (kg ha<sup>-1</sup>), y se sometieron a análisis de varianza conforme a un diseño experimental bloques completos al azar con arreglo factorial 6 x 9, con dos repeticiones. La comparación de medias de carotenoides totales se hizo mediante la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). Los análisis estadísticos se hicieron con los paquetes SAS (SAS Institute, 2002) o InFostat (Di Rienzo *et al.*, 2013).

## **Determinación de carotenoides totales**

La técnica de extracción de carotenoides totales, se realizó con el método de Nagata y Yamashita (2002) (Figura 6.2). De cada muestra se pesó 150 mg de polvo fino de capítulos secos de caléndula, se agregó 10 mL de acetona-hexano (4:6, v/v) y

se agitó vigorosamente en un agitador (Heidolph Multi Reax®) durante 1 min; después el extracto se filtró a través de papel filtro Whatman N° 4, y enseguida se leyó la absorbancia del filtrado en un espectrofotómetro (PYE Unicam® SP-8 100) a 453, 503, 645 y 663 nm; posteriormente se sustituyeron los valores de absorbancia en la siguiente ecuación (Nagata y Yamashita, 2002):

$$\text{Carotenoides totales} \frac{\text{mg}}{100 \text{ mL}} = (0.216)(A_{663}) - (1.220)(A_{645}) - (0.304)(A_{505}) + (0.452)(A_{453})$$



**Figura 6. 2.** Diagrama del proceso de cuantificación de carotenoides totales.

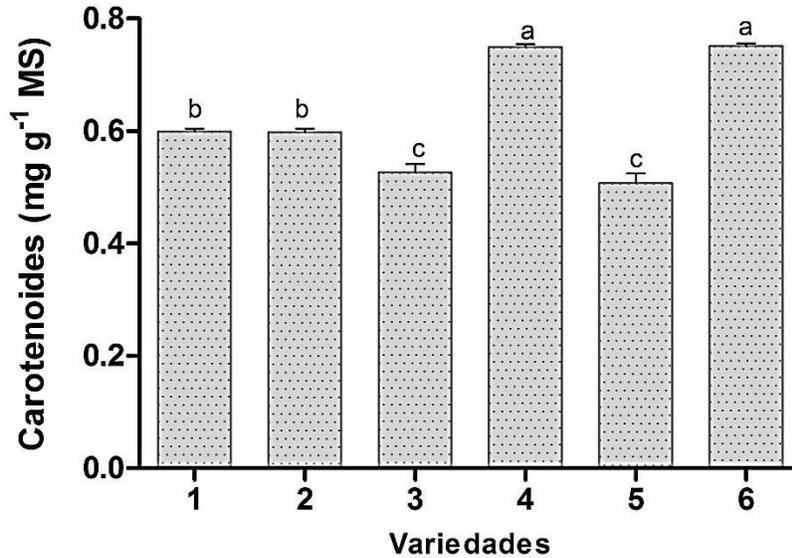
Para obtener los datos de producción de carotenoides totales (PCT, en kg ha<sup>-1</sup>), se usó la siguiente ecuación:

$$PCT = \frac{(\text{Concentración de carotenoides totales, mg g}^{-1} \text{ M.S})(\text{biomasa de capítulos secos, kg ha}^{-1})}{1000}$$

Los datos obtenidos de concentración de carotenoides totales (mg g<sup>-1</sup> MS) y de producción de carotenoides totales (kg ha<sup>-1</sup>) se sometieron a análisis de varianza conforme a un diseño experimental de bloques completos al azar con arreglo factorial 6 x 9, con dos repeticiones. La comparación de medias de flavonoides totales se hizo mediante la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). Los análisis estadísticos se hicieron con los paquetes SAS (SAS Institute, 2002) o InFostat (Di Rienzo *et al.*, 2013).

### 6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con respecto a la concentración de carotenoides totales, se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre variedades (en promedio de cortes) con 79 % de la variación debida a tratamientos, así como entre cortes (en promedio de variedades) con 8 % de la variación, y también de la respectiva interacción con 13 % de la variación (Anexo Cuadro 10.15). Es claro que la mayor fuente de variación en contenido de carotenoides totales es el efecto varietal. Las variedades V4 y V6 superaron a las otras variedades ( $P \leq 0.05$ ), seguidas de las variedades V1 y V2. Las de menor concentración fueron las variedades V3 y V5 (Figura 6.3).



**Figura 6. 3.** Concentración de carotenoides totales en los capítulos de seis variedades de caléndula, en promedio de nueve cortes. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05; DMS = 0.041). Las líneas verticales en cada columna corresponden a las desviaciones estándar (n = 27).

En la concentración de carotenoides totales, las variedades V4 y V6 superaron en 29.3 % a las variedades V3 y V5, que fueron que acumularon menos.

Todas las variedades tuvieron presencia de carotenoides (0.62 mg g<sup>-1</sup> en promedio), en rangos que fueron de 0.51 a 0.75 mg g<sup>-1</sup>, valores que corresponden al rango de 0.56 a 0.85 mg g<sup>-1</sup> de carotenoides totales reportados por Azzaz *et al.* (2007) para inflorescencias de caléndula cultivadas sin tratamiento alguno, y mucho mayores que el valor promedio (0.03 mg g<sup>-1</sup>) reportado por Naguib *et al.* (2005) para variedades de caléndula.

Cabe señalar que hubo diferencias en la concentración de estos pigmentos en variedades con tonalidades distintas en sus inflorescencias, pues la concentración fue mayor en variedades de tonalidad anaranjado con respecto a las amarillas, tendencia que ha sido reportada por otros autores (Kishimoto *et al.*, 2005; Kishimoto y Ohmiya, 2012), lo que sugiere una correlación alta entre el contenido de carotenoides y el la intensidad del color en las flores.

Las variedades V3 (0.53 mg g<sup>-1</sup>) y V5 (0.51 mg g<sup>-1</sup>), ambas de tonalidad amarilla y de menor contenido de carotenoides totales en este estudio, tuvieron mayor

concentración que la reportada por Pintea *et al.* (2003) para una variedad de la misma tonalidad (0.48 mg g<sup>-1</sup>). En cambio, las variedades de tonalidad anaranjado que aquí presentaron los mayores contenidos de carotenoides (0.60 a 0.75 mg g<sup>-1</sup>) son inferiores a los valores más altos (1.118 a 2.76 mg g<sup>-1</sup>) reportados por Pintea *et al.* (2003).

Al integrar los valores de rendimiento de capítulos con la concentración de carotenoides totales, se detectaron diferencias significativas en la producción de carotenoides por variedad ( $P \leq 0.05$ ), así como entre cortes en promedio de variedades, pero sin efecto de la interacción variedades x cortes (Cuadro 10.19 Anexo). Entre variedades destacaron V2, V3, V4 y V5 (Figura 6.1), lo que también demuestra que la producción por hectárea de estos pigmentos se ve influenciada más por el rendimiento que por la concentración del compuesto en sí.

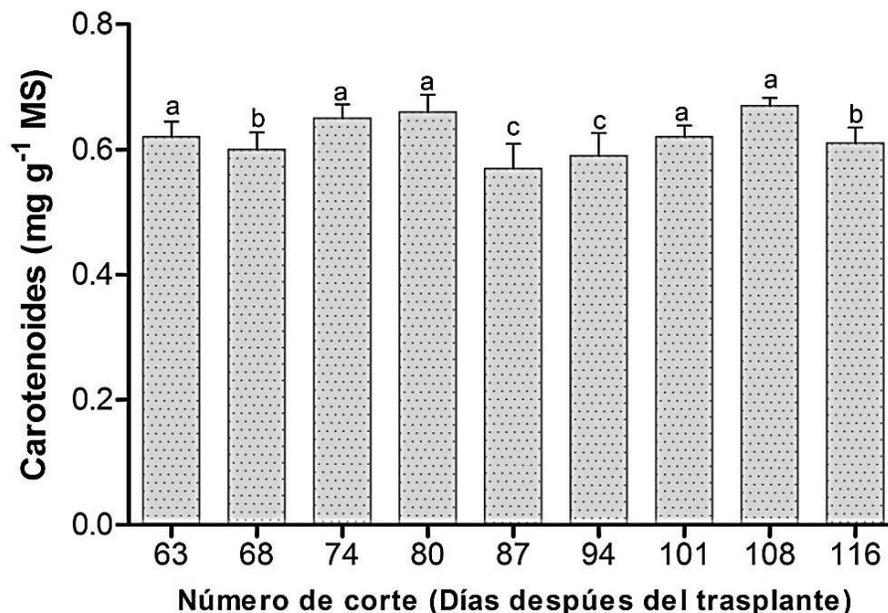
**Cuadro 6. 1.** Producción de carotenoides totales por variedad.

