



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Perfiles de acumulación de metabolitos
secundarios en 3 especies medicinales de San Rafael,
Coxcatlán, Puebla, bajo diferentes prácticas de cultivo**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

AMANDA MORENO RODRÍGUEZ

DIRECTOR(A) DE TESIS: Dr. CÉSAR MATEO FLORES ORTIZ

MÉXICO, D.F.

Mayo de 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

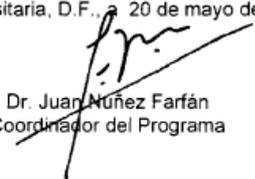
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de febrero de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **MORENO RODRÍGUEZ AMANDA** con número de cuenta **508451092** con la tesis titulada **"Perfiles de acumulación de metabolitos secundarios en 3 especies medicinales de San Rafael, Coxcatlán, Puebla, bajo diferentes prácticas de cultivo"**, realizada bajo la dirección del **DR. CÉSAR MATEO FLORES ORTIZ:**

Presidente: DRA. ALMA DELFINA LUCIA OROZCO SEGOVIA
Vocal: DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
Secretario: DR. CÉSAR MATEO FLORES ORTIZ
Suplente: DR. RENÉ MIRANDA RUVALCABA
Suplente: DR. IGNACIO PEÑALOSA CASTRO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 20 de mayo de 2009.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

Al CONACyT por la beca otorgada, número 210554.

A KEW por la financiación del presente trabajo, incluido en el Proyecto Plantas Útiles de San Rafael Coxcatlán (MGU/Useful Plants Project Mexico)

Al Dr. César Flores por su tiempo y disposición, siempre.

A los miembros del comité tutorial, Dr. Manuel Jiménez E. y Dr. Ignacio Peñalosa Castro por sus observaciones y el apoyo.

A los miembros del jurado: Dra. Alma Delfina Orozco S. y Dr. René Miranda Ruvalcaba.

A Héctor Cervantes y Martín López, por sus colectas y la dedicación en el proyecto.

A todos los miembros del Laboratorio de Fisiología Vegetal de la UBIPRO, porque además de ser los profesores más entregados y enseñarme aspectos académicos, fueron y serán mi familia en México.

A todos los amigos y familiares, que en cuerpo presente o a la distancia estuvieron junto a mí en este proceso.

ÍNDICE

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	6
MARCO TEÓRICO	8
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	28
METODOLOGÍA	29
RESULTADOS	36
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	58
CONCLUSIONES	71
PROPUESTAS	72
ANEXOS	73
LITERATURA CITADA	81

PERFILES DE ACUMULACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN 3 ESPECIES MEDICINALES DE SAN RAFAEL, COXCATLÁN, PUEBLA, BAJO DIFERENTES PRÁCTICAS DE CULTIVO

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar las condiciones para la propagación en invernadero de 3 plantas medicinales de San Rafael, Coxcatlán, Puebla: *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less (Asteraceae), *Castela tortuosa* Liebm. (Simaroubaceae) y *Lippia graveolens* Kunth (Verbenaceae); y determinar el efecto de las condiciones de cultivo, luminosidad y riego, sobre parámetros fisiológicos: productividad fotosintética (asimilación de CO₂), conductancia estomática y concentración interna de CO₂, y sobre la acumulación de los flavonoides con actividad medicinal reportada. Los mayores porcentajes de germinación fueron de 76.5% y de 66.85% para *G. glutinosum* y *L. graveolens*, respectivamente. En *C. tortuosa*, la máxima germinación fue de 50%. En los estadios iniciales de las plántulas, no hubo diferencias en los parámetros fisiológicos. Una vez sometidas las plantas a los tratamientos, las mayores tasas de asimilación de CO₂ se registraron en el mes de agosto para *L. graveolens* y en septiembre para las otras dos especies bajo condiciones de riego óptimo. Se observó una tendencia de relación inversa entre la asimilación de CO₂ y la conductancia estomática al igual que con la concentración interna de CO₂. Este último parámetro fue mayor en campo que en invernadero en *L. graveolens* y *G. glutinosum* y en *C. tortuosa* la asimilación de CO₂ fue superior en plantas silvestres y la concentración interna de CO₂, menor.

Las concentraciones más altas de flavonoides se presentaron bajo la condición lumínica y en el mes previo al que registró la máxima tasa fotosintética. Las plantas con flor (*L. graveolens*) no mostraron diferencias ni en parámetros fisiológicos ni en acumulación de flavonoides comparadas con las plantas sin flor. Adicionalmente, en esta especie la pentahidroxi flavanona-glucósido fue el metabolito con las concentraciones más altas en todas las muestras, con un valor máximo de 91.83 mg/100g, mientras que la naringina no mostró una clara tendencia de acumulación, y sus concentraciones fueron mucho menores, en el rango de 0.01 a 0.2 mg/100g; valores similares a los obtenidos para fisetina de *C. tortuosa* y la 5,7-dihidroxi-3,6,8,2',4',5'-hexametoxiflavona de *G. glutinosum*, con sus máximos de concentración bajo la condición lumínica alta. En las muestras obtenidas en campo de las tres especies, se observó una alta variabilidad en la concentración de los metabolitos, aun entre individuos de la misma localidad.

Por otro lado, plantas de *G. glutinosum* y *L. graveolens* con suministro permanente de agua y nutrientes mediante un sistema de fertirrigación, mostraron un desarrollo vegetativo superior, sin embargo, la acumulación de los flavonoides fue significativamente menor. Se concluye que los tratamientos lumínicos e hídricos, además de otros factores como el fotoperiodo, influyen en la fijación de carbono determinada en las tasas fotosintéticas y concentraciones internas de dióxido de carbono. La condición de mayor luminosidad se asoció con una mayor acumulación de flavonoides en estas especies y la variabilidad en el contenido de estos metabolitos en individuos silvestres muestra la influencia de los factores ambientales como determinantes en su producción y acumulación, y justifica el hecho de tener las plantas bajo condiciones controladas en sistemas de invernadero para posibilitar una acumulación más uniforme del metabolito con propiedad medicinal, al tiempo que se maneje su productividad. Finalmente, se resalta la independencia entre el desarrollo vegetativo de las especies y la producción de flavonoides.

INTRODUCCIÓN

Existe un gran número de especies vegetales que han sido usadas durante siglos con fines medicinales y que hoy por hoy, son de gran importancia en la medicina popular. México tiene una gran diversidad florística, con cerca de 25000 especies registradas, y es a nivel mundial uno de los países con mayor riqueza biológica (Dirección General de Estadística e Información Ambiental, 2002). La región del Valle de Tehuacán-Cuicatlán es considerada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza UICN como un centro de megadiversidad y endemismo a nivel mundial (Dávila *et al.*, 1993), así como una de las zonas de mayor diversidad cultural de México. Estudios etnobotánicos indican que los habitantes de esta región utilizan 1284 especies pertenecientes a 142 familias de plantas vasculares, de las cuales cerca del 30% son endémicas (Dávila, 1993; Blanckaert, 2001). Toda esa riqueza biológica y cultural conforma un material de gran potencial en el manejo de problemas de salud pública poco explorado científicamente; de modo que su estudio, además de contribuir al conocimiento fitofarmacológico, brinda un respaldo científico para el uso tradicional de las plantas con miras a la aplicación de estrategias de uso sustentable en los sistemas de manejo de recursos naturales.

Actualmente entre 65-80% de la población de los países en vías de desarrollo depende de las plantas como herramienta de primera mano para resolver problemas de salud, debido a la carencia o pérdida del acceso a la medicina moderna (Calixto, 2005). Aún después del advenimiento de la medicina alopática, las plantas medicinales siguen teniendo predominio en las áreas rurales para satisfacer las necesidades básicas de salud (Nice, 1990). El aumento en la demanda de este tipo de plantas a nivel mundial, asociado a los altos costos de los fármacos sintéticos y a la incidencia de enfermedades infecciosas, ha llevado a la planeación de una serie de estrategias para su cultivo (Fennell *et al.*, 2004) considerando esta práctica como única solución de conservación *ex situ* (Van Staden, 1999). Sin embargo, se ha discutido que las plantas propagadas bajo condiciones agrícolas no tienen las mismas características medicinales o biológicas que las que se desarrollan de forma silvestre (Cunningham, 1993), ya que este potencial medicinal en las plantas está dado por su metabolismo secundario, el cual que puede variar, por cambios en el clima, las estaciones, las condiciones ecológicas y de crecimiento, entre otros factores. Se han llevado a cabo muy pocos estudios para evaluar la actividad biológica de plantas medicinales en condiciones de cultivo.

Es por tal motivo que el estudio de la propagación de este tipo de plantas en conjunto con el análisis de la productividad y acumulación de metabolitos secundarios, responsables de la actividad

medicinal, es de gran importancia. Esto es más relevante en una región como San Rafael, Coxcatlán cuya comunidad presenta un amplio conocimiento etnobotánico lo que enmarca este proyecto como un aporte para la aplicación a mediano y corto plazo de las prácticas de propagación, conservación y manejo de las especies medicinales, sin que se pierda su productividad pero tampoco la propiedad medicinal por la que son usadas estas especies.

MARCO TEÓRICO

México y la medicina tradicional

Según la Organización Mundial de la Salud (WHO), los sistemas de medicina tradicional juegan un papel importante en el cuidado de la salud. De hecho, el 80% de la población mundial trata sus enfermedades con base en sistemas tradicionales de medicina, especialmente en países en vías de desarrollo (Calixto, 2005). La medicina herbolaria en México se remonta a épocas prehispánicas y con la llegada de los europeos se amplió con las nuevas especies introducidas. Actualmente, cerca del 25% de la población en el país usa las plantas como fuente de tratamiento y prevención de enfermedades (Hernández *et al.* 2003).

Las especies vegetales usadas medicinalmente en México abarcan el 10% de la riqueza florística del país. Estudios realizados por Betancourt y Gutiérrez (1999) reportan que de manera cotidiana se comercializan cerca de 250 especies, entre frescas y deshidratadas, provenientes principalmente de las zonas centro y sur del país. Esta práctica tiene características culturales, ambientales y socioeconómicas como los patrones de consumo de acuerdo con la farmacoterapia dominante, el consumo no industrial del recurso (principalmente en comunidades rurales e indígenas), el aumento importante de recolecta en época de estiaje y el hecho de que más del 90% de las plantas medicinales que se consumen provienen de poblaciones silvestres sin ningún manejo sustentable del recurso, de modo que la recolección excesiva de algunas especies que tienen alta demanda comercial ha originado una fuerte disminución de sus poblaciones, hasta el punto de llegar a ser consideradas como amenazadas y en peligro de extinción. Por otra parte, se presenta adulteración o sustitución de plantas completas, de sus partes y/o del producto fitofarmacéutico y, además, no existe un programa nacional de plantas medicinales que integre de manera efectiva aspectos como ecología, fitoquímica, etnobotánica, farmacología, toxicología y cultivo de estas especies (Martínez y Betancourt, 2006).

Metabolitos secundarios y condiciones medioambientales

Los metabolitos secundarios juegan una serie de papeles cruciales en las plantas pues son los responsables del color, la apariencia, el aroma y el sabor, entre otras características. Al contenido de estos metabolitos se debe, principalmente, que las especies vegetales sean consumidas por animales, incluidos los humanos. Para la planta misma, estos metabolitos cumplen funciones ecológicas determinadas (por ejemplo, atraer o repeler consumidores), y para el humano brindan beneficios alimenticios y medicinales, entre muchos otros que incluyen usos industriales, artesanales y culturales.

La producción de metabolitos secundarios está dada por 3 factores: la química de la especie, la ontogenia y los factores ambientales, entre los cuales se encuentran el suelo, la flora asociada, el clima y los métodos de cultivo (Núñez 2004). Según Tomás-Barberán y Robins (1997) y Lambers *et al.* (1998), la producción, el almacenamiento y la degradación de los metabolitos secundarios se ven afectados por numerosos aspectos que abarcan desde las características del suelo (nutrientes, contenido de calcio, sulfuros, etc.) hasta las condiciones ambientales como estrés hídrico, lumínico y salino.

En el caso de algunos flavonoides, importantes en la defensa de la planta contra patógenos, herbívoros y estrés ambiental, se ha visto que su producción aumenta con la temperatura (Raghuwanshi *et al.*, 1994). En algunos casos, la acumulación varía de acuerdo con la madurez de la planta, como el caso de *Lotus tenuis*, que muestra la existencia de un ritmo de producción de kaempferol-3-O-glucósido (K-G), cuya ruta biosintética se inicia con el periodo reproductivo de la planta (Strittmatter *et al.*, 1991). La biosíntesis de estos compuestos (kaempferol y quercetina) se ha descrito en semillas y en la parte aérea de la planta gracias a la inducción de UV-B (Hess *et al.*, 2002; Markham y Ryan 1996).

***Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less**

- Taxonomía y distribución

Esta especie pertenece a la Familia Asteraceae que, en México, cuenta con cerca de 361 géneros y 3021 especies (Villaseñor, 2003) con múltiples usos medicinales en la población indígena y mestiza (Heinrich *et al.*, 1998). La familia se caracteriza por presentar pétalos unidos en al menos un cuarto de su longitud, hojas alternas o basales, flores en cabezuelas involucradas, cáliz sin modificar y siempre presente. Los frutos no son aquenos. Las flores son unisexuales, y si son perfectas, las anteras son de 5 estambres unidos.

El nombre *Selloa* Spreng. (Nov. Prov. Hal. 36. 1819) fue el primer nombre del género publicado y es homónimo de *Selloa* H. B. K., el nombre conservado por acuerdo internacional. Nash y Williams (1976) mencionan como sinónimos a *Selloa glutinosa* Spreng.; *Gymnosperma corymbosum* DC.; *G. multiflorum* DC.; *G. scoparium* DC.; *Selloa multiflora* O. Ktze. y *Xanthocephalum glutinosum* Shinn. Shinn.

Gymnosperma es un género monotípico que crece en regiones abiertas y semidesérticas; se distribuye desde el sur de los Estados Unidos y se reporta como endémica de México con base en la

propuesta de Megaméxico de Rzedowski (1986). Ocupa hábitats muy diversos: extremadamente secos, pendientes rocosas o montañas relativamente húmedas. Se halla hasta los 2500 m s.n.m., con época de florecimiento entre agosto y noviembre en Nueva Galicia. Aunque la actual distribución se reporta en México, el origen de esta especie probablemente se dio en Brasil (Mc Vaugh, 1909 ed. 1984).

La especie es conocida en San Rafael como “Popote” (Rosas 2003). Otros nombres en la República Mexicana son: “escobilla”, “jarilla” y “pegarrosa” en el estado de México; en Guerrero se denomina “xoniquilet”, “zacayauchi”, en Puebla “xinecuite” ó “zazal”, en Coahuila “barda”, “escobilla” en Oaxaca (Olivas Sánchez, 1999) y en Tepejí del Río (Hidalgo) se conoce como “tatalencho”. En lengua Náhuatl es *Tezozotla* (Canales *et al.*, 2006). Es muy común en las tierras de cultivo de regiones de selva baja, de matorrales xerófilos o selva baja caducifolia, ocasionalmente en la región de pino-encino a alturas entre 1200-2850 m s.n.m. En San Rafael se encuentra de forma silvestre en la Sierra (Rosas, 2003) y se cultiva en Zapotitlán de las Salinas (Hernández *et al.*, 2005).

