

COMPOSICIÓN DEL ACEITE ESENCIAL EN GERMOPLASMA DE *Tagetes filifolia* Lag. DE LA REGIÓN CENTRO-SUR DE MÉXICO

COMPOSITION OF ESSENTIAL OIL IN GERMPLASM OF *Tagetes filifolia* Lag. FROM CENTRAL-SOUTH REGION OF MÉXICO

Miguel Á. Serrato-Cruz¹, Francisco Díaz-Cedillo² y Juan S. Barajas-Pérez³

¹ Metodología de Investigación. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. 56230. Chapingo, Estado de México. (serrato@correo.chapingo.mx). ² Departamento de Química Orgánica. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. Prolongación Carpio y Plan de Ayala, Casco de Santo Tomás. 11340, México, D. F. ³ Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional. San Isidro Km 8.5 Carretera Yautepec-Jojutla. 62730. Yautepec, Morelos, México.

RESUMEN

Los aceites esenciales de *Tagetes filifolia* tienen potencial para controlar insectos biotransmisores de virus en plantas. El objetivo del presente estudio fue evaluar la composición del aceite esencial de 78 recolectas de *T. filifolia* de la región centro-sur de México, establecidas en Chapingo, México. Cuando las plantas presentaron floración se hizo la extracción de aceites esenciales por arrastre de vapor usando 500 g de tejido de la planta completa. La composición química del aceite se determinó con cromatografía de gases acoplada a masas. Los compuestos principales del aceite fueron 4-alilanisol y *trans*-anetol (4-propenilanisol), en forma individual o en mezcla: 1.3% de las recolectas sólo con anetol, 7.7% de las recolectas sólo con alilanisol y 91% de recolectas con mezcla. En las recolectas con mezcla de anetol y alilanisol, la proporción de estos compuestos químicos fue variable.

Palabras clave: *Tagetes filifolia*, aceites esenciales, composición química, germoplasma mexicano.

INTRODUCCIÓN

El empleo de aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas es una opción importante para controlar insectos (Calmasur *et al.*, 2006; Isman, 2006), hongos (Terblanche y Cornelius, 2000) y nemátodos (Perez *et al.*, 2003) causantes de fuertes daños a la agricultura. El uso del aceite esencial de la especie aromática *Tagetes filifolia* Lag. tiene amplio potencial contra nemátodos e insectos biotransmisores de virus (Cubillo *et al.*, 1999; Serrato, 2003; Serrato *et al.*, 2005). Los bajos costos de producción del aceite esencial de esta especie (Serrato, 2003) y su origen orgánico, representan una opción económica y ecológica importante comparada con productos insecticidas de origen sintético, los cuales, además de ser fuente de

Recibido: Mayo, 2007. Aprobado: Noviembre, 2007.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 42: 277-285. 2008.

ABSTRACT

The essential oils of *Tagetes filifolia* have potential for controlling insects that are biotransmitters of virus in plants. The objective of the present study was to evaluate the composition of the essential oil of 78 accessions of *T. filifolia* of the south-central region of México, established in Chapingo, México. When the plants presented flowering, the extraction of the essential oils was made by simple distillation process using 500 g of tissue of the complete plant. The chemical composition of the oil was determined with gas chromatography coupled to masses. The principal components of the oil were 4-alilanisole and *trans*-anethole (4-propenilanisole), individually or in mixture: 1.3% of the accessions only with anethole, 7.7% of the accessions only with alilanisole and 91% of accessions with mixture. In the accessions with mixture of anethole and alilanisole, the proportion of these chemical compounds was variable.

Key words: *Tagetes filifolia*, essential oils, chemical composition, Mexican germplasm.

INTRODUCTION

The use of essential oils extracted from aromatic plants is an important option for insect control (Calmasur *et al.*, 2006; Isman, 2006), fungi (Terblanche and Cornelius, 2000) and nematodes (Perez *et al.*, 2003) which cause important damage to agriculture. The use of essential oil of the aromatic species *Tagetes filifolia* Lag. has a broad potential against nematodes and virus transmitting insects (Cubillo *et al.*, 1999; Serrato, 2003; Serrato *et al.*, 2005). The low production costs of the essential oil of this species (Serrato, 2003) and its organic origin, represent an important economic and ecological option compared with insecticides of synthetic origin, which, besides being a source of environmental contamination and of damage to human health, are in part a cause of agricultural production systems being financially non feasible.

contaminación ambiental y de daño a la salud humana, parcialmente son causa de incosteabilidad de los sistemas de producción agrícolas.

Los compuestos químicos anetol y alilanisol, del grupo fenilpropanoides, constituyen la mayor parte del aceite esencial de *T. filifolia* (Zygadlo *et al.*, 1993; Feo *et al.*, 1998; Vila *et al.*, 2000). El anetol produce diferentes efectos biológicos como repelente, insecticida, fungicida, nematocida y bactericida y es un ingrediente activo del aceite esencial obtenido de las familias botánicas Lamiaceae y Apiaceae, especialmente de especies de los géneros *Timbra*, *Satureja*, *Origanum*, *Corydothymus*, *Pimpinella* y *Foeniculum*, las que contienen configuraciones químicas cis-anetol y trans-anetol (Tuzun y Yegen, 2000).

En la familia botánica *Asteraceae* la presencia de anetol es infrecuente, aunque en el género *Tagetes*, con centro de diversidad en México, las especies *T. filifolia* y *T. mandonii* contienen anetol en su aceite esencial. En *T. mandonii*, 12.7% del aceite corresponde a fenilpropanoides y sólo 9.2% corresponde a cis-anetol (Senatore y Feo, 1999), composición muy pobre comparada con la de *T. filifolia*, donde los fenilpropanoides abundan y cuyas moléculas mayoritarias son anetol (33 a 68%) y alilanisol (13 a 61%) (Feo, 1998; Vila, 2000; Serrato *et al.*, 2005).