Variedad	Rendimiento de capítulos (kg ha <sup>-1</sup> )	Concentración de carotenoides (g kg <sup>-1</sup> de MS)	Producción de carotenoides (kg ha <sup>-1</sup> )
1	239.14 b	0.60 b	0.12 b
2	338.28 a	0.60 b	0.16 a
3	279.43 b	0.53 c	0.15 a
4	492.00 a	0.75 a	0.23 a
5	349.43 a	0.51 c	0.13 b
6	322.57 a	0.75 a	0.17 a

Medias con la misma letra en una columna, son estadísticamente iguales entre sí (Tukey, 0.05).

El contenido de carotenoides totales también varió significativamente ( $P \leq 0.05$ ) entre las cosechas o cortes sucesivos (Anexo Cuadro 10.15), en promedio de las seis variedades. Sobresalen los cortes 1, 3, 4, 7 y 8, como se observa en la Figura 6.4. La concentración de estos pigmentos fluctuó de 0.57 a 0.67 mg g<sup>-1</sup>, variación que es relativamente baja en comparación con los valores encontrados en otros estudios (Pintea *et al.*, 2003).

Estos resultados confirman que en caléndula se pueden hacer varias cosechas de capítulos, para aprovechar la capacidad de esta planta de generar nuevos capítulos después de un corte. Y aún con este manejo de podas florales continuas, hay presencia de carotenoides totales en todos los cortes y con contenidos similares.



**Figura 6. 4.** Concentración de carotenoides totales a través de nueve cortes sucesivos, en promedio de seis variedades de caléndula. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05; DMS = 0.055). Las líneas verticales en cada corresponden a las desviaciones estándar (n = 18).

Al igual que la concentración de carotenoides totales a través de cortes, en promedio de seis variedades de caléndula, hubo diferencias significativas en la producción de carotenoides totales ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) entre cortes como se observa en el Cuadro 6.2; en este caso las dos primeras cosechas (63 y 68 días después del trasplante) mostraron los rendimientos más bajos ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) de carotenoides por hectárea, indicando que aunque los primeros cortes tengan mayor concentración de carotenoides, no necesariamente será así la producción de estos pigmentos por hectárea, ya que son influenciados más por el rendimiento de capítulos que por la concentración del compuesto en sí.

**Cuadro 6. 2.** Producción de carotenoides totales en diferentes fechas de cosecha (en promedio de seis variedades de caléndula).

Días después del trasplante	Número de cosecha	Rendimiento de capítulos (kg ha <sup>-1</sup> )	Concentración de carotenoides (g kg <sup>-1</sup> de MS)	Producción de carotenoides (kg ha <sup>-1</sup> )
63	1	60.6 c	0.62 a	0.04 c
68	2	100.33 c	0.60 b	0.06 c
74	3	182.00 b	0.65 a	0.12 b
80	4	312.33 a	0.66 a	0.20 a
87	5	344.67 a	0.57 c	0.20 a
94	6	313.00 a	0.59 c	0.18 a
101	7	386.33 a	0.62 a	0.24 a
108	8	325.33 a	0.67 a	0.22 a
116	9	290.67 a	0.61 b	0.18 a

Medias con la misma letra en una columna, son estadísticamente iguales entre sí (Tukey, 0.05).

Piccaglia *et al.* (1997) no encontraron diferencias entre cortes en el rendimiento de carotenoides por hectárea, aunque se debe señalar que en nuestro estudio solo fueron diferentes en la producción de carotenoides los tres primeros cortes, comparados con el resto.

En el rendimiento de carotenoides totales por hectárea el efecto de cortes es de mayor magnitud que el efecto de variedades. Y como se mencionó antes, no hubo efecto significativo de la respectiva interacción (Anexo Cuadro 10.19).

## 6.4. CONCLUSIONES

Todas las variedades de caléndula cultivadas en el Valle de México acumularon carotenoides totales, y se detectaron en todos los cortes. Sin embargo, hubo variación entre variedades, donde destacan las variedades V4 y V6 por tener mayor concentración con respecto a las variedades V1, V2, V3 y V5.

Al integrar el rendimiento de capítulos y su concentración de carotenoides totales, las variedades V2, V3, V4 y V6 fueron las de mayor rendimiento por hectárea de estos pigmentos.

La concentración de carotenoides totales también varió entre fechas de corte de los capítulos, donde los valores mayores fueron en los cortes uno (63 días), tres, cuatro, siete y ocho. Dado las diferencias entre los datos entre este rango se puede inferir que el contenido de carotenoides tiende a ser constante a través de cortes. La variación debida a cortes fue menor que la variación observada entre variedades.

El rendimiento de carotenoides totales en los capítulos florales ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) fue más afectado por la acumulación de biomasa en los propios capítulos que por la concentración de esos compuestos.

## 6.5. LITERATURA CITADA

- Azzaz, N. A., E. A. Hassan and F. A. Emarey. 2007. Physiological, anatomical, and biochemical studies on pot marigold (*Calendula officinalis* L.) plants. African Crop Science Conference Proceedings 8:1727–1738.
- Berti, M. D., W. E. Rosemarie, H. H. Felicitas y A. Montecinos. 2003. Influencia de la fecha de siembra y de la procedencia de la semilla en el rendimiento de capítulos de *Calendula officinalis* L. durante dos temporadas en Chillan. Agricultura Técnica 63:3–9.
- Bouvier, F., J. C. Isner, O. Dogbo and B. Camara. 2005. Oxidative tailoring of carotenoids: a prospect towards novel functions in plants. Trends in Plant Science 10:187–194.
- Butnariu, M. and C.Z. Coradini. 2012. Evaluation of biologically active compounds from *Calendula officinalis* flowers using spectrophotometry. Chemistry Central Journal 6:1–7.
- Karadas, F., E. Grammenidis, F. Surai, T. Acamovic, N. Sparks. 2006. Effects of carotenoids from lucerne, marigold and tomato on egg yolk pigmentation and carotenoid composition. British Poultry Science 47:561–566.
- Khan, M. U., A. Rohilla, D. Bhatt, S. Afrin, S. Rohilla, S. Ansari. 2011. Review article diverse belongings of *Calendula officinalis*. An Overview 3:173-177.
- Kishimoto, S., T. Maoka, K. Sumitomo, A. Ohmiya. 2005. Analysis of carotenoid composition in petals of calendula (*Calendula officinalis* L.). Bioscience Biotechnology and Biochemistry 69:2122-2128.
- Kishimoto, S., and A. Ohmiya. 2012. Carotenoid isomerase is key determinant of petal color of *Calendula officinalis*. The Journal of Biological Chemistry 287:276–85.
- Liu, G.N., H. Y. Zhu, G. J. Jiang. 2009. The metabolomics of carotenoids in engineered cell factory. Applied Microbiology and Biotechnology 83:989–99.

Moehs, C.P., L. Tian, W. K. Osteryoung, D. DellaPenna. 2001. Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development. *Plant Molecular Biology*. 45: 281-293.

Nagata, M. and I. Yamashita. 2002. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish*. 39:925-928.

Naguib, N.Y., Y. M. Khalil, E. S. Sherbeny. 2005. A comparative study on the productivity and chemical constituents of various sources and species of calendula plants as affected by two foliar fertilizers. *Journal of Applied Sciences* 1:176-189.

Palma, T. M., M. G. Cuevas, G. V. Cano, G. C. Mendoza. 2007. *Mercadela cultivo y usos terapéuticos*. Primera edición. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Fitotecnia. 133 p.

Palma, T. M. 2009. Cinética del crecimiento, desarrollo floral y acumulación de flavonoides en Caléndula (*Calendula officinalis* L.). Tesis presentada como requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados.

Piccaglia, R. M. Marotti, G. A. Chi , N. Gandini. 1997 Effects of harvesting date and climate on the flavonoid and carotenoid contents of marigold (*Calendula officinalis* L.). *Flavour and Fragrance Journal* 12:85-90.

Pintea, A., C. Bele, S. Andrei, C. Socaciu. 2003. HPLC analysis of carotenoids in four varieties of *Calendula officinalis* L. flowers. *Acta Biologica Szegediensis* 47:37-40.