Forma poblaciones grandes, sobre todo en parcelas de cultivo abandonadas o en descanso. Villaseñor y Espinosa (1998) la han reportado en Aguascalientes, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Estado de México, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luís Potosí, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas.

- Descripción botánica

Planta perenne, herbácea o sufrútice (herbácea con la base leñosa), erecta, glabra o casi glabra, pegajosa, de hasta 1 (raramente 2) metros de alto cuyas hojas usualmente mueren en épocas secas. Los tallos son más o menos ramificados y estriados. Posee hojas alternas, lineares-elípticas a angostamente lanceoladas, de 1 a 8.5 cm de largo, de 1 a 9 mm de ancho, agudas o acuminadas en el ápice, con margen entero, trinervadas, densamente punteadas en ambas caras, sésiles a casi sésiles y generalmente con brotes estériles en las axilas. Inflorescencia compuesta de cabezuelas numerosas, sésiles o sobre pedúnculos hasta de 3 mm de largo, cabezas angostas y pequeñas de 3 a 4 mm de longitud, ovoides a fusiformes o angostamente campanuladas, y dispuestas en densos conjuntos corimbiformes terminales con cabezuelas redondas en corimbo de más de 30 cm de largo con flores radiales de 4 a 6 con corola amarilla, angostamente tubular de 2.5 mm de longitud, incluyendo una lígula obtusa. Flores de disco de 4 a 6, tubulares o funelformes de 3 mm de longitud; anteras de 0.8-1 mm de largo obtusas en la base. Aquenos de 1 a 1.5 mm de largo columnar-clavados a fusiformes de color café pálido con la superficie más oscura por pelos. La cabezuela no presenta páleas;

involucro de 9 a 15 brácteas dispuestas en 4 a 5 series, cilíndrico-turbinado, sus brácteas son elípticas a ovadas, verdes en el ápice, las más largas de 4 a 5 mm de longitud, coriáceas y con los márgenes secos y translúcidos, graduadas, las exteriores más cortas. Son flores bisexuales (a menudo no todas fértiles) con los estambres alternos con los lóbulos de la corola y ovario ínfero. El fruto presenta un aquenio oblongo, algo comprimido, de 1 a 1.5 mm de largo, con 4 a 5 costillas y con pelillos. En el ápice del fruto se puede, o no, presentar una estructura llamada vilano que consiste en una corona inconspicua de diminutas escamas y presenta una sola semilla (Nash y Williams, 1976; Rzedowski y Rzedowski, 2001 y Mc Vaugh, 1909).



Figura 1. *Gymnosperma glutinosum* con flor en la región de Tehuacán, Puebla

- Usos

En los Estados de México, Durango y Guanajuato la planta es usada para tratar el reumatismo y el dolor de pies (Argueta *et al.* 1994). Se ha reportado también el uso contra la diarrea y como analgésico (Semarnat, 2001). En Puebla es usada contra el dolor de cabeza y los piquetes de hormiga. Otros usos incluyen: tratamiento de fiebre amarilla, soldadura de huesos y limpieas de animales, este último en el Estado de Guerrero (Serrano, 2004). Para la tos en Coahuila, en Puebla las hojas fritas en aceite se usan localmente contra los enfriamientos, mientras que en Tlaxcala las hojas en emplasto se colocan sobre la cintura cuando las mujeres no pueden dar a luz y en Oaxaca se hace una cocción de hojas y ramas para ponerla localmente en zonas de fracturas (Olivas Sánchez, 1999).

A comienzos del siglo XX, el Instituto Médico Nacional señalaba esta especie como antipalúdica, antiséptica, diurética y digitálica. Posteriormente se le atribuyeron usos antidiarreicos, antirreumáticos, cicatrizantes, regenerativos y como vasodilatador coronario. Para tratar la diarrea se usa la infusión de la parte aérea al 10%, sin exceder de 100 mg/g por día y, como analgésico, se aplica directamente sin exceder de 500 mg/2.5 g (Serrano, 2004). Un estudio etnobotánico previo mostró que *Gymnosperma glutinosum* es reconocida como una de las 46 especies más importantes

en la medicina tradicional de San Rafael, Coxcatlán, (Canales *et al.*, 2005) donde se utiliza con fines medicinales para tratar la diarrea, mediante un té hecho con la parte aérea de la planta.

- Química de la especie

Martínez (1967) reportó presencia de aceites esenciales, resina ácida y neutra, ácido orgánico no determinado, ácido análogo al málico, materia colorante, albúmina, azúcar, goma, principios pécticos y sales minerales en tallos y flores. Posteriormente se aislaron dos flavonoides pentametoxilados (Domínguez y Torre 1974). Miyakado *et al.* (1974) aislaron un triol diterpeno: el gymnospermin. Yu *et al.* (1988) realizaron un extenso trabajo en el que se describieron 21 flavonoides de tallos y hojas; 14 ya conocidos: 5,7,2'-trihidroxi-3,6,8,4',5'-pentametoxiflavona, 5,7,2',4'-tetrahidroxi-3,6,8,5'-tetrametoxiflavona, 5,3'-dihidroxi-3,6,7,8,4',5'-hexametoxiflavona, 5,7,3'-trihidroxi-3,6,8,4',5'-pentametoxiflavona, 5,7,3',5'-tetrahidroxi-3,6,8,4'-tetrametoxiflavona, 5,7,3',4',5'-pentahidroxi-3,6,8-trimetoxi-flavona, 5,7,3',5'-tetrahidroxi-3,6,4'-trimetoxiflavona, 5,7,4'-trihidroxi-3,6,8,3'-tetrametoxiflavona, 5,7,3',4'-tetra-hidroxi-3,6,8-trimetoxiflavona, 3,5,7,3',4'-pentahidroxi-6,8-dimetoxiflavona, 5,7,4'-trihidroxi-3,6,8-trimetoxiflavona, 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona, 8-C-glucosil-5,7,4'-trihidroxiflavona y 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona 7-O-glucósido. Los siete reportados como nuevos son: 5,7-dihidroxi-3,6,8,2',4',5'-hexametoxiflavona, 5,4',5'-trihidroxi-3,6,7,8,2'-pentametoxiflavona, 5,7,4'-trihidroxi-3,6,8,2',5'-pentametoxiflavona, 5,7,4',5'-tetrahidroxi-3,6,8,2'-tetrametoxiflavona, 5,7,4',5'-tetrahidroxi-3,6,2'-trimetoxiflavona, 5,7,4',5'- tetrahidroxi-3,2'-metoxiflavona y 3,5,4'-trihidroxi-6,7,8,3'-tetrametoxiflavona. Este grupo de investigadores concluyó que debido a la composición química, específicamente de flavonoides, *G. glutinosum* es una especie estrechamente relacionada con las especies arbustivas del género *Gutierrezia*, con una similitud química aún mayor que la que existe entre las especies arbustivas y leñosas dentro de este mismo género.

Por su parte, Arroyo (1992) aisló un diterpeno con esqueleto labdano. Maldonado *et al.* (1994) y Martínez, en el mismo año, reportaron dos nuevos diterpenos en las partes aéreas de la planta: (+)-ent-labd-7-en-13S,14R,15-triol y ácido (-)-17-hidroxi-neo-clerod-3-en-15-oico. Horie *et al.* (1998) aislaron cinco flavonoides ya reportados por Yu *et al.* (1988). Calderón *et al.* (2001) identificaron por medio de RMN-C el cristal y la estructura molecular del ácido (-)-17-hidroxi-neo-clerod-3-en-15-oico.

- 5,7-dihidroxi-3,6,8,2',4',5'-hexametoxiflavona

Este compuesto fue aislado por primera vez en esta especie por Yu *et al.* (1988) a partir de la parte aérea de la planta. Su peso molecular es de 594 g/mol y el coeficiente de extinción usado para la cuantificación, obtenido como un promedio de los coeficientes de extinción hallados para otras metoxiflavonas (Amaral *et al.*, 2001), fue de 1348.96 milimolar.

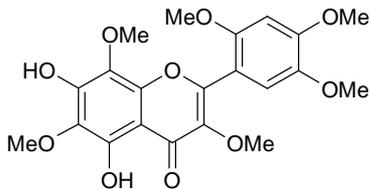


Figura 2. Estructura de la 5,7-dihidroxi-3,6,8,2',4',5'-hexametoxiflavona

Ha sido aislado como compuesto bioactivo y mostró actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Sarcina lutea*, *Vibrio cholerae*, *Shigella boydii*, *Salmonella typha* y *Enterobacter aerogenes* (Canales *et al.*, 2007). También se ha establecido su efecto inhibitorio sobre el hongo *Rhizoctonia solana* en extracto metanólico de raíz; mientras que se ha observado que los extractos etanólicos y hexánicos inhiben el crecimiento tanto de *R. solana* como de *Fusarium sporotrichum* y *Candida albicans* (Andrade Rodríguez, 2005). Es considerado como un metabolito inducible debido a que este compuesto no siempre es detectado y muestra alta variabilidad en su concentración de acuerdo con la época de colecta (temporada seca y lluviosa), de modo que los autores lo consideran como un posible indicador de estrés (Informe anual Ubipro, 2006).

- Cultivo

Las condiciones para la germinación incluyen medio de germinación (agar 1%) y temperatura de 25°C (RBG, 2006). Para su desarrollo necesita luz solar de forma directa la mayor cantidad de horas posible. Puede soportar sin problemas las temperaturas de algunos grados bajo cero. En condiciones ideales es adecuado evitar las lluvias. Por otro lado, existen reportes de que en época de escasez las hojas de esta especie son consumidas por cabras. Sin embargo, no se relaciona este fenómeno de herbivoría con la producción de metabolitos secundarios (Ramírez *et al.*, 2006).

***Lippia graveolens* Kunth**

- Taxonomía y distribución

Especie de la familia Verbenaceae que se caracteriza porque sus miembros son arbustos o hierbas anuales o perennes, de hojas opuestas o alternas, enteras a dentadas o disectadas, ex-estipuladas.

Presentan flores perfectas, usualmente irregulares. Brácteas en espigas, racimosas, cáliz usualmente con 4-5 sépalos unitarios, lóbulos a veces desiguales; corola irregular mayoritariamente bilabiada y tubular, 4 estambres didínamos, epipétalos y alternos con los lóbulos de la corola. Ovario superior con 2-4 celdas, un estilo apical y 2 estigmas. Fruto separado en su maduración en 2 ó 4 nueces o a veces dropáceo (Martin y Hutchins, 1980).

La especie *Lippia graveolens* H. B. K. tiene los sinónimos: *Goniostachyum graveolens* (H. B. K.) Small y *Lippia berlandieri* Schauer. Se la conoce comúnmente como “orégano mexicano”. Es una planta nativa del Sur de Norteamérica, México, Nicaragua, Guatemala y Honduras. En México, se encuentra de forma silvestre, en regiones áridas y semiáridas de al menos 24 estados. Sus principales hábitats están en suelos generalmente pedregosos de cerros, laderas y cañadas entre los 400 y 2000 metros de altitud, aunque se le halla en mayor abundancia entre los 1400 y 1800 metros de altitud. Se distribuye desde Texas hasta Centroamérica. En Nuevo México se describe la especie en colinas de roca seca, en una altura de 915.5 a 1676 m s.n.m. y con floración de marzo a octubre (Martin y Hutchins, 1980). En San Rafael, Coxcatlán, se encuentra en huertos y barrancas de selva baja caducifolia, pero también está en Tetecheras de *Neobuxbamia tetetzo* (Rosas, 2003).

- Descripción botánica

Arbustos aromáticos que alcanzan hasta 4 m de altura y desarrollan en promedio 1.20 m de follaje. Presenta tallo delgado, pubescente y densamente resino-puntado La planta tiene tallos ramificados, cortamente pilosos y con gran cantidad de hojas, que constituyen la parte aprovechable. Las hojas, oblongas a elípticas de hasta 65 mm. de largo, crenadas, pubescentes y resino-glandulares. Peciolos de 2-20 mm. de longitud, angostamente lanceolados, acutados, pubescentes y resino-glandulares. Tienen una textura rugosa y con ligeras vellosidades. Las flores son pequeñas, corola amarilla o blanca con centro amarillo; tubo de 3 a 6 mm. de largo y pubescente en el exterior, y forman inflorescencias en racimos. Los frutos son pequeñas cápsulas que contienen las semillas de color café, no mayores de 0.25 mm (Huerta, 1997; Martin y Hutchins 1980).



Figura 3. *Lippia graveolens* con flor, en San Rafael, Coxcatlán, Puebla

- Usos

Alimenticio: Es usado en México y Norteamérica en alimentos, bebidas alcohólicas, carnes y productos cárnicos, condimentos, salsas, productos lácteos, verduras procesadas y pasabocas (Leung y Foster, 1996). También se añade industrialmente a salsas, aderezos y enlatados. La mayor producción de esta especie con fines comerciales se concentra en los estados de Durango, Guanajuato, Jalisco, Querétaro, San Luis Potosí y Zacatecas. El orégano mexicano es un producto muy importante en la economía del país, ya que es el primer exportador a nivel mundial con el 35-40% del mercado internacional. La producción anual en México es cercana a las 40000 toneladas, aunque con el nombre de orégano, en el país se manejan cerca de 40 especies. Su alta demanda se debe al gran contenido de aceites esenciales que presenta la hoja.

Medicinal: Las hojas se usan con fines analgésicos, anti-inflamatorios, anti-piréticos, anti-espasmódicos y abortivos (Pascual *et al.*, 2001). También se ha descrito como expectorante ya que el uso de los tallos y hojas en decocción produce un efecto broncodilatador (Germosen-Robineau, 2003). En San Rafael y Zapotitlán de Salinas la parte aérea se usa para tratar enfermedades gastrointestinales, en especial la diarrea y los dolores de estómago, así mismo para cólicos y como abortivo (Hernández *et al.*, 2005). Se usan las ramas con hojas y flores, siendo la coccción la manera más común de prepararlas. La coccción tibia en ayunas se usa como té para la tos. Se toma una vez para tratar la fiebre, mientras que como abortivo se utiliza como agua de tiempo. El cocimiento de las hojas se usa como emenagogo para que baje la menstruación; si se agregan más hojas, agua y un poco de alcohol se puede usar para baños de asiento cuando hay comezón en la vagina. La hoja soasada es usada para heridas, pasmo o granos. El jugo de estas hojas, en gotas o en aceite, sirve para el dolor de oídos.

- Química de la especie

Para las hojas, raíces y parte aérea se han descrito aceites esenciales, cerca de 10 iridoides, flavonoides y la naftoquinona lapachenol.

Por ser una especie aromática es rica en aceites esenciales. Vernin *et al.* (2001) mediante hidrodestilación, espectrometría de masas y cromatografía de gases obtuvieron 45 compuestos, correspondientes al 93% del aceite, de los cuales los mayoritarios fueron el carvacrol (71%) y el timol (5%). Entre los monoterpenos del aceite se han descrito borneol, camfeno, carvacrol, cineol, ρ -cimeno, mirceno, α y β - pineno, terpinenol, α -terpineno, α -terpineol, α -tuyeno y timol.

