



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL

FOTOSÍNTESIS, CRECIMIENTO Y ACEITES ESENCIALES EN MORFOTIPOS FLORALES DE CALÉNDULA (*Calendula officinalis* L.)

LUIS FRANCISCO SALOMÉ ABARCA

**TESIS
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2014

La presente tesis, titulada: **Fotosíntesis, crecimiento y aceites esenciales en morfotipos florales de caléndua (*Calendula officinalis* L.)** realizada por el alumno: **Luis Francisco Salomé Abarca**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: _____
DR. VÍCTOR ARTURO GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

ASESOR: _____
DR. RAMÓN MARCOS SOTO HERNÁNDEZ

ASESOR: _____
DR. NICACIO CRUZ HUERTA

Montecillo, Texcoco, Edo. De México, Febrero de 2014.

RESUMEN GENERAL

CRECIMIENTO, FOTOSÍNTESIS Y ACEITES ESENCIALES EN MORFOTIPOS FLORALES DE CALÉNDULA (*Calendula officinalis* L.)

Luis Francisco Salomé Abarca, MC

Colegio de Postgraduados, 2014

La caléndula (*Calendula officinalis*) es una especie herbácea originaria de Egipto, que se cree fue introducida a Europa en el siglo XII. En México es cultivada como una planta medicinal y de ornato, en lugares con clima semiseco y templado. En la zona de los valles centrales de México, Palma observó amplia diversidad fenotípica en una variedad común de caléndula, y eligió seis variantes en la morfología floral de esa población heterogénea, a las cuales denominó de la S1 a la S6. El objetivo de este estudio fue comparar morfotipos florales de caléndula en cuanto a crecimiento, eficiencia fotosintética, y contenido de aceites esenciales, a través de modelaje y cinéticas de crecimiento, cinéticas fotosintéticas, técnicas de extracción para aceites y de separaciones cromatográficas. El morfotipo floral S1 presentó la mayor acumulación de biomasa total. La limitante fotosintética en los morfotipos florales S2, S3, S4 y S5 fue la $V_{cmáx}$ y en el morfotipo S1 las limitantes fueron la $V_{cmáx}$ y TPU. El mejor morfotipo floral para la obtención de aceites esenciales fue el morfotipo floral S1 con un rendimiento promedio de aceite esencial de 3.65 g de aceite por cada 100 g de materia floral seca en combinación con su rendimiento floral que se encontró por encima del de los otros morfotipos (54.58 kg ha^{-1}). El δ -Cadineno fue el principal componente del aceite esencial en todos los morfotipos florales de Caléndula.

Palabras clave: Acumulación de biomasa, rendimiento floral, parámetros fotosintéticos, aceite esencial, δ -Cadineno.

GENERAL ABSTRACT

GROWTH, PHOTOSYNTHESIS AND ESSENTIAL OILS IN FLORAL MORPHOTYPES OF POT MARIGOLD (*Calendula officinalis* L.).

Luis Francisco Salomé Abarca, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2014

Pot marigold (*Calendula officinalis*) is an herb native to Egypt, believed to have been introduced to Europe in the twelfth century. In Mexico it is cultivated as a medicinal and ornamental plant, in areas with mild and medium-dry climate. In the area of the central valleys of Mexico, Palma observed extensive phenotypic diversity in a common variety of pot marigold, and chose six variants in floral morphology of this heterogeneous population, to which called from S1 to S6. The aim of this study was to compare floral morphotypes of Pot marigold in terms of growth, photosynthetic efficiency and content of essential oils, through modeling and growth kinetics, photosynthetic kinetics, extraction techniques for oils and chromatographic separations. The floral morphotype S1 has the highest biomass accumulation. The photosynthetic limitation in floral morphotypes S2, S3, S4 and S5 is the $V_{cmáx}$ and morphotype S1 by $V_{cmáx}$ and TPU. The best floral morphotype to obtaining essential oils is the floral morphotype S1 with an average yield of essential oil from 3.65 g of oil per 100 g of dry floral material in combination with its floral performance, which is above of the floral yields from the others morphotypes. The δ -Cadinene is the main component of the essential oil in all floral morphotypes of pot marigold.

Key words: Biomass accumulation, floral yield, photosynthetic limitation, essential oil, δ -Cadinene.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo financiero proporcionado durante la realización de mis estudios de maestría.

Al **Dr. Víctor Arturo González Hernández** por su gran apoyo como Consejero y Director de tesis, por darme la oportunidad y tenerme la confianza para permitirme hacer este trabajo, que con su experiencia y paciencia supo guiarme de manera correcta hasta la culminación del mismo, dándome siempre consejos y sugerencias acertadas.

Al **Dr. Ramón Marcos Soto Hernández** que de manera cordial y atenta me brindó su apoyo como asesor y mostró gran interés por el trabajo desarrollado, dando consejos y contribuyendo de forma práctica en base a toda su experiencia.

Al **Dr. Nicacio Cruz Huerta** por su apoyo en el análisis e interpretación de datos, además de las sugerencias acertadas para la mejora del trabajo y por su permanente disposición de ayudar.

Al **Ing. Bioquímico Industrial Iván Ramírez Ramírez** por todas sus valiosas contribuciones al trabajo y su buena disposición de ayudarme con mis dudas, con las mediciones e interpretación de datos fotosintéticos.

A la **M. C. Mariana Palma Tenango** por su apoyo y disposición para asesorarme en el establecimiento y desarrollo del cultivo en campo.

Al **Dr. Juan Cibrián Tovar** por su accesibilidad con el equipo y material de laboratorio y sus sugerencias para la identificación de los compuestos del aceite esencial.

Al **técnico laboratorista Javier Carrillo** por su apoyo en campo y procesamiento de muestras de crecimiento en laboratorio.

A todos los **profesores investigadores** que me impartieron cursos y que con el conocimiento adquirido en estos, me fuera de mayor facilidad la comprensión de mi trabajo de investigación.

DEDICATORIAS

A Dios por darme salud, fuerza, paciencia y comprensión para poder hacer este trabajo.

A mi familia entera que siempre me apoyaron, en especial a mis padres José Luis y Verónica que en todo momento vieron por mí, a mis hermanos Jenny y Miguel Ángel, y a mi abuela Concepción.

A mis amigos lejanos que aunque no estuvieron aquí conmigo siempre me animaron, Ariadna, Dalia, Giovanni, Felipe, José Luis, Roberto.

A mis mejores amigos de la maestría: José Manuel, Alfricia y Claudia con quienes compartí la mayor parte de mi tiempo y de quienes tuve su apoyo incondicional, gracias.

A todos mis amigos que durante mi estancia en la maestría se convirtieron en mi segunda familia y a los que he ido conociendo incluso al final de la misma: Fátima, Paco, Iván, Anaid, Celia, Selene, Cristóbal, Moisés, Tonatiuh, Kary, Gerardo, Emma, Adriana, Isis, Judith, Shayra, Ricardo, Hanzel, Ana, Elzy, Regina, Juanito, Mara, Marina, Carmen, Fernando, Olivia, Manuel, Hernán, Alfonso, Aranza, Johana, Nelson y Christopher.

A la Dra. Dolores Vargas quien me animó a estudiar la maestría en este plantel y quien siempre me apoyó durante mi estancia aquí como si fuera de su familia.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN GENERAL	2
1.1 OBJETIVOS	4
Objetivo general	4
Objetivos particulares	4
1.2 HIPÓTESIS	5
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
2.1 Generalidades de la caléndula	6
2.2 Nombres vulgares	6
2.3 Clasificación taxonómica	6
2.4 Descripción botánica	7
2.5 Ecología y corología	7
2.6 Características morfológicas de capítulos florales	7
2.6.1 Características organolépticas.....	8
2.6.2 Características anatómico-microscópicas.....	8
2.7 Características morfo-anatómicas del fruto y semilla de caléndula	8
2.8 Metabolitos secundarios de caléndula	10
2.9 Usos y propiedades terapéuticas	11
2.9.1 Actividad anti-inflamatoria	11
2.9.2 Actividad anti-VIH	12
2.9.3 Actividad anti-cáncer	12
2.10 Morfotipos florales de caléndula	12
2.11 Cultivo de caléndula	13
2.11.1 Establecimiento del cultivo	13
2.11.2 Fecha de siembra	14
2.11.3 Siembra directa	14
2.11.4 Siembra en semillero y trasplante	15
2.11.5 Germinación	15
2.11.6 Labores de cultivo.....	15
2.11.7 Riegos.....	15
2.11.8 Fertilización.....	16
2.11.9 Número de cortes y rendimiento	16
2.11.10 Secado	16
2.11.11 Plagas y enfermedades que pueden atacar a la caléndula	17
2.11.12 Recolección	17
2.12 Cinéticas de crecimiento	18
2.13 Radiación fotosintéticamente activa (RFA)	19

2.14 Cinéticas fotosintéticas	20
2.15 Fotosíntesis en caléndula	21
2.16 Número de estomas	23
2.17 Contenido de clorofila	24
LITERATURA CITADA	25
CAPÍTULO III. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO EN MORFOTIPOS FLORALES DE CALÉNDULA (<i>Calendula officinalis</i> L.).....	30
CAPÍTULO IV. CINÉTICAS FOTOSINTÉTICAS EN RESPUESTA AL CO₂ (A/Ci) EN MORFOTIPOS FLORALES DE CALÉNDULA (<i>Calendula officinalis</i> L.).....	54
CAPÍTULO VII. RENDIMIENTO Y COMPOSICIÓN DE ACEITES ESENCIALES A TRAVÉS DE FECHAS DE CORTES EN MORFOTIPOS FLORALES DE CALÉNDULA (<i>Calendula officinalis</i> L.)	98
CAPÍTULO IX. DISCUSIÓN GENERAL	115
CAPÍTULO X. CONCLUSIONES GENERALES.....	118

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Frecuencia estomática de hojas de caléndula.....	24
Cuadro 2. Concentraciones de clorofila de hojas de caléndula.....	25
Cuadro III. 1. Valores a, b y c de la ecuación logística para la predicción de acumulación de biomasa total, en cinco morfotipos florales de caléndula.....	39
Cuadro III. 2. Distribución promedio de los 8 muestreos para biomasa entre órganos de morfotipos florales de Caléndula.....	40
Cuadro III. 3. Valores a, b y c de las ecuaciones logísticas para la predicción de acumulación de biomasa en tallo, en cada uno de cinco morfotipos florales de caléndula.....	42
Cuadro III. 4. Valores a, b y c de la ecuación logística para la predicción de acumulación de biomasa en raíz en cinco morfotipos florales de caléndula.....	42
Cuadro III. 5. Valores a, b y c de la ecuación logística para la predicción de acumulación de biomasa en hojas en cinco morfotipos florales de caléndula.....	43
Cuadro III. 6. Valores a, b, c y d de la ecuación polinomial de tercer grado para la predicción de acumulación de biomasa en órganos reproductores de cinco morfotipos florales de caléndula.....	43
Cuadro IV. 1. Puntos de compensación (<i>PC</i>) y saturación (<i>Psat</i>) por CO ₂ , tasa máxima de fotosíntesis (<i>A_{max}</i>) y eficiencia de rubisco (<i>ER</i>) en seis morfotipos florales de caléndula.....	60
Cuadro IV. 2. Parámetros fotosintéticos de Sharkey <i>et al.</i> (2007) de seis morfotipos florales de caléndula.....	63
Cuadro V. 1. Rendimiento floral (kg MS ha ⁻¹) de seis morfotipos florales a través de cortes florales de 90 ddeat	75

Cuadro V. 2. Rendimientos floral (kg ms ha^{-1}) de seis morfotipos florales a través de cortes florales en plántulas de 30 ddeat.....	75
Cuadro VI. 1. Comparación de tres técnicas de extracción de aceites.....	88
Cuadro VI. 2. Compuestos obtenidos por hidrodestilación.....	90
Cuadro VI. 3. Compuestos obtenidos por maceración solvente orgánico.....	92
Cuadro VI. 4. Compuestos obtenidos por enfleurage.....	93
Cuadro VII. 1. Rendimiento de aceite en morfotipos de caléndula a través de fechas de cortes.....	103
Cuadro VII. 2. Compuestos presentes en aceite esencial de caléndula del morfotipo floral S1, a través de cuatro fechas de corte.....	107
Cuadro VII. 3. Compuestos presentes en aceite esencial de caléndula del morfotipo floral S2, a través de cuatro fechas de corte.....	108
Cuadro VII. 4. Compuestos presentes en aceite esencial de caléndula del morfotipo floral S3, a través de cuatro fechas de corte.....	109
Cuadro VII. 5. Compuestos presentes en aceite esencial de caléndula del morfotipo floral S4, a través de cuatro fechas de corte.....	110
Cuadro VII. 6. Compuestos presentes en aceite esencial de caléndula del morfotipo floral S5, a través de cuatro fechas de corte.....	111
Cuadro VII. 7. Compuestos presentes en aceite esencial de caléndula del morfotipo floral S6, a través de cuatro fechas de corte.....	111

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Capítulo floral y clasificación taxonómica de caléndula.....	6
Figura 2. Flores liguladas de <i>Calendula officinalis</i>	8
Figura 3. Disposición interna de la semilla y el embrión dentro del fruto.....	9
Figura 4. Morfología del embrión de <i>C. officinalis</i>	10
Figura 5. Morfotipos florales de caléndula.....	13
Figura 6. <i>Alternaria</i> (a) y pulgón (b) en caléndula.....	17
Figura 7. Rangos de fotosíntesis en hojas crecidas a diferentes intensidades de luz.....	22
Figura 8. Máximo rango de fotosíntesis en diferentes edades de hojas.....	23
Figura III. 1. Cinéticas de crecimiento en cinco morfotipos florales de caléndula.....	37
Figura III. 2. Cinética del área foliar en morfotipos florales de caléndula.....	38
Figura III. 3. Distribución de biomasa entre órganos de morfotipos florales.....	41
Figura III. 4. Tasa absoluta de crecimiento (TAC) de órganos vegetativos en cinco morfotipos florales de caléndula.....	44
Figura III. 5. Tasa absoluta de crecimiento (TAC) de órganos reproductores de morfotipos florales de caléndula.....	45
Figura III. 6. Comparación de la tasa absoluta de crecimiento (TAC) de órganos vegetativos y reproductivos del morfotipo floral S1 de caléndula.....	46

Figura III. 7. Tasa relativa de crecimiento (TRC) de órganos vegetativos en morfotipos florales de caléndula.....	47
Figura III. 8. Tasa relativa de crecimiento (TRC) de órganos reproductores de morfotipos florales de caléndula.....	48
Figura III. 9. Comparación de la tasa relativa de crecimiento (TRC) de órganos vegetativos y reproductores.....	49
Figura IV. 1. Cinéticas fotosintéticas <i>A/Ci</i> en seis morfotipos florales de caléndula.....	59
Figura IV. 2. Esquema de las principales reacciones bioquímicas de la fotosíntesis.....	64
Figura V. 1. Comparación de rendimiento floral acumulado entre morfotipos florales de 30 y 90 deat.....	77
Figura V. 2. Morfotipos detectados en seis materiales de caléndula.....	78
Figura VI. 1. Aceite esencial de caléndula obtenido por hidrodestilación, extracción con disolvente orgánico y enfleurage.....	89
Figura VI. 2. Comparación se sistemas de extracción.....	91
Figura VII. 1. Rendimiento de aceite esencial a través de fechas de corte en seis morfotipos florales de caléndula.....	103

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

En el mundo se observa un continuo aumento en el consumo de frutas tropicales, y al igual que los frutos también otros órganos de las plantas pueden ser fuentes de beneficios para nuestros cuerpos (Kuskoski, 2005). Las deficiencias de fármacos disponibles en la actualidad impulsan el descubrimiento de nuevos agentes farmacoterapéuticos en la medicina natural (Kuate, 2011).

Las plantas aromáticas y medicinales conforman una lista amplia y diversa de especies, muchas de las cuales no tienen un único uso. Así pues, hay diferentes ámbitos de utilización: en medicina, alimentación, perfumería, cosmética, decoración, ambientación, protección de vegetales, agricultura y apicultura. Algunos de estos usos, no obstante, sólo son de tipo doméstico (Palos *et al.*, 2002). Debido a sus numerosas propiedades, la utilización de las plantas aromáticas y medicinales y la de sus principios activos, proporcionan importantes beneficios ambientales, económicos y sociales, además de constituir un amplio campo de aplicación de las industrias alimentaria, farmacéutica, y perfumero-cosmética (Palacio, 2000). La caléndula (*Calendula officinalis* L.) es una especie herbácea originaria de Egipto, que se cree fue introducida a Europa en el siglo XII, desde donde se extendió al resto del mundo (Moore, 2006). En México es cultivada como una planta medicinal y de ornato, en lugares con clima semiseco y templado. En la zona de los valles centrales de México, Palma (Com. Personal¹) observó amplia diversidad fenotípica en una variedad común de caléndula, y eligió seis variantes en la morfología floral de esa población heterogénea, a las cuales denominó S1, S2, S3, S4, S5 y S6.

La caléndula contiene metabolitos primarios y secundarios como: flavonoides, cumarinas, aceites esenciales, terpenos, carotenoides aminoácidos, carbohidratos y lípidos, los cuales le proporcionan diferentes propiedades terapéuticas como anti-inflamatoria, anti-cáncer, antibacteriano, anti-VIH, y antiespasmódica, entre otras (Muley *et al.*, 2009).

La parte utilizada en la industria farmacéutica, y por tanto la que interesa producir, está constituida por las inflorescencias o capítulos enteros secos (comúnmente llamadas “flores”), y también los flósculos aislados (también conocidos erróneamente como “pétalos”), y en menor medida se emplean las hojas (Moore, 2006). Los metabolitos que confieren sus propiedades terapéuticas a la caléndula provienen del metabolismo secundario, el cual utiliza como sustrato a los fotoasimilados formados mediante el metabolismo primario del cual forma parte el proceso de fotosíntesis.

Los estudios de fotosíntesis sobre estas plantas serían de utilidad para determinar la influencia de este proceso en la formación de los metabolitos secundarios de interés. Por ejemplo, podría esperarse que hubiera una relación entre la tasa neta de fotosíntesis con el contenido de aceites esenciales. Además, los estudios fotosintéticos permitirían medir los parámetros de este proceso, como son: los puntos de compensación y de saturación en respuesta al CO₂ y a la radiación fotosintéticamente activa, así como estimar la eficiencia de la enzima Rubisco. Estos parámetros se pueden cuantificar a partir de las cinéticas fotosintéticas en respuesta a la disponibilidad de CO₂ (Romero 2012), parámetros que influyen en crecimiento y acumulación de biomasa (Sharkey *et al.*, 2007).

Al respecto, en una población heterogénea de caléndula, Palma en 2009 encontró que la planta muestra cinéticas de crecimiento y acumulación de biomasa de tipo sigmoideal, tanto en la planta entera como en órganos, y que de la biomasa total producida 46 % corresponde a tallos, y

se esperaría un comportamiento similar de tipo sigmoidal entre morfotipos florales pero con variaciones en la distribución de biomasa (Palma; Comunicación Personal¹).

Además del mercado de los fitofármacos, otro gran mercado que se encuentra en pleno auge es el de las esencias. La caléndula sintetiza aceites esenciales con un amplio espectro de actividades terapéuticas, que por ser liposolubles pueden ser rápidamente absorbidos a través de la piel y así facilitar la curación de enfermedades con pomadas y ungüentos. Por ello resulta conveniente cuantificar el rendimiento y diversidad de dichos aceites.

Palma *et al.* (2012) reportaron diferencias entre morfotipos florales y fechas de corte de capítulos florales en cuanto al contenido y diversidad de flavonoides, por lo que se esperaría que los diferentes morfotipos florales también varíen en concentración y diversidad de aceites esenciales, así como entre fechas de corte, y de esta forma saber qué morfotipo o morfotipos y qué fechas de corte servirían más para la extracción de estos mismos y su comercialización. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue comparar seis morfotipos florales de caléndula en cuanto a eficiencia fotosintética, eficiencia en crecimiento y contenido de aceites esenciales.

1.1 OBJETIVOS

Objetivo general

Comparar seis morfotipos florales de caléndula en cuanto a eficiencia fotosintética, eficiencia en crecimiento y contenido de aceites esenciales.

Objetivos particulares

Medir y comparar fotosíntesis en seis morfotipos de caléndula, y determinar sus parámetros fotosintéticos, como tasa fotosintética neta, fotosíntesis máxima, puntos de compensación y de saturación por CO₂, y eficiencia de Rubisco.

Comparar la cinética de crecimiento de cinco morfotipos de caléndula.

Comparar el contenido de aceites esenciales en los capítulos florales de seis morfotipos de caléndula, colectados en diferentes fechas de corte.

1.2 HIPÓTESIS

Se encontrarán diferencias entre los morfotipos florales de caléndula en cuanto a parámetros fotosintéticos, lo cual influirá y ocasionará diferencias entre las cinéticas de crecimiento y en los contenidos de aceites esenciales entre ellos, además de ser afectados por las fechas de corte de modo que habría fechas de corte con mayor rendimiento de capítulos y de aceites esenciales.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades de la caléndula

La caléndula (*Calendula officinalis* L.) es una especie herbácea originaria de Egipto, cuya introducción en Europa data del siglo XII, desde donde se extendió al resto del mundo. El nombre común proviene del latín *calendae*, primer día del mes. En la actualidad se encuentra frecuentemente en los jardines de todo el mundo como planta ornamental, aunque su aroma no es agradable (Moore *et al.*, 2006).

2.2 Nombres vulgares

La caléndula tiene una gran diversidad de nombres comunes. En Colombia se le llama caléndula, flor de muerto, maravillosa, botón de oro, corona de rey, caldo, flamenquilla, maravilla, caléndula officinal, chucho, espanta novios, etc. En Estados Unidos se le conoce como pot marigold, o calendula. Alemania: Reingelblume. En Brasil: bom-meque, mal-me-quer, etc. En Chile: chinita. En Cuba: copetuda, mercadela, flamequilla. En España: caldo, caléndula, flor de todos los meses, mejicanas, flamencuella, flamequilla, tudesca, maravilla tudesca, mercadela, reinita, rosa de muertos, corona del rey. En Francia: soici, souicides jardins. México: Mercadela, maravilla, caléndula, altareyna, etc. (Universidad Nacional de Colombia, 2007).

2.3 Clasificación taxonómica

Según Muley BP (2009), la clasificación taxonómica de la *Calendula officinalis* (Figura

1) es la siguiente:



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

Figura 1. Capítulo floral y clasificación taxonómica de caléndula.

2.4 Descripción botánica

La caléndula, que pertenece a la familia de las Compuestas, es una hierba anual más o menos pubescente, de 30 a 60 cm de altura; sus hojas son simples, alternas, algo gruesas, de forma oblonga a obovado-oblonga, enteras o diminutas y remotamente denticuladas; los capítulos o cabezuelas solitarias están en pedúnculos robustos, son vistosas, y miden de 3.75 a 5 cm de diámetro; los radios planos extendidos con flores tubulares y lígulas de color amarillo blanquecino hasta anaranjado subido, que se cierran por la noche; porta varias cabezuelas pedunculadas que se disponen en forma esférica encerrando toda la planta (Lastra, 1999).

2.5 Ecología y distribución geográfica

La caléndula es un vegetal hemicriptófito poco exigente respecto al tipo de suelo, aunque prefiere suelos arcillosos. Es una planta de clima templado, pero resiste heladas y sequías.

Es cultivada en Europa desde el siglo XII, existe localmente naturalizada en el sur y oeste de Europa y casual por todos los lugares.

2.6 Características morfológicas de capítulos florales

Los capítulos son solitarios, generalmente de 4 a 7 cm de diámetro. Las brácteas involucrales están en 1 a 2 filas y lineales, acuminadas, casi iguales y con un estrecho borde escarioso. El receptáculo es plano y sin brácteas interflorales.

Las flores liguladas son amarillas o anaranjadas y las tubulares pueden ser o no concoloras con las lígulas. Las lígulas miden de 2 a 3 cm de largo por 5 a 7 mm de ancho, con tres dientes en el ápice (Palma y Cuevas, 2007) y hacia la base posee abundantes tricomas tectores biseriados. Las flores tubulares son mucho más cortas (5 mm) que las liguladas y tienen menos tricomas tectores en la base.

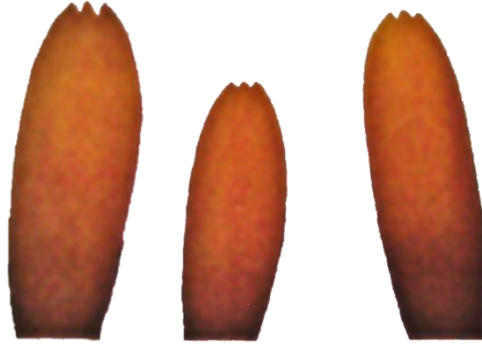


Figura 2. Flores liguladas de *Calendula officinalis* (Palma y Cuevas, 2007).

2.6.1 Características organolépticas.

Las flores presentan olor débil, desagradable, característico. Su sabor es amargo y aromático.

2.6.2 Características anatómico-microscópicas.

En la base de las flores liguladas hay numerosos tricomas tectores pluricelulares, biseriados, y algunos tricomas glandulares pedicelados también biseriados de longitud variable; en las flores tubulares, además de éstos, también se observan tricomas tectores uniseriados y algunos glandulares con pie corto y cabeza secretora formada por varios estratos de células superpuestas (Muñoz-Centeno, 2004).

2.7 Características morfo-anatómicas del fruto y semilla de caléndula

El fruto es un aquenio, curvo, que simula la letra C o media luna; tiene dos caras, una dorsal o convexa y otra ventral o cóncava. En la cara ventral, en cada extremo posee una protuberancia; la de mayor prominencia (base) indica el sitio de emergencia de la radícula durante la germinación. En la cara dorsal posee una serie de apéndices o espinas dorsales que facilitan la dispersión al fijarse y transportarse en otros individuos. La cavidad que alberga la semilla abarca desde la espina basal hasta la mitad del fruto (Figura 3), el resto es tejido de protección altamente resistente. El tamaño varía entre 1 y 2 cm de largo, 2 y 3 mm de ancho y 3

a 4 mm de grosor. En algunos casos presenta tejido del pericarpio en forma de costillas opuestas, lo que le da aspecto de fruto alado. Aparecen frutos agregados de aquenios o cabezuela de aquenios.

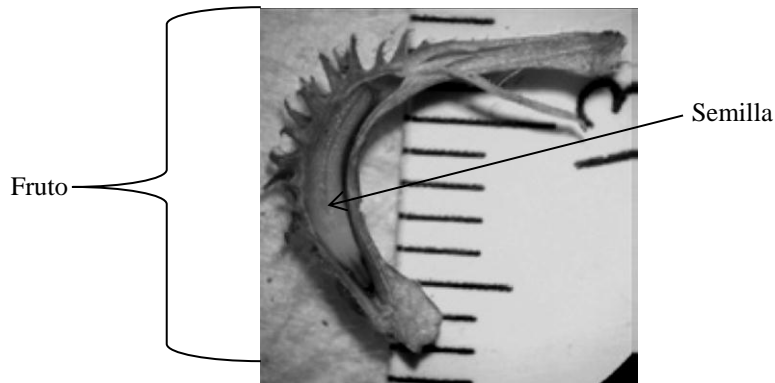


Figura 3. Disposición interna de la semilla y el embrión dentro del fruto (Victoria, 2007).

El embrión posee una curvatura en “C” (Figura 4), y forma cónica cuyo extremo puntiagudo hacia la base del fruto corresponde a la radícula, mientras que el extremo redondeado corresponde al ápice de los cotiledones y varía entre 0.5 a 1.0 cm, se encuentra recubierto por una testa delgada y membranosa que facilita el intercambio gaseoso entre el fruto y el exterior. Posee dos cotiledones que constituyen el 70 % del peso de la semilla, el eje embrionario es recto y consta del meristemo apical caulinar (futura plúmula), hipocótilo, meristemos radicales subapicales y de la cofia (radícula); se encuentra en la sección basal de la semilla, rodeado por la testa y tejidos corticales (tejidos de protección) inmediatamente debajo del punto de unión de los cotiledones (mesocótilo).

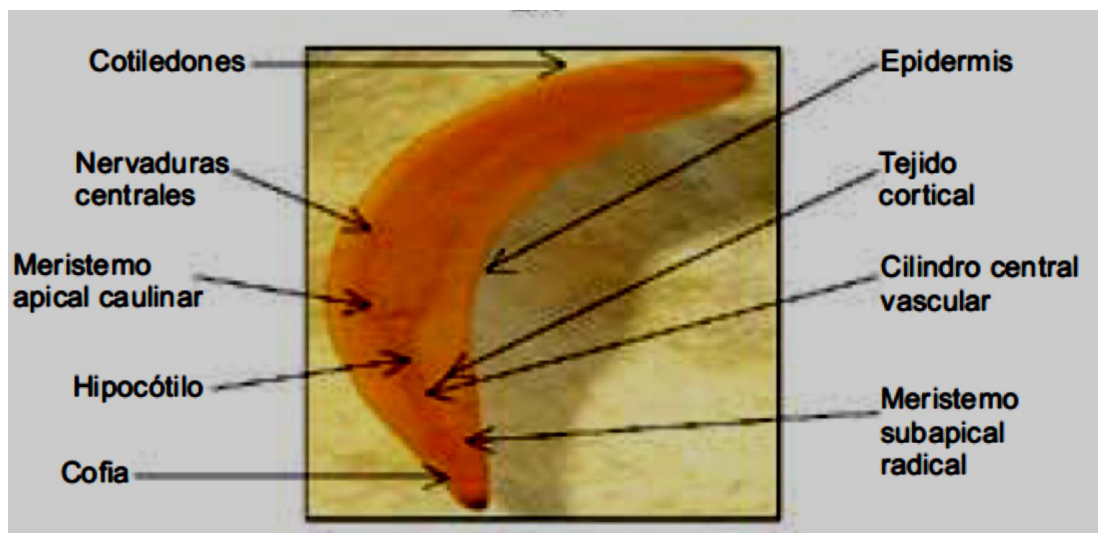


Figura 4. Morfología del embrión de *C. officinalis* (Victoria, 2007).