Rao, A.V. and G. L. Rao. 2007. Carotenoids and human health. *Pharmacol Res* 55:207-216.

Sandmann, G., S. Romer, P. Fraser. 2006. Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. *Metabolic Engineering* 8:291-302.

Vârban, D. A., M. M. Duda, R. Vârban, S. Muntean. 2008. The influence of the nutrition space upon the production, at *Calendula officinalis* L. in the conditions of Cluj Napoca. *Journal of Agricultural Science*: 235–238.

## 7. CARACTERIZACIÓN Y DESCRIPCIÓN VARIETAL DE *Calendula officinalis* L.

Mariana Palma-Tenango<sup>1</sup>, Aquiles Carballo-Carballo<sup>3</sup>, Víctor A. González-Hernández<sup>1</sup>,  
R. Marcos Soto-Hernández<sup>2</sup>, Cecilia B. Peña-Valdivia<sup>2</sup>, Alfredo Carrillo-Salazar<sup>2</sup> y  
Manuel Jiménez-Vasquez<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Fisiología Vegetal. <sup>2</sup>Botánica. <sup>3</sup> Semillas <sup>4</sup> Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillos. ( [vagh@colpos.mx](mailto:vagh@colpos.mx) [anairam@colpos.mx](mailto:anairam@colpos.mx) )

### RESUMEN

En el mundo se comercializan diferentes variedades de caléndula (*Calendula officinalis* L.); sin embargo, de acuerdo a la Unión Internacional para la Protección de Nuevas Variedades [UPOV](#) (por su siglas en inglés: International Union for the Protection of New Varieties of Plants) no existe una guía de descripción varietal para dicha especie. Los descriptores varietales son una herramienta importante para identificar variedades. El objetivo de esta investigación fue proponer una guía para la descripción varietal de caléndula, mediante la descripción de caracteres morfológicos de la planta en 24 variedades elegidas visualmente por su variación en las características de sus capítulos florales, para este fin en los años 2010 y 2011, se obtuvo el manual gráfico para la descripción de caracteres morfológicos en planta, tallo, hoja, capítulo, sépalos, lígula, flor tubular y fruto de caléndula. Las principales diferencias para identificar variedades nuevas de caléndula se centraron en su inflorescencia. Se pudo aportar un grupo de características para la rápida identificación de variedades de caléndula.

**Palabras clave:** Descripción varietal, caléndula, caracterización, manual gráfico.

## ABSTRACT

In the world of pot marigold (*Calendula officinalis* L.) varieties are marketed. However, according to the UPOV there is no guide varietal description for that species in the world. Varietal descriptors are an important tool for identifying varieties. The objective of this research was to propose a guide for varietal description of calendula, by describing morphological characters of the plant varieties in 24 visually chosen for their variation in the characteristics of their flower heads, for this purpose in 2010 and 2011. The graphic manual for the description of morphological characters in plant stem, leaf, chapter, sepals, ligule, tubular marigold flower and fruit was obtained. The main differences to identify new varieties of marigold focused on its inflorescence. It could provide a set of general character for the rapid identification of varieties of Calendula.

**Keywords:** Varietal description, calendula, characterization, graphic manual.

## 7.1. INTRODUCCIÓN

Caléndula es una planta ornamental, industrial y medicinal (Breemhaar y Bouman, 1995) que se encuentra distribuida en todo el mundo (Długosz *et al.*, 2003) y se cultiva en varios países, entre ellos Alemania, Colombia, Costa Rica, España, Estados Unidos, Francia, Hungría, Japón, Kuwait, México, Polonia, Rumania, Suecia, Suiza, y Rusia (Acosta *et al.*, 2001).

Los órganos de mayor uso son los capítulos florales, los cuales contienen una diversidad de compuestos químicos de interés por sus actividades terapéuticas, entre los que destacan los flavonoides (Raal y Kirsipuu, 2011), carotenoides (Pintea *et al.*, 2003), ácido oleanólico (Długosz *et al.*, 2003) cumarinas, esteroides (Muley *et al.*, 2009), ácido grasos, saponinas (Szakiel *et al.*, 2005), aceites esenciales (Kaškonienė *et al.*, 2011), y terpenoides (Neukirch *et al.*, 2004).

La Unión Internacional para la Protección de Nuevas Variedades [UPOV](#) (por sus siglas en inglés: International Union for the Protection of New Varieties of Plants), es una organización que se encarga de proteger los derechos de obtentor. Para obtener la protección de una nueva variedad se deben cumplir con requisitos como: que la variedad sea distinta (D) de cualquier otra variedad, que sea suficientemente homogénea (H) y estable (S), de conformidad con el examen de distinción, homogeneidad y estabilidad (DHE) (UPOV, 2002). Este examen o test, se basa principalmente en ensayos en cultivo, llevadas a cabo por la autoridad competente para la concesión de derechos de obtentor. El examen se hace siguiendo los descriptores varietales para cada especie, mediante una serie de descriptores morfológicos, químicos y fisiológicos, los cuales permiten el cumplimiento de los requisitos de los ensayos (Montoya *et al.*, 2008).

Existe una diversidad de variedades de caléndula que se comercializan principalmente con fin ornamental. Sin embargo, no se cuenta con una guía de descripción varietal (UPOV, 2014) que permita facilitar un examen DHE y hacer la diferenciación entre las variedades de esta especie. Debido a la amplia variabilidad

genotípica y fenotípica que ha mostrado una variedad de origen desconocido que se cultiva comercialmente en el Estado de México (Palma *et al.*, 2007), se considera importante contar con una guía de los caracteres morfológicos de las plantas, para hacer la descripción varietal en esta especie.

Una descripción varietal se define como el informe técnico mediante el cual se especifican los caracteres pertinentes de la variedad vegetal, conforme a su guía específica, y que permite evaluar la identidad genética y tener una caracterización integrada, como el conjunto de observaciones que permiten distinguir a una población de plantas que constituyen una variedad vegetal (Bourgoin y Lallemand, 1993).

Por lo anterior, el objetivo de esta investigación es proponer una guía para la descripción varietal de caléndula, mediante la descripción de caracteres morfológicos de la planta a partir de 24 variedades elegidas visualmente en los años 2010 y 2011, por su variación en las características de sus capítulos florales.

### **7.3. MATERIALES Y MÉTODOS**

La caracterización para hacer la descripción varietal de caléndula se hizo en cultivo de campo en dos ciclos de producción en los años 2010 y 2011, en Texcoco, Estado de México (19°29' N, 98°54' W), a una altitud de 2250 m.

El material vegetal usado fueron 24 selecciones de caléndula (Figura 7.1) obtenidas por selección de la variedad comercial que se siembra en la región de Ozumba, Estado de México (19°41'49"N, 98° 45'17"W y altitud de 2365 m), muy heterogénea en los capítulos de las plantas individuales que la componen.



**Figura 7. 1.** Materiales de caléndula seleccionados en dos ciclos de producción (2010 y 2011).

La selección de características se basó en la metodología para la descripción de variedades utilizadas por la Unión Internacional para la Protección de Nuevas Variedades [UPOV](#) (por su siglas en inglés: International Union for the Protection of New Varieties of Plants).

La evaluación de características se hizo en 30 plantas de cada variedad o selección. Los caracteres considerados fueron: en planta: porte y altura; en tallo: presencia de antocianinas y número de ramificaciones; en hoja: longitud, forma, forma del ápice; en capítulo: distribución en el follaje, tipo, diámetro; en sépalos: presencia de antocianinas; en lígula: estructura, forma del ápice y color; en flor tubular: presencia de antocianinas. Se calificaron en la etapa fenológica tres (Cuadro 7.1), cuando el capítulo floral está completamente abierto, con flores tubulares y liguladas maduras, y cuando ocurre polinización y fecundación de óvulos. El carácter medido en fruto fue longitud, que se calificó en la etapa fenológica cinco, cuando el fruto ya estaba formado.