La especie se caracteriza por presentar flavonoides. En un estudio reciente y minucioso de estos metabolitos se describieron 23, de ellos 20 por primera vez (Lin *et al.*, 2007). Estos 23 compuestos fueron reunidos en 3 grupos:

1. Grupo de flavonas y flavonoles: galangina, metilgalangina, apigenina, apigenina 7-*O*-glucósido, scutelarina, scutelarina 7-*O*-hexósido, 6-metilscutelarina, 6,7-dimetilscutelarina, luteolina, luteolina 7-*O*-glucósido, quercetina, 6-hidroxluteolina, 6-hidroxluteolina 7-*O*-hexósido y 6-hidroxluteolina 7-*O*-ramnósido.
2. Grupo de flavanonas: pinocembrina, naringenina, sakuranetina, eriodictiol, eriodictiol 7-*O*-glucósido, taxifolina, pentahidroxi-flavanona-A, pentahidroxi-flavanona-A 7-*O*- hexósido, pentahidroxi-flavanona-B, pentahidroxi-flavanona-B 7-*O*- hexósido-1 y pentahidroxi-flavanona-B hexósido-2.
3. Grupo de hidrochalconas: floretina, floridzina (floretina-6-*O*-glucósido), 3-hidroxi-floretina y 3-hidroxi-floretina 6-*O*-hexósido.

Otros flavonoides aislados incluyen pilosina, cirsimaritina, kaempferol, isokaempferido, un derivado de catequiza y un hexósido de quercetina no identificado (Soto, 2007) con actividad antioxidante evaluada a partir del extracto de acetato de etilo y de metanol por el método de radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).

Entre los iridoides reportados para esta especie se encuentran loganina, secologanina, secoxiloganina, dimetilsecologanósido, ácido logánico, ácido 8-epi-logánico y carioptósido. Sin embargo, los constituyentes principales son el ácido carioptosídico y lippiósido I y II, que corresponden al ácido esterificado en la posición 6 de la glucosa con *p*-coumaroil o residuos cafeil, respectivamente (Rastrelli *et al.*, 1998).

Se ha descrito que la composición de estos aceites esenciales en esta especie depende de la madurez de la planta y de su condición cultivada o silvestre. En el caso de 1-8 cineol y del carvacrol, la concentración es menor en las plantas silvestres que en las cultivadas, a diferencia de la concentración de timol (Silva y Dunford 2005). El carvacrol se ha descrito como antihelmíntico y

fungicida (Harborne y Baxter, 1983), antibacteriano (Bastide *et al.*, 1987; Russell, 1986), antidiurético y antiplaquetario (Lawrence, 1992), citotóxico (Jiménez *et al.*, 1993), carminativo y expectorante (Leung y Foster, 1995).

- Naringenina

Esta flavanona (4',5,7-trihidroxi-flavanona), es una aglicona que se encuentra como compuesto principal de los cítricos y en la uva, al igual que su glucósido, la naringina (4',5,7-trihidroxi-flavanona-7-ramnoglucósido). Tiene un peso molecular de 272.257 g/mol y registro CAS 480-41-1 y un coeficiente de extinción de 10000 milimolar.

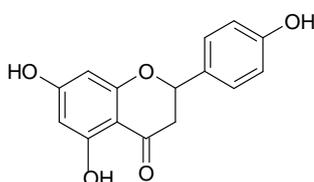


Figura 4. Estructura de la naringenina

Se le han descrito múltiples actividades biológicas que se han estudiado mayoritariamente a nivel *in vitro*. La más estudiada ha sido su actividad antioxidante en especies como *Lycopersicon esculentum* cv. Naomi F1 (Raffo *et al.*, 2006) y en la misma *Lippia graveolens* (González *et al.*, 2007). El mecanismo antioxidante de los flavonoides se debe a que inhiben enzimas involucradas en la generación de radicales libres, como xantina oxidasa, ciclooxigenasa, lipoxigenasa, monooxigenasa y NADH oxidasa. Por otro lado, actúan como quelantes de metales (como hierro y cobre), elementos importantes en el metabolismo del oxígeno y que, si bien son esenciales en varias funciones fisiológicas como hemoproteínas y cofactores de diversas enzimas (incluyendo algunas con actividad antioxidante), pueden ser también generadores de radicales libres. Los flavonoides unen estos radicales especialmente en el anillo B (mitad catecol), los grupos 3-hidroxil y 4-oxo en el anillo heterocíclico y en los grupos 5 hidroxil y 4 oxo entre el anillo heterocíclico y el anillo A. Debido a que presentan un potencial redox bajo ($0.23 < E^{\circ} < 0.75$ V), son termodinámicamente capaces de reducir algunos radicales libres, como el superóxido, peróxido, alcoxilo y radicales hidroxilo (Pietta, 2000).

La naringenina también ha sido descrita como inhibidor del virus de la hepatitis C (Nahmias *et al.*, 2008), agente inhibidor de úlceras, inhibidor de la proliferación en células cancerígenas de cerebro y de estómago, por los mismos efectos moduladores de los mecanismos redox (Ekambaran *et al.*, 2008), citotóxico sobre el factor de necrosis tumoral α evaluado en fibroblastos murinos de la línea

L-929 (Habtemariam, 1997) y en otras líneas celulares, favoreciendo la apoptosis (Kanno *et al.*, 2006); anticancerígeno mediante mecanismos de reparación del DNA en células tumorales de próstata (Gao *et al.*, 2006). En otras líneas celulares cancerígenas, como las cerebrales MCF-7, se ha establecido que la disminución de la proliferación está dada por la disminución en la toma de glucosa, y el fenómeno de inducción a la apoptosis se ha asociado con la estructura del carbono 7 (Lee *et al.*, 2008).

La naringenina ha mostrado propiedades antiinflamatorias (Hirai *et al.*, 2007), cuyo mecanismo se basa exclusivamente en la inhibición del factor nuclear κ B, un importante factor de transcripción de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), productora de óxido nítrico de la respuesta inflamatoria (Hämäläinen *et al.*, 2007). También se ha visto efecto relajante arterial en arterias coronarias porcinas mediante estudios de relación estructura-función (SAR) (Xu *et al.*, 2007), como agente que disminuye los niveles de colesterol debido a la inhibición de la síntesis de ésteres de colesterol (Borradaile *et al.*, 1999; Jeon *et al.*, 2007) y como anti-estrogénico (Ruh *et al.*, 1995).

Aunque la afinidad de los flavonoides por los receptores de estrógeno (ER α y ER β) es de 1000 a 10000 veces más baja que para sus ligandos naturales (17 β -estradiol o E2). En la década de los 40's del siglo pasado se empezó a sospechar algún efecto anti-estrogénico al observar, en Australia occidental, que las ovejas que consumían clavel rojo eran infértiles. La palmitoilación del receptor de estrógeno es un factor determinante en la localización del receptor en la membrana plasmática y en su habilidad para activar la cascada de señalización en vías de proliferación. La naringenina induce la palmitoilación del receptor, más rápido que su sustrato, de modo que el receptor se disocia de la caveolina 1 en la membrana; además, la naringenina impide que se una a los adaptadores e induce, de manera independiente a la palmitoilación, la activación de la cinasa P38, responsable de los efectos antiproliferativos de la naringenina en células cancerígenas. De modo que este flavonoide, al unirse al receptor del estrógeno, modula selectivamente las modificaciones post-traduccionales lipídicas, lo que representa un mecanismo que dirige las células cancerígenas hacia la proliferación o hacia la apoptosis (Galluzzo *et al.*, 2008). Por otro lado, la naringenina aumenta significativamente la concentración citosólica del receptor α de estrógeno en útero e induce la activación de éste en el núcleo de células hepáticas en dosis de 4-100 mg/Kg en ratas (Miller *et al.*, 2004).

En relación con la citotoxicidad adjudicada a la naringenina se han propuesto varios mecanismos basados en la estructura química, siendo determinantes la presencia del 4-carbonilo, asociado a la inhibición de la síntesis de ácidos grasos, y la presencia de la doble ligadura entre el carbono 2 y el carbono 3, que le confiere a la molécula una estructura planar de anillo A y C. Esta ligadura se ha asociado con la inhibición de la actividad de la glicoproteína P, un transportador de membrana responsable de la exportación de agentes quimioterapéuticos, con daños mitocondriales y muerte celular (Plochman *et al.*, 2007).

Por otro lado, los procesos oxidativos han mostrado tener una asociación con enfermedades crónicas degenerativas. La naringenina se ha asociado con la inactivación parcial de la reacción de Fenton, y la subsecuente quelación de hierro (Cheng y Breen, 2000); una restauración de la protección dependiente de glutatión contra peroxidación lipídica en microsomas de hígado con deficiencia de α -tocoferol; además de inhibir la producción de malonaldehído inducido por ácido ascórbico en mitocondrias de cerebro de rata o por auto-oxidación en homogenizados del mismo tejido. Otros efectos neuroprotectores de la naringenina incluyen la inhibición de ciertos compuestos neurotóxicos, como la proteína β -amiloide, que media la producción de radicales libres en el sistema nervioso, fenómeno asociado a la enfermedad de Alzheimer (Heo *et al.*, 2004). Otras acciones de esta flavanona incluyen una modulación del citocromo P-450 dependiente de monooxigenasa, la primera enzima involucrada en el metabolismo de varios xenobióticos como fármacos, carcinógenos y tóxicos ambientales (Ueng *et al.*, 1999). Se ha descrito como agente atenuante de la nefrotoxicidad en ratas (Badary *et al.*, 2005), protector celular contra apoptosis generada por rayos UV, por lo que se sugiere que previene el envejecimiento de la piel y la carcinogénesis (El- Mahdy *et al.*, 2008) y aún, se ha visto asociada con procesos de memoria y aprendizaje en ratas inyectadas con streptozotocina, sustancia que causa trastornos cognoscitivos (Baluchnejadmojarad y Roghani, 2006).

Este compuesto tiene actividades particulares para las plantas. Algunos flavonoides generan una activación en los genes *nod*, que inducen las funciones en las moléculas señal en los procesos de interacción de las leguminosas con bacterias nodulantes. Sin embargo, la naringenina, entre otras flavanonas, exhibe un efecto inhibitorio sobre estos genes, al menos en modelos de alfalfa (Peters y Long, 1988). Por otro lado, este compuesto se ha identificado después de un ataque fúngico con *Cephalosporium gregatum* tipo B en *Vigna angularis* (Abe *et al.*, 1987).

- Cultivo

Es una especie que necesita luz solar directa, riego diario pero evitando el sobre-riego. No es exigente en cuanto a humedad del suelo, pues en suelos secos se desarrolla bien. La descripción del suelo incluye características rocosas de piedra caliza, tipo arenoso-arcilloso (Damude y Bender 1999).

***Castela tortuosa* Liebm.**

- Taxonomía y distribución

Especie de la familia Simaroubaceae, a la cual pertenecen árboles y arbustos con flores regulares cuyos estambres y pétalos son desiguales en número; si no lo son, entonces son alternos. Sépalos y pétalos de 4 a 5, insertos o sobre un disco hipógino. Los estambres no son tetradínamos; los pétalos se encuentran formando escalas en la base. Hojas no reducidas a escalas, ni palatilobuladas, sin estípulas largas coalescentes ni peciolos encerrando la yema axilar. Hojas glandulares y exestipuladas. Presentan más de un ovario superior 2-5 carpelado; cuando sólo hay uno, éste tiene 1 o más celdas. Hojas compuestas y fruto en samara o drupa (Martin y Hutchins, 1980).

Es conocida comúnmente como “chaparro amargo” o “chaparro amargoso”, “bisbirinda” (Tamaulipas), “palo amargoso” (Oaxaca), “corona de Cristo” (Nuevo León), “palo copache” (Durango), “hierba de perro” (San Luis Potosí) y “venenillo” o “xixontle” en la región de estudio, Tehuacán, Puebla (Oliveros, 2000). Presenta gran número de sinonimias por lo que la información no se encuentra del todo reunida y sistematizada bajo un mismo nombre científico. Entre los sinónimos están *C. erecta* Turf. Subs. *texana* (T. et G.) Cronq.; *C. tortuosa* Liebm. y *C. nicholsonii* beta *texana* T. et G.

Esta especie se distribuye desde Texas, Estados Unidos, hasta el estado mexicano de Oaxaca, aunque se ha reportado al norte de Colombia y zonas adyacentes en Venezuela. En México se distribuye en los estados de Durango, Chihuahua, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, y Tamaulipas (Aguilar *et al.*, 1994).

- Descripción botánica

Árbol o arbusto espinoso de 1 a 2 m de alto, con ramas espinosas de corteza generalmente amarga, con cavidades almacenadoras de aceite. Pueden ser monoicos, dioicos o polígamos. Las ramas son

jóvenes densamente pubescentes. Hojas alternas que miden de 0.8 a 1.5 cm de largo, rara vez opuestas, pinnadas compuestas a unifoliadas, menos frecuentemente simples, nunca glandulares; estípulas generalmente ausentes; si están, son intrapeciolares. Inflorescencias axilares o terminales, en racimos o mezcla de panículas o cimas de dicasios: flores bisexuales o unisexuales, generalmente numerosas, pequeñas actinomorfas, hipoginas, sépalos (3-)5(-7), connatos en la base, menos frecuente libres, imbricados o valvados; pétalos (3-) 5(-7) o en ocasiones ausentes, libres, imbricados o valvados. El estambre generalmente el doble que el número de sépalos o menos frecuente, tanto como sépalos y alternos a ellos, filamentos libres sobre el disco floral, a veces con un apéndice ventral cerca de la base, anteras disecas, tetrasporangiadas, dehiscencia longitudinal. Las flores miden 2.5 mm de largo y presentan un disco nectarífero generalmente presente en forma de copa, en ocasiones alargado en un ginóforo corto androgínforo. Ovario súpero, carpelos 2-5(8), parcial o totalmente unidos, rara vez carpelos enteramente libres, placentación axilar; en ocasiones solamente un lóbulo es ovulífero, estigmas terminales involutos, uno por lóbulo, rara vez pareados, erectos y ascendientes, epítropos, algunas veces apótrofos, anátropos o hemítropos. Los frutos están en cápsulas o sámaras, rara vez drupas o bayas, a veces esquizocaros, separándose en mericarpos indehiscentes, secos o carnosos; semillas generalmente solitarias (Medina y Chiang, 2001).



Figura 5. *Castela tortuosa* con fruto en San Rafael, Coxcatlán, Puebla

- Usos

Esta especie ha sido ampliamente utilizada en el tratamiento de diversas enfermedades, como la amibiasis, la diabetes, la diarrea, la disentería y la tricomoniasis (Mendoza Orozco y Godínez Álvarez, 2007). El tratamiento contra las amebas se realiza mediante una infusión, en ayunas, de $\frac{3}{4}$ de taza de agua hervida con trozos de tallos (Sámamo, 1995). Mientras que para gastroenteritis se cuecen 50 gramos de hojas en 1 litro de agua, se filtra y se completan 2 litros, para consumir un vaso de esto antes de cada comida. En San Rafael, Coxcatlán, Puebla utilizan el té elaborado con la parte aérea para aliviar la diabetes (Canales, 2005). Otros usos reportados incluyen tratamiento de dolores abdominales y espasmódicos (Martínez, 1987).