En el ápice basal del embrión se observa la cofia, tejido negro suberizado con alto grado de dureza que actúa como estructura de protección y facilita la emergencia de la raíz una vez ablandado por acción del agua. Sin embargo, aun en éstas condiciones la dureza sigue siendo considerable, y por ello la cofia actúa como un “escudo” para la emergencia de la raíz (Victoria, 2007).

2.8 Metabolitos secundarios de caléndula

Contiene aceites esenciales compuestos por mono y sesquiterpenos oxigenados, como Carbona, Ionona, Genarelicetona, Mentona, Isomentona, Cariofileno, Cariofilencetona, γ -Terpineno, α -Muuroleno, γ y δ -Cadineno, Pedunculatina, Dihydroactiniodiólido, entre otros componentes. También contiene flavonoides, como heterósidos de Isoramnetina, Quercetina y numerosos compuestos saponósidos hemolíticos derivados del Ácido oleanólico (calendulósidos). Sintetiza alcoholes triterpénicos como α y β -Amirina, Taraxasterol, Calenduladiol, Arnidiol, Faradiol, y triterpenoles pentacíclicos. Contiene esteroides libres, esterificados y glicosilados, carotenos y xantofilas, poliacetilenos, ácidos fenólicos, taninos.

2.9 Usos y propiedades terapéuticas

Las cabezuelas o flores de caléndula son ampliamente utilizadas por sus propiedades medicinales, como: antiinflamatoria, espasmódica, emenagoga, colagoga, sedativa, sudorífica, vulneraria y bactericida contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus fecalis*; los extractos de las flores se recomiendan en el tratamiento de leucorrea. En aplicación interna se usa para estimular la actividad hepática y por tanto la secreción biliar, en tratamiento de úlceras gástricas; y externamente, la decocción, tintura o pomada se emplea en escaras, úlceras varicosas, erupciones cutáneas. Se usa en forma de infusión como componente de té compuestos, en forma tópica, en tintura, y para la preparación de medicamentos tales como gel antiulceroso, supositorios vaginales y emulsión acuosa para el tratamiento de afecciones de la piel. En Francia se reporta la actividad antitumoral de los extractos de caléndula. Además de su uso medicinal se refiere su empleo en cosméticos, en la preparación de champú, cremas y como colorante y en la industria alimentaria en la confección, fabricación de galletas, caramelos, licores, como colorante natural de la mantequilla o como sucedáneo del azafrán (Acosta *et al.*, 2001).

Como se mencionó anteriormente, los extractos de caléndula han mostrado diferentes actividades terapéuticas entre los cuales destacan los siguientes por su frecuencia de aparición en humanos.

2.9.1 Actividad anti-inflamatoria

La fracción soluble de acetato de etilo del extracto metanólico de las flores de caléndula mostraron una potente inhibición (84 %) del 12-otetradecanoil forbol-13-acetato (TPA) que es un inductor de inflamación en ratones con un valor de dosis infectiva media (ID50) de 0.05 a 0.02 mg/oído comparado con indometacina como droga de referencia (Muley *et al.*, 2009).

2.9.2 Actividad anti-VIH

El extracto diclorometano-metanol (1:1) de flores de caléndula han mostrado potente actividad anti-VIH *in vitro*, basada en el ensayo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio MTT/tetrazolio. Esta actividad fue atribuida a la inhibición de HIV1-RT a concentraciones de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, y también como la supresión de la fusión del VIH a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Muley *et al.*, 2009).

2.9.3 Actividad anti-cáncer

La fracción soluble de acetato de etilo del extracto metanólico de las flores de caléndula han mostraron actividad citotóxica *in vitro* contra células malignas. El aislamiento de esta fracción mostró componentes activos, donde el calenduliosido F6-butil éster es activo contra líneas celulares de leucemia (MOLT-4 y RPMI8226), cáncer de colon (HCC-2998) y melanoma (LOXIMVI, SK-MEL-5 y UACC-62), las cuales tuvieron una inhibición media (IC50) de 0.77 a 0.99 μmol (excepto leucemia, la cual fue de 23.1 μmol), cáncer renal (AK-1, 17.2 μmol ; UO-31, 12.7 μmol), y cáncer de mama (NCI/ADR-RES, > 50 μmol) (Muley *et al.*, 2009).

2.10 Morfotipos florales de caléndula

En 2009 Mariana Palma Tenango obtuvo seis morfotipos florales de un cultivo heterogéneo que se utiliza comercialmente en la región, a las cuales denominó S1, S2, S3, S4, S5 y S6 (Figura 5). Hasta el momento se sabe que cada selección varía a nivel de capítulos florales en cuanto a número de flores liguladas por capítulo floral y en el color de lígulas y flores tubulares entre morfotipos florales (Palma *et al.*, 2012).



Figura 5. Morfotipos florales de caléndula.

2. 11 Cultivo de caléndula

2.11.1 Establecimiento del cultivo

La producción de caléndula puede realizarse a campo abierto o bajo invernadero, por siembra directa o por trasplante. Para el diseño de la plantación se recomienda que la distancia entre surcos sea de 70 a 85 cm, y entre plantas de 30 a 35 cm, para obtener una densidad mayor de 35,000 plantas ha⁻¹. Esta densidad se recomienda para lugares de producción bajo temporal y a una hilera, a diferencia de la plantación a “tresbolillo” que requiere una separación entre surcos de entre 100 y 120 cm y de 40 a 45 cm entre plantas, para obtener una densidad aproximada de 18, 518 plantas ha⁻¹, lo cual requiere de riegos frecuentes. Esta última densidad se recomienda más para la producción intensiva bajo invernadero (Cuevas y Palma, 2007).

La siembra directa se puede hacer de forma mateada o a chorrillo, lo que requiere un aclareo posterior para evitar la competencia excesiva entre plantas que puede afectar el rendimiento. El establecimiento del cultivo también puede hacerse por trasplante, lo cual requiere que la siembra de semilla se haga en charolas de vivero, las cuales pueden ser de plástico o unicel con diferente número de cavidades y debidamente desinfectadas al igual que el sustrato a utilizar.

Para evitar problemas fitosanitarios, 30 días después de la siembra se hace un despunte a las plantas, además de protegerlas con fungicidas, y cuando la planta alcanza un tamaño de entre 10 y 15 cm es cuando la planta se trasplanta.

2.11.2 Fecha de siembra

Generalmente se siembra temprano en primavera., a mediados de abril. La emergencia normalmente es rápida y el establecimiento termina a finales de mes. Sin embargo, Muñoz (1987) menciona que en las zonas con invierno poco riguroso la fecha adecuada es septiembre-octubre, o en marzo-abril en las zonas de invierno riguroso. En el primer caso, los capítulos más pequeños florecen en el periodo julio-agosto.

En cuba, Acosta *et al.* (2001) mencionan que la fecha más conveniente para instalar los semilleros o la siembra directa es en el periodo noviembre-diciembre, de preferencia en noviembre.

La caléndula se considera una especie rústica por lo que es poco exigente en cuanto al tipo de suelo, que crece bien en suelos de mediana fertilidad aunque para este cultivo se dedican suelos ricos en materia orgánica (Muñoz, 1987).

2.11.3 Siembra directa

Puede ser manual, a chorrillo o por golpe, y en este último caso las semillas se cubren con una capa ligera de tierra (2 a 3 cm) cuando se trata de pequeñas áreas, mientras que en grandes extensiones la siembra se puede realizar mecánicamente. La cantidad de semillas necesarias para sembrar una hectárea depende de la separación entre líneas y del sistema de siembra. Por golpe o a chorrillo, varía de 2 a 8 kg ha⁻¹, aunque el promedio es de 3 a 4 kg ha⁻¹.

2.11.4 Siembra en semillero y trasplante

Se surca el área de semillero con una separación de 10 cm entre filas y a 20 mm de profundidad. Las semillas se cubren con 2 a 3 cm de tierra, y se necesitan aproximadamente 12 kg de semilla para obtener plántulas suficientes para una hectárea.

Cuando las plántulas alcanzan una altura de aproximadamente 10 cm se llevan a campo entonces (35 a 45 días después de la siembra) (Acosta *et al.*, 2001).

2.11.5 Germinación

Después de la emergencia, que tiene lugar unos 15 días después de la siembra, es preciso remover el suelo.

En preemergencia, después de la siembra, se puede aplicar propizamida (principio activo del Kerb50®), para evitar la aparición de maleza; esto se hace a dosis de 3 kg ha⁻¹. Si la siembra se hizo en otoño, el tratamiento puede repetirse en la primavera siguiente (Muñoz, 1987).

2.11.6 Labores de cultivo

Durante el desarrollo del cultivo se necesitan dos deshierbes y dos aporques. El primer deshierbe se debe hacer entre los 20 a los 25 días después de la germinación, y el segundo un mes después. Durante el periodo de floración, aunque no son obligatorios, conviene hacer aporques mensuales para evitar la compactación del suelo y facilitar su aireación (Acosta *et al.*, 2001).

2.11.7 Riegos

En los semilleros los riegos se aplican diariamente con regadera fina hasta la nacencia final; luego, cuando las plantas alcancen unos 5 cm de altura, los riegos se espaciarán a días alternos. En siembra directa los riegos iniciales serán diarios y ligeros hasta la completa germinación; posteriormente, a medida que aumenta el sistema radical y la parte aérea de la

planta, se reducen a 2 ó 3 por semana, pero de mayor intensidad; finalmente se aplicará un riego después de cada recolección de flores (Acosta *et al.*, 2001).

2.11.8 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) considera que si el terreno es pobre en materia orgánica, en la labor preparatoria del suelo, un mes antes de la siembra, se deben aplicar 1 t ha⁻¹ de estiércol mineralizado. La fertilización mineral será: 50-80-10 de N-PO₅-K₂O.

2.11.9 Número de cortes y rendimiento

En Chillán, Chile, Berti *et al.* (2003) efectuaron 17 cortes en caléndula, durante 142 d, con un rendimiento de 3685 kg ha⁻¹ de capítulos secos.

En Cuba, Acosta *et al.* (2001) hicieron de 10 a 12 cortes de capítulos frescos y obtuvieron un rendimiento de 1.3 a 2.0 t ha⁻¹, que en seco correspondieron a aproximadamente 200 a 300 kg, ya que la relación peso fresco:peso seco fue de 10.15: 1.

2.11.10 Secado

El secado de la planta tiene gran importancia para la preservación de principios activos. Omelchuk *et al.* (1984) recomiendan que el secado de capítulos de caléndula se haga inmediatamente después de cosecharlas, de lo contrario puede haber una pérdida de 28 a 30 % de carotenoides y de 24 a 26 % de flavonoides (Acosta *et al.*, 2001). Según García *et al.* (1996), la mejor forma de secado es al sol o bien en estufa de recirculación de aire a 40 °C, independientemente de la fecha de plantación.

2.11.11 Plagas y enfermedades que pueden atacar a la caléndula

Las plagas más comunes que afectan a la caléndula son pulgones (Figura 5), cochinillas (*Maconellicoccus* spp.), mosca blanca (*Bemisia* spp.), y larvas minadoras (*Lyriomiza* spp.). Por otro lado, las enfermedades más comunes que se pueden presentar en su cultivo son las “manchas de las hojas”, que pueden ser producidas por los hongos *Cercospora*, *Colletotrichum* y *Alternaria* (Figura 6); el “oidio” (formación de un micelio blanquecino sobre las hojas), podredumbre del tallo, producida por los géneros *Rhizoctonia* o *Sclerotinia*, y la “roya”, que se manifiesta a través de pústulas de color pardo-rojizas producidas por el género *Puccinia* (Moore, 2006).

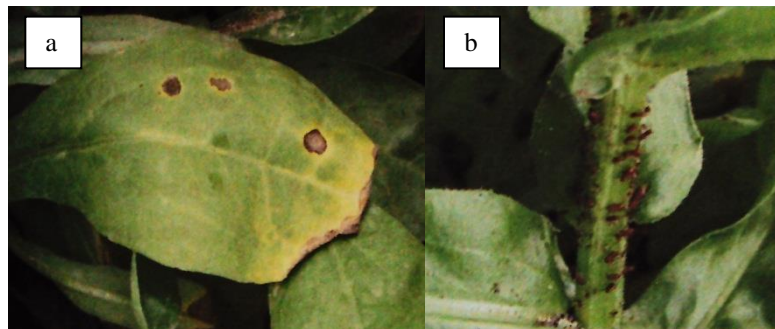


Figura 6. *Alternaria* (a) y pulgón (b) en caléndula.

2.11.12 Recolección

Cosechas de capítulos florales. Cuando 10 % de la plantación presenta estado de floración, se inicia la recolección, lo cual ocurre alrededor de los 70 d de la siembra o entre 40 y 50 días después del trasplante.

Para un mejor aprovechamiento, se recogen las cabezuelas con corto pedúnculo (2 a 3 cm), en forma escalonada, es decir, a medida que las flores abren por completo, cada 5 a 7 d, en tiempo soleado y después de eliminado el rocío. Durante la etapa productiva se efectúan de 10 a 12 recolecciones, con más frecuente al principio mientras que al final del período las flores son

de menor diámetro. En el momento de máxima producción, novena cosecha, se necesitan unos siete obreros para la cosecha de 1 ha en una jornada (Acosta *et al.*, 2001).

Semillas. Para la cosecha de semillas, la colecta se inicia a los 90 d de la siembra o a los 100 d del transplante, y también se recolectan las cabezuelas con frecuencias de 5 a 7 d, y se recogen sólo aquellas donde las flores liguladas han decaído. Se pueden hacer 6 o más cosechas, con lo que se obtienen alrededor de 400 kg ha⁻¹ de semilla.

Para mayor explotación de las plantaciones de caléndula, se pueden aprovechar los campos dedicados a la producción de capítulos florales, y después de 10 a 11 recolecciones se pudieran coleccionar semillas aún por cinco veces sucesivas; con esto se lograría aproximadamente 160 kg ha⁻¹ de semilla. El tiempo que demora la cosecha de 1.3 kg de semillas es de 7 h; por tanto, para una producción media de 32 kg de semillas en una hectárea se necesitarían más de 20 obreros por jornada (Acosta *et al.*, 2001).

2.12 Cinéticas de crecimiento

Para saber cómo se comporta el crecimiento se pueden usar las curvas de crecimiento que se obtienen al graficar el tamaño o peso como función del tiempo, y que permiten observar cómo se comporta la planta, si su crecimiento es exponencial, si se comporta constante o simplemente deja de crecer. El crecimiento en la mayoría de las plantas producen curvas de crecimiento sigmoidales (Salisbury y Ross, 1994).

Una curva de crecimiento (cinética de crecimiento) se obtiene mediante muestreos a través del tiempo cuyos datos suelen ser graficados y con frecuencia la curva es ajustada mediante funciones matemáticas para eliminar el error experimental (Babbayan y Crout, 1999). Los modelos matemáticos investigan y profundizan el entendimiento y de la fisiología del crecimiento y desarrollo (Lents, 1998).

El desarrollo de la planta involucra procesos de crecimiento y diferenciación que generalmente suceden al mismo tiempo, para permitir la existencia de estructuras y funciones determinadas de las células en lugares específicos de la planta, como hojas, tallos raíces, etc. (Taiz y Zeinger, 2002).

2.13 Radiación fotosintéticamente activa (*RFA*)

La luz es un elemento clave en las modificaciones del aparato fotosintético inducidas por diferentes factores abióticos. La radiación fotosintéticamente activa (*RFA*) captada por un vegetal determina la cantidad de materia seca producida y la calidad de la producción.

La energía luminosa del espectro visible es la más importante para los agroecosistemas y, dependiendo de las condiciones locales del clima, constituye entre 40 y 60 % de la energía total irradiada sobre la superficie terrestre (Stephen, 2002). En la *RFA* la longitud de onda se ubica de 400 a 760 nm, que también corresponde a la luz visible. Las plantas verdes no se desarrollan sin una combinación de la mayoría de las longitudes de onda de luz en el espectro visible.

La energía solar que recibe la Tierra llega en forma de ondas electromagnéticas que varían desde menos de 0.001 hasta más de mil millones de nanómetros. Esta energía forma el espectro electromagnético. La parte del espectro electromagnético entre uno y un millón de nanómetros es considerada como luz; sin embargo no toda es visible. La luz con longitudes de onda entre 1 y 390 nm es conocida como luz ultravioleta. La luz con longitudes de onda mayor a 760 nm y menor a 1000 nm es conocida como infrarroja; la luz infrarroja con longitud de onda mayor de 3000 nm se percibe como calor.

En su respuesta a diferentes intensidades de luz (cinética de luz), las plantas presentan dos parámetros, conocidos como punto de compensación y de saturación de luz. El punto de compensación es la intensidad de luz mínima que la planta requiere para que los fotoasimilados

producidos sólo alcancen para ser utilizados en el proceso de la respiración, sin que resulten sobrantes para el crecimiento, y por tanto la tasa de fotosíntesis neta es igual a cero. El punto de saturación es la luz máxima que la planta puede aprovechar, porque es la que satura su aparato fotosintético (Romero, 2012).

En ausencia de factores adversos, el rendimiento de los cultivos es directamente proporcional a la radiación solar absorbida. Diversos cultivos sintetizan diferentes compuestos, y por tanto tienen diferencias en la eficiencia de conversión de biomasa.

2.14 Cinéticas fotosintéticas

El intercambio de gases se lleva a cabo a través de los estomas, cuya conductancia de gases se controla por cambios en la turgencia de las células oclusivas y responde a diversos factores ambientales, entre los que destacan luz, humedad y concentración de CO₂ (Damián-Nava *et al.*, 2009).

Así, al aumentar la concentración de CO₂ también aumenta la tasa de asimilación neta hasta alcanzar el nivel de saturación, con una cinética propia para cada especie. El conocimiento de dicha cinética con respecto a la concentración interna de CO₂ en la hoja (C_i) permite determinar parámetros importantes del mecanismo fotosintético, como: el punto de compensación por CO₂, que indica la C_i en la que la absorción y liberación CO₂ son iguales y la tasa de asimilación neta (A) es cero; el punto de saturación por CO₂ (PS), en la que A alcanza su máximo valor; y la eficiencia de carboxilación por la enzima Rubisco, o tasa de captura enzimática del CO₂. Estos parámetros también permiten clasificar a las plantas en función de sus mecanismos fotosintéticos, ya sean C3 o C4.

Las cinéticas fotosintéticas en función de la concentración de CO_2 (A/C_i) pueden además proporcionar valores numéricos de otros importantes parámetros fotosintéticos, como: tasa máxima de carboxilación (V_{cmax}) permitida por la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO), tasa de transporte fotosintético de electrones (J) basada en el requisito de NADPH, uso de triosas fosfato (TPU), tasa de respiración (R_d), y conductancia del mesófilo (g_m). El método requiere al menos cinco pares de valores de asimilación neta de CO_2 (A) y C_i , y que los usuarios indiquen al presunto factor limitante (Sharkey *et al.*, 2007).

La temperatura influye de manera importante en el comportamiento de las curvas de CO_2 . Estudios recientes informan que la pendiente inicial, es decir la tasa de fotosíntesis saturada de luz *vs.* C_i , cambia en función del aumento de temperatura. Sin embargo, pocos estudios comparan la pendiente inicial con las propiedades de la enzima de carboxilación denominada ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco), la cual determina el rendimiento fotosintético en bajas y altas temperaturas (Romero, 2012).

2.15 Fotosíntesis en caléndula

Como es bien conocido, la capacidad fotosintética de las hojas de plantas superiores depende de la intensidad de la luz a la cual están expuestas durante su crecimiento. Además es bien conocido que la capacidad fotosintética varía con la edad de la hoja. La influencia de la intensidad de luz sobre el crecimiento y fotosíntesis ha sido el sujeto de numerosos estudios por muchos años. Los primeros estudios relacionados con la influencia de la luz y la anatomía de la hoja, y posiblemente los primeros experimentos fueron los realizados por Bonnet en 1754, que comparó el crecimiento de semillas de pera crecidas a aire abierto, bajo un vaso y bajo una pared de madera.

En caléndula, Groen (1975) cuantificó los rangos de fotosíntesis por cm^2 de área foliar a diferentes intensidades de luz y en hojas de diferentes edades. Como puede ser observado y esperado de una planta originaria de un hábitat soleado, se esperaría una tendencia general a que el máximo rango de fotosíntesis aumente con la intensidad de luz a la que las plantas son crecidas. En algunos casos las diferencias son pequeñas y a veces el máximo rango de fotosíntesis es mayor en hojas crecidas a 75 % o 37 % de luz. El desarrollo de los valores para los experimentos en interiores claramente muestran un incremento del rango máximo de fotosíntesis al incrementar la intensidad de luz a las que las plantas fueron crecidas (Figura 7).

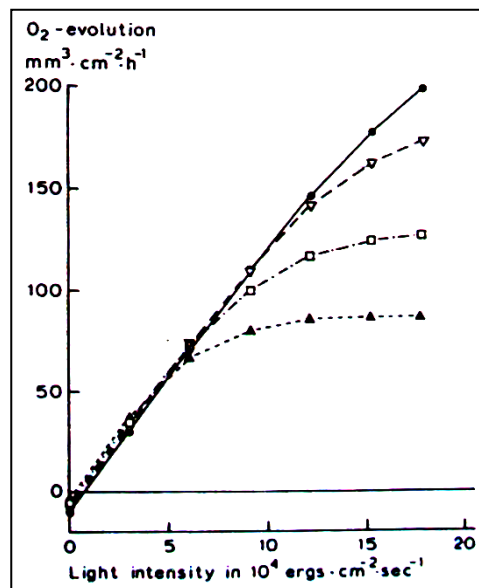


Figura 7. Rangos de fotosíntesis por cm^2 de área foliar a $20\text{ }^\circ\text{C}$, de hojas de caléndula crecidas a diferentes intensidades de luz (Fuente: Groen, 1975).

En cuanto a la relación entre el rango de fotosíntesis y la edad de las hojas, la tendencia general muestra que los mayores rangos fotosintéticos son presentados por las hojas crecidas a mayores intensidades de luz. Estas hojas además muestran el rápido decaimiento de su máximo rango de fotosíntesis debido al avance en edad y al comienzo de senescencia (Figura 8) (Groen, 1975).

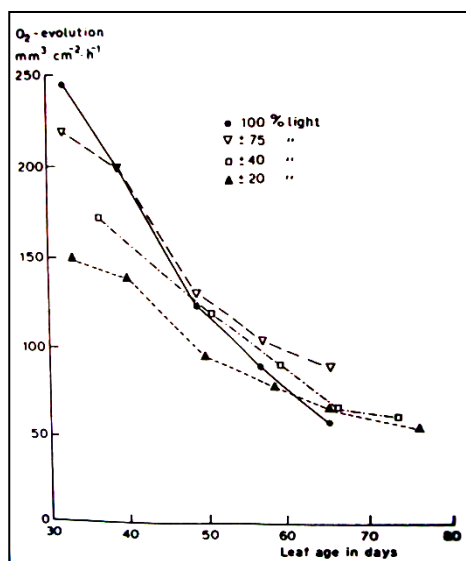


Figura 8 Tasas de fotosíntesis por cm^2 de área foliar a 20°C . en diferentes edades de hojas del tallo principal de plantas de caléndula crecidas a diferentes intensidades de luz (Groen, 1975).

2.16 Número de estomas

Algunas investigaciones han mostrado que la intensidad de luz durante el crecimiento tiene influencia sobre la resistencia estomática. Björkman y Holmgren (1963) encontraron un incremento en el número de estomas en *Solidago virgaurea*, con un incremento en la intensidad de luz durante el crecimiento. Wilson y Cooper (1969) encontraron un decrecimiento en el número de estomas con el aumento de intensidad luminosa durante el crecimiento de *Lolium perenne*, pero los estomas fueron mucho más largos. Además, en condiciones de altas concentraciones de bióxido de carbono en las cuantificaciones, la resistencia estomática no será de mucha influencia en los rangos fotosintéticos (Groen, 1975).

Para *Calendula officinalis* se realizó una cuantificación de estomas en hojas en su máximo desarrollo, que es uno de los mayores factores que hacen variar la cantidad de estomas y células epidérmicas por unidad de área foliar. Si bien en varias especies se ha verificado que a mayores intensidades de luz la cantidad de estomas es mayor, en caléndula se observó una reducción en el número de estomas del lado adaxial mientras que a bajas intensidades luminosas

hubo mayor cantidad de estomas del lado abaxial de la hoja. El ratio estomas/células epidérmicas es influenciado por la intensidad de luz (Cuadro 1).

Cuadro 1. Frecuencia estomática de hojas de caléndula crecidas en el fitotrón a intensidades luminosas de 67,000 y 16,000 $\text{erg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, respectivamente (Fuente: Groen, 1975).

Lado adaxial			Lado abaxial		
S^Z	E^Y	S/E^X	S	E	S/E
Alta intensidad de luz					
82	504	0.16	91	452	0.20
71	364	0.20	110	560	0.20
103	528	0.20	73	368	0.20
85	464	0.18	105	560	0.19
Media 85	465	0.18	Media 95	485	0.20
Baja intensidad de luz					
75	624	0.12	79	568	0.14
52	528	0.10	105	588	0.18
51	448	0.11	117	732	0.16
50	356	0.14			
Media 57	489	0.12	Media 100	629	0.16

^ZS (número de células epidérmicas), ^YE (número de estomas), ^XS/E (Relación número células epidérmicas:número de estomas).

2.17 Contenido de clorofila

En general una hoja totalmente verde contiene suficiente clorofila para absorber una cantidad suficiente de luz para saturar la fotosíntesis en altas intensidades de luz y para asegurar un uso eficiente de la quanta incidente a bajas intensidades de luz. Un alto contenido de clorofila es frecuentemente encontrado en hojas sombreadas, que es seguramente importante para las hojas que se encuentran situadas en la parte baja de la planta y así absorber adecuadamente el verde y el rojo cercano de la luz remanente después de pasar a través de las otras hojas (Groen, 1975).

Las hojas de caléndula muestran un incremento en la concentración de clorofila después del estado joven, y muestran un ligero cambio cuando las hojas se vuelven viejas conforme ocurre un amarilleamiento. Las hojas sombreadas muestran frecuentemente un alto contenido de clorofila. Esto es más obvio en las hojas jóvenes, ya sea al medir la clorofila por unidad de área

foliar o por unidad de peso fresco, excepto para los niveles más bajos de luz. Probablemente porque la poca cantidad de energía captada es utilizada para asegurar una concentración normal de clorofila (Cuadro 2).

Cuadro 2. Concentraciones de clorofila de hojas de caléndula de diferentes edades, de plantas crecidas en fitotrón a intensidades de luz de 67,000 erg·cm⁻² (100 %), 47,000 erg·cm⁻² (70 %), 28,000 erg·cm⁻² (40 %) y 16,000 erg·cm⁻² (20 %) (Fuente: Groen, 1975).

Valores por unidad de área foliar (Coeficientes de extinción, desarrollo de varios valores)				
Intensidad luminosa	100%	ca. 70%	ca. 40%	ca. 20%
Hojas jóvenes	0.382	0.440	0.470	0.342
Hojas maduras	0.510	0.538	0.544	0.377
Hojas viejas	0.529	0.542	0.478	0.387
Valores relativos por unidad de peso fresco (desarrollo de varios valores)				
Intensidad luminosa	100 %	ca. 70 %	ca. 40 %	ca. 20 %
Hojas jóvenes	26	36	40	29
Hojas maduras	39	43	36	20
Hojas viejas	39	32	31	27

LITERATURA CITADA

- Acosta de la Luz L. 2001. Instructivo técnico de *Calendula officinalis*. Revista Cubana de Plantas Medicinales 1: 23-7.
- Assmann S. M., K. Shimazaki. 1999. The multisensory guard cell. Stomatal responses to blue light and abscisic acid. *Plant Physiology* 119:809-816.
- Bernatoniene J. 2011. Topical application of *Calendula officinalis* (L.): Formulation and evaluation of hydrophilic cream with antioxidant activity. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(6): 868-877.
- Berti, D. M., R. Wilckens, F. Hevia, 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 Chillán. *Agricultura Técnica* 63.
- Palma T. M., V. A. González H., y R. M. Soto H. 2013. Avances de Investigación 2012. Capítulo: Variación genética y ambiental en el contenido de flavonoides en capítulos de

- caléndula. In: Cruz-Izquierdo S., O. J. Ayala-Garay, N. Cruz-Huerta, I. Ramírez-Ramírez, y E. Martínez-Villegas (eds.). por Ed. Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad–Genética. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. pp: 81-84.
- Damián Nava A., I. Ramírez Ramírez, C. B. Peña Valdivia, G. Díaz Villaseñor, y V. A. González Hernández. 2009. Características del intercambio de gases en hojas de guayabo (*Psidium guajava* L.) Revista Chapingo Serie Horticultura 15: 119-126.
- Davis J. E. 1987. Rapid field measurement of the assimilation rate versus internal CO₂ concentration relationship in green ash (*Fraxinus pennsylvanica* Marsh.): the influence of light intensity. Tree Physiology 3, 387-392.
- Fuentes Fiallo V. R. 2000. Comparación entre 2 cultivares de *Calendula officinalis* L. Revista Cubana de Plantas Medicinales 5(1):14-6.
- García D. 1996. Estudio farmaconóstico de Caléndula (*Calendula officinalis*). Revista Cubana de Farmacia 1(3): 21-25.
- Gazim Z. C., C. Moraes Rezende, S. R., Fraga, F.B. Prado Días, C. Vataru, and D. A. Garcia. 2008. Analysis of the essential oils from *Calendula officinalis* growing in Brazil using three different extraction procedures. Brazillian Journal of Pharmautical Science 44 (3): 391–395.
- González González R. L. 2006. Evaluación de la actividad antiviral de plantas medicinales frente al virus de la hepatitis B (VHB) en células PLC/PRF/5. Revista Cubana de Medicina Tropical 58(2):103-8.
- Gröen J. 1973. Photosynthesis of *Calendula officinalis* L. and *Impatiens parviflora* DC. influenced by light intensity during growth and age of the leaves and plants. Mededelingen Landbounw Whoge School. Wageningen-Nederland. pp: 73-8.
- Hunt R. 1978. Plant Growth Analysis. Studies in Biology No. 96. Edward Arnold. The Camelot Press Ltd. Southampton, UK. 167 p.