**Cuadro 7. 1.** Fenología de caléndula.

Etapa	Nombre de la etapa	Secuencia
0	Germinación y emergencia	Más de 50% de semillas germinadas.
1	Crecimiento de plántulas	Formación de dos hojas vegetativas.
2	Crecimiento de la planta	Formación de hojas maduras. Formación de ramas y tallos secundarios. Formación del meristemo apical vegetativo, visto como domo liso y translúcido de color ligeramente verde-amarillo. Meristemo apical en etapa reproductiva, que ha iniciado la formación de primordios de órganos reproductores del capítulo. Botón con flores tubulares que inician pigmentación en dirección centripeta.
3	Desarrollo floral	Botón con todas las flores tubulares pigmentadas. Botón floral con flores tubulares y liguladas encerradas por completo en los sépalos. Botón floral, con sépalos aún fusionados. Inicio de apertura del botón floral, cuando los sépalos empiezan a abrir y dejan ver a las flores liguladas. Las flores liguladas se han alargado y ya sobrepasan a los sépalos. Flores liguladas de color amarillo intenso y aún en posición vertical. Flores liguladas se empiezan a ponerse en posición horizontal y a separarse entre sí. Capítulo floral completamente abierto, con flores tubulares y liguladas maduras. Es cuando ocurre polinización y fecundación de óvulos. Comienza la pérdida de turgencia y de pigmentación

de las flores liguladas, que también marca el inicio de la senescencia floral.

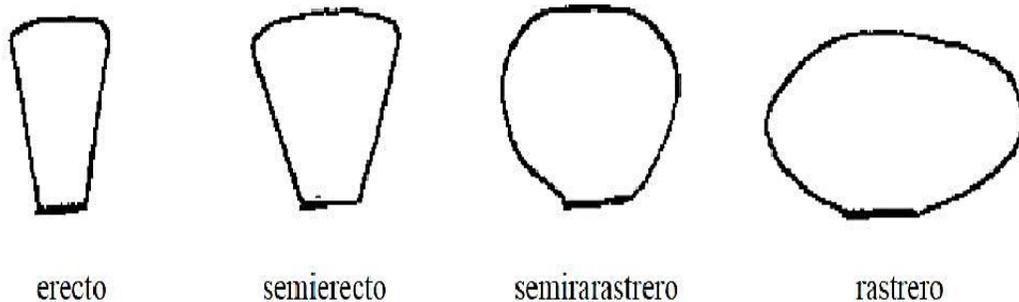
Comienza la senescencia del capítulo donde ocurre el desprendimiento de pétalos de flores liguladas y tubulares.

4	Formación de las semillas	Formación de achenios.
5	Semilla	Semillas completamente formadas.

Los datos se evaluaron de la siguiente forma:

Planta: porte

Se le ha otorgado la siguiente clasificación de acuerdo con el descriptor planta: porte propuesta por UPOV (2006) (Figura 7.2).



**Figura 7. 2.** Tipos de porte en plantas.

Planta: altura

Se tomó como la dimensión que presentó la planta, medida desde el nivel del suelo hasta el último entrenudo de donde se generan los pedúnculos, al igual que lo hizo Cervantes (2000). Se midió (cm) en plantas diferentes y mediante frecuencias acumuladas (cantidad de veces que se repite un determinado valor de la variable) se obtuvieron los rangos correspondientes a tres niveles: baja, media y alta (Cuadro 7.2).

**Cuadro 7. 2.** Frecuencias acumuladas de altura de planta (cm) para tres niveles de clasificación. En negritas se marcan las clases elegidas para establecer los niveles de clasificación.

Clase (Altura cm)	Frecuencia	Raíz cuadrada de la frecuencia	Frecuencia acumulada de la raíz cuadrada	Niveles de clasificación
50-55	1	1	1	
56-60	6	2.44949	3.44949	
<b>61-65</b>	9	3	<b>6.44949</b>	<b>Baja &lt; 65 cm</b>
66-70	6	2.44949	8.89898	
<b>71-75</b>	2	1.41421	<b>10.3132</b>	<b>Media 66 a 75 cm</b>
<b>76-80</b>	2	1.41421	11.7274	<b>Alta &gt; 76 cm</b>
81-85	1	1	12.7274	
86-90	2	1.41421	14.1416	
91-95	0	0	14.1416	
96-100	1	1	<b>15.1416</b>	
Número de plantas	30		15.1416 / 3 = 5.04 5.04+5.04 = 10.08	

Tallo: presencia de antocianinas

Se observó la coloración rojiza característica de estos compuestos, en los tallos de cada variedad.

Tallo: número de ramificaciones

Se contaron las ramas de cada planta, junto con la observación cualitativa en campo de las diferentes variedades.

Hoja: longitud

Se consideró como largo a la medida desde el punto donde el peciolo se une al tallo hasta el ápice de la hoja. La clasificación se hizo mediante frecuencias acumuladas.

Hoja: forma

Se consideraron las hojas maduras de la parte media de la planta, para su clasificación de acuerdo con Cervantes (2000).

Hoja: forma del ápice

Se consideraron las hojas maduras de la parte media de la planta para su clasificación.

Capítulo: distribución del follaje

Se tomó como la ubicación de los capítulos con respecto al follaje.

Capítulo: tipo

Se refiere a los estratos de flores liguladas. El simple tiene 1 estrato, el doble dos y el tipo margarita tres; después de tres estratos se denominó múltiple.

Capítulo: diámetro

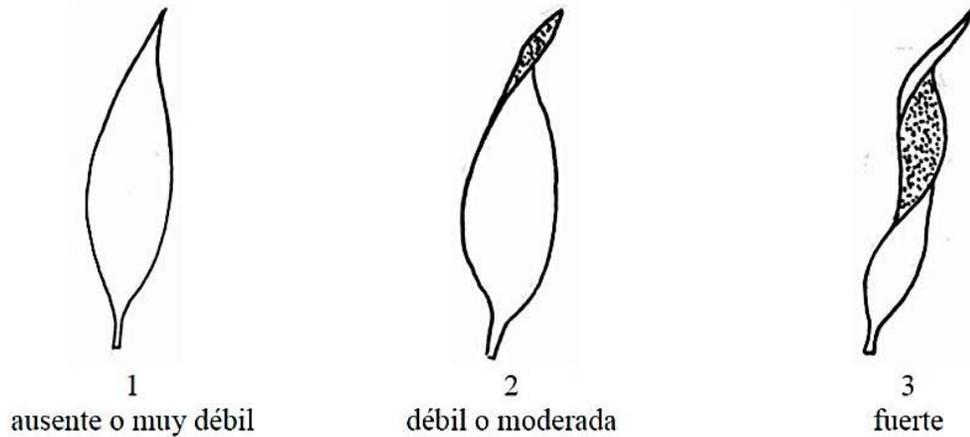
Se clasificaron dos capítulos de cada material y se ubicaron en tres categorías; la clasificación fue cualitativa.

Sépalos: presencia de antocianinas

Se ubicó a simple vista y en microscopio, la tonalidad rojiza característica.

Lígula: torsión

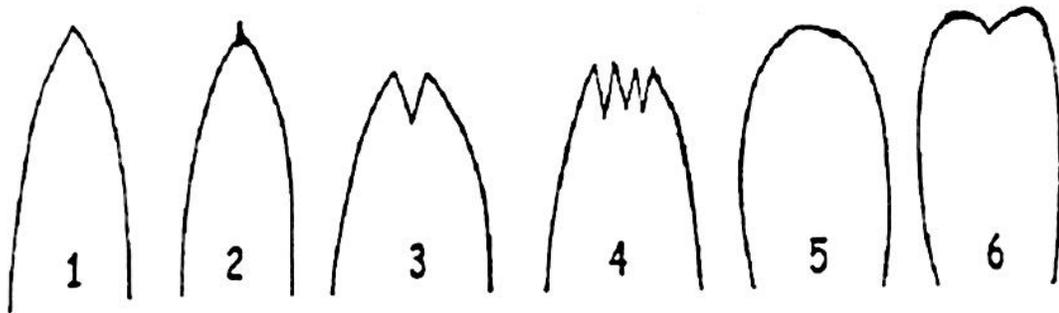
Clasificación de acuerdo con UPOV (2006) en una guía técnica (Figura 7.3).



**Figura 7. 3.** Tipos de torsión en las lígulas

Lígula: forma del ápice

Forma que presentó el extremo apical de la flor ligulada (Figura 7.4).