- Química de la especie

Se han descrito terpenos de tipo di, tri, tetraterpenos y los llamados nor-terpenos o quasinoideos, característicos de la familia botánica a la que pertenece *C. tortuosa* (Díaz de León, 2005). Estos compuestos se originan biosintéticamente de la degradación oxidativa y reordenamiento de triterpenos tetracíclicos siendo por tanto nor-triterpenos. La mayoría de los quasinoideos, suelen ser los de esqueleto pentacíclico que muestran un mayor y más amplio rango de actividades biológicas. En *C. tortuosa*, el estudio de los quasinoideos se llevó a cabo a partir de la década de los 60's con el aislamiento de la chaparrina (Geissman y Ellestad, 1962), primer compuesto caracterizado. Se han aislado varios quasinoideos de la corteza mediante técnicas espectroscópicas, en particular NMR. Entre ellos: chaparrinona, los glucósidos castelósido A (chaparrin-2-O-β-D- glucopiranosido), castelósido B (glaucarubol-2-O-β-D-glucopiranosido) (Chaudhuri *et al.* 1992) y castelalene-1-O-β-D-glucopiranosido (Kubo y Chaudhuri, 1993); y los quasinoideos castelanina, glaucarubolona (Kubo *et al.*, 1993) y chaparrumarin (Kubo *et al.* 1992). Este último como agente inhibidor del crecimiento de insectos, puntualmente del lepidóptero *Heliothis virescens*.

Posteriormente Dou *et al.* (1996) aislaron el 11-O-*trans-p*-cumaroilamarólido en la fracción clorofórmica del extracto metanólico. Estos compuestos han mostrado actividad antiparasitaria y citotóxica en protozoarios como *Plasmodium* con CI₅₀ de 0.92 μg/ml para el último quasinoide descrito. Por otro lado, se reportan compuestos como fenoles y flavonoides y algunos alcaloides como la alantoína (Mendoza Orozco y Godinez Alvarez, 2007). Entre los flavonoides, el grupo de Kubo (1993) aisló la prosopina y el fisetinidol. La actividad antiamebiana del extracto de esta especie se ha evaluado *in vitro* (Calzado Flores *et al.*, 2000), así como su actividad antimalárica (Hotesttman *et al.*, 1995)

- Fisetina

La fisetina (3,3',4',7-tetrahidroxiflavona) es un flavonol aislado mayoritariamente de las fresas, con un peso molecular de 286.24 g/mol y registro CAS 528-48-3. Su coeficiente de extinción es 20892 milimolar.

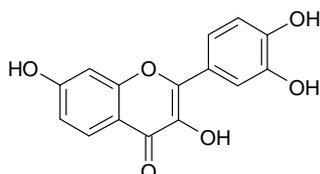


Figura 6. Estructura de la fisetina

En cultivo de células cancerígenas humanas de próstata, este compuesto detiene el ciclo celular en la fase G1 con una marcada disminución en la expresión de las ciclinas D1, D2 y E y el desencadenamiento de apoptosis mediante la inhibición de proteínas inhibitoras de este proceso y activación de caspasas 3, 8 y 9 y de activadores mitocondriales secundarios (Khan *et al.*, 2008). Así mismo, como en la mayoría de flavonoides, se ha comprobado su actividad antioxidante. En *C. elegans* la fisetina disminuyó la concentración de especies reactivas de oxígeno intracelular bajo condiciones de estrés térmico letal, por lo que aumentó la sobrevivencia de estos organismos mediante la translocación del factor de transcripción FoxO DAF-16 del citosol al núcleo, lo que indica una modulación de este flavonol en las cascadas de señalización (Kampkötter *et al.*, 2007). En liposomas la actividad antioxidante se ha explicado mediante el anclaje de la fisetina en la región interfacial de liposomas, entre las cabezas hidrofílicas y las colas hidrofóbicas, inhibiendo la peroxidación lipídica con una eficiencia del 50% (Sengupta *et al.*, 2004).

En células cancerígenas hepáticas humanas, la fisetina ha mostrado inducción de la apoptosis de las mismas mediante la activación de caspasas-3 y la expresión de la proteína p21 –acompañada de fragmentación del ADN- en forma dosis dependiente con la máxima concentración de 80 μ M (Yen-Chou *et al.*, 2002). En otras líneas celulares ha mostrado inhibición de la proliferación celular, como en las provenientes de colon: Caco-2, MCF-7 y HT-29 con EC₅₀ de 60 μ M (Kuntz *et al.*, 1999); en células de la próstata (Haddad *et al.*, 2006) con el arresto de las mismas en la fase G2/M; en células leucémicas (Lee *et al.*, 2002) y, en la línea HL60 la adición de fisetina mostró altos niveles de expresión de NF κ B, MAPK p38 e inhibición de enzimas encargadas del mantenimiento del status redox (Ruela de Sousa *et al.*, 2007). En la línea U937 (células mieloides) la fisetina compite en la toma de glucosa, por lo que se la ha propuesto como un bloqueador alternativo de este proceso (Park, 1999). Recientemente, se ha descrito un efecto neuroprotector que permite la diferenciación neuronal e inhibe la agregación de la proteína β amiloide, causante de la pérdida neuronal en la enfermedad de Alzheimer. Esta actividad se adjudica al grupo 3'4'-hidroxilo de la fisetina, mientras que el grupo 3 ó 7-hidroxilo parece no intervenir (Akaishi *et al.*, 2008).

La actividad más conocida de la fisetina es la relacionada con la memoria, pues se sugiere que este flavonoide, además de su actividad protectora neural, podría estar creando nuevas conexiones entre neuronas mediante un proceso que han denominado “potenciación a largo término” (LTP), ya que induce la fosforilación de la proteína CREB en el hipocampo de rata, de modo que los autores proponen a la fisetina como un compuesto que facilita la memoria a largo término y podría ser de gran utilidad en el tratamiento de pacientes con desórdenes de memoria (Maher *et al.*, 2006).

- Cultivo

Se recomienda la luz solar directa. Puede soportar sin problemas las temperaturas mínimas también muy rígidas, de muchos grados bajo cero. En climas particularmente ventosos, se aconseja asegurar los árboles jóvenes a palos altos y sólidos, para evitar que el viento pueda quitar las jóvenes raíces desarrolladas; puede suceder que los ejemplares que tienen pocos años sean susceptibles al frío fuerte y el viento. Estas plantas no siempre son verdes y pierden las hojas por algunos meses al año. *es.gardening.eu/arc/plantas/Arboladuras/Castela-tortuosa-Liebm/13011*

Zona de estudio

El poblado de San Rafael se sitúa en la parte centro-sur de México, en el municipio de Coxcatlán, Puebla, al sudeste de la reserva de la biosfera de Tehuacán-Cuicatlán. Su abanico aluvial forma parte de la sierra Mazateca, situada en la porción sudeste del valle de Tehuacán: N18°12' - 18°14'; W 97°07' - 97°09'. Este valle, según lo propuesto por Rzedowski (1988), se ubica dentro del reino Neotropical, región xerofítica mexicana. Es un área relativamente pequeña en el sector sureste del Estado de Puebla y en porciones adyacentes al de Oaxaca, así como una superficie reducida de Veracruz.

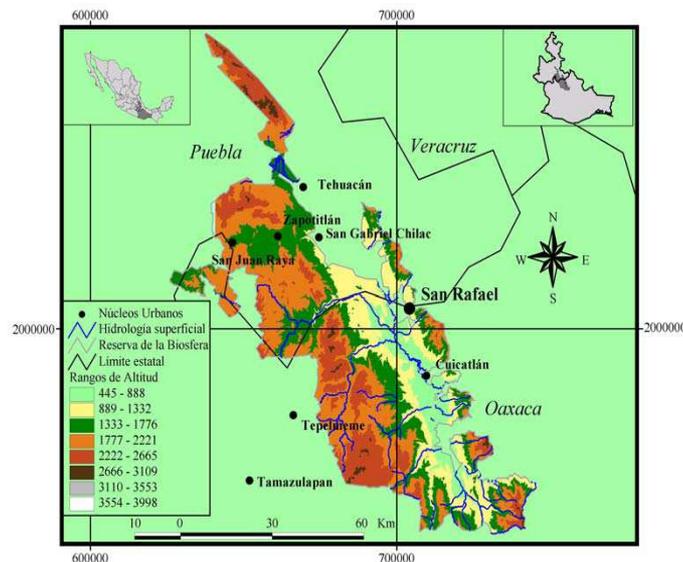


Figura 7. Localización geográfica de San Rafael, Puebla.

La zona se caracteriza por presentar clima seco, pero algo aislada de la gran faja continua de zonas áridas del altiplano. Su flora, sobre todo en las partes más cálidas, presenta cierta relación con las de la Provincia de la depresión de Balsas, que es una región amplia de tierras bajas que se intercala entre el eje volcánico transversal y la Sierra Madre del Sur, ocupando porciones de los Estados de

Michoacán, Guerrero, Morelos y Puebla. Las altitudes menores oscilan entre 300-500 m s.n.m. (Miranda 1948). Los géneros restringidos son *Oaxacania*, *Pringlechloa* y *Solicia*.

El clima, según la clasificación de Köeppen modificada por García (1988) para las condiciones de la República Mexicana (Soto *et al.*, 1999), corresponde a seco semiárido, dentro del subgrupo menos seco de los áridos con P/T^1 no mayor a 22.9; con temperatura media anual mayor a 22°C y el mes más frío sobre 18°C; con régimen de lluvia en verano; clima considerado como extremo, ya que la oscilación de la temperatura media mensual entre el mes más frío y el más cálido varía entre 7 y 14°C; y con una marcha de la temperatura tipo Ganges caracterizada porque el mes más cálido se presenta en junio, antes del solsticio de verano. Lo anterior se reduce con la expresión climática $Bs_1(h)w''(w)eg$ (Fernández 1999). La zona está drenada por el río Tehuacán ubicado al oeste del cerro Colorado, que se convierte en el río Salado y entra en el nordeste por la sierra madre de Oaxaca (Serrano, 2004).

El suelo es de origen cuaternario, Era Cenozoica, con rocas sedimentarias y volcano-sedimentarias en conglomerados, formando calizas, areniscas, rocas ígneas y fragmentos de cuarzo en una matriz arcillo-arenosa con sedimentos de lutita y areniscas del Paleozoico superior. El suelo es predominantemente regosol, calcáreo, eutrípico y xerosol háplico (Serrano, 2004).

La zona registra una precipitación total anual de 394.6 mm. En cuanto a la vegetación, es un bosque tropical caducifolio. Hay 57 especies de Angiospermas distribuidas heterogéneamente, que, por nivel topográfico y de acuerdo con la clasificación de Miranda y Hernández (1963), se reconocen los siguientes tipos de vegetación:

Cardonal de *Pachycerus weberi* (J. Caulter) Bakeb

Chiotillal de *Escontria chiotilla* (F:A:C) Webben Rose

Cuajitotal con especies dominantes como *Bursera morelensis* Ramirez, *Mimosa polyantha* Benth, *Fouquieria formosa* Kunth y el arbusto *Sanvitalia fruticosa*.

Fouqueria con especies dominantes como *Fouquieria formosa* Kunth, *Bursera aptera* Ramirez, *Mimosa polyantha* Benth, *Ceiba parvifolia*, *Manihotoides pauciflora* (Bandegee) D. J Roger y Appan, *Senna wislizenii* (A: Gray) H. S Irwin y Barneby, *Mimosa luissina* Bandegee y el arbusto *Sanvitalia fruticosa* (Aguilar 2006).

¹ Índice de humedad de Lang. Cociente que resulta de dividir la precipitación total anual (mm) sobre la temperatura media anual (°C).

El Valle de Tehuacán-Cuicatlán es una de las reservas bióticas más importantes de México. En 10000 Km² posee, probablemente, la mayor diversidad biológica de las zonas áridas de Norteamérica, con 2700 especies de plantas vasculares, de las cuales cerca del 25% son usadas por diferentes comunidades humanas (Canales *et al.* 2006), que también tienen una alta diversidad, pues en esta área relativamente pequeña confluyen siete (Nahuas, Popolocas, Mazatecos, Chinantecos-Cuicatecos, Ixcatecos, y Mixtecos) de los 52 grupos indígenas que actualmente existen en todo el territorio de México (Dávila *et al.*, 2002). Aunque el grupo étnico predominante es el Naha, no todos los habitantes son nativos; de hecho habita gente proveniente de Oaxaca y el sur de Puebla. Adicionalmente, esta región ha tenido gran importancia para la reconstrucción de la prehistoria de la región cultural conocida como Mesoamérica, pues en algunas de sus cuevas se ha encontrado la evidencia más antigua de domesticación de plantas y origen de la agricultura en el Nuevo Mundo (Bye, 1998; Hernández-Xolocotzi, 1993) y recientemente ha sido decretada como una Reserva de la Biosfera.

De un total de 374 especies pertenecientes a 249 géneros y 87 familias descritas en San Rafael, Coxcatlán, cerca de 368 son usadas por habitantes de la comunidad para uno o varios fines (Rosas 2003); cifra similar al dato de 289 plantas útiles de la región reportado por Paredes (2001). Este gran número de plantas útiles en San Rafael tiene influencia en el hecho de que existe un alto número de especies introducidas en los jardines de las personas de esta comunidad, esencialmente con usos ornamentales, como lo muestran Blanckaert *et al.* (2004):

Tabla 1. Porcentaje de usos de las plantas útiles de San Rafael, Coxcatlán, Puebla.

Condición	Uso	%
Cultivadas	ornamental	70
	comestible	29,5
	medicinal	6,5
	otro	16
Protegidas	ornamental	55,2
	comestible	31
	medicinal	17,2
	otro	20,7
Tolerantes	ornamental	47,6
	comestible	36,5
	medicinal	15,9
	otro	58,1

HIPÓTESIS

Entre los factores que determinan la acumulación de metabolitos secundarios se encuentran la intensidad luminosa, el fotoperíodo, la temperatura, y la disposición de nutrientes y agua, por lo tanto, su manejo en condiciones de cultivo en invernadero permitirá controlar la acumulación de dichos metabolitos en plantas medicinales de la región mexicana de San Rafael, Coxcatlán, Puebla: *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less, *Castela tortuosa* Liebm. y *Lippia graveolens* Kunth.

OBJETIVOS

Objetivos generales

- Determinar las condiciones para el cultivo *ex situ* de 3 plantas útiles de San Rafael, Coxcatlán, Puebla: *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less, *Castela tortuosa* Liebm. y *Lippia graveolens* Kunth.
- Analizar el contenido de los metabolitos secundarios 5,7-dihidroxi-3,6,8,2',4',5'-hexametoxiflavona en *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less; naringenina en *Lippia graveolens* Kunth y fisetina en *Castela tortuosa* Liebm. bajo condiciones de invernadero.

Objetivos particulares

- Realizar la colecta de semillas de las 3 especies: *Gymnosperma glutinosum*, *Castela tortuosa* y *Lippia graveolens* en San Rafael, Coxcatlán, Puebla.
- Establecer las condiciones óptimas de germinación de las especies seleccionadas.
- Establecer los valores de riego óptimo y estrés hídrico de las especies en cultivo.
- Evaluar el efecto del flujo fotónico y del riego sobre la productividad y sobre la acumulación de metabolitos secundarios de las especies establecidas en invernadero.
- Cuantificar el efecto de los tratamientos sobre la acumulación de metabolitos secundarios 5,7-dihidroxi-3,6,8,2',4',5'-hexametoxiflavona en *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less; naringenina en *Lippia graveolens* Kunth y fisetina en *Castela tortuosa* Liebm. en diferentes etapas del desarrollo vegetativo de cada una de las especies seleccionadas.