En la literatura sobre la composición del aceite de *T. filifolia* se advierten algunas diferencias: 1) el número de sus compuestos reconocidos varía de 33 (Vila *et al.*, 2000) a 57 (Feo *et al.*, 1998); 2) se ha encontrado tanto cis-anetol (Feo *et al.*, 1998) como trans-anetol (Zygadlo *et al.*, 1993; Vila *et al.*, 2000); 3) la cantidad de alilanisol y de anetol en la composición total del aceite esencial es 61.2% y 33.1% (Vila *et al.*, 2000), a 21% y 79% (Serrato *et al.*, 2005), o 13.7% y 68.3% (Feo *et al.*, 1998). Esta variabilidad en la composición química del aceite esencial de *T. filifolia* se puede deber a diferencias ambientales entre los lugares de origen del material analizado, ya que esta especie se distribuye en forma silvestre desde el sur de EE.UU. hasta Argentina (Neher, 1965). En México, la especie se localiza en altitudes de 600 a 2600 m en diferentes climas y suelos (Neher, 1965; Turner, 1996; Villarreal, 2004). Para *T. minuta* se ha encontrado variación en el contenido del aceite esencial asociada con la diversidad de hábitats de origen de las muestras, y se ha confirmado la existencia de quimiotipos (Gil *et al.*, 2000). Esta relación químico-ambiental también se ha encontrado en *Artemisia* (Putievsky *et al.*, 1992) y en *Mentha* (Chou y Zhou, 1998).

El primer antecedente sobre la composición esencial de materiales mexicanos de *T. filifolia* es el de Serrato *et al.* (2005), quienes usaron muestras de una población silvestre recolectada en Tlalám, Atlautla,

The chemical compounds anethole and alilanisole, of the phenylpropanoids group, comprise the major part of the essential oil of *T. filifolia* (Zygadlo *et al.*, 1993; Feo *et al.*, 1998; Vila *et al.*, 2000). Anethole produces different biological effects as repellent, insecticide, fungicide, nematocida and bactericide and is an active ingredient of the essential oil obtained from the botanical families Lamiaceae and Apiaceae, especially species of the genera *Timbra*, *satureja*, *Origanum*, *Corydothymus*, *Pimpinella* and *Foeniculum*, which contain cis-anethole and trans-anethole chemical configurations (Tuzun and Yegen, 2000).

In the botanical family *Asteraceae* the presence of anethole is infrequent, although in the genus *Tagetes*, with its center of diversity in México, the species *T. filifolia* and *T. mandonii* contain anethole in their essential oil. In *T. mandonii*, 12.7% of the oil corresponds to phenylpropanoids and only 9.2% corresponds to cis-anethole (Senatore and Feo, 1999), which is a very poor composition compared with that of *T. filifolia*, where the phenylpropanoids are abundant and whose molecules are for the most part anethole (33 to 68%) and alilanisole (13 to 61%) (Feo, 1998; Vila, 2000; Serrato *et al.*, 2005).

In the literature of the composition of the oil of *T. filifolia* some differences are observed: 1) the number of its recognized compounds varies from 33 (Vila *et al.*, 2000) to 57 (Feo *et al.*, 1998); 2) both cis-anethole (Feo *et al.*, 1998) and trans-anethole (Zygadlo *et al.*, 1993; Vila *et al.*, 2000) have been found; 3) the amount of alilanisole and of anethole in the total composition of the essential oil is 61.2% and 33.1% (Vila *et al.*, 2000), to 21% and 79% (Serrato *et al.*, 2005), or 13.7% and 68.3% (Feo *et al.*, 1998). This variability in the chemical composition of the essential oil of *T. filifolia* may be due to environmental differences among the places of origin of the material analyzed, given that this species is distributed in wild form from the southern part of the United States to Argentina (Neher, 1965). In México, the species is located at altitudes of 600 to 2600 m in different climates and soils (Neher, 1965; Turner, 1996; Villarreal, 2004). For *T. minuta*, variation has been found in the content of the essential oil associated with the diversity of habitats of origin of the samples, and the existence of chemotypes has been confirmed (Gil *et al.*, 2000). This chemical-environmental relationship has also been found in *Artemisia* (Putievsky *et al.*, 1992) and in *Mentha* (Chou and Zhou, 1998).

The first antecedent of the essential composition of Mexican materials of *T. filifolia* is that of Serrato *et al.* (2005), who used samples from a wild population collected in Tlalám, Atlautla, México, locality with transitional climate, altitude of 1720 m and alluvial

México, localidad con clima transicional, altitud de 1720 m y suelo aluvial. Al cultivar estas plantas de Tlalámac pero en las condiciones de Chapingo, con clima templado subhúmedo, altitud de 2240 m y suelo franco arcilloso, se encontró la presencia de alilanol 21 y *trans*-anetol 79%; este contenido fue constante durante diferentes fechas de cultivo de la especie.

El aceite esencial de *T. filifolia* constituye una importante fuente natural de anetol y alilanol, pero se desconoce la variabilidad en la composición de su aceite esencial en función del origen geográfico. El conocimiento de la composición del aceite esencial de *T. filifolia* es fundamental para poder utilizarlo en la agricultura mexicana, especialmente para su uso en el control de insectos plaga (Serrato *et al.*, 2003).

El Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos de la Secretaría de Agricultura Ganadería y Recursos de Pesca en México, aprobó un proyecto para la recolección y caracterización de *T. filifolia*, incluyendo la conformación de un Banco de Germoplasma Nacional con materiales de las regiones centro-sur, sur y norte de México. La caracterización morfológica preliminar de recolectas de la región centro-sur indica que es amplia la variabilidad de estos materiales, los cuales crecen en 27 variantes climáticas en altitudes de 750 a 2686 m (Serrato y Barajas, 2006). Los distintos aromas reconocidos cualitativamente en recolectas de esta región geográfica permiten suponer una composición química diferente (Serrato y Barajas, 2006). Con base en los planteamientos expuestos, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la composición del aceite esencial en germoplasma de *T. filifolia* proveniente de la región centro-sur de México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedencia de las recolectas

De septiembre a noviembre del 2004 se hizo la primera exploración botánica a localidades de varios Estados de la región centro-sur de México y se depositaron 104 accesiones de semillas en el Banco de Germoplasma Salvador Miranda Colín de la Universidad Autónoma Chapingo (Serrato y Barajas, 2006), pero sólo 78 de esas recolectas se incluyeron en el presente estudio (Cuadro 1) debido a distintos problemas para el establecimiento del total de recolectas.