- Kuskoski E. M., G. M. Asuero Agustín, J. Troncoso, R. Mancini-Filho. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas 25(4): 726-732.
- Lastra Valdés H., y R. Piquet García. 1999. *Calendula officinalis*. *Revista Cubana de Farmacia* 33(3):188-94.
- Leal L. M. and L. J. Ruy de Souza. 2012. Wound healing and anti-inflammatory effect in animal models of *Calendula officinalis* L. growing in Brazil. Hindawi Publishing Corporation. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Article ID 375671, 7 pages. doi:10.1155/2012/375671.
- Long S. P., and C. J. Bernacchi. 2003. Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *Journal of Experimental Botany* 54: 2393-2401.
- Moore T. L., P. Sánchez Villarreal, y C. Desmarchelier. 2006. Manual de Cultivo y Manejo de “Caléndula” *Calendula officinalis* L. Proyecto de atención primaria de la salud con plantas medicinales y fitomedicamentos “cultivando la salud”. Municipio de Malvinas argentinas, provincia de Buenos Aires, Argentina. 15 pp.
- Muley B. P., S. S. Khadabadi and N. B. Banarase. 2009. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A review *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 8 (5): 455-465.
- Muñoz L., B. 1987. *Plantas Medicinales y Aromáticas*. Ediciones Mundi-prensa. Madrid, España. pp: 248-249.
- Muñoz C. L. M. 2009. Plantas medicinales de españolas, *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). *Medicina Naturista* 5: 257-261.
- Palacio García-Nieto L. 2000. Las plantas medicinales y aromáticas Una alternativa de futuro para el desarrollo rural. *Boletín Económico de ICE* N° 2652, del 1 al 14 de mayo.
- Palma T. M., C. Cuevas M., D. Cano G., y C. Mendoza G. 2007. *Mercadela, Cultivo y Usos Terapéuticos*. Universidad Autónoma de Chapingo. 131 p.

- Palma Tenango M. 2009. Cinética del crecimiento, desarrollo floral y acumulación de flavonoides en caléndula. Tesis de Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. 89 pp.
- Palos E., M., A., Colom Gorgues. 2002. Distribución comercial de plantas aromáticas y medicinales en Cataluña. Invest. Investigación agraria. Producción y protección vegetal 17 (1).
- Raffo M. D., y N. Iglesias. 2004. Efecto de la intercepción y distribución de la radiación fotosintéticamente activa en manzanos cv. Fuji, bajo cuatro sistemas de conducción en alta densidad. Revista de Investigaciones Agropecuarias 33:29-42.
- Rintama E. 2004. Plant response to stress: modifications of the photosynthetic apparatus. University of Turku, Turku, Finland. Cap. 315. Encyclopedia of Plant and Crop Science. 993 p.
- Romero Félix C. S. 2012. Cinéticas fotosintéticas del frijol (*Phaseolus vulgaris*) sometido a déficit hídrico. Tesis de Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. 73 pp.
- Sharkey T. D., C. J. Bernacchi, G. D. Farquhar, E. L. Singsaas. 2007. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves. Plant, Cell and Environment 30:1035-1040.
- Taiz L. and E. Zieger. 2002. Plant Physiology. Third edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 690 p.
- Universidad Nacional de Colombia. 2007. El Cultivo de la Caléndula, *Calendula officinalis* L. ISBN 978-958-8095-40-0.
- Victoria T. J. A. 2007. Morfoanatomía y efecto del secado en la germinación de semillas de caléndula y eneldo. Acta Agronómica 56 (2): 61-68.
- Yamori W., K. K. Suzuki, M. Noguchi, and I. Nakai. 2006. Effects of rubisco kinetics and rubisco activation state on the temperature dependence of the photosynthetic rate in spinach leaves from contrasting growth temperatures. Plant, Cell & Environment 29:1659-1670.

CHAPTER III. GROWTH KINETICS IN FLORAL MORPHOTYPES OF POT

MARIGOLD (*Calendula officinalis* L.)

Luis F. Salomé-Abarca,¹ Víctor A. González-Hernández¹, Nicacio Cruz-Huerta¹, y R. Marcos Soto-Hernández²

¹Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Fisiología Vegetal y ²Postgrado en Botánica, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México.

ABSTRACT

The growth curves are used to determine the physiological and agronomic performance of plants. These curves are obtained by plotting the size or weight as a function of time. Mathematical models fitted to the growth curves are useful tools to test hypotheses, synthesize knowledge, describe, understand complex systems and compare different scenarios. They are used as support for decision making-systems, climate control of greenhouses, forecasting and production planning. The floral morphotypes of pot marigold (*Calendula officinalis* L.) have not been characterized in terms of growth parameters such as total accumulation and distribution of biomass among organs, and efficiency ratios. The aim of this study was to compare the growth kinetics of five floral morphotypes of pot marigold. The five floral morphotypes showed sigmoidal kinetics of growth in both total biomass and in the organs that compound it, but with differences in the duration of its phases and the respective growth rates associated with their ability to accumulate biomass. The vegetative parts showed most of the strength of demand in the floral morphotypes, and in both kinds of organs the greatest strength of demand occurred at 72 and 57 d after transplantation, respectively.

Keywords: Sigmoidal, growth phases, demand force (TAC).

CAPÍTULO III. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO EN MORFOTIPOS FLORALES DE CALÉNDULA (*Calendula officinalis* L.)

Luis F. Salomé-Abarca,¹ Víctor A. González-Hernández¹, Nicacio Cruz-Huerta¹, y R. Marcos Soto-Hernández²

¹Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Fisiología Vegetal y ²Postgrado en Botánica, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México.

RESUMEN

Las curvas de crecimiento sirven para conocer el desempeño fisiológico y agronómico de las plantas. Dichas curvas se obtienen al graficar el tamaño o peso como función del tiempo. Los modelos matemáticos ajustados a las curvas de crecimiento son herramientas útiles para probar hipótesis, sintetizar el conocimiento, describir, entender sistemas complejos y comparar diferentes escenarios. Se usan como soporte para la toma de decisiones en sistemas, control climático de invernaderos, predicción y planeación de la producción. Los morfotipos florales de calendula (*Calendula officinalis*) no han sido caracterizados en cuanto a parámetros de crecimiento como acumulación total y distribución de biomasa entre órganos, e índices de eficiencia. El objetivo de este trabajo fue comparar la cinética de crecimiento de cinco morfotipos florales de calendula. Los cinco morfotipo florales presentaron cinéticas de crecimiento tipo sigmoideal tanto en biomasa total como en los órganos que los componen, pero con diferencias en la duración de sus fases y en las respectivas tasas de crecimiento asociadas con su capacidad de acumular biomasa. Las partes vegetativas presentaron la mayor parte de la fuerza de demanda en los morfotipos florales, y en ambos órganos la mayor fuerza de demanda se dio a los 72 y 57 d después del trasplante, respectivamente.

INTRODUCCIÓN

Es esencial estudiar el crecimiento de las plantas, sobre en condiciones naturales de campo. La gran acumulación de conocimiento de las formas y funciones de las plantas no provee de suficiente información para inferir como alguna planta en particular puede comportarse como un todo funcional. El crecimiento vegetal se puede cuantificar mediante curvas de crecimiento, que se obtienen al graficar el tamaño o peso como función del tiempo, curvas que además permiten determinar las fases y tasas del crecimiento de las plantas, variables útiles para caracterizar genotipos y para detectar limitantes de este complejo proceso (Clifford, 1972). El crecimiento en la mayoría de las plantas produce curvas de tipo sigmoideal (Salisbury y Ross, 1994).

Una curva de crecimiento (cinética de crecimiento) se obtiene mediante muestreos efectuados periódicamente a través del ciclo biológico de la planta, donde los datos suelen ser graficados y con frecuencia la curva es ajustada mediante funciones matemáticas para eliminar el error experimental (Babbayan y Crout, 1999). Los modelos matemáticos investigan y profundizan el entendimiento de la fisiología del crecimiento y desarrollo (Lents, 1998).

El desarrollo de la planta involucra procesos de crecimiento y diferenciación que generalmente suceden al mismo tiempo, para permitir la existencia de estructuras y funciones determinadas de las células en lugares específicos de la planta, como hojas, tallos, raíces, entre otros (Taiz y Zeiger, 2002).

Los modelos matemáticos son herramientas útiles para probar hipótesis, sintetizar el conocimiento, describir y entender sistemas complejos, y comparar diferentes escenarios. Se usan como soporte para la toma de decisiones en sistemas, control climático de invernaderos, predicción y planeación de la producción (Lentz, 1998). Un modelo es una representación

matemática de un fenómeno o de un sistema, y la modelación es el proceso para desarrollar dicha representación; para que un modelo opere y produzca una imitación del mundo real, es necesario que se dé el proceso de simulación (Goudriaan y Van Laar, 1994). Penning de Vries *et al.* (1989) clasifican los modelos en descriptivos o explicativos. Descriptivos, estadísticos o empíricos son los modelos obtenidos mediante regresión lineal y reflejan poco o nada los mecanismos que causan el comportamiento del sistema, mientras que los explicativos consisten de un conjunto de ecuaciones que proveen una descripción cuantitativa de esos mecanismos y procesos.

En la zona de los Valles Centrales de México, Palma (2009) observó amplia diversidad fenotípica en los capítulos de una variedad común de caléndula (*Calendula officinalis* L.), y entre las variantes eligió seis morfotipos florales de esa población heterogénea a las cuales denominó de S1 a S6. Hasta el momento se sabe que cada morfotipo varía en el número de flores liguladas por capítulo floral y en el color de lígulas y flores tubulares, pero estos morfotipos florales no han sido caracterizados en cuanto a parámetros de crecimiento, tales como acumulación total y distribución de biomasa entre órganos. Por ello el objetivo de este trabajo fue comparar la cinética de crecimiento de los cinco morfotipos florales de caléndula que contaban con suficientes plantas para realizar el estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del experimento

Los cinco morfotipos de caléndula (S1 a S5) se establecieron en un campo experimental ubicado en el municipio de Texcoco, Estado de México (19° 19' N, 98° 53' O, altitud de 2250 m).

Establecimiento del almácigo

La semilla de los cinco morfotipos se sembró el 29 de febrero de 2012 en invernadero. Como sustrato se utilizó una mezcla de tierra de monte con turba (“peat moss”) en proporción 1:1, la cual se colocó en charolas de 200 cavidades. El sustrato se humedeció a capacidad de campo y se colocó una semilla por cavidad. Cuando tenían 90 d de edad (29 de mayo), las plántulas se trasplantaron a campo.

Manejo experimental

En campo las plantas se distribuyen en surcos de 95 cm de ancho con 60 cm de distancia entre plantas (17,543 plantas ha⁻¹). Los tratamientos consistieron de los cinco morfotipos, y la unidad experimental en cada repetición constó de tres surcos de 5 m, en un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones.

Los muestreos para medir el crecimiento se hicieron mediante la técnica de Hunt (1978), con muestras tomadas cada dos semanas de tres plantas completas (una planta por cada repetición), las cuales fueron extraídas completamente del suelo, incluida la raíz. Las plantas colectadas fueron llevadas al Laboratorio de Fisiotecnia Vegetal, donde se disecaron para separar tallo, hoja, raíz y órganos reproductores (capítulos florales). En cada muestreo los órganos disecados se midieron las siguientes variables: peso fresco en seguida de haber sido cosechadas en campo, y peso seco después de secar en estufa con recirculación de aire (Riosa Inc.; México) a 70 °C por 72 h, ambas efectuadas con una balanza Ohaus® modelo Explorer (USA). En las hojas frescas también se midió área foliar verde con un integrador LI-3100® (LICOR, Inc.; Lincoln, NE, USA), y las mediciones se tomaron de tres plantas diferentes, donde cada planta fue una repetición.

Manejo de datos

Después de graficar los promedios por morfotipo y por muestreo de los datos observados en función de la edad de las plantas (en días después del trasplante, ddt), de cada morfotipo se obtuvo un modelo de simulación mediante ajuste del modelo logístico aplicado a los datos observados. El modelo fue representado por la ecuación $y = a/(1+be^{-cx})$, donde a = peso asintótico, b = peso mínimo, e = logaritmo natural con base e , c = tasa de crecimiento, y x = número de días después del trasplante en cada muestreo (cuando se realizó la medición), de manera que en cada morfotipo se lograra un modelo con alta bondad de ajuste estadístico (R^2) entre los datos observados y los predichos por el modelo, así como un buen ajuste biológico (con datos predichos biológicamente aceptables).

Este procedimiento se aplicó a los datos de biomasa total así como a los de biomasa asignada a cada órgano, para comparar los morfotipos con base en la acumulación total de biomasa en la planta y de su distribución entre órganos. Todos los modelos y los valores de sus parámetros se obtuvieron con el programa Curve Expert Professional 2.0® (<http://www.curveexpert.net/download/>). Los promedios ($n = 3$) de datos observados en cada muestreo y sus respectivas desviaciones estándar fueron calculados, con el paquete Excel de Microsoft®, el cual también se utilizó para graficar los valores predichos en función de la edad de la planta.

Con los datos predichos de cada morfotipo, y por ello libres del error experimental, se calcularon dos índices de eficiencia: tasa absoluta de crecimiento (TAC) y tasa relativa de crecimiento (TRC), mediante las fórmulas correspondientes indicadas por Hunt (1978). Ello se hizo para dos grupos de órganos, los vegetativos y los reproductores. La TAC, en $g\ d^{-1}$, se obtuvo mediante la fórmula $TAC = (P_2 - P_1)/(t_2 - t_1)$, donde P_1 y P_2 son los pesos secos predichos para t_1 y

t_2 , que corresponden a los tiempos de dos muestreos sucesivos; la TRC, expresada en $g\ g^{-1}\ d^{-1}$, se obtuvo mediante la fórmula $TRC = (\ln P_2 - \ln P_1) / (t_2 - t_1)$, donde \ln corresponde al logaritmo natural de base e .

Como la fuerza de la demanda (FD) de un órgano o demanda se puede calcular mediante el producto: tamaño de la demanda (TD, en g) x la actividad de la demanda (AD, en $g\ g^{-1}\ d^{-1}$); entonces la FD corresponde a la TAC, el TD a la biomasa y la AD a la TRC (Aguilar *et al.*, 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinéticas de acumulación y distribución de biomasa

Los cinco morfotipos florales presentaron cinéticas de crecimiento tipo sigmoideal (Figura 1), lo cual coincide con Salisbury y Ross (1994) quienes afirman que las plantas usualmente presentan cinéticas de crecimiento de tipo sigmoideal. Cinéticas del mismo tipo se han observado en otras especies vegetales como papa, *Solanum tuberosum* L. (Aguilera, 2006), lechuga, *Lactuca sativa* L. (Carranza *et al.*, 2009), estevia, *Stevia rebaudiana* (Jarra *et al.*, 2006) y chile jalapeño, *Capsicum annuum* L. cv. Hot (Azofeifa y Moreira, 2004), entre otras.

Todos los morfotipos florales presentaron las mismas fases del crecimiento (LE, Lenta; A, aceleración; LI, lineal; D, desaceleración y E, estacionaria), con excepción del morfotipo S1 que no presentó fase lineal. El morfotipo S1 presentó la mayor capacidad de crecimiento (acumulación de biomasa total) a los 102 ddt, con un máximo de 228 g de materia seca por planta, en contraste con los demás morfotipos que no lograron acumular más de 200 g en biomasa total.

Estas diferencias entre morfotipos se atribuyen a diferencias en la duración y velocidad de las fases del crecimiento; por ejemplo, el morfotipo S1 presentó una rápida y larga fase de

aceleración (A, 45 d aprox.) acoplada con una larga y rápida fase de desaceleración (D, 30 d aprox.), lo que le permitió a estas plantas alcanzar la fase estacionaria (E, máximo crecimiento) con más de 200 g de biomasa por planta a los 102 ddt, aunque su fase lenta (LE) fue de igual duración que en los demás morfotipos. En contraste, el morfotipo S2 aunque tuvo una fase A rápida y más larga (32 d) éste dejó de crecer a los 91 ddt (11 d menos de crecimiento que el S1), de modo apenas acumuló 155 g por planta en biomasa total (Figura 1). Además, el área foliar de S1 continuó creciendo hasta los 92 ddt, mientras en los demás morfotipos el área foliar dejó de crecer a los 72 ddt (Figura 2), lo que le permitió a S1 seguir produciendo tejido fotosintético durante 20 d más que los demás morfotipos.

Entre los morfotipos S2 a S5 hubo pocas diferencias en acumulación de biomasa total, asociada con pocas diferencias entre las duraciones de sus fases y sus respectivas tasas de crecimiento. El morfotipo S3 presentó la fase A de menor tasa de acumulación de biomasa, por lo que fue el morfotipo que produjo la menor cantidad de biomasa total (Figura 1). Por tanto, la duración y tasa de crecimiento de las fases A y D pueden ser las etapas convenientes para comparar el vigor de morfotipos florales de caléndula.

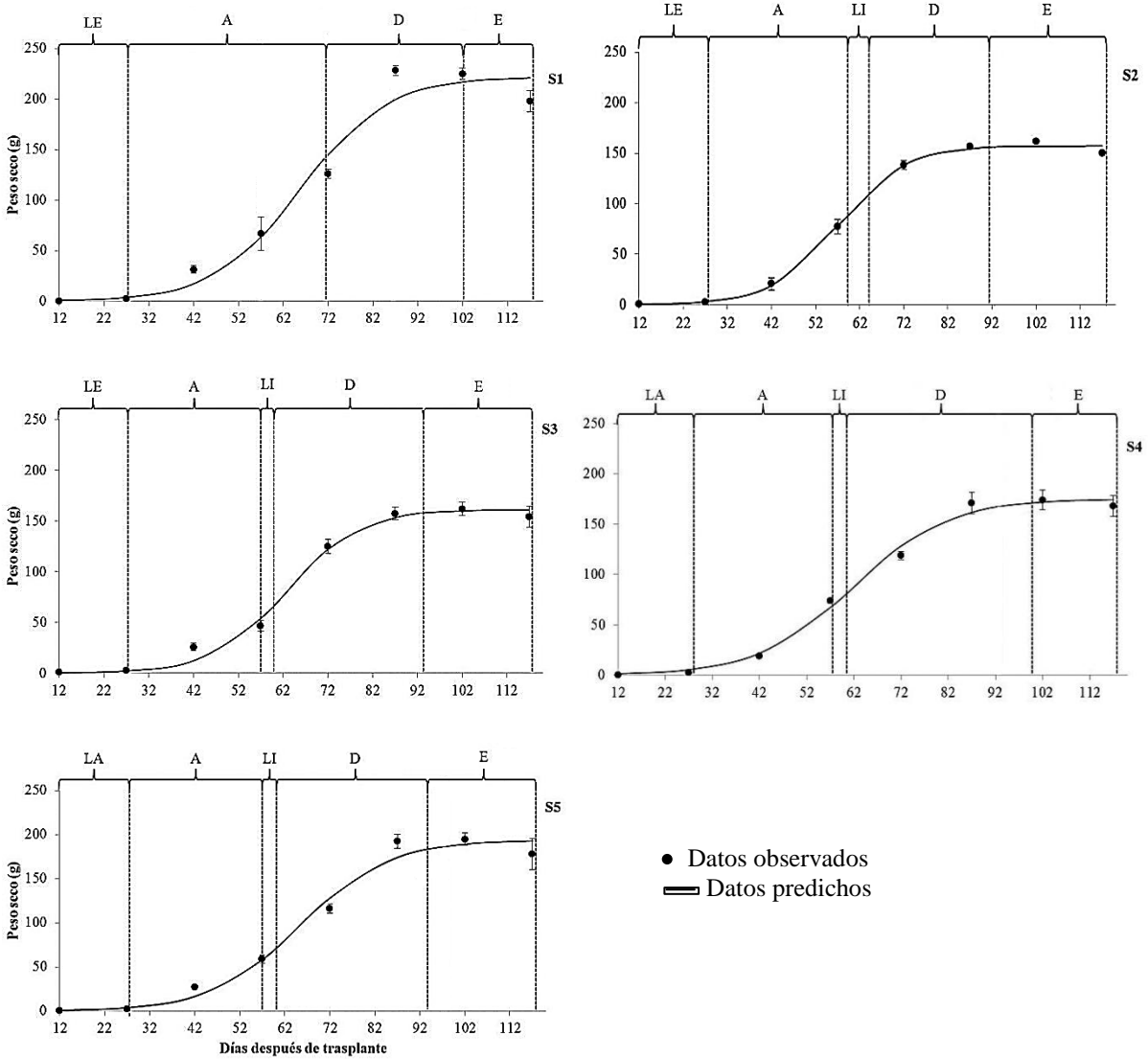


Figura III. 1. Cinéticas de crecimiento de biomasa total en cinco morfotipos florales de caléndula (S1 a S5), en g/planta. Fases del crecimiento: LE = Lenta o 'lag'; A = Aceleración o exponencial; LI = Lineal; D = Desaceleración; E = Estacionaria. Los puntos representan promedios (n = 3) y las barras verticales indican \pm una desviación estándar.

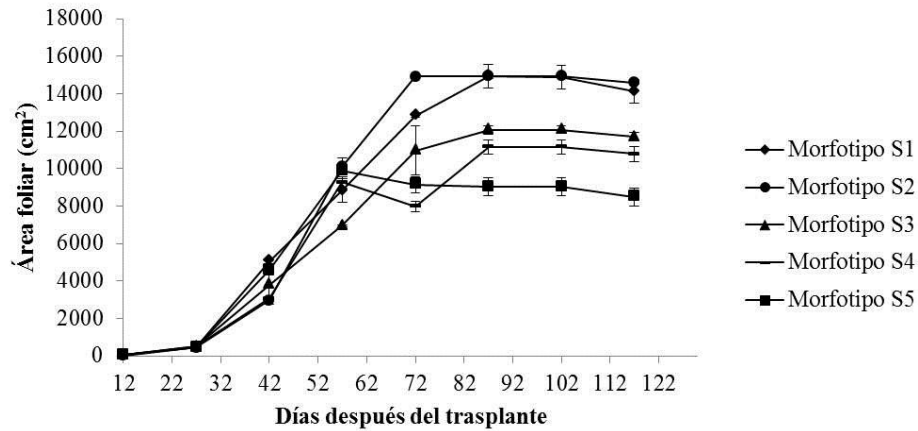


Figura III. 2. Cinética del área foliar en morfotipos florales de caléndula. Las barras representan \pm una desviación estándar ($n = 3$).

De los modelos logísticos ajustados a las cinéticas de crecimiento para acumulación de biomasa se obtuvieron los valores de los parámetros a , b y c para predecir o simular el crecimiento de cada morfotipo (Cuadro III. 1). Todos estos modelos tienen buen ajuste estadístico con R^2 mínimo de 0.98, por lo que son confiables para simular el crecimiento de los morfotipos de caléndula, si crecieran en las mismas condiciones que en el presente estudio. Conviene destacar que los morfotipos difirieron en los tres parámetros, lo que permite apreciar que el morfotipo S1 sobresale por tener los máximos valores de pesos máximo e inicial (a y b , respectivamente), mientras que el morfotipo S2 tuvo la máxima tasa de crecimiento (c).

Cuadro III. 1. Valores a, b y c de la ecuación logística de la forma $y = a/(1+be^{-cx})$ para la predicción de acumulación de biomasa total, en cinco morfotipos florales de caléndula.

Morfotipo	a (g)	b	c (g g ⁻¹ d ⁻¹)	R ²
S1	2.220E+02	9.025E+02	1.033E-01	0.98
S2	1.574E+02	1.827+03	1.310E-01	0.99
S3	1.610E+02	2.014E+03	1.214E-01	0.99
S4	1.750E+02	4.467E+02	9.878E-02	0.99
S5	1.941E+02	7.187E+02	1.005E-01	0.99

a = peso máximo o asintótico, b = factor de ajuste del modelo, e = logaritmo natural, c = tasa de crecimiento, x = número de días después del trasplante, y R²= coeficiente de determinación o bondad de ajuste.

En cuanto a la distribución de biomasa entre órganos, el tallo fue el órgano donde se dio la mayor acumulación de biomasa, en particular en el morfotipo floral S1 con un promedio de general (de los 8 muestreos) 61.43 ± 1.43 g, con excepción del morfotipo floral S2 que destacó por asignar la mayor cantidad de materia seca a hojas con 48.2% de la biomasa total (Cuadro 2). En los demás morfotipos la biomasa asignada a hojas varió entre 33 a 39%.

Debido a que es en el ápice de los tallos de caléndula donde se forma el capítulo floral, se esperaría que los morfotipos que asignen mayor cantidad de biomasa a tallos fueran también los que tuvieran una mayor asignación de biomasa a capítulos florales. Sin embargo, esto no fue así probablemente porque en lugar de generar un mayor número de tallos y por ende de capítulos florales, hubo un menor número de tallos pero éstos alcanzaron mayor acumulación de biomasa por tallo.

En todos los morfotipos la raíz es el órgano que recibió menos biomasa, excepto el S5 cuya raíz recibió igual cantidad de biomasa que en los capítulos. Los capítulos florales constituyen la segunda demanda más baja de asimilados, con 7.8 a 12 % del total y apenas

ligeramente mayor que la raíz que recibe de 5.2 a 8.7 %. En materia seca de capítulos destacan los morfotipos S1 y S2 por alcanzar los mayores rendimientos, pero en magnitud relativa solamente el morfotipo S2 asignó más biomasa a la formación de capítulos con 12 %, que superó a los demás morfotipos cuyas asignaciones relativas oscilaron de 7.8 a 10.3 % (Cuadro III. 2).

Cuadro III. 2. Distribución promedio de los 8 muestreos para biomasa entre órganos de morfotipos florales de caléndula.

Órgano	S1 (g)	S2 (g)	S3 (g)	S4 (g)	S5 (g)
Tallo	61.43 ± 1.43 52.5 %	31.55 ± 0.57 33.2 %	38.03 ± 2.44 42.3 %	46.86 ± 3.55 47.5 %	48.29 ± 1.39 47.7 %
Hoja	38.78 ± 2.60 33.1 %	45.76 ± 0.91 48.2 %	34.99 ± 0.92 38.9 %	35.67 ± 0.91 36.1 %	36.73 ± 3.98 36.2 %
Raíz	5.96 ± 0.53 5.1 %	6.15 ± 0.24 6.4 %	7.90 ± 0.45 8.7 %	4.64 ± 0.32 4.7 %	8.32 ± 0.33 8.22 %
Capítulo floral	10.87 ± 0.71 9.3 %	11.43 ± 0.63 12 %	9.02 ± 0.76 10 %	10.20 ± 0.19 10.3 %	7.85 ± 0.39 7.8 %
Total	109.7 ± 3.7	88.5 ± 0.20	84.07 ± 3.4	90.99 ± 4.1	96.35 ± 5

Datos promedios (n = 24), ± una desviación estándar; % de biomasa asignado a cada órgano con respecto de la biomasa total.

Las cinéticas correspondientes a los órganos fueron también de tipo sigmoïdal en todos los morfotipos florales, como se muestra en la Figura III. 3. No se muestran estas cinéticas de los morfotipos florales S3, S4 y S5 porque tuvieron la misma tendencia de distribución de biomasa entre órganos que el morfotipo floral S1.

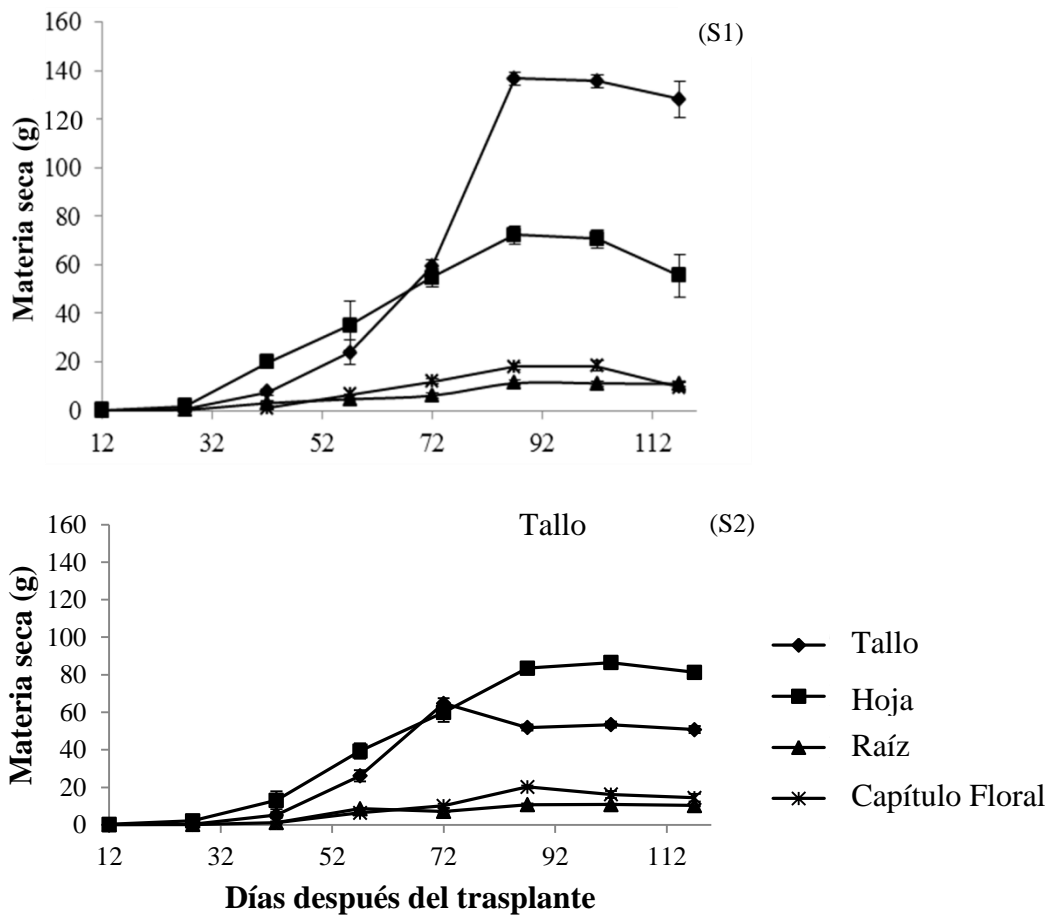


Figura III. 3. Cinéticas de distribución de biomasa entre órganos de morfotipos florales S1 y S2 de Caléndula. Los puntos representan promedios ($n = 3$) y las barras verticales indican \pm una desviación estándar.