METODOLOGIA

Elección de especies

Los criterios de selección de las especies *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less, *Castela tortuosa* Liebm. y *Lippia graveolens* Kunth incluyeron la importancia del uso medicinal en la comunidad de San Rafael y la existencia de antecedentes químicos sobre las actividades biológicas evaluadas (Canales *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 1988; Soto, 2007; Lin *et al.*, 2007; Pascual *et al.*, 2001; Kubo *et al.*, 1993; Khan *et al.*, 2008; Maher *et al.*, 2006).

Colecta de semillas

Para cada una de las especies se utilizaron dos lotes de semillas: uno de semillas almacenadas (1) y otro de semillas colectadas inmediatamente antes de iniciar los experimentos (2):

Gymnosperma glutinosum (Spreng.) Less:

1. Fue colectada en Tepanco de López, Puebla por el personal del Banco de Semillas de la FES-IZTACALA, con número de colecta Jic 23037, del 18 de septiembre de 2001. Las semillas provinieron de 199 individuos y se almacenaron hasta octubre de 2007 a -20°C. El total de semillas utilizadas fue de 180.
2. Fue colectada en Tepeji del Río (Hidalgo) N 19°54' W 99°21' a 2175 m s.n.m. en enero de 2008 por personal del Laboratorio de Fitoquímica de la Ubipro. Se mantuvo a temperatura ambiente hasta su uso.

Lippia graveolens

1. Semillas colectadas en San Rafael, Coxcatlán, Puebla N 18°12' y 18°14' W 97°07' y 97°09' a 957 m s.n.m. en 2005 por el personal del Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Ubipro. Las semillas se mantuvieron a temperatura ambiente y para los experimentos se utilizaron en total 99 semillas.
2. Se realizó una colecta, en octubre de 2007, de 451 semillas de los individuos de 2 años de edad establecidos en el invernadero de la FES- IZTACALA bajo las coordenadas N 19°31'17.7" W 99°11'19.5" a 2254 m s.n.m. Las semillas se mantuvieron a temperatura ambiente, para los experimentos se utilizó el número total de semillas colectadas.

Castela tortuosa

1. Fue colectada en mayo de 2002 por parte del personal del Laboratorio de Fitoquímica de la Ubipro en Zapotitlán de las Salinas, Puebla, bajo las coordenadas N 18°19'55" W 97°28'28", las

semillas se almacenaron a -20°C en el Banco de Semillas de la Ubipro hasta el momento de los experimentos. De esta colecta se trabajó con un total de 110 semillas.

2. Colectada por parte del personal del Banco de Semillas de la FES-IZTACALA en abril de 2008, en San Rafael, Coxcatlán, Puebla N $18^{\circ}12'$ y $18^{\circ}14'$ W $97^{\circ}07'$ y $97^{\circ}09'$. El número de colecta es HCM-041 y se utilizó un total de 320 semillas, almacenadas hasta su uso a temperatura ambiente.

Germinación de semillas

Las semillas de *Gymnosperma glutinosum* provenientes de Puebla y las semillas de *Lippia graveolens* fueron tratadas de la misma manera: desinfección con hipoclorito de sodio NaClO al 1% durante 5 minutos, seguido de enjuague 3 veces con agua destilada. Posteriormente se dejaron una noche en imbibición en agua destilada y se sembraron en agar bacteriológico al 1%. Se incubaron en un cuarto diseñado para este propósito bajo las siguientes condiciones: temperatura promedio de 30°C , con una máxima de 33.1°C y una mínima de 27.4°C ; Humedad máxima de 82%, mínima de 32% y un fotoperiodo de 12/12 horas. De *G. glutinosum* se hicieron 6 réplicas y de cada lote de semillas de *L. graveolens*, 3.

Las semillas de *Castela tortuosa* además de la desinfección con NaClO al 2% por 20 minutos, se escarificaron con H_2SO_4 concentrado por 20 minutos, con agitación constante cada cinco minutos para lograr la penetración del ácido. Las semillas se limpiaron con agua corriente sobre un colador para eliminar completamente los residuos del ácido y se dejaron en imbibición en agua durante una noche. La siembra en este caso se hizo directamente en almácigos de 36 pozos, llenos con la mezcla de sustrato agrolita:tierra. Cada pozo fue de 3.5 cm de ancho X 5.7 cm de alto. El material vegetal de la colecta de *G. glutinosum* proveniente de Tepeji del Río fue separado en tamices Standard Testifrng Sieve Números 50 ($300\ \mu\text{m}$) y 60 ($250\ \mu\text{m}$). Las semillas obtenidas se desinfectaron con NaClO 1% y se sembraron sobre la mezcla de sustrato agrolita:tierra 1:2 humedecida con solución Hoagland (Anexo I) en cajas transparentes de plástico de 11.5 x 10 x 2.5 cm, las cuales se llevaron al cuarto de incubación con las condiciones de luz, temperatura y humedad ya mencionadas. Debido a que los almácigos ni las cajas se subdividieron para contabilizar un subgrupo de semillas, no se tuvieron réplicas en estas dos especies. Para las tres especies, la germinación fue considerada como emergencia de la radícula.

Propagación en invernadero

Las plantas trasplantadas de cada especie se separaron en dos lotes de 80 individuos, cada uno. Un lote se colocó en el invernadero bajo una malla sombra 70% (30% de la luz total). El otro lote se

colocó en otra nave del mismo invernadero, sin malla sombra. Las plantas colocadas en cada condición de luz se dividieron en dos y se expusieron a dos condiciones de riego: bajo (estrés hídrico) y alto (riego óptimo). El diseño factorial fue 2X2 con 40 plantas por tratamiento.

En una nave independiente del invernadero, se sembraron directamente sobre tezontle semillas de *G. glutinosum* provenientes de Tepeji del Río y de *L. graveolens* provenientes de la colecta de semillas de individuos de 2 años de edad, establecidos en este mismo invernadero. En esta nave el riego se suministró permanentemente mediante un sistema de riego por aspersión de agua con nutrientes (Anexo II) por lo que se denominó fertirrigación.

El invernadero se encuentra ubicado en la Facultad de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM, en Tlalnepantla, Estado de México, bajo las coordenadas N 19°31'17.7" W 99°11'19.5" a 2254 m s.n.m.

Tabla 2. Tratamientos aplicados a las plantas en invernadero

	Riego A Riego óptimo	Riego B Estrés hídrico
Luz (Nave 1)	Tratamiento 1	Tratamiento 2
Sombra (Nave 2)	Tratamiento 3	Tratamiento 4

La sobrevivencia de las plantas se determinó considerando el total de semillas germinadas como el 100% y tiempo cero, y se registró la sobrevivencia por 5 meses en *G. glutinosum* y *L. graveolens* y por 7 meses en *C. tortuosa*.

Para establecer el volumen requerido de agua para generar las condiciones de estrés hídrico y riego óptimo en las plantas se realizó la prueba de capacidad de campo en la mezcla de sustrato agrolita:tierra 1:2. Adicionalmente, una muestra de sustrato fue analizada por parte del Departamento de Suelos de la Universidad Autónoma de Chapingo mediante el método de curva de constantes de humedad (Van Genuchten, 1980).

- Temperatura y luminosidad en el invernadero

Los datos de temperatura y de intensidad de luz se registraron mediante los dispositivos HOBO UA 002-64 Pendant temp/light, Serial 986598, Versión 1.0.6, con toma de datos cada 30 minutos, diariamente en cada una de las naves. Los datos se procesaron en Excel para obtener las medias diarias y mensuales en cada una de las naves.

Los datos de luminosidad, dados en pies-candelas (lum/ft^2) se convirtieron a unidades PAR ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) convirtiendo los pies candelas a unidades lux (1 pie-candela equivale a 10.74 luxes) y multiplicando este producto por el factor correspondiente a luz natural (6000K) que es de 0.018 (Nestor, 2006). Debido a que los dispositivos no hacen los registros de luminosidad en unidades PAR, cabe resaltar que la conversión de unidades genera un error del 53%.

Parámetros fisiológicos

Durante las etapas iniciales del experimento, tanto en el cuarto de incubación, como en semilleros y en las macetas con las plántulas establecidas de cada una de las naves se registraron parámetros fisiológicos en el tiempo cero y, posteriormente bajo los tratamientos hídricos, una vez al mes en al menos 3 plantas de cada tratamiento. Estos parámetros incluyeron asimilación de CO_2 , la concentración interna de CO_2 y conductancia estomática. Los datos se registraron mediante un Analizador Infrarrojo de Gases Portátil (IRGA), marca Li-COR modelo Li-6400, el cual presenta un sistema de intercambio de gas abierto, es decir, que tiene un flujo neto de aire a través del sistema. Se manejó una temperatura del bloque de la cámara del IRGA a 25°C y un flujo fotónico de $1500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para *L. graveolens* y *G. glutinosum* y $900 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para *C. tortuosa*.

Colecta de muestras de individuos silvestres

Se tomaron en el campo muestras de la parte aérea, de cada una de las especies (3-6 individuos) para evaluar la acumulación de los flavonoides seleccionados. Así mismo, se tomó una muestra para el ejemplar de herbario. Se muestrearon plantas adultas en el área de Zapotitlán de las Salinas N $18^\circ16'10.1''$ W $97^\circ32'17.7''$ y en San Rafael, Coxcatlán Puebla. En esta última también se registraron los parámetros fotosintéticos y la radiación fotosintéticamente activa de la zona mediante el Analizador Infrarrojo de Gases IRGA. Los datos de las colectas en el área de estudio son los siguientes:

- Gymnosperma glutinosum

1. Muestras colectadas en Agosto de 2008 en San Rafael, Coxcatlán, Puebla.
2. Colectada en la Vía a Tehuacán, Estado de Puebla en septiembre de 2008 bajo las coordenadas N $18^\circ27'36.6''$ - $18^\circ27'27.6''$ W $97^\circ26'27.6''$ - $97^\circ26'38.6''$ a 1751 m s.n.m. Radiación fotosintéticamente activa (PAR) de la zona, en promedio $508.8 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Especímenes con flor.

- Castela tortuosa

Muestras colectadas en Agosto 7 de 2008 y septiembre 19 de 2008 en San Rafael, Coxcatlán, Puebla.

Individuo 1: N 18°11'33.6" W 97°08'36.1" a 883 m s.n.m.

Individuo 2: N 18°11'42.4" W 97°08'36.6" a 898 m s.n.m.

Individuo 3, 4 y 5: N 18°12'33.9" W 97°08'31.1" a 920 m s.n.m.

PAR, en promedio $125.3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

- *Lippia graveolens*

Muestreo de Mayo de 2008 en San Rafael, Coxcatlán, Puebla N 18°12'07.9" W 97°08'15.8" a 951 m s.n.m. Plantas sin flores y pocas hojas.

Muestreo de plantas florecidas, Septiembre de 2008:

Individuo 1: N 18°11'31.6" W 97°08'36.6" a 883 m s.n.m.

Individuo 2: N 18°11'29.4" W 97°08'35.5" a 883 m s.n.m.

Individuo 3: N 18°11'29.5" W 97°08'35.4" a 903 m s.n.m.

Individuo 4 y 5: N 18°11'29.7" W 97°08'35.4" a 894 m s.n.m.

PAR, en promedio $435 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios

Al igual que con el registro de parámetros fotosintéticos, el análisis de metabolitos secundarios se realizó en el tiempo cero y cada mes desde que fueron sometidas con los tratamientos en al menos 3 plantas. Las muestras de hojas de cada especie fueron colectadas manualmente. Se pesaron y se realizó un extracto metanólico mediante maceración, que se centrifugó a 3000 rpm durante 3 minutos. Se tomaron 30 μL para inyectar en el HPLC (Harborne, 1998; Seeram *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2007), el cual se usó con un módulo de separación HP serie 1100 (Hewlett-Packard, Wilmington, DE, USA), equipado con un detector de arreglo de diodos (DAD) 1100, operado con ChemStation AO903 (1417). Las separaciones se llevaron a cabo en una columna Allsphere (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) y el detector ajustado a 260 nm. Se usó una fase móvil de agua: ácido acético: metanol 60:5:35 y un gradiente de presión definido por un flujo:

Minuto 0- Minuto 5: 1 ml/min.; Minuto 5.1- Minuto 20: 1.5 ml/min.

Se inyectó el estándar auténtico naringenina Sigma-Aldrich® con pureza de 95% y naringina Sigma-Aldrich® pureza $\geq 90\%$ los cuales fueron diluidos en metanol con una concentración final de 5 μM . Con el estándar de naringenina se llevó a cabo un ensayo de estándar interno. A partir de las referencias bibliográficas (Canales *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 1988; Lin *et al.*, 2007; Justesen *et al.*, 1998; Wang y Li, 2007) se identificaron los demás flavonoides cuantificados: pentahidroxi flavanona-glucósido en *L. graveolens*, 5,7-dihidroxi-3,6,8,2',4',5'-hexametoxiflavona en *G. glutinosum* y fisetina en *C. tortuosa*, con base en sus máximos de absorbancia y la comparación

de espectros de ultravioleta. La mayoría de tratamientos tuvieron 3 réplicas, excepto algunos casos que se muestran a continuación en la tabla 3:

Tabla 3. Número de replicas por tratamiento en análisis de metabolitos secundarios

Especie	Mes	Tratamiento	No. Réplicas
<i>L. graveolens</i>	Abril	Todos	1
	Julio	Sombra con riego óptimo	5
	Agosto	Sombra con riego óptimo	4
		Sombra con estrés hídrico	4
	Septiembre	Luz con estrés hídrico	5
	Octubre	Luz con riego óptimo	4
	Noviembre	Sombra con estrés hídrico	4
		Luz con riego óptimo	4
	Mayo	Sombra con estrés hídrico	5
		Campo: San Rafael	4
	Septiembre	Campo: San Rafael	10
	Septiembre	Campo: San Martín	4
<i>G. glutinosum</i>	Abril	Todos	1
	Mayo	Todos	1
	Julio	Todos	2
	Octubre	Sombra con riego óptimo	2
		Sombra con estrés hídrico	2
	Septiembre	Luz con riego óptimo	2
		Campo: San Rafael	10
	Septiembre	Nave fertirrigación	18
<i>C. tortuosa</i>	Septiembre	Campo: San Rafael	10

Análisis estadístico

Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de 3 vías para comparar entre tratamientos y entre los meses de muestreo en cada una de las especies $\alpha \geq 0.05$ para cada uno de los parámetros fotosintéticos y para la acumulación del metabolito correspondiente. En caso de existir diferencias significativas se aplicó también la prueba *post hoc* de diferencia mínima significativa LSD $\alpha \geq 0.05$. Para la comparación de metabolitos entre las muestras silvestres y las de nave de fertirrigación con las muestras de invernadero, así como para comparar parámetros de plantas con y sin flor, se realizó una prueba t student, significancia del $\alpha \geq 0.05$. En el caso de los parámetros fisiológicos iniciales se aplicó una prueba de Duncan $\alpha \geq 0.05$. Todas las pruebas se realizaron con el programa STATISTICA/Win StatSoft (1998) versión 6.0.