Establecimiento de las recolectas

El 18 de junio de 2005 se sembraron 30 semillas de cada recolecta de la cosecha del 2004 en bandejas de poliestireno expandido para germinación, de 200 cavidades, que se mantuvieron en invernadero. Las plántulas se llevaron al Campo Agrícola Experimental del Departamento de Fitotecnia, en la Universidad Autónoma Chapingo;

soil. When these plants from Tlalámac were cultivated under conditions of Chapingo, with sub-humid temperate climate, altitude of 2240 m and loam clay soil, the presence of alilanol (21%) and *trans*-anethole (79%); this content was constant during different cultivation dates of the species.

The essential oil of *T. filifolia* comprises an important natural source of anethole and alilanol, but the variability in the composition of its essential oil as a function of its geographic origin is unknown. The knowledge of the composition of the essential oil of *T. filifolia* is fundamental for being able to use it in Mexican agriculture, especially for its use in the control of insect pests (Serrato *et al.*, 2003).

The Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos of the Secretaría de Agricultura Ganadería y Recursos de Pesca in México, approved a project for the accession and characterization of *T. filifolia*, including the conformation of National Germplasm Bank with materials from the south-central, southern and northern regions of México. The preliminary morphological characterization of accessions from the south-central region indicates that the variability of these materials is broad, and which grow in 27 climatic variations at altitudes that range from 750 to 2686 m (Serrato and Barajas, 2006). The distinct aromas that are qualitatively recognized in accessions from this geographic region make it possible to assume a different chemical composition (Serrato and Barajas, 2006). Based on the abovementioned information, the objective of the present study was to evaluate the composition of the essential oil in germplasm of *T. filifolia* from the south-central region of México.

MATERIALS AND METHODS

Origin of the accessions

From September to November of 2004, the first botanical exploration was made in localities of various states of the south-central region of México. From this process, 104 seed accessions were deposited in the Banco de Germoplasma Salvador Miranda Colín of the Universidad Autónoma Chapingo (Serrato and Barajas, 2006), but only 78 of these accessions were included in the present study (Table 1) due to different problems for the establishment of the total of accessions.

Establishment of the accessions

On June 18 of 2005, 30 seeds were sown from each accession of the 2004 harvest in trays of expanded polystyrene for germination, of 200 cavities, which were maintained in the greenhouse. The seedlings were taken to the Experimental Agricultural Field of the Plant Science Department, in the Universidad Autónoma Chapingo;

Cuadro1. Procedencia de 78 recolectas de *T. filifolia* obtenidas en la región centro-sur de México.
Table 1. Precedence of 78 accessions of *T. filifolia* obtained in the south-central region of México.