La acumulación de biomasa, tanto la total como la de cada órganos vegetativo (tallo, hoja y raíz), se ajustaron a modelos logísticos de tipo empírico (Cuadros III. 3, III. 4 y III. 5), que según Carranza *et al.* (2008) sirven para describir el fenómeno de crecimiento de un cultivo en evaluación. Todos estos modelos tuvieron también buen ajuste estadístico con R^2 mínima de 0.98, por lo que son modelos confiables para simular el crecimiento de los respectivos morfotipos de caléndula, si éstos crecieran en las mismas condiciones que en el presente estudio. Además muestran que, según los modelos, los principales parámetros causantes de diferencias

morfológicas en acumulación de biomasa son a y b. Los valores de cada parámetro del modelo de predicción o simulación de cada órgano se muestran en los Cuadros III. 3, III. 4 y III. 5.

Cuadro III. 3. Valores a, b y c de las ecuaciones logísticas de la forma $y = a/(1+be^{-cx})$ para la predicción de acumulación de biomasa en tallo, en cada uno de cinco morfotipos florales de caléndula.

Morfotipo	a (g)	b	c (g g ⁻¹ d ⁻¹)	R ²
S1	1.369E+02	5.858E+04	1.520E-01	0.98
S2	5.223E+01	4.966E+03	1.493E-01	0.99
S3	7.524E+01	2.916E+04	1.590E-01	0.99
S4	9.585E+01	5.001E+03	1.293E-01	0.99
S5	1.051E+02	1.147E+04	1.331E-01	0.99

a = peso máximo o asintótico, b = factor de ajuste del modelo, e = logaritmo natural, c = tasa de crecimiento, x = a número de días después del trasplante, y R² = coeficiente de determinación o bondad de ajuste.

Cuadro III. 4. Valores a, b y c de la ecuación logística de la forma $y = a/(1+be^{-cx})$ para la predicción de acumulación de biomasa en raíz en cinco morfotipos florales de caléndula.

Morfotipo	a (g)	b	c (g g ⁻¹ d ⁻¹)	R ²
S1	1.188E+01	8.374E+01	6.910E-02	0.96
S2	1.064E+01	1.485E+05	2.346E-01	0.99
S3	1.776E+01	2.135E+04	1.354E-01	0.97
S4	7.152E+00	5.836E+04	2.338E-01	0.98
S5	1.860E+01	2.321E+06	1.940E-01	0.95

a = peso máximo o asintótico, b = factor de ajuste del modelo, e = logaritmo natural, c = tasa de crecimiento, x = a número de días después del trasplante, y R² = coeficiente de determinación o bondad de ajuste.

Cuadro III. 5. Valores a, b y c de la ecuación logística de la forma $y = a/(1+be^{-cx})$ para la predicción de acumulación de biomasa en hojas en cinco morfotipos florales de caléndula.

Morfotipo	a (g)	b	c (g g ⁻¹ d ⁻¹)	R ²
S1	6.634E+01	2.034E+02	9.835E-02	0.97
S2	8.565E+01	2.738E+02	9.345E-02	0.99
S3	6.221E+01	4.386E+02	1.061E-01	0.98
S4	6.305E+01	1.437E+02	8.917E-02	0.97
S5	6.242E+01	2.958E+02	1.061E-01	0.97

a = peso máximo o asintótico, b = factor de ajuste del modelo, e = logaritmo natural, c = tasa de crecimiento, x = a número de días después del trasplante, y R² = coeficiente de determinación o bondad de ajuste.

Para modelar el crecimiento de los órganos reproductores, que incluyen los estadios tempranos de los capítulos florales, se utilizó una función polinómica de tercer orden para todos los morfotipos florales, cuyos parámetros a, b, c y d se muestran en el Cuadro 6.

Cuadro III. 6. Valores a, b, c y d de la ecuación polinomial de tercer grado para la predicción de acumulación de biomasa en órganos reproductores de cinco morfotipos florales de caléndula.

Morfotipo	a	b	c	d	R ²
S1	3.01E+01	-1.85E+00	3052E-02	-1.78E-04	0.99
S2	1.35E+01	-1.03E+00	2.24E-02	-1.16E-04	0.91
S3	4.11E+00	-5.57E-01	1.51E-02	-8.57E-05	0.93
S4	-8.39E+00	2.39E-02	6.93E-03	-4.80E-05	0.99
S5	4.10E+01	-2.16E+00	3.59E-02	-1.70E-04	0.96

$Y = a + bx + cx^2 + dx^3$; a = constante; b, c, y d = coeficientes de los componentes lineal, cuadrático, y cúbico, respectivamente; x = a número de días después del trasplante, y R² = coeficiente de determinación o bondad de ajuste.

Índices de eficiencia del crecimiento vegetativo y reproductivo

Puesto que en los datos predichos por las funciones de simulación ya se había eliminado el error experimental (Aguilar *et al.*, 2006), a partir de ellos se calcularon los índices de eficiencia del crecimiento como TAC y TRC, tanto para los órganos vegetativos como para los capítulos florales u órganos reproductores.

La TAC (expresada en g de materia seca acumulada por día), para los órganos vegetativos alcanzó su valor máximo a los 72 ddt para los morfotipos S1, S3, S4 y S5, mientras que para el morfotipo S2 fue a los 57 ddt (Figura 4). En todos los morfotipos, el comportamiento de la TAC tuvo un cinética sinoidal simétrica (de tipo campana), excepto en S2, y la TAC máxima se alcanzó en la fase lineal o al final de la fase de aceleración.

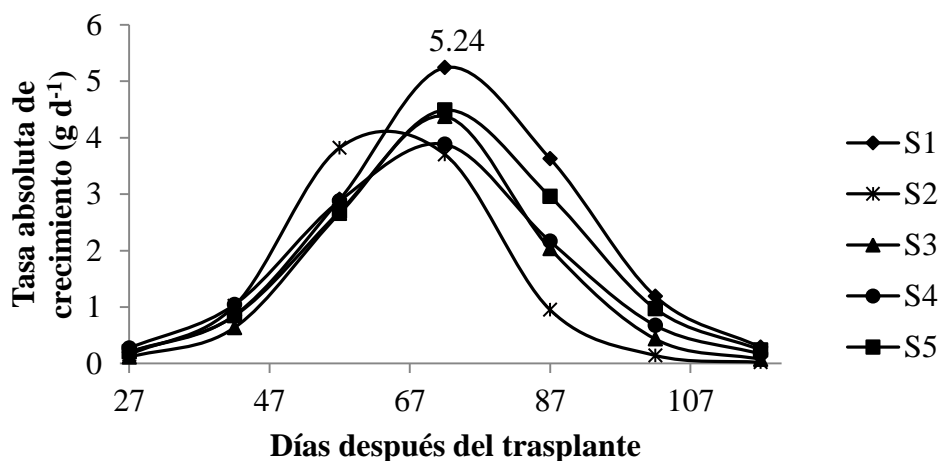


Figura III. 4. Tasa absoluta de crecimiento (TAC) de órganos vegetativos en cinco morfotipos florales de caléndula.

En los órganos reproductores la máxima TAC se presentó a los 57 ddt para los morfotipos S1, S2, S3 y S5, y para el morfotipo S4 fue a los 42 ddt. Es de destacar que las TAC de órganos reproductores fueron aproximadamente 10 veces menores que las TAC de órganos vegetativos, lo cual evidencia que la fuerza de demanda (FD) de órganos vegetativos es 10 veces más que la

FD de órganos reproductores. Esta gran diferencia explica el por qué caléndula asigna a capítulos apenas 10 % de la biomasa total. Entre los morfotipos destacan S1 y S2 por alcanzar los mayores valores de FD de órganos reproductores, que coincide con sus mayores rendimientos de capítulos (Figura III. 5).

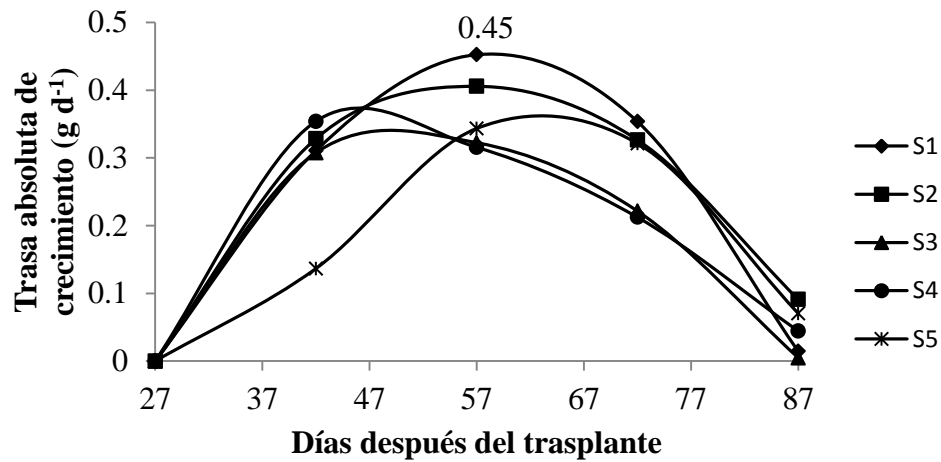


Figura III. 5. Tasa absoluta de crecimiento (TAC) de órganos reproductores de morfotipos florales de caléndula.

La drástica competencia entre órganos vegetativos y reproductores, que favorece ampliamente a los primeros, se ilustra en la Figura III. 6 para el morfotipo floral S1 que tuvo la mayor acumulación de biomasa total. Esto es congruente con las cinéticas de distribución de biomasa antes mencionadas, en donde se mostró que los órganos vegetativos constituyen 90.7 % de la biomasa total promedio en este morfotipo floral. Además, aquí se evidencia que los órganos reproductores y vegetativos están compitiendo como demandas simultáneas en caléndula, y que solamente al inicio del desarrollo reproductivo (40 ddt) la competencia es más equilibrada, cuando la TAC de los órganos vegetativos es el doble de la TAC de los reproductores. En los demás morfotipos se detectó la misma tendencia (datos no mostrados).

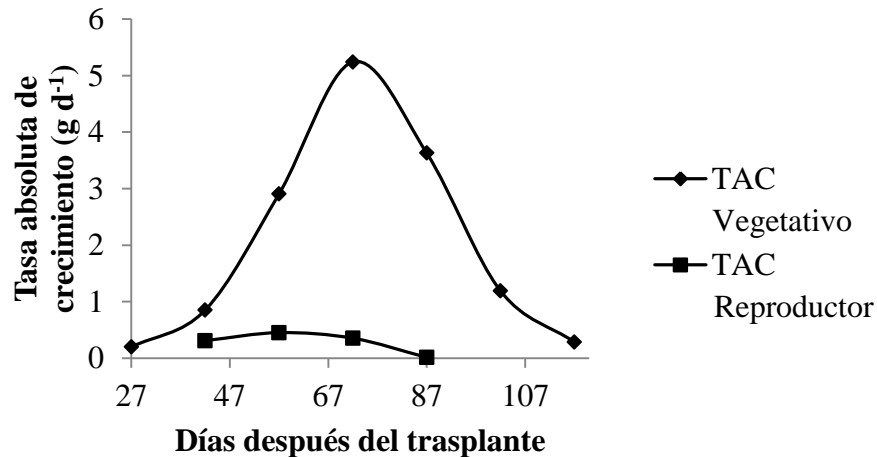


Figura III. 6. Comparación de la tasa absoluta de crecimiento (TAC) de órganos vegetativos y reproductores del morfotipo floral S1 de caléndula.

La TRC es un índice de eficiencia que expresa el crecimiento en términos de una tasa de incremento en tamaño por unidad de tiempo, y representa la eficiencia de la planta para producir de nuevo tejido, lo que depende de la fotosíntesis total y de la respiración (Carranza, 2009). Además, la TRC se considera como una medida que integra el comportamiento fisiológico de las plantas (Radford, 1967), y del balance entre la capacidad potencial de fotosíntesis y el costo respiratorio (Archila *et al.*, 1998). Desde el punto de vista de las relaciones entre los órganos que producen fotoasimilados y los que los consumen, la TRC representa la actividad de la demanda (Ho *et al.*, 1989); y desde el punto de vista del desarrollo vegetal, la TRC constituye un indicador de la actividad del meristemo apical del tallo (González *et al.*, 1986; Battey y Lyndon, 1990).

En caléndula se encontró que el morfotipo floral S2 es el que posee la mayor TRC tanto en órganos vegetativos como reproductores (0.13 y 0.11 g g⁻¹ d⁻¹, respectivamente), y por tanto es el de mayor actividad meristemática (Figura III. 7). En todos los morfotipos la TRC decrece con la edad de las planta, debido a la disminución de la capacidad de la planta de formar nuevos ápices meristemáticos, que luego se transformarán en tallos y capítulos; ello significa que la planta va reduciendo su capacidad de crecer con la edad. En todos los morfotipos la TRC o AD

de los órganos vegetativos de la planta decrece continuamente durante el ciclo biológico de caléndula, y las diferencias entre morfotipos son mayores al inicio del ciclo (hasta los 50 ddt). En este índice destacan los morfotipos S2 y S3 por mostrar los mayores valores entre los 27 a los 50 ddt.

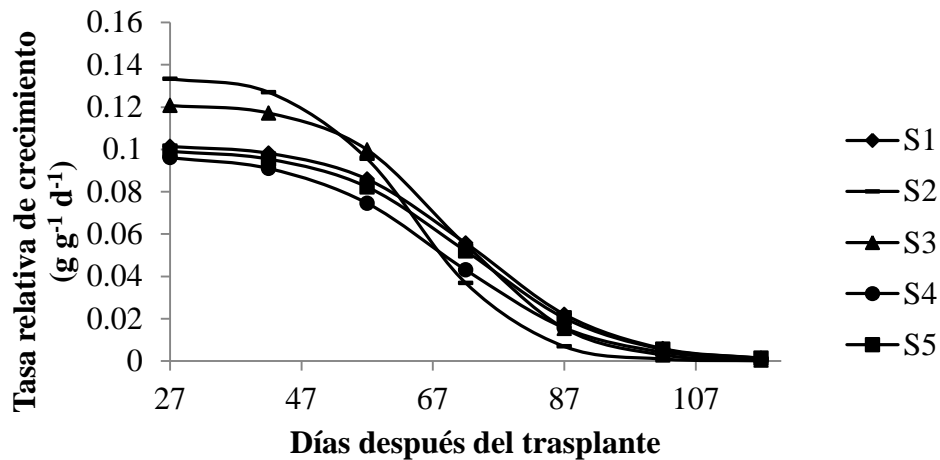


Figura III. 7. Tasa relativa de crecimiento (TRC) de órganos vegetativos en morfotipos florales de caléndula.

En los órganos reproductores de todos los morfotipos la AD también decrece conforme avanza el desarrollo (Figura III. 8), pero en este caso la mayoría los órganos reproductores de todos los morfotipos tienen una AD inicial similar a la de los órganos vegetativos en la misma edad (42 ddt), excepto el morfotipo S5 cuya AD en órganos reproductores es 30 % inferior a la de los demás a los 42 ddt. Esta diferencia entre morfotipos se asocia con el hecho de que S5 es el de menor rendimiento de capítulos.

Debido a que la TRC es una medida de la proporción y actividad del tejido meristemático, se esperaba que los morfotipos con mayor asignación de biomasa a capítulos florales fueran los que presentaran los valores más altos de TRC, lo cual no se cumple del todo para el morfotipo S1 que muestra valores de TRC superiores al morfotipo S3 pero muy similares al del morfotipo S2 (Figura III. 8), los cuales fueron los morfotipos que asignaron mayor

cantidad de biomasa al capítulo floral. Esto puede deberse a que el capítulo floral corresponde a una inflorescencia formada de flores liguladas y tubulares, y a que el capítulo floral del morfotipo S1 produzca una mayor cantidad de flores que los de los morfotipos S2 y S3, de manera que por tener un mayor número de meristemas florales dentro del capítulo tal vez equivalga a una actividad meristemática similar a la de los morfotipos florales S2 y S3.

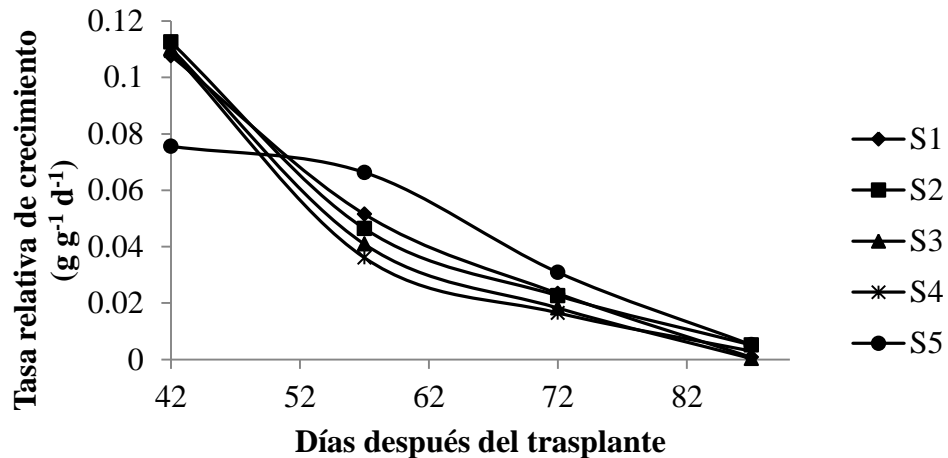


Figura III. 8. Tasa relativa de crecimiento (TRC) de órganos reproductores de morfotipos florales de caléndula.

En la comparación de las cinéticas de TRC de órganos vegetativos vs. los reproductores ocurrió lo contrario que con la TAC (Figura III. 9), ya que en este caso los órganos reproductores presentaron un valor mayor para la TRC máxima. Esto puede explicarse debido a que la TRC es un indicador de la proporción y actividad del tejido meristemático (González *et al.*, 1986), y corrobora la continua competencia que hay entre órganos vegetativos y reproductores en cuanto a demanda de asimilados para su crecimiento. Al inicio del ciclo esta competencia es equilibrada entre órganos vegetativos y reproductores pero solamente hasta los 42 ddt, porque después la competencia es ganada ampliamente por los órganos vegetativos que superan a los órganos reproductores hasta el final del ciclo.

Las diferencias en AD y en FD a favor de los órganos vegetativos, se atribuyen a que para producir un capítulo la caléndula debe producir primero un brote vegetativo que consta tallo y hojas. Como la caléndula es una planta compuesta (Muley, 2009), la mayor parte de la actividad meristemática se concentra en los capítulos florales ya que un solo capítulo floral forma más de 100 flores tubulares y liguladas individuales. Esto también evidencia el potencial de esta especie para producir nuevos brotes cuando se cortan los antes formados (cosechas sucesivas), que en condiciones ambientales favorables debería potenciar a la planta para hacer numerosos cortes en cada ciclo.

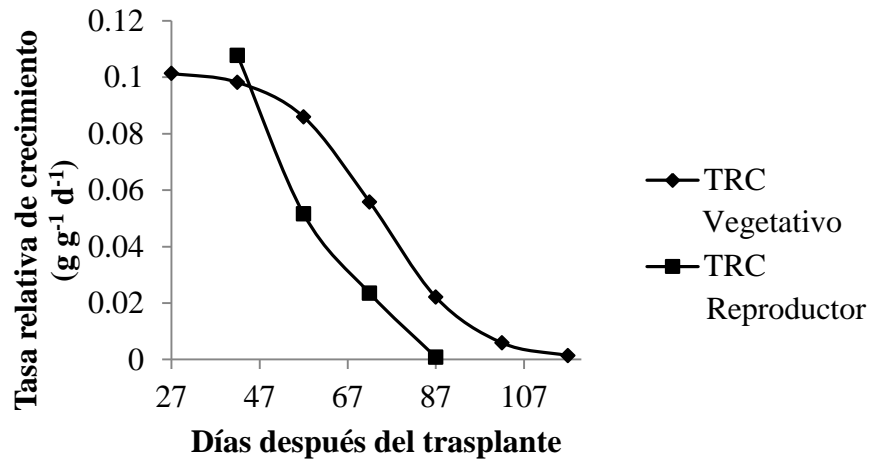


Figura III. 9. Comparación de la tasa relativa de crecimiento (TRC) de órganos vegetativos y reproductores.

CONCLUSIONES

Los cinco morfotipos florales presentan cinéticas de crecimiento tipo sigmoideal tanto en biomasa total como en los órganos que los componen, pero difieren en la duración de sus fases del crecimiento y en sus correspondientes tasas de crecimiento, sobre todo en las fases de aceleración y de desaceleración, y ello conduce a variación en la cantidad de biomasa total acumulada. La fuerza de demanda por fotoasimilados es 10 veces mayor en los órganos vegetativos que en los reproductores. Todos los morfotipos florales dirigen mayor proporción de

biomasa a los tallos, con excepción del morfotipo floral S2 que asigna más biomasa a las hojas. Una larga fase de desaceleración acoplada con mayor duración de crecimiento del área foliar permitieron al morfotipo floral S1 alcanzar un crecimiento superior al de los demás morfotipos.

LITERATURA CITADA

- Aguilar León, M. G., J. A. Carrillo Salazar, A. Rivera Peña, y González Hernández V. A. 2006. Análisis de crecimiento y de relaciones fuente–demanda en dos variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.). Revista Fitotecnia Mexicana 29 (2): 145-156.
- Archila, J., U., Contreras, H., Pinzon, H., Laverde y G., Corchuelo. 1998. Analisis de crecimiento de cuatro materiales de lechuga (*Lactuca sativa*). Agronomía Colombiana 16 (1): 68-75.
- Azofeifa, A. M., A. Moreira. 2004. Análisis de crecimiento del chile jalapeño (*Capsicum annuum* l. cv. Hot), en Alajuela, Costa Rica. Agronomía Costarricense 28(1): 57-67.
- Babbayan M. N. and M. J. Crout. 1999. A stochastic modeling approach for real-time forecasting of winter wheat yield. Field Crops Research 62: 85-95.
- Batthey N. H. and R. F. Lyndon. 1990. Reversion of flowering. Botanical Review 56: 162-189.
- Carranza C., O. Lancho, D. Miranda, M. R. Salazar, y B. Chaves. 2008. Modelo simple de simulación de distribución de masa seca en brócoli (*Brassica sp.*) variedad Coronado y repollo (*Brassica oleracea*) híbrido Delus cultivados en la Sabana de Bogotá. Agronomía Colombiana 26 (1): 23-31.
- Carranza C., O. Lancho, D. Miranda, M. R. Salazar, y B. Chaves. 2009. Análisis del crecimiento de lechuga (*Lactuca sativa* L.) ‘Batavia’ cultivada en un suelo salino de la Sabana de Bogotá. Agronomía Colombiana 27(1): 41-48.
- Clifford Evans G. 1972. The Quantitative Analysis of Plant Growth. Vol. 1. Blackwell Scientific Publications. E. E. U. A. 737 p.
- Palma Tenango M., González Hernández V., A. y Soto Hernández R. M. 2013. Variación Genética y Ambiental en el Contenido de Flavonoides en Capítulos de Caléndula. In: Avances de Investigación 2012. Cruz-Izquierdo S., Ayala-Garay O. J., Cruz-Huerta N., Ramírez-Ramírez I., Martínez-Villegas E. (eds.). Postgrado en Recursos Genéticos y

- Productividad–Genética. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 93 p.
- González H. V. A., M. Livera, L. Mendoza O., O. Barrera. 1986. Crecimiento y desarrollo de sorgos contrastantes en vigor y precocidad. *Revista Fitotecnia Mexicana* 8: 95-110.
- Goudrian J. and H. H. Van Laar. 1994. Current sigues in production ecology. Modelling potential growth processes. Text book with exercises. Kluwer Academic Publishers, Londres.
- Hunt R. 1978. *Plant Growth Analysis*. Studies in Biology No. 96. Edward Arnold. The Camelot Press Ltd. Southampton, UK. 167 p.
- Jarma A. T. y H. Araméndiz-Tatis. 2006. Fisiología de estevia (*Stevia rebaudiana*) en función de la radiación en el Caribe colombiano. II. Análisis de crecimiento. *Agronomía Colombiana* 24(1): 38-47.
- Lentz W. 1998. Model applications in horticulture. A review. *Scientia Horticulturae* 74: 151-174.
- Palma Tenango Mariana. Cinética del crecimiento, desarrollo floral y acumulación de flavonoides en Caléndula. Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias. 2009. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.
- Penning de Vries F. W., D. M. Jansen, H. F. M. Berger, & A. Bakema. 1989. Simulation of Ecophysiological Processes of Growth in Several Annual Crops. Pudoc, Wageningen. 271 p.
- Radford P. J. 1967. Growth analysis formulae. Their use and abuse. *Crop Science* 7: 171-175.
- Salisbury F. B. y Ross C. W. 1994. *Fisiología Vegetal*. Editorial Iberoamericana. México. 757-759 pp.
- Sharkey T. D., C. J. Bernacchi, G. D. Farquhar, E. L. Singsaas. 2007. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves. *Plant, Cell and Environment* 30:1035-1040.

Taiz L. y E. Zieger. 2002. Plant Physiology. Third edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 690 p.

**CHAPTER IV. PHOTOSYNTHETIC KINETICS IN RESPONSE TO CO₂ (A/Ci) IN
FLORAL MORPHOTYPES OF POT MARIGOLD (*Calendula officinalis* L.)**

Luis F. Salomé-Abarca¹, Víctor A. González-Hernández¹, Nicacio Cruz-Huerta¹, R. Marcos
Soto-Hernández¹ e Iván Ramírez-Ramírez¹

¹Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética, Colegio de Postgraduados, Km.
36.5 Carr. México-Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, México.

ABSTRACT

By increasing the concentration of CO₂ also increases the net assimilation rate to the level of saturation, with its own kinetics for each species. The Knowledge of the kinetics to determine important parameters of the photosynthetic mechanism, such as the CO₂ compensation point (*CP*), the saturation point for CO₂ (*P_{sat}*), the efficiency of Rubisco (*RE*) and maximum photosynthesis (*A_{max}*). These parameters also allow us to classify plants according to their photosynthetic mechanisms, either C₃ or C₄. Since photosynthetic parameters of pot marigold (*Calendula officinalis* L.) are unknown, the aim of the study was to measure and compare six floral morphotypes of pot marigold through their photosynthetic kinetics and determine their photosynthetic parameters such as *A_{max}*, *CP* and *P_{sat}* for CO₂, and *RE* using portable measuring apparatus photosynthesis. There are differences in photosynthetic parameters between floral morphotypes. The morphotype with higher efficient use of CO₂ based on the *P_{sat}* was morphotype S1. The morphotype with greater photosynthetic potential based on *A_{max}* was the morphotype S2.

Keywords: Photosynthetic limiting, compensation point (*CP*), saturation point (*P_{sat}*).

CAPÍTULO IV. CINÉTICAS FOTOSINTÉTICAS EN RESPUESTA AL CO₂ (A/Ci) EN MORFOTIPOS FLORALES DE CALÉNDULA (*Calendula officinalis* L.)

Luis F. Salomé-Abarca¹, Víctor A. González-Hernández¹, Nicacio Cruz-Huerta¹, R. Marcos Soto-Hernández¹ e Iván Ramírez-Ramírez¹

¹Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética, Colegio de Postgraduados, Km. 36.5 Carr. México-Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, México.

RESUMEN

Al aumentar la concentración de CO₂ también aumenta la tasa de asimilación neta hasta alcanzar el nivel de saturación, con una cinética propia para cada especie. El conocimiento de dicha cinética permite determinar parámetros importantes del mecanismo fotosintético, como: el punto de compensación por CO₂ (*PC*), el punto de saturación por CO₂ (*Psat*), la eficiencia de RuBisCO (*ER*) y la fotosíntesis máxima (*A_{max}*). Estos parámetros también permiten clasificar a las plantas en función de sus mecanismos fotosintéticos, ya sean C3 o C4. Dado que se desconocen los parámetros fotosintéticos de caléndula (*Calendula officinalis* L.), el objetivo del estudio fue medir y comparar seis morfotipos de caléndula a través de sus cinéticas fotosintéticas, y determinar sus parámetros fotosintéticos como: *A_{max}*, *PC* y *Psat* por CO₂, y *ER* con ayuda de un aparato portátil de medición de fotosíntesis. Existen diferencias en cuanto a parámetros fotosintéticos entre morfotipos florales. El morfotipo de mayor eficiencia en uso de CO₂ basado en el *Psat* fue el morfotipo S1. El morfotipo con mayor potencial fotosintético basado en *A_{max}* fue el morfotipo S2.

Palabras clave: Limitante fotosintética, punto de compensación (*PC*), punto de saturación (*Psat*)

INTRODUCCIÓN

Las plantas llevan a cabo el intercambio de gases a través de los estomas, cuya conductancia a gases se controla por cambios en la turgencia de las células oclusivas, cambios que responden a diversos factores ambientales entre los que destacan luz, humedad y concentración de bióxido de carbono (CO_2). Las hojas son los órganos especializados para interceptar la luz necesaria para la fotosíntesis, la cual es capturada y transformada a energía química en los cloroplastos del mesófilo, tejido de la hoja que está cerca de la atmósfera y del tejido vascular que transporta el agua, azúcar y otros metabolitos (Taiz y Zeiger, 2006).

Una vez dentro de la hoja, el CO_2 se difunde de los espacios intercelulares a los sitios de carboxilación en el cloroplasto. Las técnicas convencionales de intercambio de gases miden los flujos de agua y CO_2 dentro y fuera de la hoja. Al considerar los flujos, es conveniente utilizar conductancias porque éstas varían en proporción al flujo (Romero, 2012).