En el análisis estadístico de la germinación, el porcentaje acumulado de cada réplica de cada una de las especies se transformó al arcoseno y se ajustó a un modelo exponencial sigmoide ($Y = a / \{1 + b \exp[-cx]\}$) para obtener la tasa máxima de germinación (TMG) con la primera derivada máxima

(Olvera Carrillo, 2001). La primera derivada de la curva exponencial sigmoide se ajustó a un modelo Gausiano ($Y=a+b \exp(-0.5[\{x-c\}/d]^2)$) para obtener el tiempo promedio de germinación (TPG) y la sincronía (S) en el programa TCWIN 3 Table Curve 2D, versión 3.0. Estos parámetros fueron comparados mediante un análisis de ANOVA, seguido por una prueba de diferencia mínima significativa LSD $\alpha \geq 0.05$ en el programa STATISTICA/Win StatSoft (1998) versión 6.0. El panorama general de los experimentos, los puntos de muestreo y las variables de respuesta se pueden observar en el diseño experimental de la Figura 8:

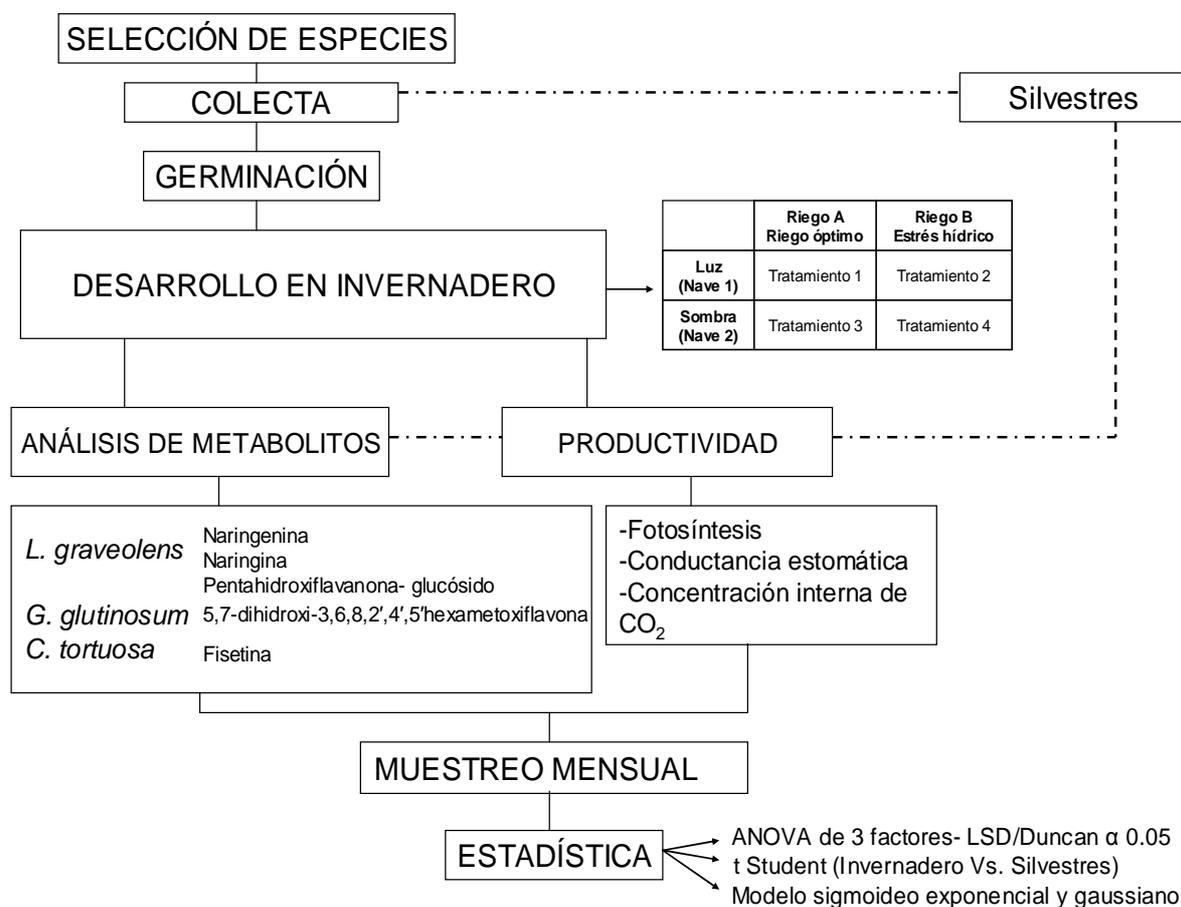


Figura 8. Esquema general de la metodología realizada

RESULTADOS

Germinación

El promedio del porcentaje de germinación de *G. glutinosum* proveniente de Puebla fue de 76.5%. Las semillas de *L. graveolens* de San Rafael tuvieron un porcentaje mayor a las semillas colectadas en Zapotitlán de las Salinas (con 2 años de almacenamiento), sin diferencias significativas entre ellas. Los menores porcentajes de germinación se obtuvieron en ambos lotes de semillas de *C. tortuosa* con 43 y 50% de germinación (Figura 9), con el mayor valor para las semillas almacenadas por 5 años.

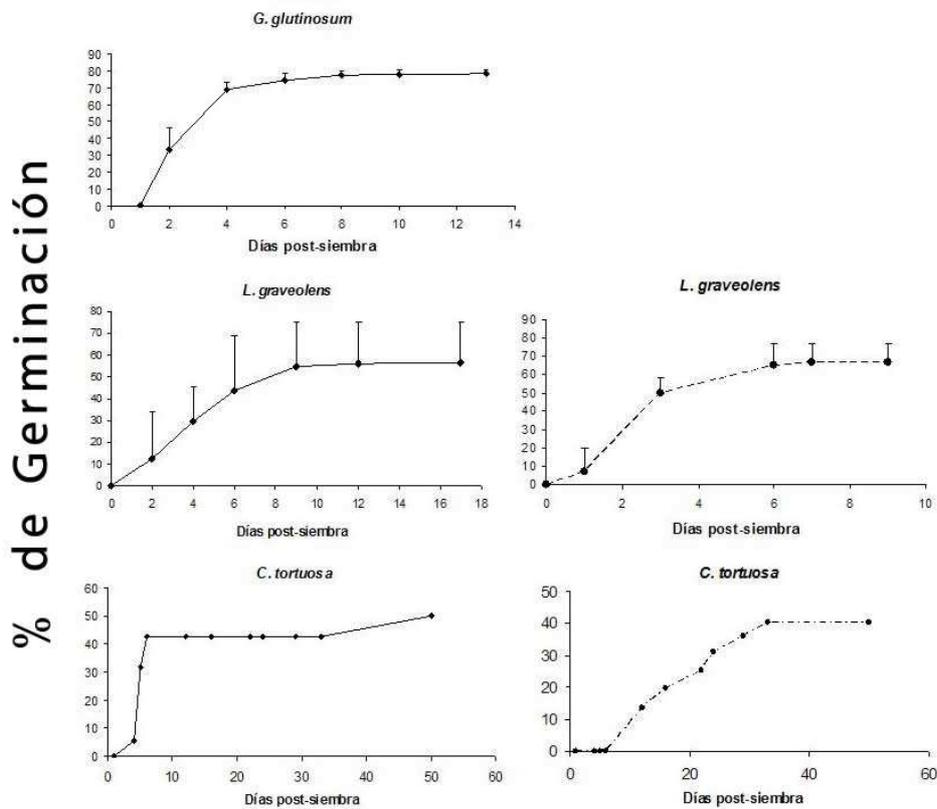


Figura 9. Porcentaje de germinación acumulada de semillas *L. graveolens*, *G. glutinosum* y *C. tortuosa* almacenadas (—) y sin almacenamiento (.....). Incubación a temperatura de 30°C, 12/12 horas fotoperiodo. El número de réplicas de *L. graveolens* fue de 3, y de *G. glutinosum* de 6.

Los primeros ensayos de establecimiento se llevaron a cabo con las semillas almacenadas. Sin embargo, las plántulas germinadas tuvieron valores de sobrevivencia de 15.62% para *G. glutinosum* y 30% para *L. graveolens*. Por esta razón se pusieron a germinar semillas recién colectadas (lote 2008) de ambas especies, con el mismo protocolo de desinfección y algunas novedades metodológicas con el fin de aumentar la sobrevivencia en invernadero. Estas novedades incluyeron la adición de solución Hoagland (Anexo I), mayor tiempo de crecimiento en el cuarto de incubación,

trasplante y establecimiento en el invernadero en plántulas de mayor tamaño y en un mes con una mayor temperatura. Se obtuvo una mayor sobrevivencia en ambas especies (Figura 10).

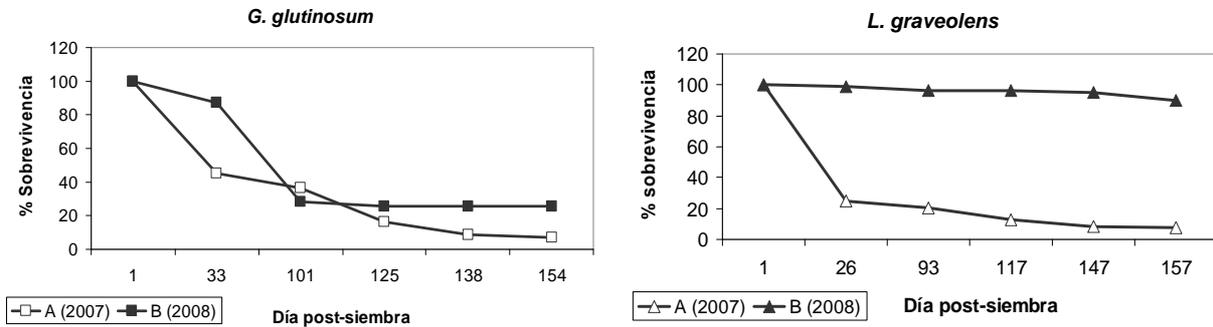


Figura 10. Sobrevivencia de *G. glutinosum* (cuadrados) y *L. graveolens* (triángulos) sembradas en octubre de 2007 (figura rellena), sin riego con solución Hoagland y temprano trasplante a macetas; y sembradas en 2008 (figuras vacías) con estas novedades metodológicas.

La sobrevivencia de *C. tortuosa* al cabo de 210 días fue de 66.7% (Figura 11)

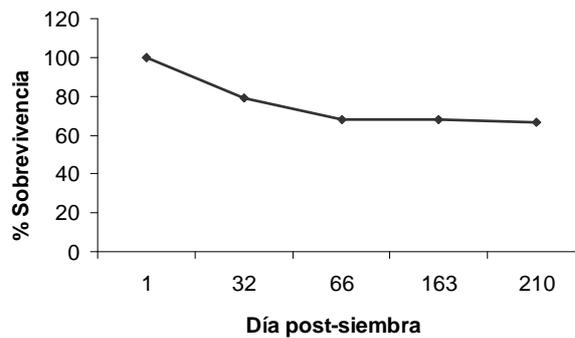


Figura 11. Porcentaje de sobrevivencia de *C. tortuosa*

Cerca de mil semillas de *G. glutinosum* de Tepeji del Río germinaron en menos de un mes. Debido a que no se conocía el número de semillas existentes en el material vegetal colectado de los tamices fue imposible determinar el porcentaje de germinación. Éstas se trasplantaron a semilleros para seguir el mismo procedimiento de las demás plántulas hasta su establecimiento en el invernadero.

Los modelos sigmoideos y gaussianos (Tabla 4) aplicados al acumulado de porcentaje de germinación en cada una de las especies permitieron mostrar que la tasa máxima de germinación (TMG) es mayor en *G. glutinosum*, estadísticamente diferente al valor obtenido para *C. tortuosa* t student (≥ 0.005), especie con el mayor valor de TPG.

Tabla 4. Tasa máxima de germinación (TMG), tiempo promedio de germinación (TPG) y sincronía (S) de *G. glutinosum*, *L. graveolens* y *C. tortuosa*.

	<i>G. glutinosum</i>	<i>L. graveolens</i>	<i>C. tortuosa</i>	
			Zapotitlán	San Rafael
TMG (No. semillas•días)	64.401	40.925	22.356	2.59
TPG (días)	2.427 días	3.103 días	4.001 días	15.246 días
S	0.122	0.107	2.296	0.04

Propagación en invernadero

- Estudios de sustrato

Se estableció arbitrariamente manejar un porcentaje de humedad entre 100-80% para el tratamiento de riego óptimo, que para la mezcla de sustrato agrolita:tierra 1:2 corresponde a un potencial hídrico entre 0.3 y 0.5 atmósferas (-0.033 y -0.055 MPa, respectivamente); y el estrés hídrico con un porcentaje de humedad del suelo entre 60 y 40%, correspondiente a 13 y 15 atmósferas (-1.43 y -1.65 MPa) de potencial hídrico para este tipo de suelo.

- Condiciones ambientales del invernadero: temperatura y luminosidad

En general, la nave de luz presentó mayor temperatura y luminosidad en relación con la nave de sombra (Figura 12). La luminosidad obtenida en campo, registrada en días nublados, fue de 435 y 508.8 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, en San Rafael y Tehuacán, respectivamente; es decir que los valores de flujo fotónico en campo durante los días de colecta fueron menores que el valor promedio de luminosidad de la nave de luz, pero mayor que el de la nave de sombra.

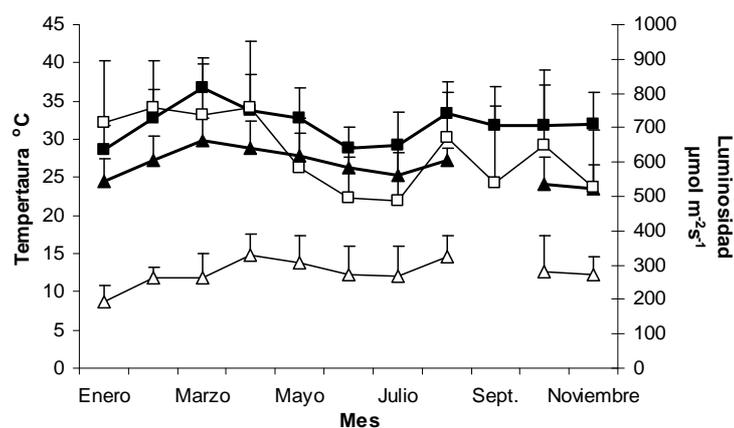


Figura 12. Promedios mensuales de temperatura (figuras rellenas) y luminosidad (figuras vacías) en la nave de sombra 70% (triángulos) y nave sin malla (cuadrados) del invernadero durante los meses del experimento, año 2008, registrados por dispositivos HOBO UA 002-64 1.0.6 cada 30 minutos.

Los máximos de luminosidad y temperatura se observaron en la nave de luz; mientras que las temperaturas nocturnas fueron más altas en la nave de sombra (Figuras 13 y 14).

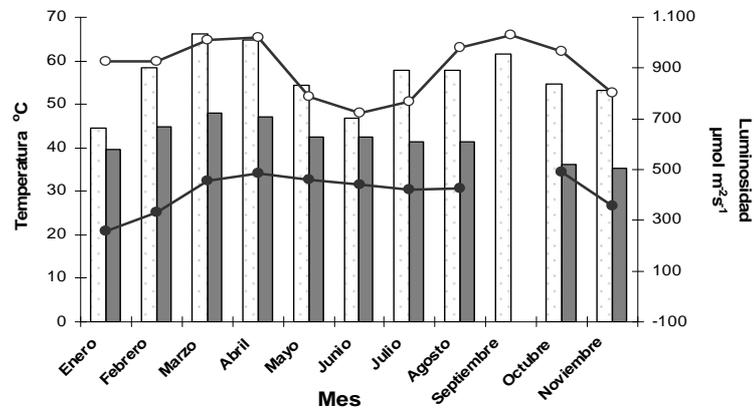


Figura 13. Máximos de luminosidad en la nave de sombra 70% (barras oscuras) y de temperatura (líneas con figura rellena) y en la nave sin sombra: barras claras y líneas con figura vacía, respectivamente. Datos registrados en el invernadero durante 2008 mediante dispositivos HOBO UA 002-64 1.0.6 cada 30 minutos.