Colecta	Localidad	Coordenadas (N; O)	Clima (García, 1981)	Altitud (m)
Sierra Madre Oriental				
36	Zacatlán, Puebla	20° 00.181' ;98° 05.888'	C (w ₂) (w) b (i')	2404
35	Zacatlán, Puebla	19° 57.044' ;98° 03.310'	C (w ₂) (w) b (i')	2567
75	Zacapoaxtla, Puebla	19° 55.778' ;97° 35.693'	(A) C (w ₂) b (i')	1680
4, 6 a 9, 101	Zacatlán, Puebla	20° 08' ; 98° 12'	C (w ₂) (w) b (i')	2000
1	Xicotepetec, Puebla	20° 14' ; 98° 01'	C (w ₂) (w) b (i')	1700
2 y 3	Zentla, Veracruz	19° 07' ; 96° 52'	(A) C (m) (f)	1860
5	Ixhuatlán, Veracruz	19° 03' ; 96° 59'	C (m) (f)	1840
99	Naolinco, Veracruz	18° 43.775' ;97° 04.024'	C (fm) w ₂ b (i')	1505
100	Zentla, Veracruz	19° 7' ; 96° 52'	(A) C (w ₁)	940
19	Totutla, Veracruz	19° 12.732' ;96° 49.740'	C (w ₂)	846
Eje Neovolcánico Oriental				
90	Acajete, Veracruz	19° 34.864' ;96° 59.513'	C b' (w ₂)	1824
21	Acajete, Veracruz	19° 06.724' ;97° 01.929'	C b' (w ₂)	2187
102	Tlacolula, Veracruz	19° 06.724' ;97° 01.929'	C b' (w ₂)	2187
Eje Neovolcánico Central				
23 a 29	Yecapixtla, Morelos	18° 53.040' ;98° 51.996'	C (w ₂) x'	1558
104	Atlautla, México	19° 05' ; 98° 49'	(A) C b' (w ₂)	1780
31 a 34	Nepantla, México	18° 58.611' ;98° 50.380'	C b' (w ₂)	1980
37 a 40	Ecatzingo, México	18° 58.150' ;98° 45.104'	C b' (w ₂)	2557
Eje Neovolcánico Occidental				
41	Pátzcuaro, Mich.	19° 20.099' ;101° 42.291'	C (w ₂) (w) b (e) g	2153
42	Tingambato, Mich.	19° 29.500' ;101° 52.568'	(A) C (w ₂) (w) b (i') g	1893
43 a 45	Uruapan, Michoacán	19°20.059' ;102°04.742'	(A) C (w ₂) (w) b (i') g	1454
46	Uruapan, Michoacán	19°15.648' ;102°03.313'	(A) C (w ₂) (w) b (i') g	973
49 a 51	Tancitaro, Michoacán	19°21.185' ;102°22.505'	(A) C (w ₁) (w) b (e)	2066
52 a 54	Periban, Michoacán	19°33.123' ;102°26.668'	(A) C (w ₁) (w) b i	1449
55	Los Reyes, Mich.	19°37.756' ;102°29.325'	(A) C (w ₁) (w) b i	1308
59	Tinguindín, Mich.	19°48.935' ;102°30.725'	(A) C (w ₁) (w) b i	1802
63 y 64	Chilchota, Michoacán	19° 48.934' ;102° 30.726'	C (w ₁) (w) b (i')	1780
66	Paracho, Michoacán	19° 48.934' ;102° 30.726'	C (w ₁) (w) b (i')	2286
67 y 69	Ziracuaretiro, Mich.	19° 27.647' ;101° 53.168'	(A) C (w ₂) (w) b (i') g	1719
70	Morelia, Michoacán	19° 39.087' ;100° 57.245'	C (Wo ₁) (w) b (i') g	2178
71	Zitácuaro, Michoacán	19° 39.088' ;100° 57.243'	C (w ₁ /w ₂) b (i') g	1653
91	Temascaltepec, Méx.	19° 09.997' ;99° 53.599'	BS ₁ k' w (w) (i')	2674
92	Temascaltepec, Mex.	19° 05.276' ;99° 59.398'	BS ₁ k' w (w) (i')	2155
93	Tejupilco, México	18° 55.231' ;100° 08.907'	BS ₁ k' w (w) (i')	1427
Sierra Madre Occidental				
16 a 18	Atotonilco, Jalisco	20° 27.059' ;102° 32.784'	(A) C (wo) (w) a (i')	1722
14, 15	Cocula, Jalisco	20° 22.519' ;102° 28.721'	BS ₁ (h') w (w) (e) g	1518
11	Sayula, Jalisco	19° 49.694' ;103° 37.610'	(A) C (w ₁) (w) a (e) g	1807
12, 13	San Gabriel, Jalisco	19° 47.812' ;103° 53.277'	A (C) (wo) (w) (i')	999
Sierra del Norte de Oaxaca				
86	Zongolica, Veracruz	18° 43.751' ;97° 03.849'	C (fm) w ⁿ b (e)	1993
87	Zongolica, Veracruz	18° 43.236' ;97° 03.808'	C (fm) w ⁿ b (e)	1830
88	Zongolica, Veracruz	18° 40.074' ;96° 57.590'	C (fm) w ⁿ b (e)	1453
89	Zongolica, Veracruz	18° 40.612' ;96° 56.157'	C (fm) w ⁿ b (e)	1004
77	Ayutla, Oaxaca	16° 59.098' ;96° 08.574'	C (w ⁿ 2) (w) b (i') g	1902
Sierra Madre del Sur				
80	Miahuatlán, Oaxaca	16° 13.798' ;96° 31.557'	BS ₁ h w ⁿ (w) (i') g	2361
81	Ciénega, Oaxaca	16° 12.538' ;96° 32.116'	(A) C (w0)x'	2388
82	Paxtla, Oaxaca	16° 10.271' ;96° 30.166'	(A) C (w0)x'	2476
94 y 95	Coyuca, Guerrero	17° 58.839' ;101° 13.746'	Awo (w) (e) g	1898
98	Coyuca, Guerrero	17° 49.272' ;100° 15.834'	Awo (w) (e) g	1403

el trasplante fue el 20 de julio de 2005 a una distancia entre plantas de 30 cm, en surcos de 5 m de largo y distancia entre ellos de 85 cm. Se aplicaron riegos rodados según necesidad de las plantas y deshierbes manuales.

transplanting took place on July 20 of 2005 at a distance of 30 cm between plants, in rows of 5 m length spaced at 85 cm. Irrigations were applied according to the requirements of the plants, along with manual weeding.

Extracción de aceite

Cuando las plantas se encontraban en plena floración, se prepararon muestras de toda la planta y se sometieron a un proceso de destilación simple. La extracción de aceite se inició el 18 de octubre de 2005 y duró una semana. Se empleó un equipo de destilación que consiste en fuente de energía, matraz de destilación (20 L) e intercambiador de calor. En el matraz de destilación se introdujo 0.5 kg de biomasa triturada (partículas 3-5 cm largo), se adicionaron 4 L de agua destilada calentada a punto de ebullición, se colocó el matraz en la fuente de energía (tela de asbesto cemento montada en una resistencia eléctrica) para una ebullición de 60 min (tiempo de destilación) y se recolectó el aceite de cada muestra con una probeta de 100 mL. De cada recolecta se realizaron tres extracciones.

Análisis del aceite

Muestras de aceite esencial puro (1 μ L) de cada recolecta se diluyeron en 2 mL de cloruro de metileno y de esta solución se tomó una muestra la cual se inyectó a un cromatógrafo de gases modelo Finnigan Trace GC Ultra, mediante un inyector Split a 250 °C, usando una columna RTX-5MX, 5% difenil-95% dimetilpolisiloxano, de 30 m X 0.25 mm D X 0.25 μ m, con detector de masas PolarizQ. Se usó un horno a temperatura inicial de 70 °C \times 1 min, con rampa de 20 grados por min, hasta una temperatura final de 250 °C. Se usó inyector con temperatura de la línea de transferencia de 300 y con velocidad de flujo de 50 mL min⁻¹; el tiempo de purga fue 1 min y se usó gas acarreador de He con presión de 100 kp; el volumen de la inyección fue 1 mL. El equipo de cromatografía se acopló al programa Xcalibur para realizar el proceso cuantitativo y obtener datos graficados.