Al aumentar la concentración de CO_2 en los espacios intercelulares de la hoja (C_i) también aumenta la tasa de asimilación neta hasta alcanzar el nivel de saturación, con una cinética propia para cada especie. El conocimiento de dicha cinética permite determinar parámetros importantes del mecanismo fotosintético, como: el punto de compensación por CO_2 , que corresponde al valor de C_i en el que la absorción y liberación CO_2 son iguales y la tasa de asimilación neta (A) es cero; el punto de saturación por CO_2 (PS), en la que A alcanza su máximo valor; y la eficiencia de carboxilación por la enzima RuBisCO, o tasa de captura enzimática del CO_2 . Estos parámetros también permiten clasificar a las plantas en función de sus mecanismos fotosintéticos, ya sean C_3 o C_4 (Demmig-Adams *et al.*, 2004).

Las cinéticas fotosintéticas en función de la concentración de CO_2 (A/C_i) pueden además proporcionar valores numéricos de otros importantes parámetros fotosintéticos, como: tasa

máxima de carboxilación (V_{cmax}) permitida por la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO), tasa de transporte fotosintético de electrones (J) basada en el requisito de NADPH, uso de triosas fosfato (TPU), tasa de respiración (Rd), y conductancia del mesófilo (gm). El método requiere al menos cinco pares de valores de asimilación neta de CO_2 (A) y Ci , y que los usuarios indiquen al presunto factor limitante (Sharkey *et al.*, 2007).

En caléndula (*Calendula officinalis* L.) se desconocen sus parámetros fotosintéticos, por lo que el objetivo de este estudio fue medir y comparar las cinéticas fotosintéticas A/Ci en seis morfotipos de caléndula, y en cada una de ellas determinar sus parámetros fotosintéticos: tasa de fotosíntesis máxima (A_{max}), puntos de compensación (PC) y de saturación por CO_2 , y eficiencia de RuBisCO, velocidad máxima de carboxilación (V_{max}), tasa de transporte de electrones (J), capacidad de uso de triosas fosfatos (TPU), y conductancia del mesófilo (gm).

MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal consistió de seis morfotipos florales de caléndula denominados S1 al S6, derivados por Palma (2009) de una variedad heterogénea que se siembra comercialmente en los Valles Centrales de México.

Las cinéticas fotosintéticas A/Ci de los seis morfotipos de caléndula, se hicieron mediante monitoreo de la tasa de fotosíntesis (A), CO_2 atmosférico (Co) e intercelular (Ci), en cuatro hojas recientemente maduras (cuatro repeticiones), provenientes de cuatro plantas diferentes. Tales mediciones se hicieron con un sistema portátil de fotosíntesis provisto con un analizador de gases en el espectro infrarrojo LI-6400® (LICOR Inc.; Lincoln, NE, USA), equipado con un dispositivo que permite dosificar las concentraciones de CO_2 recibidas por la hoja dentro de la cámara de asimilación.

El sistema se programó para variar las concentraciones de C_o desde cero hasta 1600 y 2000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, para hacer mediciones en cada una de las siguientes concentraciones de C_o : 400, 300, 200, 100, 0, 400, 600, 800, 1200 y 1600 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, en este orden. Tales evaluaciones se efectuaron entre las 10:00 h y las 15:00 h. Cabe mencionar que las mediciones se realizaron bajo condiciones ambientales óptimas respecto a temperatura, humedad relativa y con luz natural.

Las cinéticas fotosintéticas A/C_i se graficaron con respecto a los promedios de A en cada C_i correspondiente a cada C_o . Con los gráficos finales de las cinéticas ajustados mediante modelos de regresión (Microsoft Excel, 2010), se estimaron los siguientes parámetros fotosintéticos: Punto de compensación (PC), que corresponde a la concentración de C_i en la que la fotosíntesis es igual a la respiración, de modo que la fotosíntesis neta es igual a cero ($A = 0$); Punto de saturación ($Psat$) que corresponde a la concentración de C_i en la cual se alcanza la A_{max} y A se vuelve asintótica; y Eficiencia de Rubisco (ER), que corresponde a la pendiente generada de la primera recta en la cinética fotosintética, que se calculó con una regresión lineal entre A y C_i . Como los valores de estos parámetros cinéticos se derivaron de datos predichos con los modelos de mejor ajuste en cada cinética, sus medidas de dispersión.

Con las cinéticas ajustadas o predichas, también se calcularon los parámetros fotosintéticos propuestos por Sharkey *et al.* (2007): Velocidad máxima de carboxilación (V_{cmax}), Tasa de regeneración de ribulosa bifosfato (J); y Capacidad de uso de triosas fosfatadas (TPU), con las ecuaciones y el programa de cálculo desarrollados por estos mismos autores disponibles en internet (<http://www.blackwellpublishing.com/plantsci/pcecalculation/>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los seis morfotipos presentaron el mismo tipo de cinética A/C_i en la que el valor de A_{max} se vuelve asintótico aunque siga aumentando C_i , con excepción del morfotipo S1 que mostró una caída o inhibición fotosintética después del punto de saturación (P_{sat}) al final de la cinética. También se observaron pequeñas diferencias entre morfotipos en cuanto a la concentración de C_i en los puntos de compensación y de saturación por este gas. La comparación visual de estas cinéticas ofrece una vista rápida de las diferencias entre morfotipos florales en cuanto a su potencial fotosintético basado en el A_{max} , ya que este parámetro representa la máxima A que puede producir una planta, y corresponde a la tasa máxima alcanzada en la cinética A/C_i . A simple vista se pueden apreciar tres grupos de cinéticas, con base en estos valores; el primero formado por el morfotipo S1 con el potencial fotosintético más bajo, después el segundo grupo conformado por los morfotipos S3, S4, S5 y S6 con valores medios de A_{max} , y finalmente el tercero conformado por el morfotipo floral S2 con el mayor potencial fotosintético (Figura IV. 1).

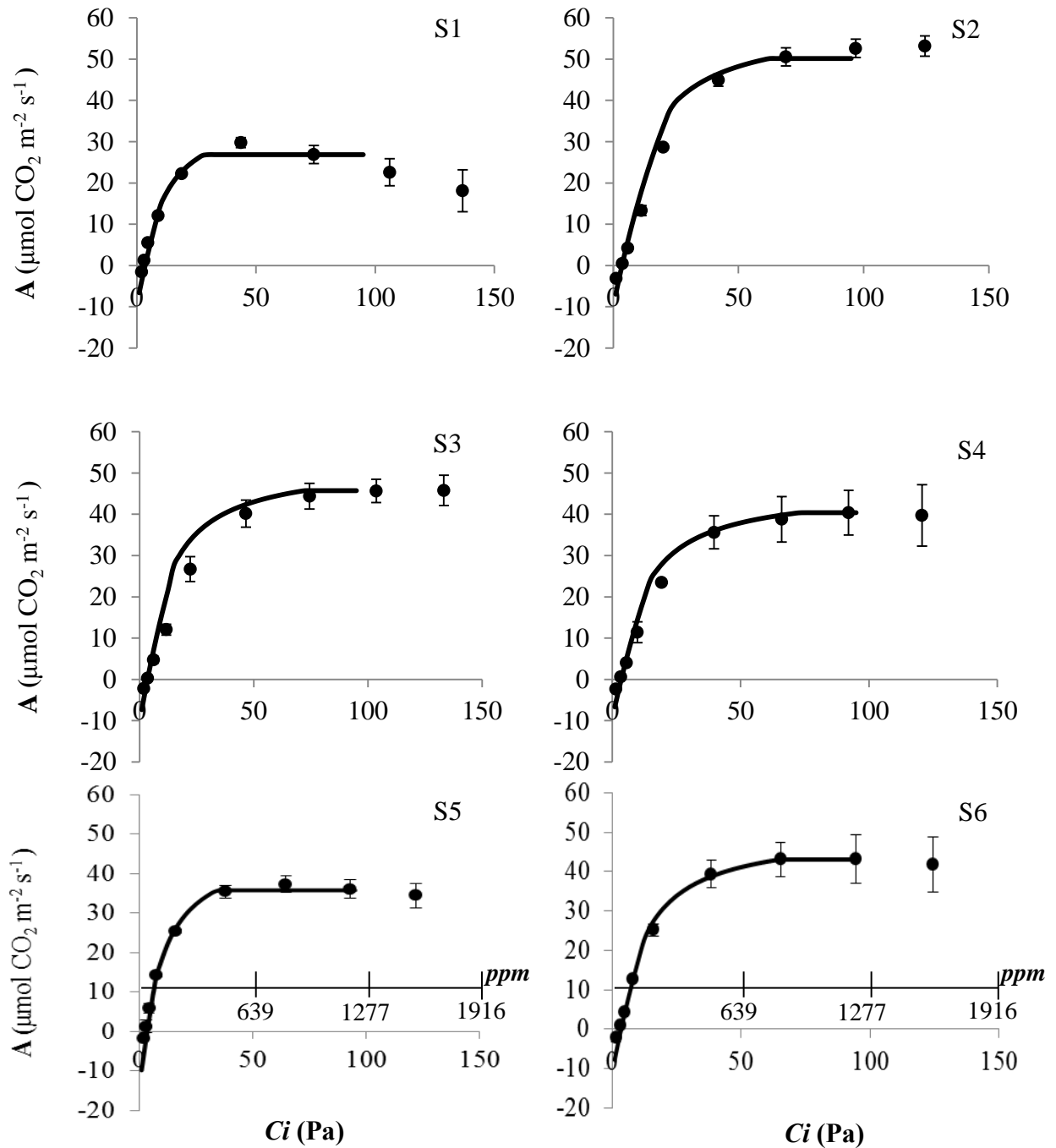


Figura IV. 1. Cinéticas fotosintéticas A/C_i en seis morfotipos florales de caléndula (S1 a S6). Las líneas verticales en cada punto corresponden a la desviación estándar ($n = 4$).

Como se mencionó anteriormente, que si bien sus cinéticas fueron similares en forma, los morfotipos florales contrastaron en sus parámetros fotosintéticos (Cuadro IV. 1), lo que evidencia diversidad genética en estas características. Por ejemplo, en la capacidad para capturar

el CO₂ en bajas concentraciones, medida con el punto de compensación (*PC*) que se define como la concentración de CO₂ en la que la fotosíntesis es igual a la respiración (*i.e.*, $A = 0$), el morfotipo S1 destacó por tener el valor más bajo (2.4 Pa = 31 ppm) en comparación con S2 que tuvo el mayor (3.3 Pa = 42 ppm), parámetros que señalan al morfotipo S1 como el más eficiente en el aprovechamiento de CO₂. Para el caso del punto de saturación por CO₂ (*Psat*), definido como la concentración de CO₂ a la cual *A* adquiere su máximo valor y se mantiene constante, los valores variaron entre 30 (383 ppm) y 75 Pa (958 ppm), donde el morfotipo S4 es el que presentó el valor mayor y por tanto resultó el morfotipo que posee la mayor capacidad de utilizar una mayor cantidad de CO₂, aunque no alcanzó el máximo valor de A_{max} alcanzado por el morfotipo floral S2 con 50.1 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Cuadro IV. 1. Puntos de compensación (*PC*) y saturación (*Psat*) por CO₂, tasa máxima de fotosíntesis (A_{max}) y eficiencia de rubisco (*ER*) en seis morfotipos florales de caléndula.

Morfotipo	<i>PC</i>	<i>Psat</i>	A_{max}	<i>ER</i>
floral	por CO ₂ (Pa)	por CO ₂ (Pa)	($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
S1	2.4	30	26.9	1.9
S2	3.3	62	50.1	2.0
S3	3.2	65	45.0	2.4
S4	2.9	75	40.4	2.0
S5	2.6	35	37.8	3.5
S6	2.8	65	43.0	2.2

En la capacidad para capturar CO₂ en altas concentraciones (*Psat*) y en la tasa máxima de fotosíntesis (A_{max}), el morfotipo S1 presentó los valores más bajos con 30 Pa (383 ppm) y 26.9 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ respectivamente (Cuadro 1), mientras que el mayor *Psat* lo obtuvo S4 (75 Pa =

958 ppm), y la mayor A_{max} fue para S2 ($50.1 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). La variación en ER también fue amplia, con un máximo de 3.5 unidades para S5 y un mínimo de 1.9 para S1. Esta diversidad genética ofrece la posibilidad de identificar genes fotosintéticos sobresalientes.

Puesto que la concentración ambiental promedio de CO_2 es de 400 ppm (5122 Pa), los resultados indican que cuatro de los seis genotipos de caléndula (S2, S3, S4 y S6) poseen la capacidad de reducir los gases con efecto invernadero en la atmósfera, sobre todo el morfotipo S4 cuyo P_{sat} fue de 75 Pa (985 ppm). Solamente los morfotipos S1 y S5 no tuvieron tal capacidad, pues sus P_{sat} fueron iguales o menores de 35 Pa (440 ppm).

Los morfotipos del S2 al S6 mostraron altos valores de A_{max} , con respecto del valor presentado por el morfotipo S1, los cuales estuvieron entre 37.8 y $50.1 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; estos valores altos de A_{max} se encuentran soportados por sus altos valores de $V_{c_{max}}$ y J . En especies invasivas de *Rubus* se encontraron valores de A_{max} de $14.9 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Mcdowell, 2002), que comparados con el encontrado para el morfotipo S1 el cual fue de $26.9 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, se observa que S1 casi duplica al potencial fotosintético de estas especies de *Rubus*, lo cual denota el alto potencial fotosintético de caléndula.

En los parámetros fotosintéticos calculados con el método de Sharkey *et al.* (2007) también se advierte amplia variabilidad entre morfotipos, atribuible a diversidad genética en enzimas de este importante proceso primario. Algunos morfotipos destacan por su alta velocidad de carboxilación ($V_{c_{max}}$), como S6 ($240.3 \pm 13.3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); otros destacaron por sus altas tasas de regeneración de ribulosas fosfatadas (J) como los morfotipos S2 y S6, y de uso de triosas fosfatadas (TPU), como S2; y el morfotipo S3 destacó por la reducida conductancia del mesófilo a la difusión del CO_2 (Cuadro 2). Es decir, al igual que con los primeros parámetros, en éstos se confirma que no hubo un genotipo que fuera sobresaliente en todos los parámetros. Por otro lado,

estos parámetros permiten identificar cuál o cuáles son las limitantes del proceso fotosintético en cada morfotipo, o incluso si los morfotipos florales comparten las mismas limitantes fotosintéticas.

Para el morfotipo floral S1 las limitantes fotosintéticas fueron todos sus parámetros (Cuadro IV. 2), ya que este morfotipo floral mostró la $V_{C_{max}}$ más baja, es decir, la menor capacidad de carboxilación de CO_2 ; y también el valor más bajo de TPU , lo que indica que bajo las condiciones ambientales de la presente evaluación la regeneración de RUBP y la misma fotosíntesis no responden de forma positiva al aumento de la concentración interna de CO_2 (Sharkey *et al.*, 2007). La limitante por TPU implica un reducido uso de triosas fosfatadas el que tampoco mejoró con el aumento de la concentración de CO_2 ; así como una de las más altas resistencias a la difusión del CO_2 en el mesófilo (g_m), lo que en conjunto se reflejó en la menor A_{max} entre todos los morfotipos, como se ilustra Figura 1. De acuerdo con Sharkey y Vasey (1989), la sensibilidad al CO_2 también puede deberse a que durante limitación por TPU , los altos niveles de ácido fosfoglicérico (PGA) pueden suprimir la síntesis de almidón mediante la inhibición de fosfoglucoisomerasa.

En los morfotipos S2 y S4 la principal limitante fotosintética fue la $V_{C_{max}}$ (Cuadro IV. 2), cuyos valores fueron intermedios. Es de destacar que en los morfotipos del S3 al S6 sus valores de $V_{C_{max}}$ y de J son cercanos y en algunos casos iguales, lo cual significa que la regeneración de ribulosa-1,5-bifosfato (RuBP) y la capacidad de carboxilación de la enzima RuBisCO (Figura IV. 2) tienden a estar en equilibrio. Por otra parte, a pesar de las diferencias en los valores absolutos de estos parámetros fotosintéticos, la proporción de triosas fosfatos exportadas fuera del cloroplasto (TPU) en comparación con las destinadas a la regeneración de RuBP, fueron una constante (7 %) en todos los morfotipos.

En el morfotipo S2 el valor de $V_{c_{max}}$ resultó muy inferior al de J que fue el más alto entre todos los morfotipos florales ($279.5 \pm 14.4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), lo cual haría suponer que S2 posee enzimas de mayor eficiencia para la regeneración de RuBP y alta capacidad del uso de las triosas fosfatos producidas durante este proceso, y por tanto entre los morfotipos sería el más eficiente en cuanto a su complejo enzimático y al aprovechamiento del CO_2 fijado. Es de suponer que si estas reacciones fotosintéticas son reguladas por enzimas y sus respectivos genes, entonces mediante mejoramiento genético se podría obtener una variedad fotosintéticamente superior.

Cuadro IV. 2. Parámetros fotosintéticos de Sharkey *et al.* (2007) de seis morfotipos florales de caléndula.

	$V_{c_{max}}$	J	TPU	gm^*
25 °C	($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$)
S1	127 ± 12.5	123.3 ± 4.6	7.6 ± 0.6	24.6 ± 0
S2	172.8 ± 7.5	279.5 ± 14.4	19.9 ± 0.9	12.6 ± 7.3
S3	204.5 ± 10.7	237 ± 14.3	17.4 ± 1.1	5.2 ± 1.5
S4	155.8 ± 12.5	211 ± 28.8	15.5 ± 2.1	24.6 ± 7.3
S5	215.8 ± 30.9	218 ± 6.9	14.8 ± 0.8	24.9 ± 9.3
S6	240.3 ± 13.3	248.3 ± 15.6	16.3 ± 2.3	19.9 ± 8.3

\pm Desviación estándar (n = 4).

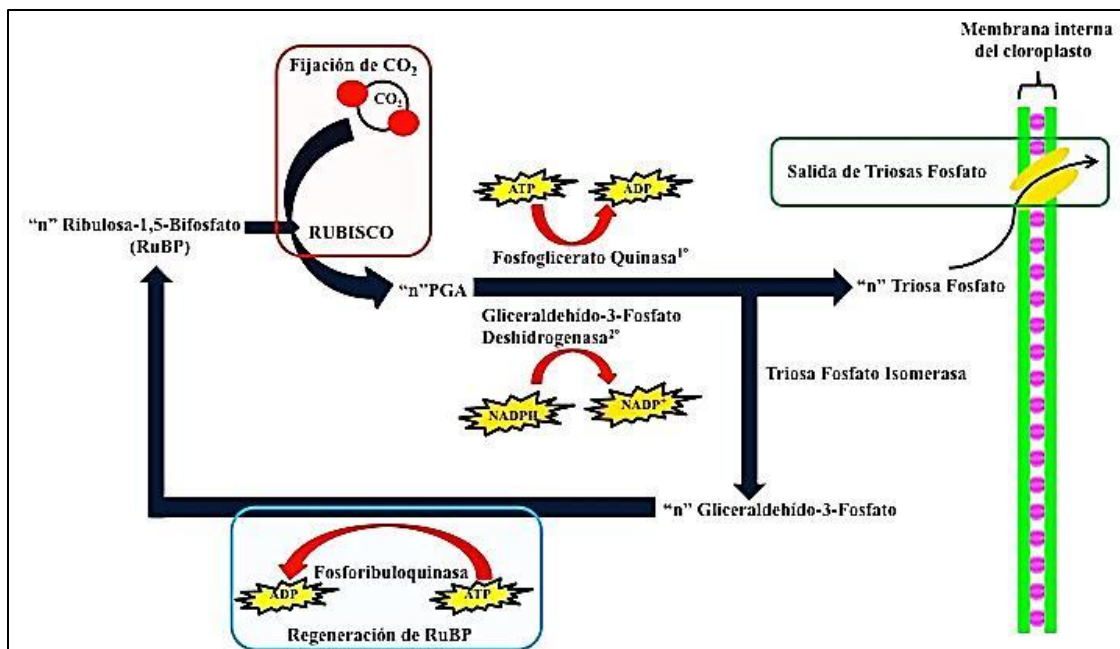


Figura IV. 2. Esquema de las principales reacciones bioquímicas de la fotosíntesis, donde se ilustran las fases que según Sharkey *et al.* (2007) limitan al proceso: carboxilación (V_{cmax}), regeneración de RuBP (J) y exportación de triosas fosfatadas (TPU).

Los valores extremos de V_{cmax} fluctuaron entre 127 ± 12.5 y $240.25 \pm 13.3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, dados por los morfotipos S1 y S6 respectivamente, y el promedio de los morfotipos fue de $186 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Cuadro IV. 2). El valor obtenido de V_{cmax} por el morfotipo S6 se encuentra por encima del máximo valor obtenido en *Beta vulgaris* que fue de $194 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Rao y Terry, 1989), especie que resultó la de mayor V_{cmax} en el estudio comparativo realizado por Wullschleger (1993). El promedio de V_{cmax} en caléndula ($186 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) es más del doble del promedio en plantas C3 herbáceas anuales, que es de $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ según Wullschleger (1993).

Para el parámetro J el valor máximo fue presentado por el morfotipo S2 ($279.14 \pm 14.4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y el mínimo por el morfotipo S1 ($123.3 \pm 4.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), y el promedio de los morfotipos fue de $219.21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Cuadro IV. 2). El valor de J más bajo reportado para *Picea abies* es de $17 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Benner *et al.*, 1988) y el más alto de $372 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para la planta anual desértica *Malvastrum rotundifolium* (Forseth y Ehleringer, 1983). El valor promedio

de J para caléndula fue de $219.51 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se encuentra por encima del valor promedio para plantas herbáceas anuales, el cual es de $154 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

La caléndula es una planta de la familia Asteraceae, al igual que el girasol (*Helianthus annuus*) que presenta un valor de $V_{c_{max}}$ de 29 ± 1 y un valor de $133 \pm 14 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para J (Siebke *et al.*, 1990). Estos valores de girasol se encuentran por debajo por lo presentados por caléndula, cuyo morfotipo floral S6 puede presentar valores de hasta 240 ± 13.3 para $V_{c_{max}}$ y valores de J hasta de 279.5 ± 14.4 en el morfotipo S2.

En cuanto al valor de TPU el máximo fue de $19.9 \pm 0.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ presentado por el morfotipo S2, y el valor mínimo para este parámetro fue de $7.6 \pm 0.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Cuadro IV. 2). El valor máximo de TPU en el morfotipo floral S2 es similar al presentado por *Xanthium strumarium* que es de $20.1 \pm 0.76 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Sharkey *et al.*, 1985), y el valor mínimo de este parámetro en caléndula fue incluso mayor que el valor de *Populus temuloides* que es de $4.7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Sharkey *et al.*, 1991); estas dos especies también resultaron ser las especies con mayor y menor valor para este parámetro en el estudio comparativo realizado por Wullschleger (1993).

CONCLUSIONES

Existen diferencias entre los seis morfotipos florales de caléndula en cuanto a parámetros fotosintéticos. El morfotipo de mayor eficiencia en uso de CO_2 basado en el punto de saturación es el morfotipo S1, pero el morfotipo con mayor potencial fotosintético basado en la tasa máxima de fotosíntesis (A_{max}) es el S2, lo cual sugiere que cuenta con un conjunto enzimático más eficiente. La máxima velocidad de carboxilación ($V_{c_{max}}$) es la principal limitante fotosintética para los seis morfotipos (S1, S2, S3, S4, S5 y S6), y en el morfotipo S1 también son limitantes la regeneración de RUBP y la exportación de triosas fosforiladas.

LITERATURA CITADA

- Antlfinger Ann E. y Wende Linda F. 1997. Reproductive effort and floral photosynthesis in *spiranthes cernua* (Orchidaceae). American Journal of Botany 84(6): 769–780.
- Assmann S. M. and K. Shimazaki. 1999. The multisensory guard cell. Stomatal responses to blue light and abscisic acid. Plant Physiology 119:809-816.
- Benner P., P. Sabel, and A. Wild. 1988. Photosynthesis and transpiration of healthy and diseased spruce trees in the course of three vegetation periods. Trees 2: 223-32.
- Damián Nava A., I. Ramírez Ramírez, C. B. Peña Valdivia, G. Díaz Villaseñor, V. A. González Hernández. 2009. Características del intercambio de gases en hojas de guayabo (*Psidium guajava* L.) Revista Chapingo. Serie horticultura 15(2): 119-126
- Davis J. E. 1987. Rapid field measurement of the assimilation rate versus internal CO₂ concentration relationship in green ash (*Fraxinus pennsylvanica* Marsh.): the influence of light intensity. 'Tree Physiology 3, 387-392 . Heron Publishing-Victoria, Canada.
- Forseth IN., and JR. Ehleringer. 1983. Ecophysiology of two solar tracking desert winter annuals. III. Gas exchange responses to light, CO₂ and VPD in relation to long-term drought. Oecologia 51: 344-51.
- Gröen J. 1973. Photosynthesis of *Calendula officinalis* L. and *Impatiens parviflora* DC. Influenced by light intensity during growth and age of the leaves and plants. Mededelingen Landbounw Whoge School. Wageningen-Nederland. 73-8.
- Long S. P., y Bernacchi C. J. 2003. Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. Journal of Experimental Botany 54: 2393-2401.
- Raffo, M. D., and N. Iglesias. 2004. Efecto de la intercepción y distribución de la radiación fotosintéticamente activa en manzanos cv. Fuji, bajo cuatro sistemas de conducción en alta densidad. Revista de Investigaciones Agropecuarias 33:29-42.
- Rao IM., and N. Terry. 1989. Leaf phosphate status, photosynthesis, and carbon partitioning in sugar beet. I. Changes in growth, gas exchange, and Calvin cycle enzymes. Plant Physiology 90: 814-19.

- Rintama, E. 2004. Plant Response to Stress: Modifications of the Photosynthetic Apparatus. University of Turku, Turku, Finland. Cap. 315. Encyclopedia of Plant and Crop Science. 993p.
- Romero Félix Celia Selene. Cinéticas fotosintéticas del frijol (*Phaseolus vulgaris*) sometido a déficit hídrico. Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, 2012, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.
- Sharkey T. D. 1985. O₂-insensitive photosynthesis in C3 plants. *Plant Physiology* 78: 71-5.
- Sharkey T. D., and T. L. Vasey. 1989. Low oxygen inhibition of photosynthesis is caused by inhibition of starch synthesis. *Plant Physiology* 90: 385-387.
- Sharkey T. D., F. Loreto, and CF. Delwiche. 1991. High carbon dioxide and sun/shade effects on isoprene emission from oak and aspen tree leaves. *Plant, Cell and Environment* 14: 333-8.
- Sharkey T D., C. J. Bernacchi, G. D. Farquhar, and E. L. Singsaas. 2007. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves. *Plant, Cell and Environment* 30:1035-1040.
- Siebke K., A. Laisk, V. Oja, O. Kiirats, K. Raschke, and U. Heber. 1990. Control of photosynthesis in leaves as revealed by rapid gas exchange and measurements of the assimilatory force FA. *Planta* 182: 513-22.
- Taiz, L. y E. Zieger. 2006. Fisiología Vegetal. Vols. 1 y 2. Universitat Jaume. España. (Traducción de la edición en inglés del año 2002).
- Wullschlegel Stan D. 1993. Biochemical Limitations to Carbon Assimilation in C3 Plants-A Retrospective Analysis of the A/C_i Curves from 109 Species. *Journal of Experimental Botany* 44(262): 907-920.

CHAPTER V. FLORAL YIELD IN FIVE MORPHOTYPES OF POT MARIGOLD

(*Calendula officinalis* L.)

Luis F. Salomé-Abarca¹, Víctor A. González-Hernández¹, Nicacio Cruz-Huerta¹, R. Marcos Soto-Hernández¹, y Mariana Palma-Tenango¹

¹Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética, Colegio de Postgraduados, Km. 36.5 Carr. México-Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México.

ABSTRACT

Pot marigold (*Calendula officinalis* L.) is native herbaceous specie from Egypt, and is considered that was introduced to Europe in the twelfth century. When 30 % of the plantation is in bloom, the flower harvest starts. The yield of fresh flowers is about from 12 to 15 t ha⁻¹, the dry flower yield is 3 to 5 t ha⁻¹, and the dried florets from 750 to 1000 kg ha⁻¹. In Chillán, Chile, 17 cuts were made it. In Mexico, there is no data of yield performance between morphotypes and through cuts, therefore, the aim of this study was to determine the floral morphotype with higher efficiency in terms of floral performance through cuts and establish the greater cutting performance. There are differences regarding the floral yield per floral morphotype, floral cut date and age of seedling transplantation. The floral morphotypes which have higher yielding are S1 and S4, and the cutoff date is the highest floral yield is the cut number six.

Keywords: Transplant age, Cut, morphotype

CAPÍTULO V. RENDIMIENTO FLORAL DE MORFOTIPOS FLORALES DE CALÉNDULA (*Calendula officinalis*)

Luis F. Salomé-Abarca¹, Víctor A. González-Hernández¹, Nicacio Cruz-Huerta¹, R. Marcos Soto-Hernández¹, y Palma-Tenango, M¹

¹Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética, Colegio de Postgraduados, Km. 36.5 Carr. México-Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, México.

RESUMEN

La caléndula (*Calendula officinalis*) es una especie herbácea originaria de Egipto, que se considera fue introducida a Europa en el siglo XII. Cuando el 30 % de la plantación se encuentra en floración, se inicia la cosecha de capítulos. El rendimiento en capítulos frescos es de 12 a 15 t ha⁻¹, el de capítulos secos de 3 a 5 t ha⁻¹ y el de lígulas secas de 750 a 1000 kg ha⁻¹. En Chillán, Chile, se efectuaron 17 cortes. En México, no se cuenta con datos de rendimiento por corte y por morfotipos, por tanto, se establecieron como objetivos, determinar el morfotipo floral de mayor eficiencia en cuanto a rendimiento floral a través de cortes y establecer el corte de mayor rendimiento. Existen diferencias respecto al rendimiento de capítulos por morfotipo floral, fecha de corte floral y edad de la plántula al trasplante. Los morfotipos florales de mayor rendimiento son los morfotipos S4 y S1 y la fecha de corte con mayor rendimiento es la número seis.

Palabras claves: Edad al trasplante, corte, morfotipo.