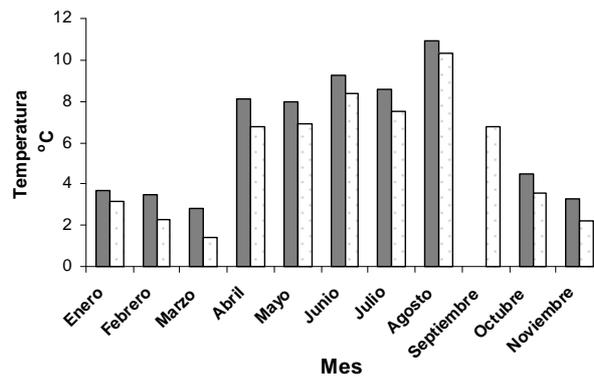


Figura 14. Mínimos de temperatura registrados en el invernadero en la nave de sombra 70% (barras oscuras) y en la nave sin sombra (barras claras) durante 2008.

En la figura 15 se aprecia el aumento de las horas de día a mitad del año, con casi 14 horas luz y 10 de oscuridad.

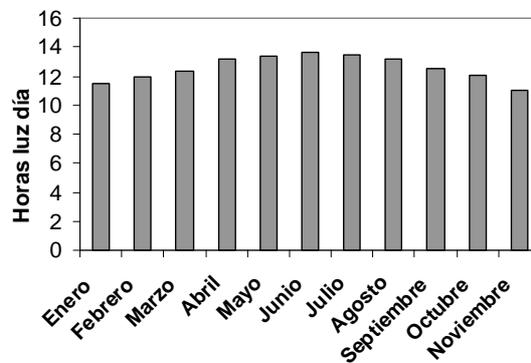


Figura 15. Fotoperiodo registrado en el invernadero durante 2008. Las barras indican el número de horas día promedio en cada mes.

Parámetros fisiológicos

- Condiciones iniciales

Se determinaron los parámetros fisiológicos en estados iniciales, esto es, en cuartos de incubación, semilleros y condiciones óptimas y tempranas en invernadero; todos ellos anteriores a la aplicación de tratamientos. *L. graveolens* mostró diferencias en la asimilación de CO₂ entre las plantas de semilleros y las de sombra en condiciones saturadas ($F_{(3, 22)} = 2.751$ $P = 0.67$; *post hoc* Duncan $\alpha \geq 0.05$), pero no en la conductancia estomática ni en la concentración interna de CO₂ bajo ninguna condición (Figura 16). Los parámetros de *G. glutinosum* no presentaron diferencias entre ninguna de las condiciones, mientras que *C. tortuosa* presentó una mayor conductancia estomática en plántulas bajo condiciones de sombra 70% con suelo saturado (Figura 16) en comparación con las plántulas establecidas en semilleros ($F_{(2, 6)} = 8.006$ $P = 0.0202$; *post hoc* Duncan $\alpha \geq 0.05$).

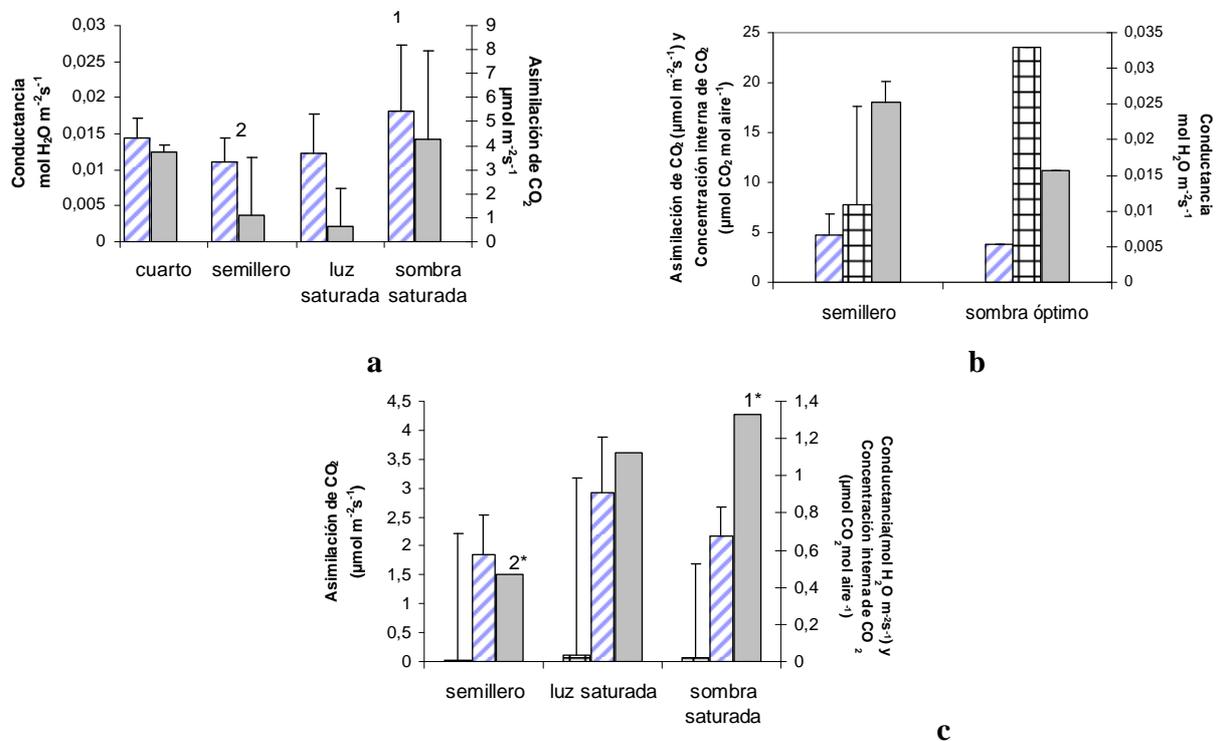


Figura 16. Parámetros fisiológicos iniciales de *L. graveolens* (a), *G. glutinosum* (b) y *C. tortuosa* (c). Asimilación de CO₂ (▨) conductancia estomática (■) y concentración interna de CO₂ (▣) registradas en plántulas antes de someterse a tratamientos hídricos. 3 réplicas en cada condición, excepto en *L. graveolens* de semillero, luz saturada y sombra saturada con 7 réplicas c/u. Los números indican diferencias significativas: 1 y 2 $F_{(3, 22)} = 2.751$ $p = 0.67$, 1* y 2* $F_{(2, 6)} = 8.006$ $P = 0.0202$

- Parámetros fisiológicos post-tratamientos

Lippia graveolens

La asimilación de CO₂ mostró una tendencia a disminuir los primeros meses del año, con un aumento a partir de julio. Los valores mayores se registraron en agosto. A partir de septiembre se observó de nuevo un descenso, aunque en este mes aún se observaron valores altos de este

parámetro, especialmente en la condición lumínica (Figura 17). En octubre se observó una disminución notable en todos los tratamientos. Estadísticamente ($F_{(27, 58)} = 5.6303$ $P = 0.0000$) hubo diferencias significativas entre los meses con las menores tasas (abril, mayo y junio) y los de las mayores tasas como fueron agosto y septiembre. El valor promedio más alto, mostró diferencias con todos los tratamientos en todos los meses, excepto con la condición de luz estrés en ese mismo mes (agosto) y luz óptimo de septiembre, el segundo más alto en todos los muestreos.

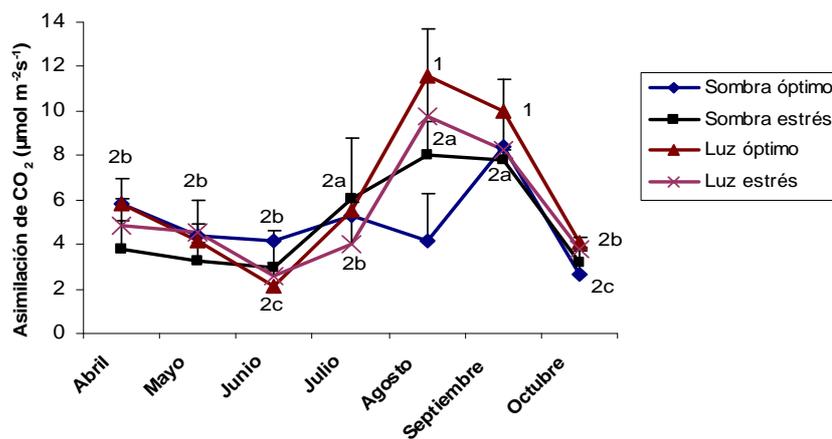


Figura 17. Tasas de asimilación de CO₂ de *L. graveolens* bajo condiciones de invernadero en nave con sombra 70% con riego óptimo ◆ y estrés hídrico ■ y en nave sin sombra con riego óptimo ▲ y estrés hídrico ×. Los números indican diferencias significativas $F_{(27, 58)} = 5.6303$ $P = 0.0000$. De cada tratamiento se hicieron 3 réplicas, mensualmente, excepto en agosto y octubre en la nave sin sombra con estrés hídrico y riego óptimo, respectivamente, donde hubo 4 réplicas.

La conductancia estomática con frecuencia fue mayor bajo condiciones de sombra, al igual que bajo la condición de riego óptimo (Figura 18), sin diferencias significativas. En cuanto a la concentración interna de CO₂, en la mayoría de los tratamientos se obtuvieron valores positivos mientras que en los meses de agosto y septiembre, se presentaron valores negativos, especialmente en septiembre fueron significativamente menores (Figura 19) $F_{(25, 60)} = 6.5450$ $P = .0000$

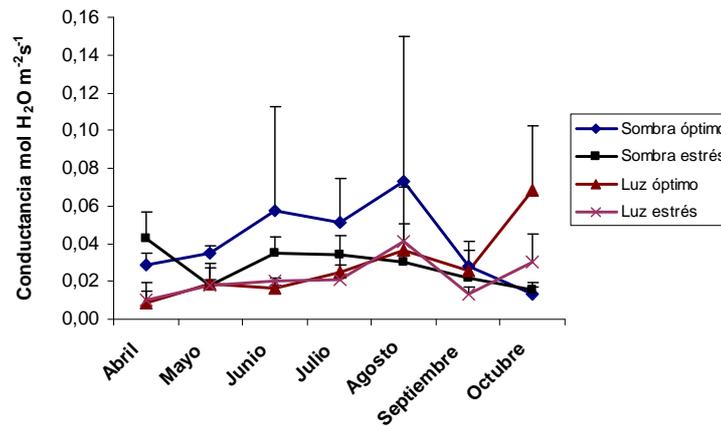


Figura 18. Promedios mensuales de conductancia estomática en *L. graveolens* bajo condiciones de cultivo: en nave con sombra 70% con riego óptimo \blacklozenge y estrés hídrico \blacksquare y en nave sin sombra con riego óptimo \blacktriangle y estrés hídrico \times

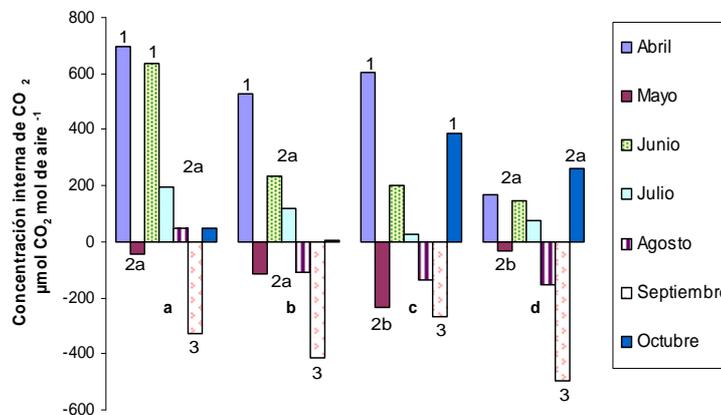
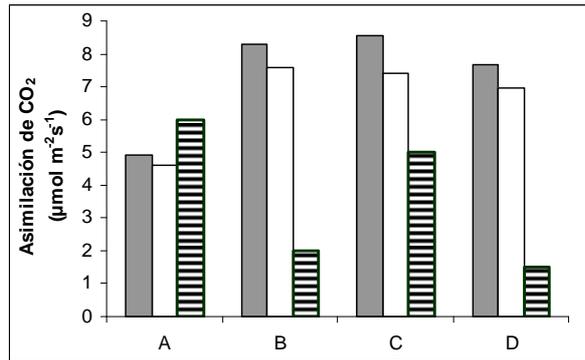


Figura 19. Promedios mensuales de concentración interna de CO₂ en *L. graveolens* bajo condiciones de cultivo en invernadero: con sombra 70% y riego óptimo (a), sombra 70% y estrés hídrico (b), sin sombra con riego óptimo (c) y sin sombra y estrés hídrico (d). Los números corresponden a diferencias significativas $F_{(25, 60)} = 6.5450$ $P = .0000$. De cada tratamiento se hicieron 3 réplicas, mensualmente, excepto en agosto y octubre en la nave sin sombra con estrés hídrico y riego óptimo, respectivamente, donde hubo 4 réplicas.

A partir del mes de junio y hasta octubre, hubo floración de esta especie. Las primeras plantas en florecer fueron las de condiciones óptimas: sombra y luz, en ese orden; de las cuales los mayores valores de fotosíntesis se registraron en luz con riego óptimo y en sombra bajo estrés hídrico. La tasa de fotosíntesis no se vio relacionada con el número de flores por individuo y tampoco se vieron diferencias en la comparación de plantas con y sin flor (es), como se observa en la figura 20b.



a



b

Figura 20 a. Planta de *L. graveolens* de 5 meses de edad, con flor y sometida a sombra 70% con riego óptimo. b. Promedio de la asimilación de CO₂ en plantas de *L. graveolens* con presencia (barras con color) y ausencia de flores (barra en blanco) en invernadero con sombra 70% y riego óptimo (A), sombra 70% y estrés hídrico (B), sin sombra con riego óptimo (C) y sin sombra y estrés hídrico (D). ▨ indica el número de flores en cada tratamiento.

Las plantas establecidas en el invernadero mostraron alta variabilidad morfológica aún bajo el mismo tratamiento (Figura 21a). Así mismo, las plantas que florecieron también mostraron diferencias evidentes en su crecimiento y desarrollo vegetativo (Figura 21b).



a

b

Figura 21. a. Plantas de *L. graveolens* bajo estrés hídrico (1 y 2) y riego óptimo (3) b. Plantas con flor en estrés hídrico (1) y riego óptimo (2 y 3).

La comparación de los parámetros fisiológicos en plantas silvestres con las de invernadero durante el mismo mes de colecta (septiembre) no mostró diferencias en la asimilación de CO₂ ni en la conductancia estomática (Figura 22), pero sí en la concentración interna de CO₂ (figura 23), la cual resultó mayor en campo que en invernadero. Éste último parámetro, en invernadero bajo condiciones óptimas de riego tuvo valores positivos, mientras que en condiciones de estrés hídrico fueron negativos (t student ≥ 0.005).