**Figura 7. 4.** Forma del ápice de flores 1) agudo; 2) Mucronado; 3) Partido; 4) Pragmorso; 5) Redondo; 6) Acorazado

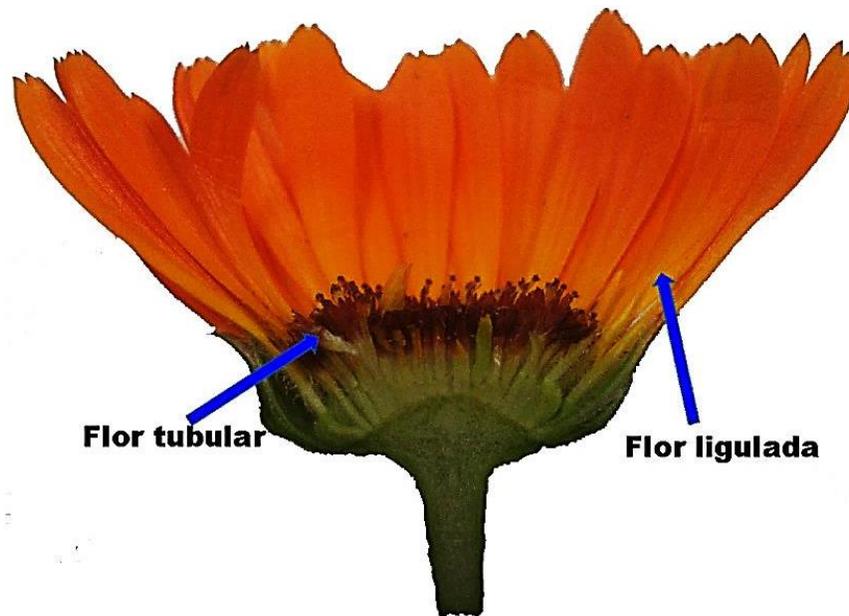
Lígula: color

Referente al número de colores observados en una sola flor ligulada, uno, dos o más colores.

Flor tubular: presencia de antocianinas (+)

Se identificó la presencia del color rojizo característico de estos compuestos (antocianinas). Con ayuda de una navaja, se corta el capítulo floral a la mitad (Figura 7.5) y se extrae una o varias flores tubulares con unas pinzas, para posteriormente observarlas en un microscopio estereoscópico e identificar el color característico de los

pigmentos. La calificación de este carácter se lleva a cabo cuando la inflorescencia está madura.



**Figura 7. 5. Capítulo floral de caléndula, flores liguladas y tubulares.**

Fruto: longitud

Clasificación cualitativa de cinco frutos de 30 plantas.

La nomenclatura usada para describir cada carácter se basó en guías del UPOV para especies similares, y fue la siguiente:

(\*) Carácter esencial.

(+): Remite a la sección: Explicaciones y Métodos; relaciona la característica con las figuras y/o especificaciones correspondientes, que permiten distinguir una variedad respecto a otra similar.

QL: Carácter cualitativo.

QN: Carácter cuantitativo.

PQ: Carácter pseudocualitativo.

MG: Medición única a un grupo de plantas o partes de plantas.

MS: Medición de varias plantas individuales o partes de plantas.

VG: Evaluación visual mediante una única observación a un grupo de plantas.

VS: Evaluación visual mediante observación de varias plantas individuales o partes de plantas.

## 7.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización varietal de caléndula

#### 1. Planta: Porte

PQ

VG



**Figura 7. 6.** Tipo de porte de planta de caléndula.

#### 2. Planta: Altura

QN

MS

Baja (< 60 cm)  
(3)

Media (66-65 cm)  
(5)

Alta (>76 cm)  
(7)

#### 3. Tallo: Presencia de antocianinas

QL (\*)

VS



Ausente  
(1)



Presente  
(9)

**Figura 7. 7.** Presencia de antocianinas en el tallo de caléndula.

4. Tallo: Número de ramificaciones

QN

MS



Pocas (< 12)  
(3)



Medias (12-20)  
(5)



Muchas (>20)  
(7)

**Figura 7. 8.** Ramificaciones del tallo de caléndula.

5. Hoja: Longitud

QN

MS

Corta (< 16 cm)  
(3)

Media (17-20 cm)  
(5)

Larga (>21 cm)  
(7)

6. Hoja: Forma

PQ (\*)

VS



Oblonga  
(1)



Ovada  
(2)

**Figura 7. 9.** Forma de hoja de caléndula.

7. Hoja: Forma del ápice

PQ

VS



**Figura 7. 10.** Formas del apice de la hoja de caléndula.

8. Capítulo: Distribución en el follaje

PQ

VG



Parte media del follaje  
(1)



Sobre el follaje  
(2)

9. Capítulo: tipo

PQ

VS



**Figura 7. 12.** Tipos de capítulos de caléndula.

10. Capítulo: Diámetro

QN

VS

Chico  
(3)

Medio  
(5)

Grande  
(7)

11. Sépalos: presencia de antocianinas

QL (\*)

VS



Ausente o débil  
(3)



Fuerte  
(9)

**Figura 7. 13.** Presencia de antocianinas en sépalos de capítulos de caléndula.

12. Lígula: torsión

QL (\*)

VS



**Figura 7. 14.** Tipos de torción de lígulas en capítulos de caléndula.

13. Lígula: forma del ápice

PQ (\*)

VS



**Figura 7. 15.** Formas del ápice de lígulas de caléndula.

14. Lígula: color

QL (\*)

VS



Un color  
(1)



Dos colores  
(2)

**Figura 7. 16.** Número de colores en lígulas de caléndula.

15. Flor tubular: Presencia de antocianinas

QL

(\*)

VS

(+)



**Figura 7. 17.** Presencia de antocianinas en flores tubulares de caléndula.

16. Fruto: Longitud

PQ (\*)

VS



**Figura 7. 18.** Longitud del fruto de caléndula.

## 7.5. CONCLUSIONES

Aquí se propone la primera guía para la descripción y caracterización varietal de caléndula. Incluye características que pueden servir para el examen DHE para variedades cultivadas en el Valle de México. En esta guía el mayor número de características descritas se refieren al órgano floral que es donde se detectó la mayor variación, lo que evidencia a los capítulos florales como órganos decisivos para diferenciar y proteger a nuevas variedades.

Falta incluir otras características para la descripción varietal de caléndula, referentes a semilla, plántula y fruto, así como marcadores moleculares, lo que abre posibilidades para futuros estudios al respecto.

## 7.6. LITERATURA CITADA

Acosta, L., C. F. Rodríguez, y E. G. Sánchez. 2001. Instructivo Técnico de *Calendula officinalis*. Revista Cubana 1:23-27.

Bourgoin-Greneche, M and J. Lallemand. 1993. Electrophoresis and its application to the description of varieties. A presentation of techniques used by GEVES, Ed. GEVES, Guancourt

Breemhaar, H. G., y A. Bouman. 1995. Harvesting and cleaning *Calendula officinalis*, a new arable oilseed crop for industrial application. Industrial Crops and Products 4, 250-255.

Cervantes, G. V. 2000. Guía técnica y de referencia para pruebas de distinción, homogeneidad y estabilidad en *Dahlia* spp. Tesis presentada como requisito para obtener el grado de maetsro en ciencias. Colegio de Postgraduados.

Dlugosz, M., E. Wiktorowska, A. Wiśniewska and C. Pączkowski. 2013. Production of oleanolic acid glycosides by hairy root established cultures of *Calendula officinalis* L. Acta Biochimica Polonica 60:1-7

Kaškonienė, V., P. Kaškonas, M. Jalinskaitė, A. Maruška. 2011. Chemical Composition and Chemometric Analysis of Variation in Essential Oils of *Calendula officinalis* L. during Vegetation Stages. *Chromatographia* 73:163-169.

Montoya, A., N. Rodríguez, I. Pérez, C. Marín. 2008. Identificación de descriptores morfológicos relevantes para la distinción de variedades y líneas élites de arroz venezolano con fines de protección intelectual. *Agronomía Tropical* 58: 223-232.

Muley, B. P., S. S. Khadabadi, B. N. Banarase, G. College, K. Naka, M. State. 2009. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *calendula officinalis* linn (asteraceae): a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 8:455-465.

Neukirch, H., M. D'Ambrosio, J. V. Dalla, A. Guerriero. 2004. Simultaneous quantitative determination of eight triterpenoid monoesters from flowers of 10 varieties of *Calendula officinalis* L. and characterisation of a new triterpenoid monoester. *Phytochemical Analysis* 15:30-35.

Pintea, A., C. Bele, S. Andrei, C. Socaciu. 2003. HPLC analysis of carotenoids in four varieties of *Calendula officinalis* L. flowers. *Acta Biologica Szegediensis* 47:37-40.

Raal, A., and K. Kirsipuu. 2011. Total flavonoid content in varieties of *Calendula officinalis* L. originating from different countries and cultivated in Estonia. *Natural Product Research* 25, 658–62.