La identificación y cuantificación de los compuestos se realizaron comparando los tiempos de retención cromatográficos, espectros de masas y de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ¹H), con los determinados a partir de patrones auténticos de alilanisol y de *trans*-anetol. En todas las muestras el porcentaje de cada compuesto de la mezcla se estableció relacionando el área bajo la curva del compuesto identificado con la de un estándar interno de *trans*-anetol o de alilanisol a una concentración de 15 mg mL⁻¹. Todas las calibraciones de patrones y muestras fueron por triplicado (Zhang y Zuo, 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cromatograma del aceite presentó dos señales principales con tiempos de retención a 5.50 y 6.20 min. Muestras de aceite con una sola señal se analizaron por RMN ¹H; el análisis de estos espectros (desplazamiento químico, constantes de acoplamiento y multiplicidad de las señales) permitió identificar que el pico a 5.50 min corresponde a alilanisol (4-alilanisol) y el de 6.20 al *trans*-anetol (4-propenilanisol). Se inyectaron patrones de alilanisol y *trans*-anetol al

Extraction of oil

When the plants were in full flowering, samples of the entire plant were prepared, which were subjected to a distillation process. The extraction of oil was started on October 18 of 2005 and lasted for one week. The distillation equipment consisted of an energy source, distillation flask (20 L) and heat exchanger. Next, 0.5 kg of macerated biomass was introduced into the distillation flask (particles 3-5 cm in length), 4 L of distilled water at the boiling point was added, the flask was placed on the energy source (cement-asbestos screen placed on an electric burner) and boiled for 60 min (distillation time), and the oil was collected from each sample with a 100 mL test tube. Three extractions were made from each accession.

Analysis of the oil

Samples of the pure essential oil (1 μ L) from each accession were distilled in 2 mL of methylene chloride, and from this solution a sample was taken to be injected into a gas chromatograph, model Finnigan Trace GC Ultra, by means of a Split injector at 250 °C, using an RTX-5MX column, 5% diphenyl-95% dimethylpolysiloxane, of 30 m X 0.25 mm D X 0.25 mm, with PolarizQ mass detector. Initial oven temperature was 70 °C \times 1 min, with ramp of 20 degrees per min, until reaching the final temperature of 250 °C. An injector was used with temperature of the transference line of 300 and with flow velocity of 50 mL min⁻¹; the purge time was 1 min and a He gas carrier was used with pressure of 100 kp; the injection volume was 1 mL. The chromatograph equipment was coupled to the Xcalibur program to carry out the quantitative process and to obtain graphed data.

The identification and quantification of the compounds were carried out by comparing the chromatographic retention times, mass spectra and nuclear magnetic resonance of hydrogen (RMN ¹H), with the determinants from authentic patterns of alilanisole and of *trans*-anethole. In all of the samples, the percentage of each compound of the mixture was established by relating the area below the curve of the identified compound with that of an internal standard of *trans*-anethole or of alilanisole at a concentration of 15 mg mL⁻¹. All the calibrations of patterns and samples were by triplicate (Zhang and Zuo, 2004).

RESULTS AND DISCUSSION

The chromatograph of the oil presented two principal signals with retention times at 5.50 and 6.20 min. Oil samples with a single signal were analyzed by RMN ¹H; the analysis of these spectra (chemical displacement, constants of coupling and multiplicity of the signals) made it possible to identify that the peak at 5.50 min corresponds to alilanisole (4-alilanisole) and that of 6.20 to *trans*-anethole (4-propenylanisol). Patterns of alilanisole and *trans*-anethole were injected to the chromatograph of gasses-masses and retention times of 5.50 and 6.20 min were registered, with which the

cromatógrafo de gases-masas y se registraron tiempos de retención de 5.50 y 6.20 min, lo cual confirmó la identidad de los componentes del aceite (Figura 1).

La composición química del aceite esencial de las 78 recolectas indicó la presencia mayoritaria de alilanisol y de *trans*-anetol (Cuadro 2), compuestos principales identificados por Zygaldo *et al.* (1993) y Vila *et al.* (2000). De acuerdo con la composición de las 78 recolectas analizadas, parece que la molécula de *trans*-anetol es frecuente en el germoplasma mexicano y distinta del *cis*-anetol que contiene *T. filifolia* en Sudamérica (Feo *et al.*, 1998).

Lo novedoso de estos resultados es que las recolectas presentaron una composición específica de alilanisol y de anetol (Cuadro 2): 1.3% de recolectas sólo contenían anetol, 7.7% sólo alilanisol y 91% contenían ambos compuestos, lo cual sugiere la posible existencia de quimiotipos. Antes sólo se había encontrado la mezcla de alilanisol y anetol en el aceite esencial de esta especie (Feo *et al.*, 1998; Vila *et al.*, 2000; Serrato *et al.*, 2005).

identity of the components of the oil were confirmed (Figure 1).

The chemical composition of the essential oil of the 78 accessions indicated the majority presence of alilanisole and of *trans*-anethole (Table 2), principal compounds identified by Zygaldo *et al.* (1993) and Vila *et al.* (2000). According to the composition of the 78 accessions analyzed, it seems that the *trans*-anethole molecule is frequent in the Mexican germplasm and different from the *cis*-anethole contained by *T. filifolia* in South America (Feo *et al.*, 1998).

What is surprising about these results is that the accessions presented a specific composition of alilanisole and of anethole (Table 2): 1.3% of accessions only contained anethole, 7.7% only alilanisole and 91% contained both compounds, which suggests the possible existence of chemotypes. Prior to this, only the mixture of alilanisole and anethole had been found in the essential oil of this species (Feo *et al.*, 1998; Vila *et al.*, 2000; Serrato *et al.*, 2005).