INTRODUCCIÓN

Las plantas aromáticas y medicinales incluyen una lista amplia y diversa de especies, que se emplean en medicina, alimentación, perfumería, cosmética, decoración, ambientación, protección de vegetales, agricultura y apicultura (Palos *et al.*, 2002). La mayoría de estas especies no tienen un uso único.

La caléndula (*Calendula officinalis*) es una especie herbácea originaria de Egipto, que se considera fue introducida a Europa en el siglo XII, desde donde se extendió al resto del mundo (Moore *et al.*, 2006). El fruto es un aquenio, monospermico, curvo, que simula la letra C o media luna, tiene dos caras, una dorsal o convexa y otra ventral o cóncava, el cual se emplea como semilla agronómica (Victoria *et al.*, 2007). Generalmente en los almácigos se surca el área con una separación de 10 cm entre filas y a 20 mm de profundidad, y se necesitan aproximadamente 12 kg de semilla (aquenios) para obtener plántulas suficientes para una hectárea. Cuando las plántulas alcanzan una altura cercana a 10 cm se trasplantan al campo, 35 a 45 d después de la siembra (Acosta *et al.*, 2001).

En México la caléndula se cultiva como planta de ornato, en regiones con clima semi-seco y templado. Cuando 30 % de la plantación se encuentra en floración es cuando se inician las cosechas o cortes de capítulos. En cuanto los capítulos abren por completo, en tiempo soleado y después de eliminar el rocío, se cortan y se deja un tallo corto de 2 a 3 cm de largo; esto ocurre aproximadamente cada 5 a 7 d. Durante la etapa productiva se realizan de 10 a 12 cortes, que son más frecuentes al principio. Hacia el final del periodo de corte las flores son de menor diámetro (Acosta *et al.*, 2001).

El rendimiento en capítulos frescos es de 12 a 15 t ha⁻¹, el de capítulos secos de 3 a 5 t ha⁻¹ y el de lígulas secas de 750 a 1000 kg ha⁻¹ (Muñoz, 1996). En Chillán, Chile, se efectuaron 17 cortes durante 142 d para obtener un rendimiento de 3685 kg ha⁻¹ de capítulos secos (Berti *et al.*, 2003). En Cuba se hicieron de 10 a 12 cortes de capítulos frescos con rendimiento de 1.3 a 2.0 t ha⁻¹ (200 a 300 kg ha⁻¹ de capítulos secos). La relación peso fresco:peso seco es de 6.5:1 (Acosta *et al.*, 2001).

En la zona de los Valles Centrales de México, Palma (2012) observó amplia diversidad fenotípica en una variedad común de caléndula, y eligió varios morfotipos florales de esa población heterogénea, a los cuales denominó S1 al Sn. Cada morfotipo varía en el número de flores liguladas por capítulo floral y en el color de lígulas y flores tubulares. En México no se dispone de datos de rendimiento por corte y por morfotipos, que permitan hacer curvas de rendimiento por corte y de rendimiento acumulado para determinar el momento en que el rendimiento floral del cultivo ya no aumenta en magnitud significativa (que se espera sea cercano al corte de mayor rendimiento) y por tanto no es rentable seguir realizando cortes florales después de esa fecha.

Es común que el rendimiento de la planta varíe entre ambientes, y que exista al menos un corte con rendimiento superior. El objetivo del presente estudio fue determinar el morfotipo floral de mayor rendimiento floral e identificar el corte de mayor rendimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del experimento

El experimento de campo se estableció en el campo experimental del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, ubicado en el municipio de Texcoco, Estado de México (19° 19' N, 98° 53' O, altitud de 2250 m). El material vegetal consistió de cinco morfotipos de caléndula denominadas S1 al S5, elegidos por Palma (2009) y reportados por Palma *et al.* (2012), que provenían de una variedad heterogénea que se siembra en los Valles Centrales de México.

Formación de almácigo

Los cinco morfotipos florales se sembraron en dos fechas de siembra (29 de febrero y 29 de abril de 2012) en invernadero. Como sustrato se utilizó una mezcla de tierra de monte con turba (“peat moss”) en proporción 1:1, el cual se colocó en charolas de 200 cavidades; el sustrato se humedeció y se colocó una semilla por cavidad. El trasplante se efectuó el 29 de mayo de 2012, cuando las plántulas tenían 90 y 30 d de edad, respectivamente.

Manejo del experimento

El trasplante en campo se llevó a cabo en surcos de 95 cm de ancho y 60 cm de distancia entre plantas (22,600 plantas ha⁻¹). La unidad experimental de cada repetición constó de tres surcos de 5 m, que se distribuyeron conforme a un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones. Una vez que el 30 % de las plantas iniciaron la floración, se realizó el primer corte de los capítulos y posteriormente cada semana. En total se hicieron ocho cortes para las plántulas de 90 d de edad al trasplante (ddeat) y diez cortes para las plántulas de 30 ddeat. Los capítulos florales se cortaron de forma manual bajo del involucro, después se secaron en una estufa con recirculación de aire a 40 °C por 48 h, se pesaron con una balanza Ohaus® modelo Explorer (USA) y el total de peso seco de capítulos florales por planta correspondió al rendimiento floral (g/planta), y finalmente se extrapoló a kilogramos de materia seca por hectárea (kg MS ha⁻¹).

Por otro lado se seleccionaron plantas del mismo lote de los morfotipos florales S2, S4 y S5 provenientes de plántulas de 30 y 90 ddeat, a las cuales no se les realizaron cortes florales. En estas plantas se determinó el rendimiento floral total en la fecha del muestreo del quinto corte floral de las plántulas de la misma edad pero sujetas a cortes florales periódicos, para evaluar el efecto de los cortes sucesivos en el rendimiento floral de esos tres morfotipos.

También se determinó el área foliar máxima alcanzada por cada morfotipo mediante un integrador de área foliar electrónico LI-3100 (LICOR, Inc. Lincoln, NE, USA), para después asociar el área foliar con el rendimiento sólo en plantas de 90 d.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se hizo en dos fases. En la primera fase se analizó el rendimiento floral por morfotipo y fechas de corte para cada edad de plántula, como experimentos independientes en un diseño de tratamientos factorial (morfotipo x fecha de corte). En esta fase el análisis de varianza se realizó con el programa SAS V 8.1, y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). En la segunda fase se usaron pruebas de “t” de Student para muestras con varianzas iguales ($\alpha = 0.05$), para comparar sólo los rendimiento totales por morfotipo y por edad de plántula.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del análisis de varianza para comparar los promedios de rendimiento entre morfotipos y fechas de corte para plántulas con 30 y 90 ddeat, indicaron que hubo efecto significativo de efectos principales (morfotipo floral y fecha de corte) y de la interacción morfotipo floral x fecha de corte ($p \leq 0.01$). Los morfotipos de mayor rendimiento floral fueron S1 (para las plántulas de 90 ddeat) y S1 y S4 (para las de 30 ddeat) (Cuadros 1 y 2). Las diferencias entre morfotipos se asocian con otras características; por ejemplo, el área foliar del morfotipo con mayor rendimiento floral (S1) tuvo también la mayor área foliar y por tanto el mayor tamaño de fuente de fotoasimilados; en contraste, el morfotipo S5 presentó el menor rendimiento floral y la menor área foliar. Sin embargo, en los morfotipos S2, S3 y S4 no se cumple esta relación, por lo que sería necesario estudiar la cinética del crecimiento de cada

morfotipo para determinar la distribución de biomasa entre órganos, ya que la biomasa producida no necesariamente es enviada al capítulo floral que es el órgano de interés.

En las plantas provenientes de plántulas con 30 ddeat hubo dos cortes más que en las de 90 d, con un total de diez cortes. El corte de mayor rendimiento fue el número seis para ambas edades (Cuadros V. 1 y V. 2), y aunque en algunos casos fue estadísticamente igual a otros cortes, el Corte 6 presentó siempre una media superior. En ambos casos (plantas de 30 y 90 ddeat) fueron los cortes intermedios los que tuvieron mayor rendimiento, en contraste con los dos iniciales y dos finales. La continua producción de nuevos capítulos después de un corte, como también señalaron Berti *et al.* (2003), se atribuye a que al igual que en la mayoría de las plantas superiores en caléndula ocurre el fenómeno llamado dominancia apical en el cual la yema apical inhibe el crecimiento de yemas laterales (axilar), de modo que la eliminación del o de los brotes apicales (decapitación), que en este caso corresponden a los cortes florales, por lo general resulta en el crecimiento de una o más de las yemas laterales (Taiz y Zeiger, 2002). Para el caso de caléndula ello representa la producción de mayor número de tallos secundarios y por tanto de capítulos florales después de cada corte floral, que además ocasiona diferencias en rendimiento entre los cortes.

Cuadro V. 1. Rendimiento floral (kg MS ha⁻¹) de seis morfotipos, a través de cortes florales, y la interacción morfotipo x corte, en plantas de 90 d de edad al trasplante (n = 4).

Núm. de corte	Morfotipos florales					\bar{x} por corte (kg MS ha ⁻¹)
	S1 (kg MS ha ⁻¹)	S2 (kg MS ha ⁻¹)	S3 (kg MS ha ⁻¹)	S4 (kg MS ha ⁻¹)	S5 (kg MS ha ⁻¹)	
1	73.71 n...p	73.99 n...p	82.32 j...p	96.04 j...p	43.94 p	74.00 F
2	100.61 i...p	77.45 m...p	89.92 j...p	101.15 j...p	64.35 op	86.70 EF
3	127.52 h...o	80.91 l...p	97.52 i...p	106.26 i...p	84.76 j...p	99.39 E
4	264.39 a...c	217.84 b...f	232.53 b...e	173.16 e...h	185.64 d...h	214.71 B
5	235.36 b...e	236.10 b...e	237.23 b...e	179.85 d...h	183.99 d...h	214.51 B
6	309.19 a	256.96 a...c	282.20 ab	318.88 a	209.11 c...g	275.27 A
7	240.46 b...d	126.33 h...o	140.50 h...m	163.24 f...i	133.47 h...n	160.80 C
8	144.30 g...l	142.32 h...k	105.24 i...p	147.76 g...j	81.4779 k...p	124.22 D
\bar{x} por morfotipo	186.94 A	151.49 B	158.43 B	160.79 B	123.34 C	

Medias con letras mayúsculas distintas en una hilera o columna son estadísticamente diferentes dentro de esas mismas hileras y columnas, y Medias con letras minúsculas distintas en una hilera o columna son estadísticamente diferentes dentro de esas mismas hileras y columnas (Tukey, p≤0.05).

Cuadro V. 2. Rendimientos floral (kg ms ha⁻¹) de seis morfotipos, a través de cortes florales y la interacción morfotipo x corte en plantas con 30 d de edad al trasplante (n=4).

No. de Corte	Morfotipos florales					\bar{x} por corte (kg MS ha ⁻¹)
	S1 (kg MS ha ⁻¹)	S2 (kg MS ha ⁻¹)	S3 (kg MS ha ⁻¹)	S4 (kg MS ha ⁻¹)	S5 (kg MS ha ⁻¹)	
1	60.21p	67.64 op	54.48 p	50.40 p	50 p	56.5526 G
2	82.95 n...p	72.60 op	60.27 p	75.01 op	61.85 p	70.5405 FG
3	105.69 m...p	77.56 op	66.05 p	99.67 m...p	73.71 op	84.5397 F
4	200.55 d...j	198.05 e...j	165.79 g...l	176.73 f...k	202.02 d...i	188.63 C
5	229.89 c...f	224.67 c...g	224.39 c...g	257.13 b...e	210.87 d...g	229.39 B
6	259.23 b...d	251.29 b...e	282.99 a...c	337.54 a	219.71 d...g	270.15 A
7	220.85 d...g	225.55 c...g	213.08 d...g	290.87 ab	187.73 f...j	227.62 B
8	229.52 c...f	211.04 d...g	216.82 d...g	208.66 d...h	150.26 h...m	203.26 C
9	181.61 f...k	184.05 f...k	149.29 h...m	185.58 f...k	107.39 l...p	161.58 D
10	147.19 i...m	141.01 j...n	126.67 k...o	126.16 k...o	91.51 ...p	126.51E
\bar{x} por morfotipo	171.77 AB	165.35 BC	155.98 C	180.78 A	135.51 D	

Medias con letras mayúsculas distintas en la hilera o columna de promedios, son estadísticamente diferentes entre sí, y medias con letras minúsculas distintas en las demás hileras o columnas son estadísticamente diferentes entre sí (Tukey, p≤0.05).

En cuanto a rendimiento total las plantas de 30 ddeat siempre fueron mejor que las plantas de 90 ddeat (Figura 1) debido a que las primeras florecieron más rápidamente, posiblemente porque la caléndula, aunque es una planta de día largo, tiene un requerimiento de fotoperiodo crítico entre 6.5 y 8 h de luz (Zimmer, 1989), condiciones que fueron alcanzadas hasta que fueron trasplantadas al campo y así lograr la inducción floral. Por ello las plantas más jóvenes de 30 ddeat entraron en floración casi simultáneamente con las plantas con 90 ddeat, además de que el ciclo de vida de estas últimas se vio reducido en campo y senescieron antes que las plantas de 30 ddeat, y por tanto rindieron un menor número de cortes y tuvieron un menor rendimiento total.

En la comparación de rendimientos florales totales, en todos los casos fueron las plántulas con 30 d de edad al trasplante las que mostraron mayor rendimiento al de las plántulas con 90 d de edad (Figura 1). Respecto a la magnitud de los rendimientos obtenidos, Ganjali (2010) señaló que la densidad de siembra óptima debe de ser de 10 plantas por 50 cm para el más alto rendimiento de capítulos y así favorecer la formación de nuevas ramas, así como para lograr mayores diámetros de los tallos principal y secundarios, y mayor peso individual de capítulo. En nuestro estudio la densidad fue de 9 plantas por cada 60 cm, lo favoreció el crecimiento y desarrollo de plantas individuales al proporcionarles mayor espacio de crecimiento y evitar el sombreado entre ellas mismas.

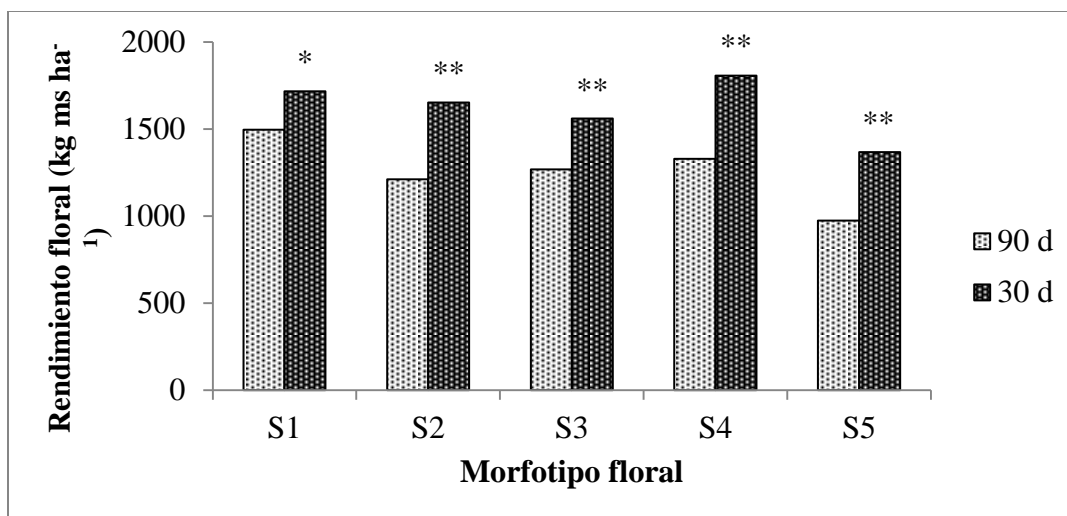


Figura V. 1. Comparación de rendimiento floral acumulado entre morfotipos florales de 30 y 90 d de edad al trasplante. * ** Indican diferencias significativas con $\alpha \leq 0.05$ y $\alpha \leq 0.01$, respectivamente.

En la quinta fecha de corte se comparó el rendimiento de plantas de los morfotipos S2, S4 y S5 a las cuales no se les realizó corte alguno, con sus contrapartes que habían sido sometidas a cortes periódicos sucesivos. La aplicación de cortes incrementó el rendimiento de peso seco de capítulos en 37, 3 y 38 % (S2, S4 y S5 respectivamente) en comparación con el rendimiento obtenido en las plantas con 90 d de edad en el mismo momento, y en 34, 32 y 46 % (S2, S4 y S5, respectivamente) en comparación con los rendimientos de plantas de 30 d de edad. Estos aumentos por efectos de cortes sucesivos, se deben a que al cosechar las flores y los frutos se retrasa la senescencia y la planta sigue creciendo y produciendo nuevos brotes, de manera que hay una menor pérdida de hojas así como de proteína y clorofila foliar (Mohr y Schopfer, 1995), ya que las hojas son la fuente de fotoasimilados para la formación de nuevas ramas, hojas y capítulos florales.

Durante este experimento se observó variabilidad morfológica adicional a la antes identificada entre los capítulos florales de caléndula, atribuible a la polinización cruzada entre

plantas, pues se encontraron al menos 21 morfotipos contrastantes en número y color de lígulas y flores tubulares (Figura 2).



Figura V. 2. Morfotipos detectados en seis materiales de caléndula (*Calendula officinalis*).

CONCLUSIONES

Existen diferencias respecto al rendimiento de capítulos por morfotipo floral, fecha de corte floral y edad de la plántula al trasplante. Los morfotipos florales de mayor rendimiento promedio por corte son los morfotipos S4 y S1, y la fecha de corte con mayor rendimiento en promedio de morfotipos es la sexta, que en general fue un corte intermedio. El trasplantar plántulas más jóvenes aumenta el rendimiento de capítulo en todas los morfotipos florales, pues los cortes estimulan la formación de nuevos tallos florales. Debido a la segregación detectada en tipos y colores de capítulo, es muy recomendable llevar a cabo trabajos de mejoramiento genético para obtener variedades homogéneas en tipo de capítulo y con los mejores rendimientos, además de la obtención de nuevas variedades con uso ornamental.

LITERATURA CITADA

- Acosta de la Luz L., C. Rodríguez Ferradá, E. Govín Sánchez. 2001. Instructivo técnico de *Calendula officinalis*. Revista Cubana Plantas Medicinales. 1:23-7.
- Berti D. M., R. Wilckens, E. F. Hevia, H. 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 Chillán. Agricultura Técnica 63 (1).
- Ganjali H. R. 2010. Effects on sowing date, Plant density and nitrogen fertilizer on yield, Yield components and various traits of *Calendula officinalis*. American-Eurasian journal of agricultural & environmental Sciences 8 (6): 672-676.
- Palma Tenango M., V.A. González Hernández y R.M. Soto Hernández. 2012. Variación Genética y Ambiental en el Contenido de Flavonoides en Capítulos de Caléndula. *In: Avances de Investigación 2012*. Cruz-Izquierdo S., O. J. Ayala-Garay, N. Cruz-Huerta, I. Ramírez-Ramírez, E. Martínez-Villegas (Eds.). Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad–Genética. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 93 p.
- Palos E. M., y A. Colom Gorgues. 2002. Distribución comercial de plantas aromáticas y medicinales en Cataluña. Investigación Agraria Producción y Protección Vegetal 17 (1).
- Mohr H., and P. Schopfer. 1995. Plant Physiology. Springer-Verlag, Berlin, Germany. 629p.
- Moore, T., Sánchez L. P., Villarreal, C., Desmarchelier. 2006. Manual de Cultivo y Manejo de “Caléndula” *Calendula officinalis* L. Proyecto de atención primaria de la salud con plantas medicinales y fitomedicamentos “cultivando la salud”. Municipio de Malvinas argentinas provincia de Buenos Aires, Argentina. Cita incompleta. http://www.plantasmedicinales.org/archivos/manual_de_cultivo_para_calendula_officialis.pdf. Consultado 21 febrero de 2012.
- Muñoz F. 1996. Plantas Medicinales y Aromáticas. 2ª reimpresión. Mundi Prensa. Madrid. España pp: 248-249.
- Taiz L., and E. Zeiger. 2002. Plant Physiology. 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 690p.

Victoria T. Jorge A. 2007. Morfoanatomía y efecto del secado en la germinación de semillas de caléndula y eneldo. *Acta agronómica* 56(2): 61-68.

Zimmer K. 1989. Photoperiodische reaktionen von sommer-schnittblumen. *Deutscher Gartenbau*. 43:1719-1721.

CHAPTER VI. CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OIL BY DIFFERENT EXTRACTION METHODS IN *Calendula officinalis* L.

Luis F. Salomé-Abarca¹, R. Marcos Soto-Hernández¹, Víctor A. González-Hernández¹, y
Nicacio Cruz-Huerta¹

¹Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética, Colegio de Postgraduados, Km. 36.5 Carr. México-Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, México.

ABSTRACT

Hydrodistillation, organic solvent extraction and enfleurage are common techniques for extracting essential oils from plant samples. One factor that influences the performance of essential oil extraction is the method used. The aim of the study was to choose the best method for essential oil extraction from pot marigold flowers, based on oil yield, processing time, and number of extracted compounds, for research purposes focused on genotypic characterization. Yields of essential oils obtained by hydrodistillation, organic solvent extraction and enfleurage were 0.9 ± 0.1 , 6.7 ± 0.2 and 7.1 ± 0.15 g of oil per 100 g of dry floral material, respectively. The method that provided the highest-quality oil (without pigments) was the hydrodistillation, which also contained the highest amount of compounds, but required a long time for processing many samples. Organic solvent extraction and enfleurage are faster for processing, but their extracted oils contain pigments. The most suitable technique for processing many samples in a short period of time was enfleurage because it provided an oil yield seven-fold higher than hydrodistillation and oil with less pigments than organic solvent extraction did. In addition, oil obtained by enfleurage contained the two main compounds in pot marigold flowers, α -Cadinene and δ -Cadinene.

Keywords: Yield, extraction method, essential oil.

CAPÍTULO VI. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE CALÉNDULA (*Calendula officinalis*) EXTRAÍDO POR TRES DIFERENTES MÉTODOS

Luis F. Salomé-Abarca¹, R. Marcos Soto-Hernández¹, Víctor A. González-Hernández¹, y
Nicacio Cruz-Huerta¹

¹Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética, Colegio de Postgraduados, Km. 36.5 Carr. México-Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, México.

RESUMEN

La hidrodestilación, extracción con disolvente orgánico y enfleurage son técnicas comunes para la extracción de aceites esenciales a partir de muestras vegetales. Un factor que influye en el rendimiento de la extracción de aceite esencial es el método utilizado. El objetivo de este estudio fue el de comparar tres métodos para la extracción de aceite esencial de capítulos de caléndula, con base en el rendimiento de aceite, el tiempo de procesamiento, y el número de compuestos extraídos, con fines de investigación centrados en caracterización genotípica de este tipo de materiales. Los rendimientos de los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación, extracción con disolvente orgánico y enfleurage fueron 0.9 ± 0.1 , 6.7 ± 0.2 y 7.1 ± 0.15 g de aceite por 100 g de material floral seco, respectivamente. El método que proporciona el aceite de más alta calidad (sin pigmentos) fue la hidrodestilación, que también contuvo la mayor cantidad de compuestos, aunque requiere mucho tiempo para procesar muchas muestras de forma simultánea. La extracción con disolventes orgánicos y enfleurage son más rápidos para su procesamiento, pero los aceites extraídos a través de ellos contienen pigmentos. La técnica más conveniente para procesar muchas muestras en un corto período de tiempo fue el enfleurage porque proporcionó un rendimiento de aceite siete veces mayor que la hidrodestilación y un aceite con menos pigmentos que la extracción con disolvente orgánico. Además, el aceite

obtenido por enfleurage contenía los dos compuestos principales en flores de caléndula, α -cadineno y δ -cadineno .

Palabras Clave: Rendimiento, técnica de extracción, floración, aceite esencial.

INTRODUCCIÓN

Los capítulos florales y las flores liguladas de caléndula (*Calendula officinalis* L.) son ampliamente utilizadas por sus propiedades antiinflamatorias, espasmódicas, emenagogas, colagogas, sedativas, sudoríficas, vulnerarias y bactericidas contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus fecalis* (Acosta *et al.*, 2001). Según Okoh *et al.* (2007), los capítulos florales de caléndula contienen su máxima concentración de aceite volátil en la fase de plena floración (0.97 %) y el mínimo en la etapa de prefloración (0.13 %).

Existen varias técnicas para extracción de aceites esenciales, las cuales difieren en sus características. Una técnica es la hidrodestilación en la que el material vegetal aromático se calienta en dos a tres veces su peso de agua con vapor provisto indirectamente desde fuera del alambique, en opuesto a la destilación de vapor donde el material vegetal se extrae con vapor directamente producido en el alambique, o por vapor indirecto producido fuera del mismo e introducido en el alambique (Mouhssen, 2004).

Otra técnica es la maceración o extracción en disolvente orgánico, cuyo principio es que cuando un material sólido entra en contacto con un disolvente los componentes solubles en el material sólido se mueven al disolvente. Por lo tanto, en esta extracción aplicada en materiales vegetales ocurre la transferencia de masa del principio activo soluble (ingrediente medicinal) al disolvente, debido a un gradiente de concentración. Este proceso no es tan selectivo para aceites esenciales (Singh, 2008).

El enfleurage es un método de extracción en grasa fría o caliente, que permite procesar grandes cantidades de material vegetal. En frío, la grasa se extiende sobre placas de vidrio contenidas en marcos de madera, dejando un margen claro cerca de los bordes. La superficie de absorción de la grasa se aumenta por ranuras superficiales hechas con una espátula de madera. Las flores frescas se extienden sobre la superficie de la grasa y los marcos se apilan en montones. Después de que la manteca ha absorbido los aceites perfumados de las flores, las flores desgastadas se retiran a mano. Flores frescas se extienden de nuevo en la superficie de la grasa, y esto se repite hasta que la superficie de grasa está completamente saturada con aceites.

En el proceso de maceración en grasa caliente (45 a 60 °C), los pétalos se sumergen en la grasa fundida de modo que el tiempo de extracción se reduce a 1 a 2 h, dependiendo de las especies de planta. Después de cada inmersión, la grasa es filtrada y los pétalos son separados. Después de 10 a 20 inmersiones, a la grasa se le eliminan los residuos florales y agua.

En el caso de jazmín (*Jasminum* spp.), el enfleurage completo dura alrededor de 70 d, y en cada día transcurrido las flores gastadas se eliminan y los cajones o placas de enfleurage se recargan con nuevas flores. Cada kg de grasa debe estar en contacto preferiblemente con 3.0 kg de flores de jazmín para todo el periodo de enfleurage (Handa, 2008).

Como cada técnica se basa en diferentes principios físico-químicos, se esperaría que cada una extrajera aceite esencial con diferentes características, aun tratándose del mismo material vegetal.

En México la caléndula es una planta de interés por las propiedades terapéuticas y cosméticas de sus aceites esenciales, pero esta especie ha sido poco estudiada en el país, y se desconoce el método de extracción para procesar muchas muestras simultáneamente en proyectos de investigación. Por tanto, el objetivo de este estudio fue el de comparar tres métodos

para la extracción de aceite esencial de capítulos de caléndula, con base en el rendimiento de aceite, el tiempo de procesamiento , y el número de compuestos extraídos, con fines de investigación centrados en caracterización genotípica de este tipo de materiales.

MATERIALES Y MÉTODOS

El cultivo de caléndula se estableció en el campo experimental del Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, ubicado en el municipio de Texcoco, Estado de México (19° 19' N, 98° 53' O, altitud de 2250 m). El material vegetal para extracción de aceites esenciales consistió de capítulos florales del morfotipo S4 secos de caléndula cosechados de mayo a agosto de 2012.

Hidrodestilación (HD)

La cantidad mínima para extracción de aceite se estableció a través de ésta técnica, en la que se utilizó un sistema de tipo Clevenger. El material vegetal (7 g de materia floral seca) se colocó en un matraz con fondo redondo con 25 mL de agua destilada, se llevó a punto de ebullición durante 3 h contabilizadas a partir de la ebullición. Una vez transcurrido este tiempo, se recuperó la emulsión de agua con aceite y éste se extrajo con diclorometano (15 mL) por tres veces; posteriormente se concentró en un rotavapor Büchi B-480® con vacío y a 30 °C, hasta evaporar la mayor cantidad de disolvente posible; el aceite que quedó depositado en el matraz se transfirió a un vial de 1.5 mL con una pipeta Pasteur y se dejó evaporar el resto del solvente a temperatura ambiente en una campana de extracción. El rendimiento de aceite se calculó multiplicando el peso del aceite libre de solvente por 100 y dividiéndolo entre el peso del material vegetal seco inicial. Se hicieron tres repeticiones para este método.

Maceración en solventes orgánicos (MS)

Para esta técnica se probaron como disolventes de extracción hexano y diclorometano, ambos con y sin sonicación. Se tomaron 4 g de material vegetal seco y se le agregaron 20 mL del disolvente correspondiente (hexano o diclorometano), se maceraron por 5 min en dichos disolventes, de los cuales una parte de cada extracto se sometió a sonicación por 15 min en un baño ultrasónico Branson modelo B-220®, para así obtener extractos hexánicos y diclorometánicos con y sin sonicación. Después los extractos se filtraron y se concentraron en un rotavapor Büchi B-480® con vacío a 30 °C, hasta evaporar la mayor cantidad de disolvente posible. El aceite que quedó depositado en el matraz se transfirió a un vial de 1.5 mL con una pipeta Pasteur y se dejó evaporar el resto del solvente al ambiente en una campana de extracción. El rendimiento de aceite se calculó igual que en el método anterior. Se hicieron tres repeticiones para esta prueba.

Para elegir el disolvente más adecuado, se tomó una muestra de 20 mg del aceite extraído y se disolvió en 500 µL del solvente correspondiente, a la que se hizo una separación por cromatografía en capa fina en placas de sílica gel 60 F₂₅₄ con soporte de aluminio de 2 x 5 cm; se hicieron varias aplicaciones de 15 µL cada una para obtener una separación visible al revelado. La fase móvil fue una mezcla de tolueno:acetato de etilo en proporción 93:7 y el revelado de la placa se hizo con vainillina a 2 % en etanol y ácido sulfúrico a 10 % en etanol por 5 min a 110 °C.