Szakiel, A., D. Ruszkowski, W. Janiszowska. 2005. Saponins in *Calendula officinalis* L. Structure, Biosynthesis, Transport and Biological Activity. *Phytochemistry Reviews* 4:151–158.

UPOV, 2002. Introducción general al examen de la distinción, homogeneidad y estabilidad a la elaboración de descripciones armonizadas de las obtenciones vegetales [UPOV/TG/3/1](#). pág. 4-7.

UPOV, 2006. Guía técnica para la descripción varietal de *Dahlia* Cav. UPOV/[TG/226/1](#).Pag. 28.

UPOV, 2014. UPOV-ROM Plant Variety Database. Revisado el 01 de Enero del 2014, en <http://www.upov.int/genie/en/dus.jsp?id=968> código: CALEN\_OFF

## 8. DISCUSIÓN GENERAL

En caléndula existe una amplia diversidad genética en los materiales vegetales que se cultivan en el Valle de México, que se manifiesta como una diversidad fenotípica en sus capítulos florales, lo que brinda la oportunidad de seleccionar las mejores variedades en cuanto a rendimiento de capítulos y calidad en compuestos químicos de interés farmacéutico. Estos resultados ofrecen una opción para contribuir a que se satisfaga la demanda comercial de esta especie, y abre el camino hacia la estandarización de sus compuestos mediante la elección de las mejores variedades y el manejo agrícola más apropiado.

Debido a que es una planta con varios usos medicinales, esta investigación se centró en algunos de los compuestos químicos que le confieren usos farmacológicos. Se identificó la presencia de flavonoides, carotenoides, terpenoides, saponinas y aceites esenciales, aunque la cuantificación se hizo solo en flavonoides y carotenoides.

Los resultados mostraron que los contenidos de flavonoides y carotenoides están influenciados por la variedad y por la fecha de corte en el transcurso de la estación de crecimiento de la planta. Las variedades sobresalientes en contenido de flavonoides fueron V3 y V5, y para contenido de carotenoides fueron V4 y V6.

Al integrar la información obtenida de concentración de flavonoides y carotenoides con el rendimiento de capítulos, se pudo observar que la biomasa acumulada en los órganos florales influye más en la producción por hectárea de estos compuestos que sus respectivas concentraciones. Así, para cosechar más kilogramos de metabolitos por hectárea es más conveniente aumentar el rendimiento de capítulos que elevar la concentración. No obstante, mediante mejoramiento genético podría elevarse tanto la concentración como el rendimiento, con lo que la ganancia puede ser mayor.

Es de destacar que las variedades sobresalientes en contenido de flavonoides no fueron las mismas que las sobresalientes en contenido de carotenoides, a pesar de que estas dos variables mostraron un coeficiente de correlación positiva y significativo

( $r = 0.53$ ,  $P < 0.0001$ ). Según esta correlación, sería de esperarse que si aumentan los flavonoides también aumentarían los carotenoides, en aproximadamente 53% de los casos. Pero además debe considerarse que la intensidad del color de los pétalos influye al menos en el contenido de carotenoides, puesto que los capítulos con concentraciones más altas correspondieron a los de color anaranjado, en comparación con los de color amarillo, al contrario de lo que se observó en contenido de flavonoides. Al respecto, Kishimoto *et al.* (2012) reportaron una relación positiva entre el color anaranjado de las flores de caléndula y el contenido de carotenoides.

Con base en los presentes avances de investigación sobre caléndula en México, se recomienda llevar a cabo un programa de mejoramiento genético para obtener variedades de caléndula con altos contenidos de flavonoides y carotenoides, y también de alto rendimiento de capítulos florales. También hace falta abundar sobre los factores ambientales que influyen en la concentración de compuestos químicos de caléndula, como la temperatura, salinidad, sequía, etc., y detectar las enzimas y genes que regulan la concentración de los mismos.

En cuanto a la descripción varietal aquí propuesta, que es la primera que se propone, conviene enriquecerla con las características de semilla y plántula, así como con la necesaria caracterización del ADN de caléndula, para completar así la descripción varietal de la especie.

## 9. CONCLUSIONES GENERALES

Existe variación genética en potencial de rendimiento de capítulos entre las seis variedades de caléndula evaluadas. La variedad V4 destacó por producir el mayor rendimiento total durante la estación de crecimiento de caléndula.

En el análisis preliminar de compuestos en capítulos florales de caléndula, se detectó la presencia y diversidad en flavonoides, terpenoides, carotenoides y aceites esenciales, lo que sustenta su cultivo en los Valles Altos de México, por ser metabolitos de interés medicinal y nutracéutico.

Las variedades estudiadas difirieron en la concentración de flavonoides totales y específicos (rutina, quercetina, luteolina, apigenina e isoramnetina), así como en el contenido de carotenoides totales. También hubo variación entre las fechas de cosecha de sus capítulos, las cuales afectaron a los contenidos de estos metabolitos en función del tipo de compuesto. Lo cual implica que se pueden obtener variedades mejores para producción de estos compuestos, y también que hay fechas de corte que producen más metabolitos que otras.

La producción total tanto de flavonoides como de carotenoides depende más del rendimiento de capítulos que de su concentración, por lo que en primera instancia conviene usar las variedades más rendidoras, como la V4. Es factible hacer mejoramiento genético para aumentar el contenido de metabolitos para elevar aún más su producción por hectárea.

Aquí se propone la primera caracterización varietal para caléndula, basada en características morfológicas de hojas, porte y, sobre todo de capítulos. Falta completarla con características de interés como la composición química, morfología de semillas y plántulas, y sus marcadores moleculares.

## 10. ANEXO

### Cuadros adicionales

**Cuadro 10. 1.** Datos climatológicos de los meses de cultivo de los años 2010 y año 2011.

Meses	Año 2010			Año 2011		
	Temperatura máxima promedio (°C)	Temperatura mínima promedio (°C)	Precipitación pluvial (mm)	Temperatura máxima promedio (°C)	Temperatura mínima promedio (°C)	Precipitación pluvial (mm)
Abril	30.8	4.5	39.5	-	-	-
Mayo	33.9	6	10.5	33.4	7.6	22.4
Junio	32.5	8.7	47.8	29.6	7	5
Julio	27.3	9.9	208.5	26.7	9.9	0
Agosto	26.9	7.4	154.9	27.2	8.2	6.1
Sep.	26.3	7.7	38.9	26.3	6.3	27.4
Octubre	25.5	3.5	0	26	2.5	14.4

### Análisis de varianza para variable rendimiento año 2010 y 2011

**Cuadro 10. 2.** Análisis de varianza del rendimiento de capítulos secos de seis variedades de caléndula, cosechados en cortes sucesivos (siete cortes en 2010, y 9 en 2011), en dos ciclos de producción (2010 y 2011). Texcoco, Edo. de México.

FV	2010					2011				
	SC	gl	CM	F	P	SC	gl	CM	F	P
	5290224	41	129029	5.43	<0.0001	2016020	53	38038	2.72	0.0002
<b>C</b>	4211143	6	701857	29.54	<0.0001	1261546	8	157693	11.28	<0.0001
<b>Var.</b>	521914	5	104382	4.39	0.0026	115270	5	230541	1.65	0.163
<b>C X Var.</b>	557167	30	18572	0.78	0.7575	639204	40	15980	1.14	0.3208
<b>Error</b>	997736	42	23755			755200	54	13985		
<b>Total</b>	6287960	83				2771220	107			
	R <sup>2</sup> = 0.84					R <sup>2</sup> = 0.73				

C: Cortes; Var: Variedad; α= 0.05; n = 84 gl: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios; F: F calculada; P: probabilidad.

**Cuadro 10. 3.** Comparaciones de medias de Tukey de rendimiento de capítulos secos (kg ha<sup>-1</sup>) de seis variedades de caléndula en promedio de siete cosechas sucesivas en 2010 (n = 14) y de nueve en 2011 (n = 18). Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

Variedad	2010		2011	
	Media		Media	
1	239.14	b	206.44	a
2	338.29	a	267.78	a
3	279.43	b	284.89	a
4	492.00	a	304.22	a
5	349.43	a	248.89	a
6	322.57	a	231.33	a
DMS=194.8			DMS=116.5	

$\alpha = 0.05$

**Cuadro 10. 4.** Comparaciones de medias de Tukey de rendimiento por corte de capítulos secos (kg ha<sup>-1</sup>) a través de siete cosechas para 2010 y nueve para 2011, en promedio de seis variedades de caléndula. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (n = 12).