In the group of accessions with mixture of compounds (71 accessions), different tendencies were detected in the proportions of anethole and alilanisole

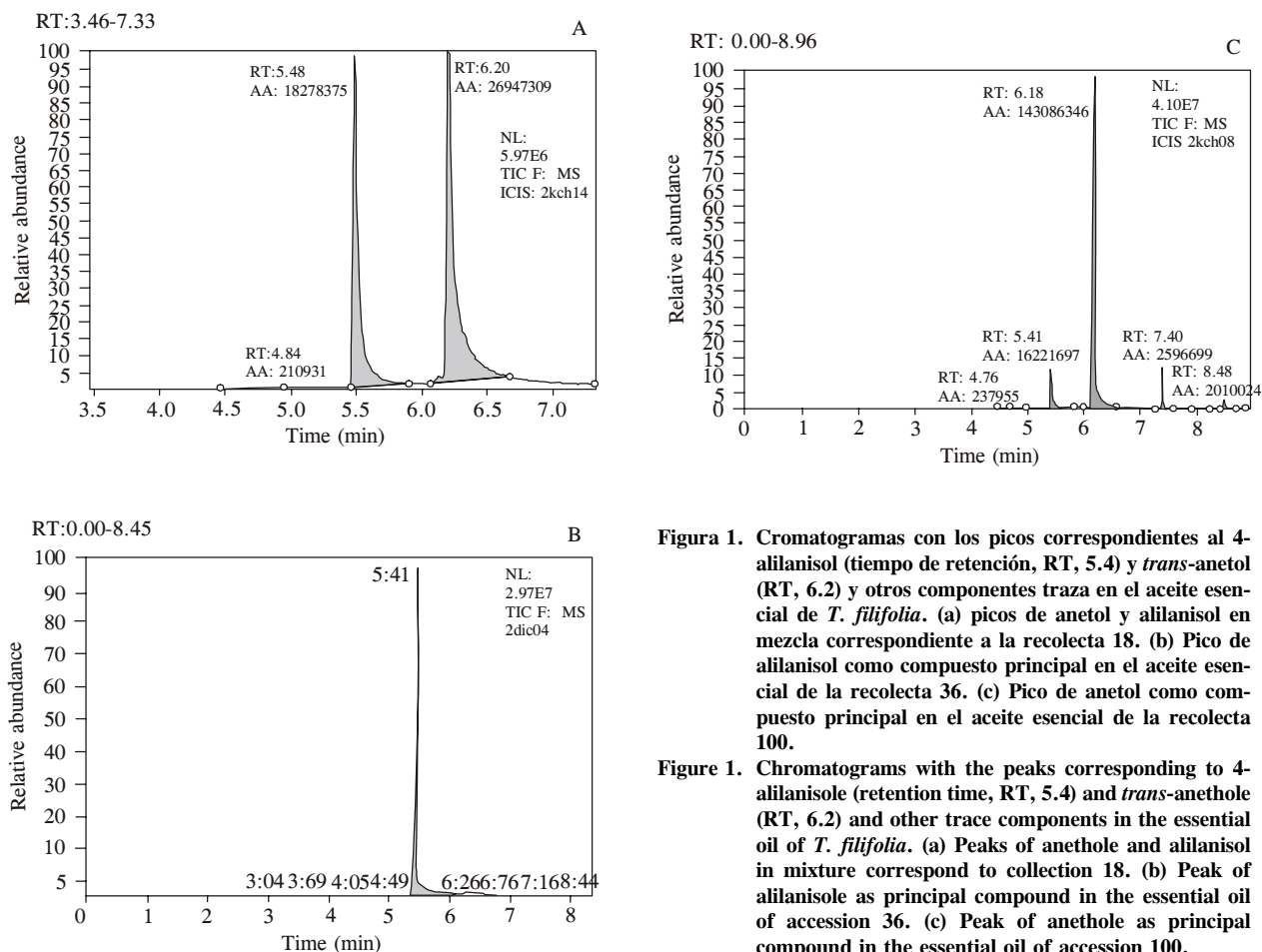


Figura 1. Cromatogramas con los picos correspondientes al 4-alilanisol (tiempo de retención, RT, 5.4) y *trans*-anetol (RT, 6.2) y otros componentes traza en el aceite esencial de *T. filifolia*. (a) picos de anetol y alilanisol en mezcla correspondiente a la recolecta 18. (b) Pico de alilanisol como compuesto principal en el aceite esencial de la recolecta 36. (c) Pico de anetol como compuesto principal en el aceite esencial de la recolecta 100.

Figure 1. Chromatograms with the peaks corresponding to 4-alilanisole (retention time, RT, 5.4) and *trans*-anethole (RT, 6.2) and other trace components in the essential oil of *T. filifolia*. (a) Peaks of anethole and alilanisole in mixture correspond to collection 18. (b) Peak of alilanisole as principal compound in the essential oil of accession 36. (c) Peak of anethole as principal compound in the essential oil of accession 100.

En el grupo de recolectas con mezcla de compuestos (71 recolectas) se detectaron distintas tendencias en las proporciones de anetol y alilanol en el aceite esencial (Cuadro 2): a) 12.6% de recolectas con más alilanol que anetol, b) 1.2% de recolectas con cantidades parecidas de los compuestos, c) 86.2% de recolectas con menos alilanol que anetol. Estos resultados amplían lo encontrado por Feo *et al.* (1998) y Vila *et al.* (2000), y en particular lo reportado por Serrato *et al.* (2005) para la recolecta 104 (79% de *trans*-anetol y 21% de alilanol).

Las diferencias en la proporción de los compuestos químicos en el aceite esencial de *T. filifolia* en la región centro-sur de México se puede explicar por la interacción evolutiva entre las poblaciones silvestres y su ambiente, como se ha documentado para otras especies productoras de aceite (Putievsky *et al.*, 1992; Chou y Zhou, 1998). En este sentido, los diferentes compuestos detectados, solos o en mezcla, se encontraron en las recolectas procedentes de diferentes pisos altitudinales, excepto para la recolecta que solamente presentó anetol (Cuadro 3). No obstante, las variaciones en la composición de aceites observadas en las 78 recolectas evaluadas ocurrieron en un ambiente diferente (área de Chapingo) al de los sitios naturales donde se obtuvieron las muestras, por lo que sería importante corroborar estos datos con muestras *in situ*.