Enfleurage (ENF)

Se estableció una microtécnica que combinó los principios de extracción de enfleurage en frío y enfleurage caliente, utilizando como extractante de los aceites esenciales a manteca vegetal de Karité (*Vitellaria paradoxa* C. F. Gaertn.), que es una grasa incolora e inodora para evitar la

interferencia de otro compuesto ajeno a material vegetal utilizado. En esta técnica se utilizaron 100 g de esta grasa calentada a 40 °C hasta obtener un estado líquido sin llegar a ebullición; luego se agregaron 3 g de material vegetal seco y se dejó extraer en la grasa a 40 °C durante 20 min. En seguida se vertió la grasa líquida sobre una placa de vidrio colocada sobre una cama de hielo para asegurar la rápida solidificación de la grasa; una vez sólida la grasa, se agregaron 5 g más de material vegetal seco sobre ella, tal como se hace en el enfleurage en frío, para atrapar compuestos volátiles que se pudieran haber perdido durante el proceso en caliente. En la grasa fría se dejó extraer durante 4 d, y al final se volvió a calentar la grasa hasta hacerla líquida, se filtró y se extrajo con 50 mL de etanol a 95 % y 60 °C, para extraer los aceites esenciales contenidos en ella. Dicho extracto se centrifugó a $4499.95 \times g$ por 5 min, para eliminar detritos de la grasa. El etanol recuperado con los aceites fue concentrado en un rotavapor Büchi B-480® con vacío a 30 °C, hasta evaporar la mayor cantidad de solvente posible. El aceite extraído que quedó depositado en el matraz se transfirió a un vial de 1.5 mL con una pipeta Pasteur, y se dejó evaporar el resto del solvente a temperatura ambiente en una campana de extracción. El rendimiento de aceite se calculó de igual forma que en las técnicas anteriores. También se hicieron tres repeticiones como en las pruebas anteriores.

Cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC-MS)

Para confirmar lo observado por CCF, los tres tipos de extracto se analizaron mediante GC-MS (por sus siglas en inglés) con un cromatógrafo Hewlett Packard HP 6890 Series® acoplado a un detector de masas HP 5973. El sistema GC-MS usó una columna DB-WAX/ 30 m x 0.250 µm y 0.25 µm de grosor de fase estacionaria, Helio como gas acarreador con grado de pureza 99.9 % a un flujo de 1 mL min⁻¹; la temperatura del horno comenzó en 40 °C y aumentó 9 °C min⁻¹ hasta alcanzar una temperatura de 220 °C; la temperatura del inyector en modo

“splitless” fue de 220 °C, y 280 °C como temperatura de interfase. Para el detector de masas, la temperatura de la fuente de iones fue de 230 °C y la del cuadrupolo de 250 °C. La energía de ionización fue de 70 eV.

Se inyectaron dos repeticiones a la misma concentración (1 mg de aceite por cada μL de solvente, diclorometano), de los extractos obtenidos por hidrodestilación, maceración en solvente orgánico y enfleurage, en las condiciones anteriormente descritas.

Debido a la falta de compuestos estándares se hizo una inyección de n-alcanos para calcular los índices de Kovats de cada compuesto, para la validación de la identidad de los mismos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los tres métodos de extracción lograron extraer aceite esencial, pero difirieron en su rendimiento de aceite, número de compuestos extraídos y el tamaño de muestra requerida, y sus características de operatividad. Dependiendo de sus capacidades de extracción, los tres métodos mostraron amplia variación extrayendo aceite esencial de caléndula, ya que los rendimientos de aceite variaron de 0.9 % para hidrodestilación a 7.1% para enfleurage (Cuadro VI. 1).

Cuadro VI. 1. Comparación de tres técnicas de extracción en cuanto a sus principales características operacionales y las características de los aceites obtenidos a través de estas mismas.

Extraction technique	TM (g)	Oil yield (%)	NCE	PP	TPM (h)
Hydrodistillation	7	0.9 ± 0.1^z	19	np ^x	4
Organic solvents	4	6.7 ± 0.2	15	+++	0.25
Enfleurage	8	7.1 ± 0.1	11	+	120

Media \pm desviación estandar (n = 3). TM: Tamaño de muestra requerida en el análisis; NCE: número de compuestos extraídos; PP: presencia de pigmentos en el aceite esencial; TPM:

Tiempo de procesamiento por muestra. ^x Escala cualitativa para presencia de pigmentos en el aceite esencial: no presente (np), alta y (+++), baja (+).

En extracción con disolvente orgánico y enfleurage se obtuvieron aceites pigmentados, en comparación con el obtenido por hidrodestilación, aunque el extracto obtenido por enfleurage contuvo menos pigmentos que el obtenido por extracción en disolvente orgánico (Figura VI. 1). Como es mostrado en el Cuadro VI. 1, en las tres técnicas el tamaño de la muestra fue reducido a pequeñas cantidades de flores secas (7, 4 y 8 g para HD, MS y ENF). En adición a la gran diferencia en rendimiento de aceite, estos métodos también contrastaron en el tiempo de procesamiento, el cual vario de 15 min a 120 h, así como en el número de compuestos extraídos (19, 15 y 11 para HD, MS y ENF respectivamente).

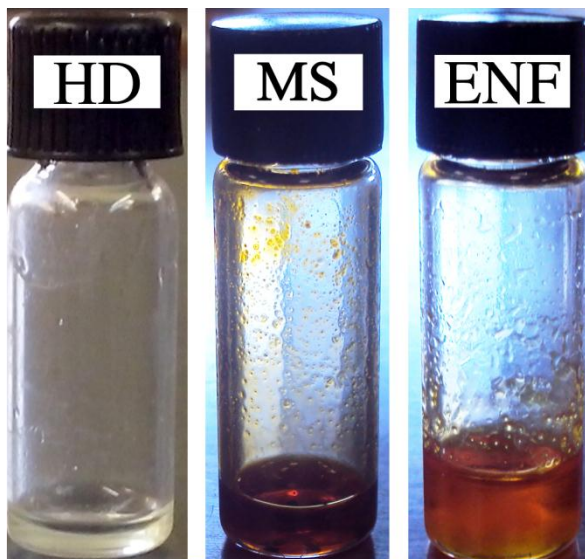


Figura VI. 1. Aceite esencial de caléndula obtenido por hidrodestilación (HD), extracción con disolvente orgánico (MS) y enfleurage (ENF).

En hidrodestilación la cantidad de muestra utilizada es pequeña comparada con la utilizada para el estudio de otras especies como *Thymus vulgaris* L. (Mohammad-Taghi *et al.*, 2008), *Ferula assa-foetida* (Khajeh *et al.*, 2005) y *Juniperus communis* L. (Pourmortazavi *et al.*,

2004), en las cuales se utilizaron 60, 40 y 80 g de material vegetal, respectivamente. Se obtuvo un rendimiento de aceite de 0.9 % \pm 0.1 (Cuadro VI. 1), valor que coincide con lo mencionado por Okoh *et al.* (2007), quienes reportaron un rendimiento de aceite del 0.97 % en capítulos de caléndula cortados en etapa de floración. Esta técnica demandó un tiempo de 4 h por muestra, incluyendo la extracción de la emulsión y su concentración en el rotavapor, por lo que para procesar muchas muestra a la vez sería necesario contar con una gran cantidad de sistemas de hidrodestilación, lo cual es un factor limitante para la mayoría de laboratorios de investigación. El análisis por CG-MS mostro la presencia de 19 compuestos en el aceite esencial extraído por esta técnica (cuadro VI. 2).

Cuadro VI. 2. Compuestos obtenidos por hidrodestilación (TR, tiempo de retención, IK, índice de Kovats, Qual, indica el porcentaje de confiabilidad con que fue identificado el compuesto).

TR	% Área	IK	Compuesto	Qual
15.46	2.39	1146	trans-p-Menta-2,8-dienol	49
15.84	3.79	1149	Isoborneol	62
15.93	9.10	1150	Borneol	94
16.24	1.08	1153	Acetato de nerilo	87
16.76	3.80	1158	Acetato de geranilo	91
17.22	6.80	1162	α -Cadineno	98
17.28	1.04	1163	Mirtenol	93
17.89	0.96	1167	cis-Carveol	98
17.95	1.08	1169	P,a,a-trimetilbenzil alcohol	91
18.08	3.03	1170	Geraniol	90
18.90	1.81	1177	3,5-Di-tert-butylcatecol	35
19.66	1.82	1184	α -Selineno	80
20.43	4.95	1191	Oxido de Cariofileno	91
21.38	3.84	1200	α -Cubebeno	46
21.49	1.37	1201	2,5,6-Trimetilbenzimidazol	47
21.71	2.06	1202	Ledol	99
22.94	19.06	1791	Biciclo[4.4.0]dec-1-ene, 2-isopropil-5-metil-9-metileno	93
23.08	1.95	1795	α -Cadinol	90
24.46	1.46	1836	2,3,5,6-Tetrametil-para-fenileno	64

En el método de extracción con disolventes orgánicos, el diclorometano fue el disolvente adecuado con exposición a baño ultrasónico por 20 min, además de que en la CCF sus extractos mostraron la presencia de dos bandas de mayor intensidad y grosor (Figura VI. 2), con un rendimiento de 6.7 ± 0.2 % (Cuadro VI. 1). La extracción en disolvente orgánico es una técnica rápida, pero que también extrae los pigmentos de las flores debido a que también son afines a la polaridad del disolvente al igual que los aceites esenciales. Los pigmentos acarreados en los extractos interfieren con el análisis fitoquímico por CCF y por GC-MS, porque podrían taponar la columna cromatográfica, y además carecen de características de volatilidad.

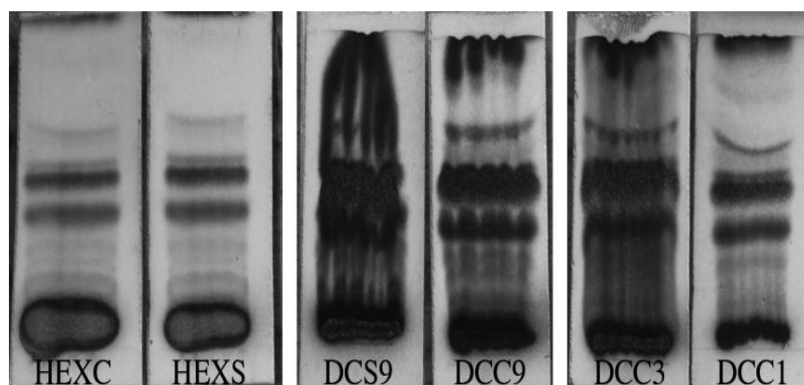


Figura VI. 2. Comparación se sistemas de extracción (Extracción con hexano y sonicación (HEXC), extracción con hexano sin sonicación (HEXS), extracción con diclorometano con sonicación con nueve aplicaciones (DCC9), extracción con diclorometano sin sonicación con nueve aplicaciones (DCS9), extracción con diclorometano con sonicación con tres aplicaciones (DCC3) y extracción con diclorometano con sonicación con una aplicación (DCC1).

El análisis por CG-MS mostró la presencia de 15 compuestos en el aceite esencial obtenido por extracción con disolvente orgánico (Cuadro VI. 3).

El rendimiento de aceite esencial aquí obtenido por enfleurage (7.1 %) se encuentra muy por encima de los rendimientos de aceite esencial reportados en caléndula de 0.97 % en plena floración (Okoh *et al.*, 2007). Tal diferencia se debe a que la técnica de extracción por enfleurage aquí utilizada para la obtención del aceite esencial, fue una combinación de enfleurage frío y caliente. Este efecto positivo se ha observado también en la extracción de aceite esencial de

Polianthes tuberosa que al ser extraído por enfleurage en caliente el rendimiento de aceite esencial fue de 6.58 %, lo que representa un aumento de 236 veces con respecto al de 0.0279 % obtenido por maceración en hexano (Rakthaworn *et al.*, 2009).

Cuadro VI. 3. Compuestos obtenidos por maceración solvente orgánico (TR, tiempo de retención, IK, índice de Kovats, Qual, indica el porcentaje de confiabilidad con que fue identificado el compuesto).

TR	%Area	IK	Compuesto	Qual
4.29	3.91	480	α -Tujeno	94
9.38	1.58	784	Metil heptenona	64
11.65	0.68	1111	(E,E)-2,4-Heptadienal	94
12.00	1.27	1114	α -Cubebeno	97
12.66	1.53	1120	Copaeno	99
12.92	1.07	1123	[R-(R*,R*)]-2,3-Butanediol	80
13.37	2.34	1127	β -Cubebeno	95
14.42	1.82	1136	Cariofileno	99
15.91	1.43	1150	γ -Muuroleno	98
16.24	2.72	1153	Germacreno D	99
16.47	3.11	1155	α -Muuroleno	98
17.00	10.15	1160	δ -Cadineno	96
17.06	7.15	1160	α -Cadineno	98
21.68	2.05	1202	Ledol	97
23.01	0.68	1793	α -Cadinol	98

El análisis por CG-MS mostró la presencia de 11 compuestos en el aceite esencial obtenido por el método de enfleurage (Cuadro VI. 4).

Cuadro VI. 4. Compuestos obtenidos por enfleurage (TR, tiempo de retención, IK, índice de Kovats, Qual, indica el porcentaje de confiabilidad con que fue identificado el compuesto).

TR	%Area	IK	Compuesto	Qual
3.69	0.63	389	3-Metil-3-buten-2-one	91
9.08	0.36	776	2,3-Octanediona	72
9.35	0.21	784	6-Metil-5-Hepten-2-ona	80
10.47	0.16	813	Nonanal	98
12.64	0.37	1120	Benzaldehído	96
13.34	0.30	1127	β -Cubebeno	95
13.53	0.15	1128	2,3-Butanediol	80
16.20	0.27	1153	Germacreno D	99
16.43	0.42	1155	α -Muuroleno	96
16.95	4.42	1159	δ -Cadineno	96
17.22	6.80	1162	α -Cadineno	98

Los resultados aquí obtenidos no coinciden con los encontrados en flores de jazmín por Paibon *et al.* (2011), quienes mediante enfleurage detectaron el mayor número de compuestos extraídos. Esta diferencia sugiere que la efectividad de las técnicas de extracción de aceites esenciales depende de la especie vegetal. En las muestras de caléndula, las tres técnicas de extracción evaluadas indicaron que el α -Cadineno y el δ -Cadineno fueron los compuestos de mayor concentración, por lo que aquí se les propone como los componentes mayoritarios de este aceite esencial. Estos dos componentes también se encontraron en el aceite esencial de caléndula cultivada en Brasil (Gazim *et al.*, 2008).

Las diferencias físicas y de composición química de la fracción volátil y no volátil de los aceites obtenidos por estas tres técnicas pueden deberse a sus diferencias en los principios físicos y químicos que rigen a cada una. Así, la hidrodestilación solo acarrea a los compuestos volátiles extraídos por calor que pueden ser arrastrados por el vapor de agua en el que se encuentra la muestra, y de esta forma es selectiva y deja de lado a los pigmentos de la muestra, a diferencia de la maceración en solvente orgánico que es no selectiva y extrae cualquier compuesto con polaridad afín al del solvente utilizado. Por su parte, el enfleurage se basa en la extracción de

compuestos liposolubles, como son los aceites y los pigmentos, y al final la extracción de aceites se depura con un solvente de polaridad afín a ellos, como el etanol, para que de esta forma quede la mayor parte de los pigmentos atrapados en el cuerpo de grasa que se utilizó para la extracción porque los retiene con mayor fuerza que a los aceites esenciales.

CONCLUSIONES

La hidrodestilación es la técnica que ofrece la obtención de aceite esencial en caléndula de mayor calidad (libre de pigmentos), con un rendimiento de 0.9 % en capítulos en estado de floración, y también mostró la mayor capacidad de extracción en cuanto a número de compuestos se refiere. La extracción en solvente orgánico es una técnica práctica que consume poco tiempo y que permite procesar gran cantidad de muestras, pero el aceite obtenido es de baja calidad debido a la gran cantidad de pigmentos presentes en el aceite extraído que interfiere en los análisis cuantitativos. La técnica de enfleurage, aunque proporciona aceite con bajas cantidades de pigmentos, ofrece un rendimiento siete veces mayor al de hidrodestilación (7.1 %) y permite el procesamiento de gran cantidad de muestras simultáneamente, por lo que esta técnica es adecuada para fines de investigación cuando se cuenta con gran número de muestras para procesar. El α -Cadineno y el δ -Cadineno son los compuestos que se encuentran en mayor concentración en el aceite esencial de caléndula. Un factor que influye sobre el rendimiento de aceite esencial es la técnica de extracción utilizada.

LITERATURA CITADA

- Acosta de la Luz L., C. Rodríguez Ferradá, y E. Govín Sánchez. 2001. Instructivo técnico de *Calendula officinalis*. Rev. Cubana Plant. Med. 1, 23–7.
- Gazim, Z., C., C., Moraes Rezende, S., R., Fraga, F., B., Prado Días, C., Vataru, and D., A., Garcia Cortez. 2008. Analysis of the essential oils from *Calendula officinalis* growing in Brazil using three different extraction procedures. Braz. J. Pharm. Sci. 44 (3), 391–395.

- Handa, S., S. 2008. An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants, in: S. S. Handa, S. P. Singh K., G. Longo, D. D. Rakesh (Eds.), *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. International Centre for Science and High Technology, ICS-UNIDO, Trieste, Italy, pp: 21–52.
- Khajeh, M., Yadollah, Y., Naader, B., Fatemeh, S., and Reza Pirmoradei, M. 2005. Comparison of essential oils compositions of *Ferula assa-foetida* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chem.* 91, 639–644.
- Mohammad-Taghi, G., and Karamatollah, R. 2008. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chem.* 109, 925–930.
- Mouhssen, L., 2004. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother. Res.* 18, 435–448.
- Okoh, O., O., Sadimenko, A., A., and Afolayan, A., J., 2007. The effects of age on the yield and composition of the essential oils of *Calendula officinalis*. *J. Appl. Sci.* 7 (23), 3806–3810.
- Okoh, O., O., Sadimenko, A., P., Asekun, O., T., and Afolayan, A., J., 2008. The effects of drying on the chemical components of essential oils of *Calendula officinalis* L. *Afr. J. Biotechnol.* 7 (10), 1500–1502.
- Paibon, W., Yimnoi, C., A., Tembab, N., Boonlue, W., Jampachaisri, K., Nuengchamnonng, N., Waranuch, N., and Ingkaninan, K., 2011. Comparison and evaluation of volatile oils from three different extraction methods for some Thai fragrant flowers. *Int. J. Cosmetic Sci.* 33, 150–156.
- Pourmortazavi S., M., Baghaee, P., and Mirhosseini, M., A. 2004. Extraction of volatile compounds from *Juniperus communis* L. leaves with supercritical fluid carbon dioxide: comparison with hydrodistillation. *Flavour Fragr. J.* 19, 417–420.
- Rakthaworn, P., Dilokkunanant, U., Sukkatta, U., Vajrodaya, S., Haruethaitanasan, V., Pitpiangchan, P., and Punjee, P. 2009. Extraction methods for tuberose oil and their chemical components. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 43, 204–211.

Singh, J. 2008. Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants, in: S. S. Handa, S. P. Singh K., G. Longo, D. D. Rakesh (Eds.), Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. International Centre for Science and High Technology, ICS–UNIDO, Trieste, Italy, pp: 67–82.

**CHAPTER VII. YIELD AND CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OILS OF
POT MARIGOLD (*Calendula officinalis* L.) THROUGH CUT DATES AND FLORAL
MORPHOTYPES**

Luis F. Salomé-Abarca¹, Víctor A. González-Hernández¹, R. Marcos Soto-Hernández¹
and Nicacio Cruz-Huerta¹

¹Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética, Colegio de Postgraduados, Km. 36.5 Carr. México-Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, México.

ABSTRACT

The flower heads of pot marigold (*Calendula officinalis* L.) contain the highest concentration of volatile oil in the phase of full flowering (0.97 %) and lowest in the pre-flowering stage (0.13 %). The essential oil was found to be rich in α -cadinene, α -cadinol, t-muurolol, limonene and 1,8-cineole and p-cymene. In the area of the Central Valley of Mexico, Palma observed phenotypic diversity in a wide variety of common pot marigold, and chose six floral morphotypes of this heterogeneous population, which were named it from S1 to S6. The aim of this study was to compare the oil yield between floral morphotypes and analyze the composition of these oil through different floral cut dates using enfleurage technique. Oil yield Behavior through cuts date it was different between floral morphotypes and the compound found it in higher proportion in the oil is δ -cadinene.

Keywords: Yield, δ -cadinene, cut date

CAPÍTULO VII. RENDIMIENTO Y COMPOSICIÓN DE ACEITES ESENCIALES A TRAVÉS DE FECHAS DE CORTES EN MORFOTIPOS FLORALES DE CALÉNDULA

(Calendula officinalis L.)

Luis F. Salomé-Abarca¹, Víctor A. González-Hernández¹, R. Marcos Soto-Hernández¹
and Nicacio Cruz-Huerta¹

¹Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética, Colegio de Postgraduados, Km. 36.5 Carr. México-Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, México.

RESUMEN

Los capítulos florales de *C. officinalis* contienen su máxima concentración de aceite volátil en la fase de plena floración (0.97 %) y el mínimo en la etapa de prefloración (0.13 %). El aceite esencial se encontró que era rico en α -cadineno, α -Cadinol, t-Muurolol, Limoneno y 1,8-Cineol y con p-Cimeno. En la zona de los Valles Centrales de México, Palma observó amplia diversidad fenotípica en una variedad común de caléndula, y eligió seis morfotipos florales de esa población heterogénea, a las cuales denominó del S1 al S6. El objetivo de este estudio fue comparar el rendimiento de aceite entre morfotipo florales y la composición de estos a través de diferentes fechas de corte floral utilizando la técnica de enfleurage. El comportamiento del rendimiento de aceite a través de fecha de cortes presenta comportamiento diferente entre morfotipos florales y el compuesto que se encuentra en mayor proporción en los mismos es el δ -Cadineno.

INTRODUCCIÓN

Los capítulos florales de caléndula (*Calendula officinalis* L.) contienen su máxima concentración de aceite volátil en la fase de plena floración (0.97 %) y el mínimo en la etapa de prefloración (0.13 %), y la composición de su aceite también varía a través de las fases del ciclo vegetativo (Okoh *et al.*, 2007). Numerosos monoterpenos y sesquiterpenos han sido reportados

en el aceite volátil, tales como: α -Tujeno, α -Pieneno, Sabineno, β -Pieneno, Limoneno, 1,8-Cineol, p-Cimeno, Trans- β -ocimeno-, γ -Terpeneno, δ -3-Careno, Nonanal, Terpeno-4-ol, 3-Cylohexeno-1-ol, α -Felandreno, α -Terpeneol, Geraniol, Carvacrol, Acetato de bornilo, Acetato de sabinil, β -Cubebeno, α -Copaeno, α -Bourboneno, α -Cubebeno, α -Gurjuneno, Aromadendreno, β -Cariofileno, α -Ylangeno, α -Humuleno, Epibiciclo Sesquifelandreno, D-Germacreno, Aloaromadendreno, β -Salieno, Calareno, Muuroleno, δ -Cadineno, 1,4-Dienocadina, α -Cadineno, Nerolidol, Palustron, Endobourboneno, Oplopenona, α -Cadinol, τ -Muurolol, entre otros. El aceite esencial de caléndula es rico en α -Cadineno, α -Cadinol, t-Muurolol, Limoneno y 1,8-Cineol y con p-Cimeno (Muley, 2009).

En los Valles Centrales de México, Palma *et al.* (2012) reportaron una amplia diversidad fenotípica floral en una variedad común de caléndula, y eligió seis morfotipos florales de esa población heterogénea, a las cuales denominó del S1 al S6; cada morfotipo varía en el número de flores liguladas por capítulo floral y en el color de lígulas y flores tubulares. En México no se cuenta con información acerca del rendimiento y composición del aceite esencial de caléndula, y en particular de estos morfotipos florales.

Por tanto, el objetivo de este estudio fue comparar el rendimiento de aceite de esos seis morfotipos florales, así como en la composición de éstos, a través de diferentes fechas de corte de capítulos, a partir de extractos obtenidos con la técnica de enfleurage.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal consistió en seis morfotipos florales de caléndula denominadas S1 al S6, que provenían de una variedad heterogénea que se cultiva comercialmente en los Valles Centrales de México.

Enfleurage

Para la extracción de aceites esenciales de capítulos florales de caléndula, se estableció una microtécnica que combina los principios de extracción de enfleurage en frío y enfleurage caliente, que utiliza como extractante a la manteca vegetal de Karité (*Vitellaria paradoxa* C. F. Gaertn.), como se describió en el capítulo anterior.

La microtécnica consistió en utilizar 100 g de esta grasa calentada a 40 °C hasta obtener una consistencia líquida sin llegar a ebullición, y una vez así sobre la grasa se colocaron 3 g de material vegetal seco y se dejó durante 20 min a temperatura constante de 40 °C. Transcurrido ese tiempo la grasa líquida se vertió sobre una placa de vidrio que se encontraba sobre una cama de hielo para asegurar su rápida solidificación. Luego se agregaron 5 g más de material vegetal seco, como se hace en el enfleurage en frío, se dejó extraer durante 4 d y al final se volvió a calentar la grasa, se filtró y se extrajo con 50 mL de etanol a 95 % a 60 °C.

El extracto con aceites se centrifugó a $4499.95 \times g$ por 5 min y se volvió a filtrar al vacío para eliminar los detritos de la grasa, y el etanol recuperado se concentró en un rotavapor Büchi B-480® con vacío a 30 °C, hasta evaporar la mayor cantidad de solvente posible. El aceite fue transferido a un vial de 1.5 mL con una pipeta Pasteur donde se dejó evaporar el resto del solvente. Con el extracto final, el rendimiento de aceite se calculó al multiplicar el peso del aceite libre de solvente por 100 y dividir entre el peso seco del material vegetal seco del cual se partió.

Cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (CG-SM)

Se utilizó un cromatógrafo Hewlett Packard HP 6890 Series acoplado a un detector de masas HP 5973, en el que el extracto gasificado se hizo pasar por una columna HP5/ 50 m x 0.20 mm y 0.33 μm de grosor de fase estacionaria, con Helio como gas acarreador con pureza de 99.9

%, a un flujo de 1 mL min⁻¹; la temperatura del horno comenzó en 40 °C y aumentó 9 °C por min hasta alcanzar una temperatura de 220 °C; el inyector en modo “splitless” (no bifurcado) estuvo a una temperatura de 220 °C, y 280 °C como temperatura de interfase. Para el detector de masas, la temperatura de la fuente de iones fue de 230 °C y la del cuadrupolo de 250 °C. La energía de ionización fue de 70 eV.

Se inyectaron extractos a la misma concentración (90 %) obtenidos por enfleurage, en las condiciones anteriormente descritas. El porcentaje de composición de cada metabolito se calculó a partir de la suma de área total de los picos que componen al cromatograma, y se hizo una inyección de n-alcenos para calcular los índices de retención de Kovats.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con base en sus medias y desviaciones estándar, los morfotipos florares S1, S2, S3 y S6 mostraron un rendimiento constante a través de sus fechas de corte floral, a diferencia de los morfotipos S4 y S5 (Figura VII. 1), en especial el morfotipo S5 que mostró un aumento en el corte 6. Al respecto, el aumento en el contenido de aceite de una planta se ha descrito como un mecanismo que favorece a la polinización de la misma (Harbone, 1991), lo cual podría tener sentido biológico puesto que como se observó en el capítulo V, es el morfotipo S5 el que presentó el menor rendimiento floral, y por otro lado este corte (6) corresponde al corte en que todos los morfotipos presentan el mayor rendimiento floral.

Entonces, quizás este morfotipo, por generar un menor número de capítulos florales aumenta el contenido de aceites en estos mismos para hacerlos aún más atractivos a los polinizadores y aumentar sus posibilidades de ser polinizada, y así preservar su especie. Según Theis y Lerdau (2003), los terpenos pueden servir a una variedad de funciones, lo que incluye disuasión del herbívoro, toxicidad contra hongos, y atracción de polinizadores. Los terpenoides

involucrados con la atracción de polinizadores, sin embargo, tienden a estar situados en partes de la planta donde la resistencia al flujo es muy baja, y las tasas de flujo sustanciales pueden ocurrir incluso a bajas concentraciones, del orden de microgramos por gramo (Ayasse y Schiestl, 2000).

Mientras que Okoh *et al.* (2007) observaron un aumento lineal en el contenido total de aceite esencial a través de cortes en caléndula, en nuestro estudio se observó que este comportamiento puede variar entre morfotipos florales y que el aumento del rendimiento de aceite esencial puede no ocurrir necesariamente en todos los cortes florales, lo cual podría estar influenciado desde las condiciones climáticas, genotipo o morfotipo floral, ubicación geográfica o incluso hasta por el manejo del cultivo en campo.

Aquí no se observaron diferencias significativas entre morfotipos florales ni entre cortes en cuanto al contenido promedio de aceite esencial (Cuadro VII. 1), aunque en la interacción morfotipo x fecha de corte se observaron algunas diferencias notables, como el aumento del rendimiento de aceite en el morfotipo S2 en el corte 6 (5 ± 0.1 %) y el mínimo rendimiento del morfotipo S4 en el corte 1 (3.2 ± 0.02 %), además de una mayor variabilidad entre los cuatro cortes de estos dos morfotipos. Por otro lado, al combinar los valores de rendimiento promedio de aceite por corte con el rendimiento floral por hectárea (ver Capítulo V), se pueden observar diferencias en el rendimiento de aceite por hectárea, de la siguiente manera: 54.58, 52.11, 49.43, 46.56 y 36.70 kg ha⁻¹ para los morfotipos florales S1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente, donde el morfotipo floral S1 destaca como el mejor para obtener un mayor rendimiento de aceite.