2010				2011			
Número de corte	Días después del trasplante	Media		Número de corte	Días después del trasplante	Media	
1	57	24.33	c	1	63	60.67	c
2	72	100	c	2	68	100.33	c
3	78	162.33	c	3	74	182	b
4	84	362	b	4	80	312.33	a
5	96	530	a	5	87	344.67	a
6	103	613	a	6	94	313	a
7	111	566	a	7	101	386.33	a
				8	108	325.33	a
				9	116	290.67	a
DMS = 173.9				DMS = 155.9			

$\alpha = 0.05$

**Cuadro 10. 5.** Análisis de varianza del rendimiento acumulado de capítulos secos de seis variedades de caléndula, cosechados en cortes sucesivos (siete cortes en 2010, y 9 en 2011), en dos ciclos de producción (2010 y 2011). Texcoco, Edo. de México.

FV	2010					2011				
	SC	gl	CM	F	P	SC	gl	CM	F	P
	6484816	41	1581662	8	<0.0001	70169110	53	1323945	7.78	<0.0001
<b>C</b>	57642261	6	9607043	48.58	<0.0001	65608748	8	8201093	48.19	<0.0001
<b>Var.</b>	3453380	5	690676	3.49	0.0099	2307156	5	461431	2.71	0.0294
<b>C X Var.</b>	3752518	30	125083	0.63	0.9039	2253205	40	56330	0.33	0.9998
<b>Error</b>	8305728	42	197755			9189608	54	170177		
<b>Total</b>	73153888	83				79358718	107			
	R <sup>2</sup> = 0.89					R <sup>2</sup> = 0.73				

C: Cortes; Var: Variedad;  $\alpha = 0.05$ ; n = 84 gl: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios; F: F calculada; P: probabilidad.

**Cuadro 10. 6.** Comparaciones de medias de Tukey de rendimiento acumulado de capítulos secos (kg ha<sup>-1</sup>) de seis variedades de caléndula en promedio de siete cosechas sucesivas en 2010 (n = 14) y de nueve en 2011 (n = 18). Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

Variedad	2010		2011	
	Media		Media	
1	624.86	b	972	a
2	880.29	ab	1243.56	a
3	792	ab	1261.11	a
4	1293.43	a	1072.67	a
5	945.43	ab	965.11	a
6	960	ab	867.11	a
DMS = 501.7			DMS = 406.2	
$\alpha = 0.05$				

**Cuadro 10. 7.** Comparaciones de medias de Tukey de rendimiento acumulado por corte de capítulos secos (kg ha<sup>-1</sup>) a través de siete cosechas para 2010 y nueve para 2011, en promedio de seis variedades de caléndula. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

2010			2011		
Número de corte	Días después del trasplante	Media	Número de corte	Días después del trasplante	Media
1	57	24.33 e	1	63	60.67 g
2	72	124.33 d	2	68	161 f
3	78	286.67 d	3	74	343 f
4	84	648.67 c	4	80	655.33 e
5	96	1178.67 c	5	87	1000 d
6	103	1791.67 b	6	94	1313 c
7	111	2357.67 a	7	101	1699.33 b
			8	108	2024.67 a
			9	116	2315.33 a
DMS = 561.9			DMS = 544.1		

$\alpha = 0.05$ ; n = 12

### Análisis de varianza para variable flavonoides año 2010 y 2011

**Cuadro 10. 8.** Análisis de varianza para concentración de flavonoides totales (mg g<sup>-1</sup> MS) en capítulos secos de seis variedades de caléndula, cosechados en cortes sucesivos (siete cortes en 2010, y 9 en 2011), en dos ciclos de producción (2010 y 2011). Texcoco, Edo. de México.

FV	2010					2011					
	SC	gl	CM	F	P	SC	gl	CM	F	P	
	55301.4	41	1348.82	14.77	<0.0001	179044.95	53	3378.21	17	<0.0001	
<b>C</b>	12065.4	6	2010.9	22.01	<0.0001	32858.53	8	4107.32	20.67	<0.0001	
<b>Var.</b>	10041.9	5	2008.39	21.99	<0.0001	58136.79	5	11627.3	58.53	<0.0001	
<b>C X Var.</b>	33194.1	30	1106.47	12.11	<0.0001	88049.64	40	2201.24	11.08	<0.0001	
<b>Error</b>	19183.7	210	91.35			53638.72	270	198.66			
<b>Total</b>	74485.2	251				232683.67	323				
$R^2 = 0.74$	N = 252					$R^2 = 0.77$	N = 324				

C: Cortes; Var: Variedad;  $\alpha = 0.05$  gl: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios; F: F calculada; P: probabilidad.

**Cuadro 10. 9.** Comparaciones de medias de Tukey de la concentración de flavonoides totales ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) de seis variedades de caléndula en promedio de siete cosechas sucesivas en 2010 ( $n = 42$ ) y de nueve en 2011 ( $n = 54$ ). Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

Variedad	2010		2011	
	Media		Media	
1	83.84	a	51.78	c
2	67.9	c	49.84	c
3	86.84	a	71.51	a
4	81.71	a	42.3	c
5	83.11	a	77.53	a
6	75.67	b	44.62	c
DMS=5.956			DMS=7.744	

$\alpha = 0.05$

**Cuadro 10. 10.** Comparaciones de medias de Tukey de la concentración de flavonoides totales ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) a través de siete cosechas para 2010 y nueve para 2011, en promedio de seis variedades de caléndula. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales ( $n = 36$ ). cultivadas en Texcoco, Edo. de México.

2010			2011		
Número de corte	Días después del trasplante	Media	Número de corte	Días después del trasplante	Media
1	57	77.23 b	1	63	38.59 e
2	72	92.00 a	2	68	48.44 d
3	78	89.27 a	3	74	53.28 c
4	84	75.49 b	4	80	72.87 a
5	96	74.23 b	5	87	69.42 a
6	103	74.66 b	6	94	54.28 c
7	111	76.02 b	7	101	62.52 b
			8	108	56.85 c
			9	116	50.11 d
DMS = 6.655			DMS = 10.327		

$\alpha = 0.05$

**Cuadro 10. 11.** Comparaciones de medias de Tukey de la concentración de flavonoides totales (mg g<sup>-1</sup> MS) de seis variedades de caléndula con número de corte, siete cosechas sucesivas en 2010 (n = 6; DMS = 21.6) y de nueve en 2011 (n = 6; DMS = 32.8). Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

Interacción Corte por Variedad año 2010				Interacción Corte por Variedad año 2011			
Número de corte	Variedad	Medias		Número de corte	Variedad	Medias	
2	6	107.7	a	4	5	136.43	a
2	5	105.25	a	4	3	104.97	a
2	4	103.21	a	5	5	103.59	a
3	6	98.18	a	5	3	100.48	b
1	1	96	a	2	5	97.25	b
3	5	95.66	a	7	5	86.53	b
3	1	94.91	a	8	1	85.26	b
3	3	94.71	a	2	3	81.81	b
2	1	94.64	a	3	3	78.35	b
5	2	93.07	a	6	5	76.73	b
2	3	91.85	a	6	3	76.62	b
1	3	90.15	a	9	1	76.27	b
5	3	86.48	a	7	3	74.43	b
1	4	85.66	b	7	1	69.13	c
6	6	85.52	b	9	5	64.63	d
5	1	84.03	b	4	4	63.13	e
4	5	83.96	b	3	2	62.1	e
4	4	83.28	c	8	3	61.18	e
6	3	82.26	c	5	6	60.6	e
7	3	82.26	c	8	6	60.25	e
1	5	80.56	d	7	6	53.91	e
7	6	80.29	d	5	4	53.8	e
4	3	80.15	d	9	6	52.19	f
7	5	79.61	d	9	2	52.19	f
6	4	78.25	d	6	2	51.84	f
6	5	76.75	d	3	1	51.49	f
4	1	76.68	d	8	2	51.26	f
3	2	76.41	e	7	2	50.92	f
3	4	75.73	e	4	2	50.69	f
7	4	74.71	e	5	1	50.34	f
6	1	71.92	f	1	2	47.92	g
5	4	71.1	g	5	2	47.69	g
7	2	70.56	g	8	5	46.19	g
7	1	68.72	h	4	6	45.04	h
4	2	68.72	h	3	4	44.81	h

1	2	63.9	i	6	4	44.69	h
4	6	60.15	j	3	5	44.23	h
5	5	59.95	j	1	1	42.97	i
6	2	53.28	k	1	5	42.16	i
5	6	50.77	l	6	6	41.47	j
2	2	49.34	m	2	4	40.2	j
1	6	47.09	n	7	4	40.2	j
				1	3	40.2	j
				3	6	38.7	j
				4	1	36.97	j
				8	4	36.97	j
				6	1	34.32	k
				2	2	33.98	k
				1	6	31.21	l
				9	4	29.83	m
				1	4	27.06	n
				9	3	25.56	n
				2	1	19.22	o
				2	6	18.19	p

---

$\alpha = 0.05$

**Cuadro 10. 12.** Análisis de varianza de la producción de flavonoides ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) en capítulos secos de seis variedades de caléndula, cosechados en cortes sucesivos (siete cortes en 2010, y nueve en 2011), en dos ciclos de producción (2010 y 2011). Texcoco, Edo. de México.