También se encontró variación en la composición química en materiales recolectados en el mismo sitio como en Yecapixtla (1558 m), Uruapan (1454 m) y Chilchota (1780 m) (Cuadros 1 y 2). Este resultado sugiere una posible variabilidad intrapoblacional, fenómeno que aún no se ha reportado en otras especies aromáticas; además, hay varios reportes sobre variabilidad de características morfológicas intrapoblacionales en especies de origen silvestre. Es probable que la naturaleza autógena de *T. filifolia* (Neher, 1965) podría predisponer la conservación de posibles variantes químicas. La abundancia de recolectas con compuestos mezclados, procedentes de altitudes entre 1600 y 2000 m (Cuadro 3), los cuales coinciden con los climas semicálidos A (C) y (A) C (Cuadro 1), sugiere que en esa altitud y climas pudieran ocurrir importantes procesos de evolución natural de *T. filifolia*. En general, las zonas de transición climática se asocian con diversidad de especies y con variabilidad genética (Harlan, 1975).

Como parte del trabajo sobre caracterización química de los aceites esenciales del germoplasma mexicano de *T. filifolia*, los autores del presente artículo están estudiando la composición del aceite esencial en cada órgano de la planta (raíz, tallo-hoja, flores) y la estabilidad de los compuestos al establecer las recolectas en ambientes contrastantes.

Cuadro 2. Composición del aceite esencial de 78 recolectas de *T. filifolia* de la región centro-sur de México.
Table 2. Composition of the essential oil of 78 accessions of *T. filifolia* of the south-central region of México.

Colecta	Proporción de alilanol (%)	Proporción de anetol (%)
36, 37, 40,		
71, 77 y 80	100.0	0.0
44	99.3	0.7
19	98.2	1.8
94	95.9	4.1
102	93.7	6.3
82	90.8	9.2
70	90.5	9.5
39	90.0	10.0
46	82.7	17.3
55	76.7	23.3
78	75.0	25.0
90	52.4	47.6
18	40.0	60.0
92	38.5	61.5
69	36.7	63.3
8	32.3	67.7
3	30.8	69.2
4 y 75	29.4	70.6
81	28.6	71.4
32 y 87	27.8	72.2
34 y 50	25.0	75.0
51	23.3	76.7
27	22.3	78.7
13 y 23	22.2	77.8
6 y 35	21.8	78.2
7	21.3	78.7
49	20.3	79.7
31	20.0	80.0
24	19.4	80.6
9 y 38	19.3	80.7
29	18.6	81.4
17	18.5	81.5
42	18.4	81.6
88	18.2	81.8
59 y 89	18.0	82.0
33	17.3	82.7
21	16.7	83.3
15	16.5	83.5
54	16.4	83.6
12	16.1	83.9
43	15.6	84.4
64	14.9	85.1
95	14.7	85.3
11	13.4	86.6
67	13.0	87.0
16, 66 y 101	12.5	87.5
52	12.1	87.9
5, 53,63 y 104	11.0	89.0
14	10.5	89.5
41 y 98	10.0	90.0
2	9.9	89.1
26 y 91	9.6	90.4
86	9.5	90.5
1 y 25	9.0	91.0
93	8.5	91.5
28	7.2	92.8
45	0.2	99.8
100	0.0	100.0

Cuadro 3. Recolectas de *T. filifolia* y composición de su aceite esencial de acuerdo con su origen altitudinal.
Table 3. Accessions of *T. filifolia* and composition of its essential oil according to its altitudinal origin.

Compuestos químicos en el aceite	Cantidad de recolectas ubicadas por intervalo altitudinal (m)					Subtotal
	800-1200	1201-1600	1601-2000	2001-2400	2401-2800	
Alilanol	0	0	2	1	3	6
Anetol	1	0	0	0	0	1
Mezcla	5	19	31	10	6	71
> Alilanol						
< Anetol	2	2	1	2	3	10
Alil=Anetol	0	0	1	0	0	1
< Alilanol						
> Anetol	3	17	29	8	3	60
Total	6	19	33	11	9	78

CONCLUSIONES

El germoplasma de *T. filifolia* de la región centro-sur de México contiene anetol y alilanol como compuestos principales en el aceite esencial. Algunas muestras contienen anetol o alilanol, pero la mayoría contiene ambos compuestos, cuya proporción presenta amplia variabilidad.

LITERATURA CITADA

- Calmasur, O., I. Aslan, and F. Sahin. 2006. Insecticidal and acaricidal effect of three Lamiaceae plant essential oils against *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn. Indus. Crops Prod. 23 (2): 140-146.
- Chou, G. X., and R. H. Zhou. 1998. The variation and chemotypes of the essential oil components in wild *Mentha haplocalyx* Briq. in China. J. Plant Resour. Environ. 7(3): 13-18
- Cubillo, D., G. Sanabria, and L. Hilje. 1999. Evaluación de la repelencia y mortalidad causada por insecticidas comerciales y extractos vegetales sobre *Bemisia tabaci*. Manejo Integrado de Plagas 53: 65-72.
- Feo, V. de, G. della Porta, E. Soria U. F. Senatore. 1998. Composition of the essential oil of *Tagetes filifolia* Lag. Flav. Frag. J. 13 (3): 145-147.
- García, E. 1981. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F. 252 p.
- Gil, A., C. M. Ghersa, and S. Leicach. 2000. Essential oil yield and composition of *Tagetes minuta* accessions from Argentina. Biochem. Syst. Ecol. 28 (3): 261-274.
- Giorgi, A., M. Bononi, F. Tateo, and M. Cocucci. 2005. Yarrow (*Achillea millefolium* L.) growth at different altitudes in Central Italian alps: biomass yield, oil content and quality. J. Herb. Spic. Med. Plants 11 (3):47-58.
- Harlan, J. R. 1975. Crops and Man. American Society of Agronomy. Wisconsin, USA. 295 p.
- Isman, M. B. 2006. Botanical insecticides, derrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Ann. Rev. Entomol. 51: 45-66.
- Muni, R. M., A. Gupta, A. Naqvi, and K. Sushil. 1997. Effect of planting time on the yield of essential oil and artemisinin in

in the essential oil (Table 2): a) 12.6% of accessions with more alilanol than anethole; b) 1.2% of accessions with similar amounts of the compounds; c) 86.2% of accessions with less alilanol than anethole. These results expand what was found by Feo *et al.* (1998) and Vila *et al.* (2000), and in particular what was reported by Serrato *et al.* (2005) for accession 104 (79% of *trans*-anethole and 21% of alilanol).