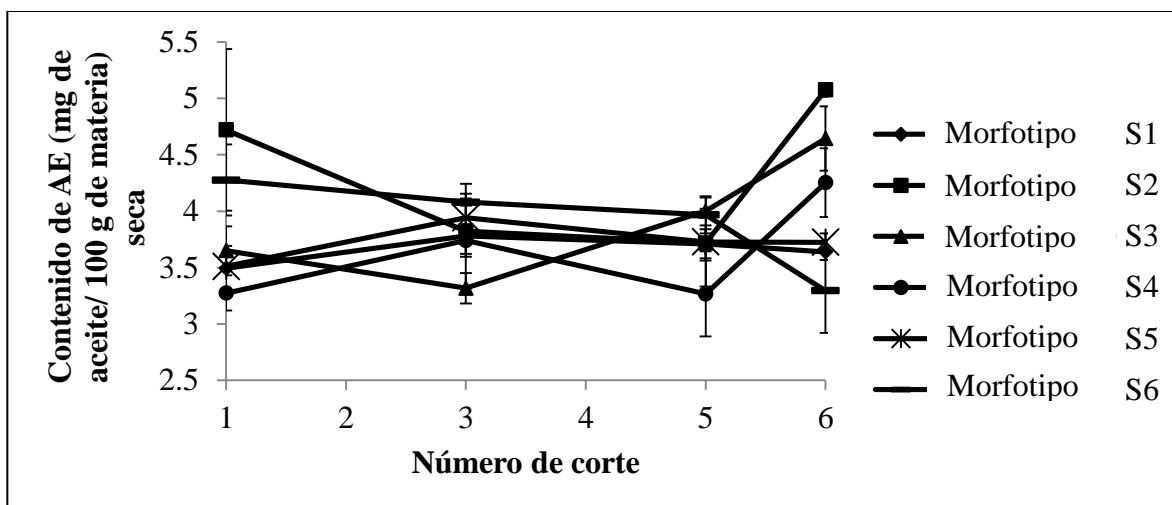


Figura VII. 1. Rendimiento de aceite esencial a través de fechas de corte en seis morfotipos florales de caléndula.

Cuadro VII. 1. Rendimiento de aceite en morfotipos de caléndula a través de fechas de cortes.

Corte	Morfotipos florales (% de acetite)						\bar{x} por corte
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	
1	3.5 ± 0.7	4.7 ± 1.4	3.7 ± 0.1	3.2 ± 0.06	3.5 ± 0.2	4.3 ± 0.6	3.8 ± 0.6
3	3.8 ± 0.9	3.8 ± 0.4	3.3 ± 0.3	3.7 ± 0.2	3.9 ± 0.4	4.1 ± 0.06	3.7 ± 0.3
5	3.7 ± 0.3	3.7 ± 0.3	4.0 ± 0.04	3.3 ± 0.7	3.7 ± 0.7	3.9 ± 0.3	3.7 ± 0.2
6	3.6 ± 0.1	5.0 ± 0.1	4.6 ± 0.3	4.3 ± 0.6	3.7 ± 0.2	3.3 ± 0.7	4.1 ± 0.7
\bar{x} por morfotipo	3.6 ± 0.1	4.3 ± 0.6	3.9 ± 0.5	3.6 ± 0.5	3.7 ± 0.2	3.9 ± 0.4	

± Desviación estándar (n= 3).

De acuerdo con el análisis cromatográfico, hubo variabilidad en la composición fitoquímica de los aceites esenciales entre morfotipos florales y dentro de los cortes de cada morfotipo floral, ya que se observó la presencia de diferentes metabolitos que conforman al aceite esencial. El morfotipo floral que presentó un mayor número de metabolitos tomando en

cuenta todos sus cortes fue el S4 con 24 metabolitos, seguido de los otros morfotipos en el siguiente orden descendente, S2 = S3 > S1 > S5 > S6, con 23, 23, 19, 17 y 15 metabolitos respectivamente (Cuadros VII. 2, VII. 3, VII. 4, VII. 5, VII. 6 y VII. 7).

El compuesto que se encuentra presente en todos los morfotipos florales y que siempre forma parte del aceite en mayor proporción es el δ -Cadineno, lo cual coincide con lo encontrado en Brasil, con un porcentaje de 22.5 % para este compuesto (Gazim, 2008). Aunque para el morfotipo floral S5 aquí utilizado se obtuvo la mayor acumulación de este compuesto en el corte 3 con 45.76 %, y que además fue siempre superior en todos sus cortes florales con valores de 32.86, 45.75, 40.78 y 44.87 % en los cortes 1, 3, 5 y 6 respectivamente (Cuadro VII. 5), lo que indica que este morfotipo floral es doblemente rico en este compuesto en comparación del utilizado en Brasil en al menos en tres cortes florales.

En algodón (*Gossypium* spp.), gopipol y sesquiterpenos aldehídicos relacionados que se derivan del precursor (+)- δ -Cadineno, proporcionan tanto en forma constitutiva como inducible, protección contra plagas y enfermedades (Ai-Xia, 2009). Tiene propiedades pro-apoptóticas, probablemente debido a la regulación de los genes *Bax* y *Bcl2*. También inhibe de forma reversible a la calcineurina y se une a la calmodulina, e inhibe la replicación del virus VIH-1 (Polsky *et al.*, 1989). A los aceites de caléndula se les ha atribuido esta misma actividad anti-VIH *in vitro*, basada en el ensayo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio MTT/tetrazolio. Esta actividad fue atribuida a la inhibición de HVI1-RT a concentraciones de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, y también a la supresión de la fusión del VIH con dosis de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Muley *et al.*, 2009), por lo que podría suponerse que esta actividad podría estar dada por la alta concentración de δ -Cadineno, que es el compuesto base del gopipol, un inhibidor eficaz de la proteína quinasa C.

También causa niveles bajos de potasio, y por lo tanto causa parálisis temporal (Bioscreening.net, 2008).

La ruta biosintética del gossipol es conocida y ocurre de la siguiente forma. El gossipol es un aldehído terpenoide que se forma metabólicamente a través del etilo por la ruta de isoprenoides (Burgos *et al.*, 1997). El sesquiterpeno dímero se somete a una reacción de acoplamiento de radicales para formar gossipol (Heinstein *et al.*, 1970). El pirofosfato de geranilo (GPP) e IPP forman a un precursor de sesquiterpenos, el difosfato de farnesilo (FPP), que sirve para formar gossipol. La biosíntesis comienza con el compuesto derivado de GPP e IPP. El catión Cadinil es oxidado por la (+)-D-Cadineno sintasa. El (+)-D-Cadineno está implicado en la fabricación de la unidad básica aromática denominada sesquiterpeno homogossipol, que por oxidación genera a la 8-hidroxi-D-Cadineno con la ayuda de (+)-D-Cadineno 8-hidroxilasa. El 8-hidroxi-D-Cadineno pasa a través de diversos procesos oxidativos para formar deoxihemigossipol, que se oxida por un electrón en hemigossipol y luego se somete a un acoplamiento oxidativo fenólico en posición orto a los grupos fenol, para formar finalmente gossipol. El acoplamiento es catalizado por una enzima dependiente de peróxido de hidrógeno (Dewick, 2008). Por tener el esqueleto base de este compuesto (δ -Cadineno) extraído del aceite de caléndula, podría establecerse un método de síntesis de gossipol a partir de este metabolito base.

Por otro lado, la concentración de este compuesto en caléndula podría funcionar como un posible marcador para elegir a los morfotipos que quizá podrían ser resistentes a plagas y enfermedades.

Otro compuesto que se encontró presente en casi todos los morfotipos y también en gran proporción fue el α -Cadineno con un promedio de 41 % en el morfotipo S5, mientras que Okoh

et al. (2008) reportaron a este metabolito con tan solo 13 % de la composición del aceite de esta misma planta. Su isómero 7-epi- α -Cadineno tuvo un promedio de 5.7 % en el morfotipo S4 que fue el que presentó la mayor presencia de este metabolito, lo cual coincide por lo descrito por Muley (2009) quien lo señaló como uno de los componentes principales del aceite esencial de caléndula.

Otro compuesto que se encontró en alta proporción en algunos morfotipos florales fue el α -Cadinol, el cual se ha mencionado que actúa como anti-fúngico (Ho, 2011) y hepatoprotector (Tung, 2011), y fue propuesto como un posible remedio para la tuberculosis resistente a medicamentos (Bueno, 2011). El α -Cadinol también se encuentra en especias como clavo y en el aceite esencial de *Juniperus communis* (Human Metabolome Data Base, 2014). Además, en los morfotipos S2 y S4 el Viridifloreno se encontró en un porcentaje considerable como constituyente del aceite, con 18.9 %; este compuesto ha sido reportado en aceites esenciales de *Machilus pseudolongifolia* (8.9 %) (Ho *et al.*, 2010), *Duguetia gardneriana* Mart. y *Duguetia moricandiana* Mart (24 %) (Almeida *et al.*, 2010), con actividad antimicrobiana en todos los casos.

Cuadro VII. 2. Compuestos presentes en aceite esencial de caléndula del morfotipo floral S1, a través de cuatro fechas de corte. IK, índice de Kovats.

Compuesto	Número de corte				
	IK	1	3	5	6
Benzaldehído	707	0.46	0.28	0	NP
Nonanal	1000	0.24	0.32	0.21	0.23
Careno	1048	0.60	NP	NP	NP
γ -Muuroleno	1502	1.16	0.74	0.74	NP
7-epi- α -cadineno	1507	3.76	5.66	3.12	1.08
Germacreno D	1510	NP	0.38	0.28	0.19
α -Muuroleno	1515	1.69	2.66	1.37	0.54
Cariofileno	1516	0.10	NP	0.06	0.09
δ -Cadineno	1519	5.60	6.76	4.47	2.37
α -Cubebeno	1520	0.43	0.66	0.44	0.22
α -Cadineno	1528	1.97	2.36	1.32	NP
Copaeno	1533	0.63	0.84	0.63	0.28
β -Cubebeno	1550	0.70	1.19	0.08	0.31
Epi-biciclosesquifelandreno	1551	1.10	0.90	0.98	NP
β -Gurjueno	1555	0.36	NP	NP	NP
γ -Gurjueno	1559	NP	NP	0.33	NP
τ -Cadinol	1560	NP	NP	0.60	0.17
α -Cadinol	1564	0.95	0.90	0.82	NP
Cedreno	1578	NP	NP	0.17	NP

NP = No presente

Cuadro VII. 3. Compuestos presentes en aceite esencial de caléndula del morfotipo floral S2, a través de cuatro fechas de corte. IK, índice de Kovats.

Compuesto	Número de corte				
	IK	1	3	5	6
Nonanal	1000	NP	0.69	NP	NP
γ -Muroleno	1502	2.99	NP	2.65	4.98
Epizonareno	1507	7.54	NP	8.01	NP
7-epi- α -cadineno	1507	NP	6.98	6.98	NP
Germacreno D	1510	NP	NP	1.53	NP
Isoledeno	1514	5.43	NP	5.23	NP
Viridiflorol	1514	NP	3.09	NP	NP
α -Muuroleno	1515	NP	NP	1.53	NP
δ -Cadineno	1519	29.27	40.96	39.94	39.05
α -Cubebeno	1520	NP	3.72	1.67	2.32
α -Cadineno	1528	NP	7.56	NP	7.08
Copaeno	1533	2.23	3.56	1.99	2.14
Aloaromandendreno	1547	NP	NP	1.84	NP
β -Cubebeno	1550	3.70	5.86	3.39	4.15
Longifoleno	1558	NP	1.60	NP	NP
γ -Gurjueno	1559	1.37	NP	NP	NP
τ -Cadinol	1560	NP	NP	3.81	NP
Aromadendreno	1563	0.28	NP	NP	NP
Valenceno	1563	NP	0.89	NP	NP
α -Cadinol	1564	NP	NP	4.33	NP
Viridiflorol	1567	NP	3.09	NP	NP
Sesquirofuran	1578	NP	NP	0.67	NP
α -Elemeno	1584	NP	NP	1.17	NP

NP = No presente

Cuadro VII. 4. Compuestos presentes en aceite esencial de caléndula del morfotipo floral S3, a través de cuatro fechas de corte. IK, índice de Kovats.

Compuesto	Número de corte				
	IK	1	3	5	6
Benzaldehído	707	NP	0.19	0.22	0.19
Nonanal	1000	0.23	0.42	0.30	0.29
γ -Muuroleno	1502	NP	NP	NP	0.68
7-epi- α -Cadineno	1507	1.08	2.81	2.94	0.92
Germacreno D	1510	0.19	0.18	0.10	0.11
Viridifloreno	1514	NP	1.05	NP	NP
α -Muuroleno	1415	0.54	1.29	NP	NP
Cariofileno	1516	0.09	NP	NP	NP
δ -Cadineno	1519	2.37	4.75	3.93	1.73
α -Cubebeno	1520	0.22	0.36	0.25	0.18
α -Cadineno	1528	NP	1.15	1.25	NP
Copaeno	1533	0.28	0.65	0.48	0.27
β -Cubebeno	1550	0.31	0.80	0.55	0.29
Epi-biciclosesquifelandreno	1551	NP	NP	0.30	NP
γ -Gurjuneno	1559	NP	NP	0.15	NP
τ -Cadinol	1560	0.17	0.39	0.29	0.07
τ -Muurolol	1561	NP	NP	0.69	NP
β -Patchouleno	1562	NP	0.06	NP	NP
Aromadendreno	1563	0.11	NP	0.14	NP
Valenceno	1563	NP	0.09	0.08	NP
α -Cadinol	1664	NP	0.49	NP	NP
Eremofileno	1612	NP	0.33	NP	NP
β -Amirina	3059	NP	NP	NP	0.44

NP = No presente

Cuadro VII. 5. Compuestos presentes en aceite esencial de caléndula del morfotipo floral S4, a través de cuatro fechas de corte. IK, índice de Kovats.

Compuesto	Número de corte				
	IK	1	3	5	6
Benzaldehído	707	0.92	0.98	0.72	0.47
Octanal	801	NP	1.07	NP	NP
Nonanal	1000	1.51	1.06	1.05	0.67
γ -Muuroleno	1502	NP	NP	1.13	NP
Epizonareno	1507	NP	0.20	0.21	0.17
7-epi- α -Cadineno	1507	2.94	7.41	5.10	6.04
Germacreno D	1510	NP	0.93	0.50	NP
Isoledeno	1514	NP	0.28	0.19	2.55
Viridifloreno	1514	6.05	NP	NP	3.60
α -Muuroleno	1515	NP	3.68	NP	NP
δ -Cadineno	1519	3.67	8.21	8.42	7.23
α -Cubeneno	1520	NP	0.50	NP	NP
α -Cadineno	1528	NP	2.41	NP	NP
Copaeno	1533	0.52	0.92	1.27	0.58
Aloaromadendreno	1547	0.79	NP	0.14	0.29
β -Cubeneno	1550	NP	0.50	NP	NP
Calareno	1556	NP	NP	0.29	0.43
Longifoleno	1558	NP	NP	0.09	0.24
γ -Gurjuneno	1559	0.75	NP	2.63	NP
Valenceno	1563	0.49	0.33	0.79	0.19
α -Elemeno	1584	NP	0.17	5.18	NP
γ -Selineno	1600	NP	0.23	NP	NP
Eremofileno	1612	1.78	NP	0.07	NP
β -Amirina	3059	NP	NP	NP	0.33

NP = No presente

Cuadro VII. 6. Compuestos presentes en aceite esencial de caléndula del morfotipo floral S5, a través de cuatro fechas de corte. IK, índice de Kovats.

Compuesto	Número de Corte				
	IK	1	3	5	6
Nonanal	1000	3.67	NP	NP	NP
γ -Muuroleno	1502	3.32	NP	NP	NP
7-Epi- α -cadineno	1507	NP	6.30	4.82	5.55
Isoledeno	1514	6.15	NP	NP	8.37
α -Muuroleno	1515	NP	8.37	7.34	NP
δ -Cadineno	1519	32.86	45.76	40.78	44.87
α -Cubebeno	1520	0.75	2.87	1.84	2.43
Copaeno	1533	2	2.97	2.81	3.08
Aloaromadendreno	1547	NP	NP	NP	1.32
β -Cubebeno	1550	2.39	5.85	4.70	4.99
γ -Gurjuneno	1559	1.07	NP	0.58	NP
τ -Cadinol	1560	6.11	3.05	NP	3.10
Valenceno	1563	NP	0.76	NP	NP
α -Cadinol	1564	7.84	NP	NP	NP
α -Elemeno	1584	NP	2.60	NP	NP
γ -Selineno	1600	NP	NP	NP	4.82
β -Amirina	3059	NP	NP	1.73	NP

NP = No presente

Cuadro VII. 7. Compuestos presentes en aceite esencial de caléndula del morfotipo floral S6, a través de cuatro fechas de corte. IK, índice de Kovats.

Compuesto	Número de corte				
	IK	1	3	5	6
Nonanal	1000	9.96	5.08	NP	NP
γ -Muuroleno	1502	19.38	2.66	2.43	1.79
Epizonareno	1507	NP	NP	NP	2.60
Germacreno D	1510	NP	1.05	3.88	1.06
Isoledeno	1514	3.95	4.70	5.42	NP
Viridifloreno	1514	14.49	NP	NP	NP
α -Muuroleno	1515	NP	NP	NP	5.01
δ -Cadineno	1519	28.03	32.61	29.02	25.32
α -Cubebeno	1520	NP	1.56	1.24	1.57
Copaeno	1533	NP	2.41	1.98	2.44
β -Cubebeno	1550	NP	3.65	4.02	NP
Valenceno	1561	NP	1.19	1.43	NP
τ -Muurolol	1563	NP	NP	NP	1.12
α -Cadinol	1564	NP	NP	4.06	NP
α -Elemeno	1584	NP	NP	8.06	0.72

NP = No presente

Okoh *et al.* (2007) también observaron variación en la presencia, ausencia y porcentaje de los compuestos que conforman al aceite esencial de caléndula cosechada a través del tiempo o cortes florales.

La mayoría de los compuestos encontrados como componentes del aceite esencial concuerdan con los reportados en la literatura (Okoh *et al.*, 2007; Gazim, 2008; Okoh *et al.*, 2008; Muley, 2009; Król, 2011). Pero conviene destacar que en los morfotipos florales S2, S4 y S6 se detectó Epizonareno en algunos cortes el cual no se ha reportado como componente del aceite esencial de caléndula (Cuadros VII. 2, VII. 4 y VII. 6).

CONCLUSIONES

Existe variabilidad de metabolitos secundarios entre morfotipos florales y a través de fechas de corte. El morfotipo floral que presenta una mayor diversidad de compuestos en su aceite es el S4. No hubo diferencias significativas entre los seis morfotipos y las cuatro fechas de corte en cuanto al contenido de aceite en los capítulos florales, excepto en el morfotipo S2 que en el sexto corte produjo mayor cantidad que en los anteriores. El mejor morfotipo para la obtención de aceite esencial tomando en cuenta su rendimiento promedio por corte y su rendimiento floral es el morfotipo floral S1.

LITERATURA CITADA

- Ai-Xia C., L. M. Yong-Gen, L. S. Ying-Bo, W. Ling-Jian, C. Xiao-Ya. 2009. Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology* 49(2):179-186
- Almeida JR. GdS., R. Facanali, MAR. Vieira, MOM. Marques, ASSC. Lúcio, EdO. Lima, MdF. Agra, and JM. Barbosa-Filho. 2010. Composition and Antimicrobial Activity of the Leaf Essential Oils of *Duguetia gardneriana* Mart. and *Duguetia moricandiana* Mart. (Annonaceae). *Journal of essential oil research* 22: 275-278.

Ayasse M., F. P. Schiestl, H. F. Paulus, C. Lofstedt, B. Hansson, F. Ibarra, and W. Francke. 2000. Evolution of reproductive strategies in the sexually deceptive orchid *Ophrys sphegodes*: how does flower-specific variation of odor signals influence reproductive success?. *Evolution* 54:1995-2006.

Bioscreening.net. Gossypol (Gossipol). (last updated 2008-07-09).

Bueno J., P. Escobar, J. R. Martínez, S. M. Leal, and E. E. Stashenko. 2011. Composition of three essential oils, and their mammalian cell toxicity and antimycobacterial activity against drug resistant-tuberculosis and nontuberculous mycobacteria strains. *Natural Product Communications* 6(11): 1743-8

Dewick P. M. 2008. *Medicinal Natural Product: A Biosynthetic approach*. 3rd ed., ED. WILEY, New York. 515 pp.

Harborne J. B. 1991. *Introduction to Ecological Biochemistry*. 4th Edition. Academic Press, London

Heinstein P. F., L. D. Herman, B. S. Tove, H. F. Smith. 1970. Biosynthesis of Gossypol. *Journal of Biological Chemistry* 245 (18): 4658–4665.

Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca/>)

Gazim Z. C., C. Moraes Rezende, S. R. Fraga, F.B. Prado Días, C. Vataru Nakamura, and D. A. Garcia Cortez. 2008. Analysis of the essential oils from *Calendula officinalis* growing in Brazil using three different extraction procedures. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science* 44 (3): 391–395.

Ho C. L., P. C Liao, K. P. Hsu, E. I. Wang, W. C Dong, and Y. C. Su. 2010. Composition and antimicrobial and anti-wood-decay fungal activities of the leaf essential oils of *Machilus pseudolongifolia* from Taiwan. *Natural product communications* 5: 1143-1146.

Ho C. L., P. C Liao, E. I. Wang, W. C Dong, and Y. C. Su. 2011. Composition and antifungal activities of the leaf essential oil of *Neolitsea parvigemma* from Taiwan. *Natural Product Communications* 6(9): 1357–60.

- Muley B. P., S. S. Khadabadi and N. B. Banarase. 2009. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 8 (5): 455-465.
- Okoh O. O., A. Sadimenko., and A. J. Afolayan. 2007. The effects of age on the yield and composition of the essential oils of *Calendula officinalis*. *Journal of applied Science* 7(23): 3806-3810.
- Okoh O. O., A. P. Sadimenko, O.T. Asekun, and A. J. Afolayan. 2008. The effects of drying on the chemical components of essential oils of *Calendula officinalis* L. *African Journal of Biotechnology* 7 (10): 1500-1502.
- Palma Tenango M., V. A. González Hernández y R. M. Soto Hernández. 2013. Variación Genética y Ambiental en el Contenido de Flavonoides en Capítulos de Caléndula. *In: Avances de Investigación 2012*. Cruz-Izquierdo S., O. J. Ayala-Garay, N. Cruz-Huerta, I. Ramírez-Ramírez, E. Martínez-Villegas (Eds.). Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad–Genética. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 93 p.
- Polsky B., SJ. Segal, PA. Baron, JW Gold, H. Ueno, and D. Armstrong. 1989. "Inactivation of human immunodeficiency virus in vitro by gossypol". *Contraception* 39 (6): 579–87.
- Theis N. and M. Lerdau. 2003. The evolution of function in plant secondary metabolites. *Int. J. Plant Sci.* 164(3):93–102.
- Tung Y. T., C. C. Huang, S. T. Ho, Y. H. Kuo, C. C. Lin, C. T. Lin, and J. H. Wu. 2011. Bioactive phytochemicals of leaf essential oils of *Cinnamomum osmophloeum* prevent lipopolysaccharide/D-galactosamine (LPS/D-GalN)-induced acute hepatitis in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(15):8117-8123.

CAPÍTULO IX. DISCUSIÓN GENERAL

La máxima acumulación de biomasa se observó a los 87 días después del trasplante en el morfotipo floral S1, con 228 g de materia seca por planta. La mayor fuerza de demanda (FD) medida por la tasa absoluta de crecimiento (TAC) tanto en órganos vegetativos como reproductores, se observó en el morfotipo floral S1, lo cual era esperado puesto que al definirse la TAC como la cantidad de biomasa (g) acumulada por día (d) entonces el morfotipo que presentaría la mayor FD sería aquel que acumulara mayor cantidad de biomasa por día.

Respecto al área foliar (AF), fueron los morfotipos florales S1 y S2 los que presentaron la mayor magnitud de esta característica, y fueron iguales entre ellos, pero el morfotipo floral S2 posee una cantidad mayor de biomasa en hojas que el S1 (45.76 ± 0.91 y 38.78 ± 2.60 respectivamente). Una posible explicación a que ambos morfotipos tengan la misma AF pero con diferentes pesos específicos (peso/área), por lo que el morfotipo que presenta mayor peso en hojas sería así porque sus hojas son más densas y pesan más.

En cuanto a los órganos reproductores, fueron los morfotipos florales S2 y S1 los que mostraron la mayor acumulación de biomasa en estos órganos, aunque en rendimiento floral fue el morfotipo floral S1 el que tuvo el mayor valor. El que no haya plena concordancia en acumulación de biomasa en órganos reproductores, se debe a que para obtener el rendimiento floral sólo se tomaron en cuenta capítulos florales completamente maduros, mientras que para obtener los datos de acumulación promedio de biomasa en los órganos de interés se tomaron en cuenta tanto capítulos florales maduros como inmaduros, lo que sugiere que los capítulos florales del morfotipo floral S1 maduraron más rápidamente con respecto de los del morfotipo floral S2, de modo que en cada corte había un mayor número de capítulos florales cosechables en las plantas del morfotipo floral S1 que en el S2, al momento del corte o cosecha floral.

Referente a las cinéticas fotosintéticas, todos los morfotipos florales con excepción del S1, se encuentran limitados por la velocidad máxima de carboxilación (V_{cmax}) puesto que ésta varía afectando a la tasa de regeneración de la enzima Rubisco (J), pero sin afectar a la tasa de uso de las triosas fosfatadas (TPU). El morfotipo floral S1 que tiene una menor V_{cmax} también posee un valor de TPU mucho más bajo que el resto de los morfotipos florales; esto puede comprobarse al observar que este morfotipo posee el valor de A_{max} más bajo (26) y presenta una caída de la fotosíntesis en la cinética fotosintética al momento de aumentar la concentración de CO_2 interno en la hoja (Sharkey y Vasey, 1989) al rebasar al punto de saturación del mismo (parte asintótica de la cinética). La limitación por TPU indica que la planta no tiene la capacidad de utilizar los fotoasimilados a la misma velocidad con que están siendo sintetizados (Sharkey *et al.*, 2007).

Debido a estas limitaciones se esperaría que el morfotipo floral S1 fuera una planta con baja eficiencia de crecimiento, aunque los resultados muestran lo contrario porque fue el que logró la mayor acumulación de biomasa y de rendimiento floral. Esto puede ser posible en primera instancia debido a que este morfotipo posee un mayor tamaño de fuente (AF) que los otros morfotipos florales ($14,939 \pm 645 \text{ cm}^2$), por lo que también produce una mayor cantidad de fotoasimilados que pueden utilizarse para el crecimiento. Además de esta característica, el morfotipo floral S1 posee el aparato fotosintético más eficiente en cuanto a la asimilación de CO_2 , puesto que su punto de compensación por CO_2 (concentración mínima para que la fotosíntesis iguale a la respiración foliar), es el más bajo (2.4 Pa) entre los seis morfotipos aquí evaluados.

En rendimiento de aceite esencial los valores promedio fueron 3.65, 4.3, 3.9, 3.62, 3.72 g de aceite por 100 g de materia floral seca, para los morfotipos florales S1, 2, 3, 4, 5 y 6

respectivamente, que se encuentran por encima de los valores previamente reportados para rendimiento de aceite esencial en caléndula que son de 0.97 % en plena floración (Okoh *et al.*, 2007). Esto es debido a que la técnica de extracción aquí utilizada para la extracción fue una combinación de enfleurage frío y caliente, como se observó en la extracción de aceite esencial de *Polianthes tuberosa* que al ser extraído por enfleurage en caliente el rendimiento de aceite esencial fue de 6.58 %, que representa un aumento de 99.58 % con respecto al obtenido por maceración en hexano de 0.0279 % (Rakthaworn, 2009).

El morfotipo floral S2 fue el que mostró el mayor rendimiento promedio de aceite esencial. No obstante, al combinar los resultados de rendimiento floral con los contenidos para calcular los rendimientos de aceite esencial por ha, se encontraron los siguientes resultados: 54.58, 52.11, 49.43, 46.56 y 36.70 kg ha⁻¹ para los morfotipos florales S1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente, que están en el mismo orden que los datos de rendimiento floral. Se aprecia entonces que aunque el morfotipo floral S2 sea el que tenga el mayor contenido promedio de aceite esencial con respecto al de los otros morfotipos florales, es el morfotipo S1 el que produce un mayor rendimiento de aceite esencial por hectárea simplemente porque produce un mayor rendimiento acumulado de capítulos florales, que son los órganos de donde se extrae el aceite.

CAPÍTULO X. CONCLUSIONES GENERALES

Todos los morfotipo florales valuados presentaron cinéticas de crecimiento tipo sigmoideal tanto en biomasa total como en los órganos que los componen, pero difirieron en la duración de sus fases del crecimiento y en sus correspondientes tasas de crecimiento, sobre todo en las fases de aceleración y de desaceleración. La fuerza de demanda por fotoasimilados es 10 veces mayor en los órganos vegetativos que en los reproductores. Todos los morfotipos florales dirigen mayor proporción de biomasa a los tallos, con excepción del morfotipo floral S2 que asigna más biomasa a las hojas. Una larga fase de desaceleración acoplada con mayor duración de crecimiento del área foliar permitieron al morfotipo floral S1 alcanzar un crecimiento superior al de los demás morfotipos.

La limitante fotosintética en los morfotipos florales S2, S3, S4 y S5 es la velocidad máxima de carboxilación (V_{cmax}), y en el morfotipo S1 es la tasa de uso de las triosas fosfatadas (TPU). Además, el morfotipo floral S1 es el más eficiente en cuanto a la asimilación de CO_2 y con un mayor tamaño de fuente (AF), lo que le confiere capacidades superiores de crecimiento, rendimiento floral y aceite esencial sobre los otros morfotipos florales. El mejor morfotipo floral para la obtención de aceites esenciales también es el morfotipo floral S1, con un rendimiento de 54.58 kg ha^{-1} que se encuentra por encima del de los otros morfotipos. El δ -Cadineno es el principal componente del aceite esencial en todos los morfotipos florales de caléndula, pues constituye 22 % en promedio de morfotipos, y hasta 45 % de la composición del aceite en el morfotipo floral S5 en el corte 2.