FV	2010					2011				
	SC	gl	CM	F	P	SC	gl	CM	F	P
	28504	41	695.23	5.32	<0.0001	12482	53	235.53	4.28	<0.0001
<b>C</b>	21886	6	3647.74	27.93	<0.0001	6201	8	775.18	14.09	<0.0001
<b>Var.</b>	3016	5	603.32	4.62	0.0019	2006	5	401.3	7.29	<0.0001
<b>C X Var.</b>	3601	30	120.04	0.92	0.5903	4274	40	10 6.87	1.94	0.0116
<b>Error</b>	5485	42	130.61			2970	54	55.02		
<b>Total</b>	33990	83				15453	107			
$R^2 = 0.84$ $N = 84$					$R^2 = 0.81$ $N = 108$					

C: Cortes; Var: Variedad;  $\alpha = 0.05$  gl: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios; F: F calculada; P: probabilidad.

**Cuadro 10. 13.** Comparaciones de medias de Tukey de la producción de flavonoides totales ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) de seis variedades de caléndula en promedio de siete cosechas sucesivas en 2010 ( $n = 42$ ) y de nueve en 2011 ( $n = 54$ ). Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

Variedad	2010		2011	
	Media		Media	
1	10.95	c	51.78	c
2	13.49	b	49.84	c
3	22.11	a	71.51	a
4	12.23	c	42.3	c
5	20.31	a	77.53	a
6	12.41	c	44.62	c
$DMS=5.956$			$DMS=7.744$	

$\alpha = 0.05$

**Cuadro 10. 14.** Comparaciones de medias de Tukey de la producción de flavonoides ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) a través de siete cosechas para 2010 y nueve para 2011, en promedio de seis variedades de caléndula. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales ( $n = 36$ ).

2010			2011		
Número de corte	Días después del trasplante	Media	Número de corte	Días después del trasplante	Media
1	57	77.23 b	1	63	38.59 e
2	72	92.00 a	2	68	48.44 d
3	78	89.27 a	3	74	53.28 c
4	84	75.49 b	4	80	72.87 a
5	96	74.23 b	5	87	69.42 a
6	103	74.66 b	6	94	54.28 c
7	111	76.02 b	7	101	62.52 b
			8	108	56.85 c
			9	116	50.11 d
DMS = 6.655			DMS=10.327		

$\alpha = 0.05$

### Análisis de varianza para variable carotenoides año 2011

**Cuadro 10. 15.** Análisis de varianza de la concentración de carotenoides totales ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) en capítulos secos de seis variedades de caléndula, cosechados en nueve cortes sucesivos en el ciclo de producción 2011 Texcoco, Edo. de México.

FV	SC	gl	CM	F	P
<b>Modelo</b>	1.92	53	0.04	13.37	<0.0001
<b>C</b>	0.16	8	0.02	7.17	<0.0001
<b>Var.</b>	1.52	5	0.3	112.08	<0.0001
<b>C x Var.</b>	0.25	40	0.01	2.28	0.0004
<b>Error</b>	0.29	106	0.00270		
<b>Total</b>	2.21	161			
$R^2 = 0.87$	N= 162				

C: Cortes; Var: Variedad;  $\alpha = 0.05$  gl: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios; F: F calculada; P: probabilidad.

**Cuadro 10.16.** Comparaciones de medias de Tukey de la concentración de carotenoides totales ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) de seis variedades de caléndula en promedio de nueve cosechas sucesivas en el año 2011 ( $n = 27$ ). Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

Variedad	Media	
1	0.60	b
2	0.60	b
3	0.53	a
4	0.75	c
5	0.51	a
6	0.75	c

DMS = 0.04135  
 $\alpha = 0.05$

**Cuadro 10.17.** Comparaciones de medias de Tukey de la concentración de carotenoides totales ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) a través de nueve cosechas en el año 2011, en promedio de seis variedades de caléndula. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales ( $n = 18$ ).

Número de corte	Días después del trasplante	Media	
1	63	0.62	a
2	68	0.60	b
3	74	0.65	a
4	80	0.66	a
5	87	0.57	c
6	94	0.59	c
7	101	0.62	a
8	108	0.67	a
9	116	0.61	b

A = 0.05; DMS = 0.055

**Cuadro 10.18.** Comparaciones de medias de Tukey de la concentración de carotenoides totales ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) en su interacción de seis variedades de caléndula con el número de corte de nueve cosechas sucesivas en el año 2011. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

Interacción Corte por Variedad			
Número de corte	Variedad	Medias	
4	6	0.8	A
4	4	0.8	A
3	6	0.76	B
6	4	0.76	B
5	4	0.76	B
1	4	0.76	B
5	6	0.76	B
6	6	0.75	B
8	6	0.75	B
3	4	0.75	B
2	4	0.75	B
1	6	0.74	B
9	4	0.74	B
9	6	0.74	B
2	6	0.73	B
7	6	0.73	A
8	4	0.72	B
7	4	0.71	B
8	5	0.66	B
8	3	0.64	B
3	1	0.64	B
3	2	0.64	B
8	2	0.63	B
4	1	0.62	B
8	1	0.62	B
4	2	0.62	B
2	2	0.61	B
7	1	0.6	B
1	1	0.6	B
9	2	0.6	B
6	2	0.59	B
1	3	0.59	B
9	1	0.58	C
5	1	0.58	D
6	1	0.58	E
5	2	0.57	F

2	1	0.57	G
7	3	0.57	G
7	2	0.57	H
3	3	0.56	H
4	3	0.56	I
7	5	0.55	I
1	2	0.55	J
9	5	0.55	J
4	5	0.54	K
3	5	0.54	K
1	5	0.5	L
2	5	0.48	L
9	3	0.48	M
2	3	0.48	M
6	3	0.46	N
5	3	0.4	O
6	5	0.38	P
5	5	0.37	P

$\alpha = 0.05$ ; DMS = 0.176; n = 3

**Cuadro 10. 19.** Análisis de varianza de la presencia de carotenoides ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) en capítulos secos de seis variedades de caléndula, cosechados en nueve cortes sucesivos en el ciclo del año 2011. Texcoco, Edo. de México.

FV	SC	gl	CM	F	P
	0.94	53	0.02	2.45	0.0006
<b>C</b>	0.50	8	0.06	13.18	<0.0001
<b>Var.</b>	0.13	5	0.03	3.49	0.00084
<b>C X Var.</b>	0.31	40	0.01	1.07	0.407
<b>Error</b>	0.39	54	0.01		
<b>Total</b>	1.32	107			
$R^2 = 0.79$	N = 84				

C: Cortes; Var: Variedad;  $\alpha = 0.05$  gl: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios; F: F calculada; P: probabilidad.

**Cuadro 10. 20.** Comparaciones de medias de Tukey de la producción de carotenoides totales ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) de seis variedades de caléndula en promedio de de nueve en el ciclo del año 2011 ( $n = 18$ ). Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

Variedad	Media	
1	0.12	b
2	0.16	a
3	0.15	a
4	0.23	a
5	0.13	a
6	0.17	b

$\alpha = 0.05$ ; DMS = 0.0835

**Cuadro 10. 21.** Comparaciones de medias de Tukey de la producción de carotenoides ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) a través de nueve cortes para el ciclo 2011, en promedio de seis variedades de caléndula. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales ( $n = 12$ ).

Número de corte	Días después del trasplante	Media
1	63	0.04 c
2	68	0.06 c
3	74	0.12 b
4	80	0.20 a
5	87	0.20 a
6	94	0.18 a
7	101	0.24 a
8	108	0.22 a
9	116	0.18 a

$\alpha = 0.05$ ; DMS = 0.111