The differences in the proportion of the chemical compounds in the essential oil of *T. Filifolia* in the south-central region of México can be explained by the evolutionary interaction among the wild populations and their environment, as has been documented for other oil producing species (Putievsky *et al.*, 1992; Chou and Zhou, 1998). In this sense, the different compounds detected, alone or in mixture, were found in the accessions from different altitudinal levels, except for the accession that only presented anethole (Table 3). However, the variations in the composition of oils observed in the 78 accessions evaluated occurred in a different environment (Chapingo area) from that of the natural sites from which the samples were obtained, therefore it would be important to confirm these data with *in situ* samples.

Variation was also found in the chemical composition in materials collected in the same site such as Yecapixtla (1558 m), Uruapan (1454 m) and Chilchota (1780 m) (Tables 1 and 2). This result suggests a possible intra-population variability, a phenomenon which has yet to be reported in other aromatic species; furthermore, there are various reports on variability of intra-population morphological characteristics in species of wild origin. It is likely that the autogamous nature of *T. Filifolia* (Neher, 1965) could predispose the conservation of possible chemical variants. The abundance of accessions with mixed compounds, from

- Artemisia annua* under subtropical conditions. J. Essential Oil Res. 9 (2): 193-197.
- Neher, R. T. 1965. Monograph of the genus *Tagetes* (Compositae). Ph. D. Dissertation. Indiana University. Bloomington, Indiana, USA. 306 p.
- Pérez, M. P., J. A. Navas-Cortés, M. J. Pascual-Villalobos, and P. Castillo. 2003. Nematicidal activity of essential oils and amendments from Asteraceae against root-knot nematodes. Plant Pathol. 52: 395-401.
- Putievsky, E., U. Ravid, N. Dudai, I. Katzir, D. Carmeli, and A. Eshel. 1992. Variations in the essential oil of *Artemisia judaica* L. chemotypes related to phenological and environmental factors. Flav. Fragr. J. 7 (5): 253-257.
- Senatore, F., and V. De Feo. 1999. Chemical composition of the essential oil from *Tagetes mandonii* Sch. Bip. (Asteraceae). Flav. Fragr. J. 14(1): 3234.
- Serrato C., M. A. 2003. Aspectos del cultivo de dos especies de *Tagetes* productoras de aceites esenciales. Rev. Naturaleza y Desarrollo 1 (1): 15-22.
- Serrato C., M. A., B. Reyes T., L. Ortega A., L. Domingo G., N. Gómez S., M. A. López M., M. A. Sánchez, L. Carvajal V., O. Jiménez R., A. Morgado G., E. Pérez M., J. Quiroz M., C. I. Vallejo G. 2003. Anisillo (*Tagetes filifolia* Lag.): recurso genético mexicano para controlar mosquita blanca (*Bemisia* sp. y *Trialeurodes* sp.). Rev. del Jardín Bot. Nacional 24(1-2): 67-70.
- Serrato-Cruz., M. A., F. Díaz-Cedillo, and J. S. Barajas-Pérez. 2005. Seasonal influence on phenology and essential oil content of *Tagetes filifolia* Lag. Annalen der Meteorologie 41 (1): 82-85.
- Serrato-Cruz., M. A. y J. S. Barajas-Pérez. 2006. Poblaciones silvestres de *Tagetes filifolia* Lag. en el centro sur de México. Rev. Fitotec. Mex. (Número Especial 2): 1-11.
- Terblanche, F. C., and G. Cornelius. 2000. A literature survey of the antifungal activity of essential oil constituents. J. Essential Oil Bearing Plants 3 (3): 139-156.
- Turner, B. L. 1996. The Comps of Mexico-A systematic account of the family Asteraceae, Vol. 6, Tageteae and Anthemideae. Phytol. Memoirs 10: 1-93.
- Tuzun, S., and O. Yegen. 2000. Essential Oils as Pesticides. PCT Int. Appl. New Jersey, USA. 89 p.
- Vila, R., J. Iglesias, S. Canigual, and J. F. Ciccio. 2000. Essential oil of *Tagetes filifolia* from Costa Rica. Ing. Ciencia Quím. 19 (1): 13-14.
- altitudes between 1600 and 2000 m (Table 3), which coincide with the semi-warm climates A (C) and (A) C (Table 1), suggests that in this altitude and climates, important processes of natural evolution of *T. filifolia* could occur. In general, the climatic transition zones are associated with diversity of species and with genetic variability (Harlan, 1975).
- As part of the work of chemical characterization of the essential oils of the Mexican germplasm of *T. filifolia*, the authors of the present article are studying the composition of the essential oil in each organ of the plant (root, stem-leaf, flowers) and the stability of the compounds when the accessions are established in contrasting environments.

CONCLUSIONS

The germplasm of *Tl filifolia* of the south-central region of México contains anethole and alilanisole as principal compounds in the essential oil. Some samples contain anethole or alilanisole, but the majority contain both compounds, whose proportion presents broad variability.

End of the English version—



- Villarreal Q., J. A. 2003. Familia Compositae. Tribu Tageteae. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Fascículo 113. Instituto de Ecología A. C. Pátzcuaro, Michoacán. México. 85 p.
- Zhang, K., and Y. Zuo. 2004. GC-MS Determination of flavonoids and phenolic and benzoic acids in human plasma after consumption of cranberry juice. J. Agr. Food Chem. 52: 222-227.
- Zygodlo J., A., A. L. Lamarque, D. M. Maestri, C. A. Guzmán, and N. R. Grosso. 1993. Composition of the inflorescence oils of some *Tagetes* species from Argentina. J. Essential Oil Res. 5 (6): 679-682.