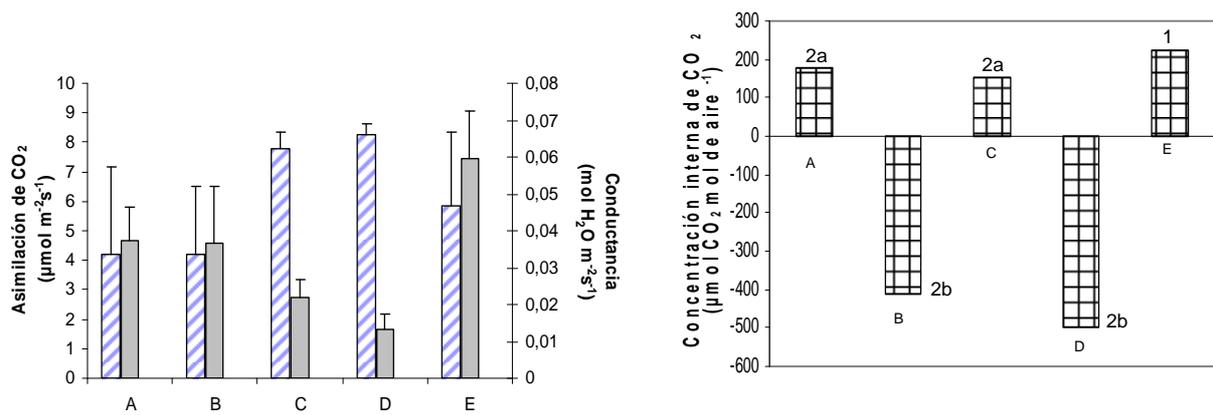


Figura 22. Asimilación de CO₂ (▨) conductancia estomática (■) y concentración interna de CO₂ (▣) en campo (E) e invernadero en nave de sombra 70% con riego óptimo (A), y estrés hídrico (B) y en nave sin sombra con riego óptimo (C) y estrés hídrico (D) en *L. graveolens*. La numeración hace referencia a diferencias estadísticamente significativas t student ≥ 0.005 entre las muestras de campo (5 réplicas) y las de invernadero (3 réplicas en cada tratamiento).

Gymnosperma glutinosum

Al igual que en *L. graveolens*, la asimilación de CO₂ fue mayor en septiembre, y en octubre se observó una disminución notable (Figura 23). Las diferencias significativas ($F_{(27, 56)} = 5.598$ $P = 0.000$) se encontraron entre los mayores valores promedio (agosto, septiembre, sombra óptimo de abril) con respecto a los menores, registrados en los meses de mayo y junio, julio sombra estrés y luz óptimo, agosto sombra estrés y octubre sombra óptimo. Los tratamientos con los mayores registros de asimilación de CO₂ mostraron diferencias significativas con todos los tratamientos en mayo, junio, julio luz óptimo y sombra estrés, agosto sombra estrés y octubre sombra óptimo (las altas fotosintéticas más bajas).

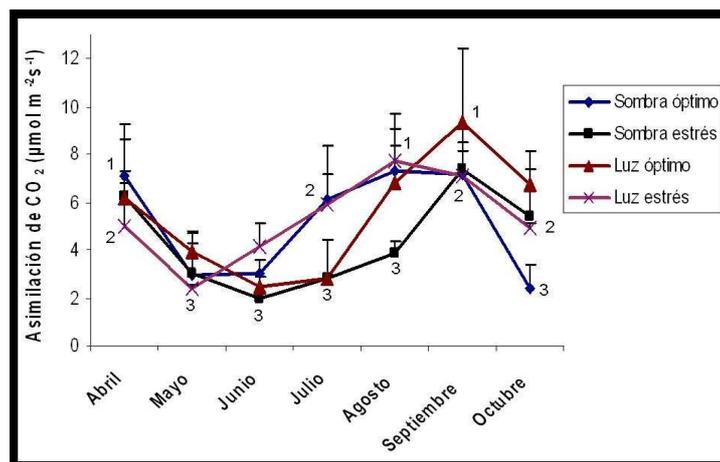


Figura 23. Promedios mensuales de la acumulación de CO₂ de *G. glutinosum* bajo condiciones de cultivo: en nave con sombra 70% con riego óptimo (◆) y estrés hídrico (■) y en nave sin sombra con riego óptimo (▲) y estrés hídrico (×). Los números indican diferencias significativas $F_{(27, 56)} = 5.598$ $P = 0.000$. Todos los tratamientos tuvieron 3 réplicas.

Las tasas de conductancia estomática, contrario a la asimilación de CO₂, mostraron un aumento en el mes de octubre. Los mayores valores se obtuvieron en julio bajo la condición de sombra con riego óptimo, agosto en luz con estrés hídrico –tratamientos que mostraron diferencias significativas con las menores tasas de conductancia- y, en el mes de octubre, en la nave de luz con riego óptimo (Figura 24), grupo que se diferenció significativamente del resto de tratamientos en todos los meses y aún con los demás tratamientos del mismo mes ($F_{(27, 56)} = 3.895 P = 0.000009$).

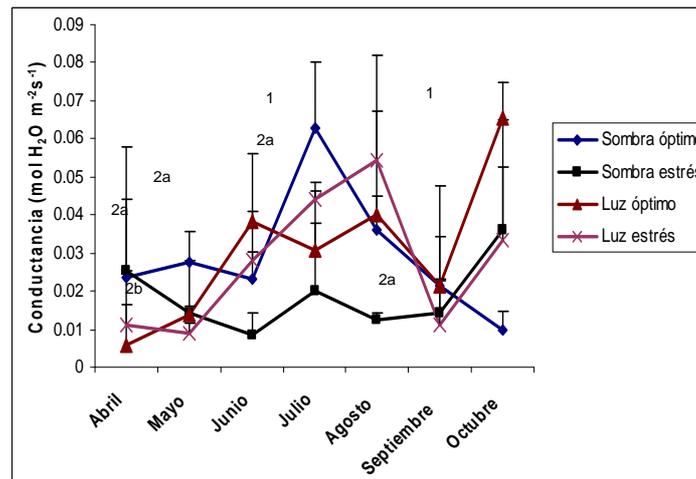


Figura 24. Promedios mensuales de la conductancia estomática de *G. glutinosum* bajo condiciones de cultivo: en nave con sombra 70% con riego óptimo (◆) y estrés hídrico (■) y en nave sin sombra con riego óptimo (▲) y estrés hídrico (×). Los números indican diferencias significativas $F_{(27, 56)} = 3.895 P = 0.000009$. Todos los tratamientos tuvieron 3 réplicas.

La concentración interna de CO₂ en esta especie fue mayor en los meses de abril, junio (excepto en luz bajo estrés hídrico) y en octubre luz con riego óptimo. Este último tratamiento mostró diferencias significativas con casi todos los tratamientos a través del tiempo ($F_{(27, 56)} = 4.113 P = 0.000004$), excepto con aquellos con tasas positivas y altas. Durante los meses de mayo y septiembre, las concentraciones internas de CO₂ fueron negativas (Figura 25), especialmente en nave de sombra con bajo estrés hídrico en el mes de mayo, mientras que en septiembre fue la misma nave pero con riego óptimo el que mostró una concentración significativamente menor -también negativa- que el resto.

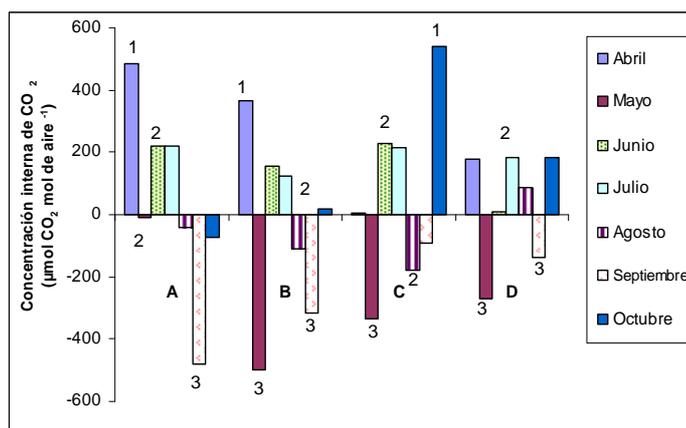


Figura 25. Promedios mensuales de la concentración interna de CO₂ de *G. glutinosum* bajo condiciones de cultivo: en nave con sombra 70% con riego óptimo \blacklozenge y estrés hídrico \blacksquare y en nave sin sombra con riego óptimo \blacktriangle y estrés hídrico \times . Los números indican diferencias significativas $F_{(27, 56)} = 4.113$ $P = 0.000004$. Todos los tratamientos tuvieron 3 réplicas.

Las mediciones hechas en campo mostraron que la asimilación de CO₂ y la conductancia estomática son similares a las tasas registradas en invernadero bajo todos los tratamientos (figura 26), sin diferencias significativas entre ellas. Sin embargo, la concentración interna de CO₂ fue significativamente mayor en las plantas silvestres que en invernadero (t student $\alpha \geq 0.005$).

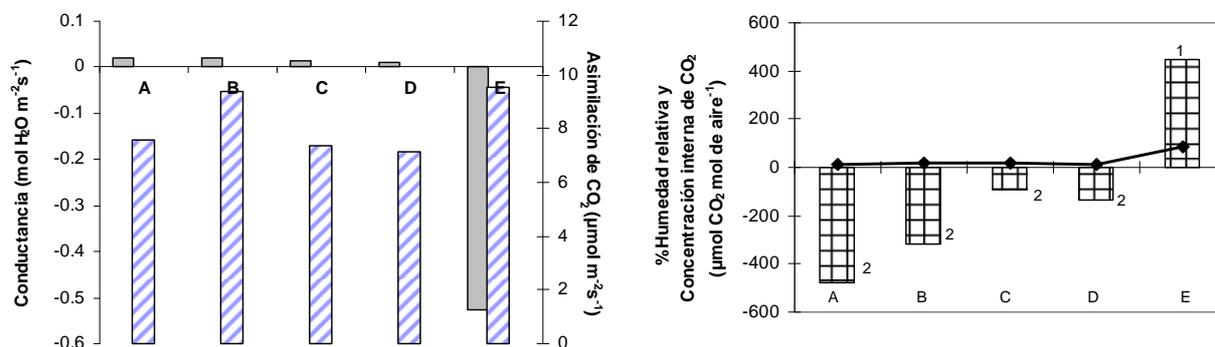


Figura 26. Asimilación de CO₂ \square conductancia estomática \blacksquare y concentración interna de CO₂ \square en campo (E) e invernadero en nave de sombra 70% con riego óptimo (A), y estrés hídrico (B) y en nave sin sombra con riego óptimo (C) y estrés hídrico (D) en *G. glutinosum*. La línea \blacklozenge muestra la humedad relativa en cada condición. La numeración hace referencia a diferencias estadísticamente significativas t student ≥ 0.005 entre las muestras de campo (5 réplicas) y las de invernadero (3 réplicas en cada tratamiento).

Castela tortuosa

Al igual que en las otras dos especies, las tasas de asimilación de CO₂ fueron mayores en septiembre, previo a un declive en el mes de octubre (Figura 27). Este mes mostró diferencias significativas con el resto de tratamientos en todos los meses, al igual que la condición lumínica bajo riego óptimo del mes de agosto. Por su parte, los valores más bajos (octubre) tuvieron también una marcada diferencia con el resto de valores, excepto con el de agosto en la nave de sombra y riego óptimo ($F_{(15, 32)} = 31.699$ $P = 0.0000$).

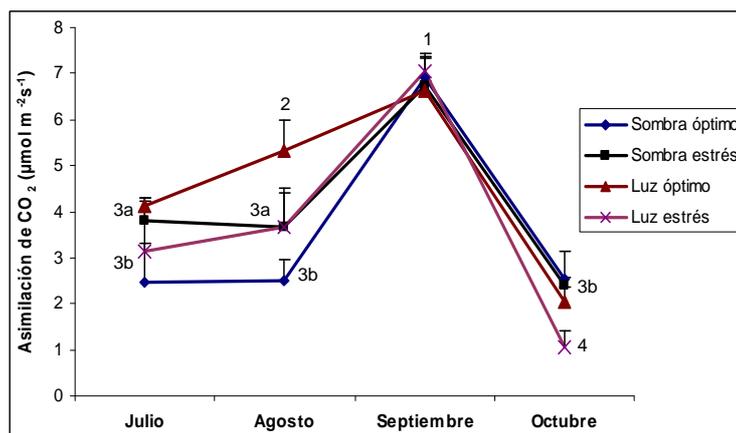


Figura 27. Promedios mensuales de la acumulación de CO₂ de *C. tortuosa* bajo condiciones de cultivo: en nave con sombra 70% con riego óptimo \blacklozenge y estrés hídrico \blacksquare y en nave sin sombra con riego óptimo \blacktriangle y estrés hídrico \times . Los números indican diferencias significativas $F_{(15, 32)} = 31.699$ $P = 0.0000$. Todos los tratamientos tuvieron 3 réplicas

La conductancia estomática no mostró diferencias significativas entre tratamientos con la prueba ANOVA, pero al aplicar la prueba *post hoc* LSD $\alpha \geq 0.005$, se observaron diferencias entre los valores obtenidos para la condición de riego óptimo en la nave de luz del mes de octubre y los registrados en el mes de agosto y el valor de septiembre en la nave de sombra con riego óptimo (figura 28).

En cuanto a la concentración interna de CO₂ en esta especie, (figura 29) durante septiembre se registraron siempre valores negativos y en el mes de agosto -únicamente en la condición de sombra con riego óptimo-. Estos valores mostraron diferencias con los positivos más altos como lo fueron los datos de los meses de julio y octubre ($F_{(15, 32)} = 2.6183$ $P = 0.01091$).

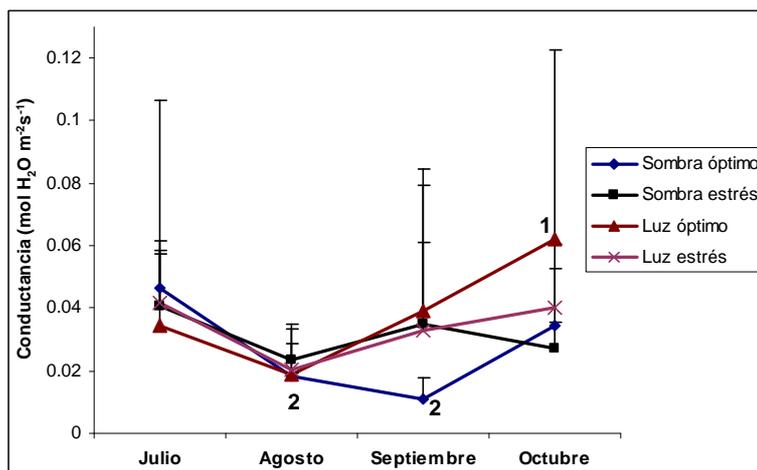


Figura 28. Promedios mensuales de la conductancia estomática de *C. tortuosa* bajo condiciones de cultivo: en nave con sombra 70% con riego óptimo \blacklozenge y estrés hídrico \blacksquare y en nave sin sombra con riego óptimo \blacktriangle y estrés hídrico \times . Los números indican diferencias significativas LSD ≥ 0.005 . Todos los tratamientos tuvieron 3 réplicas.

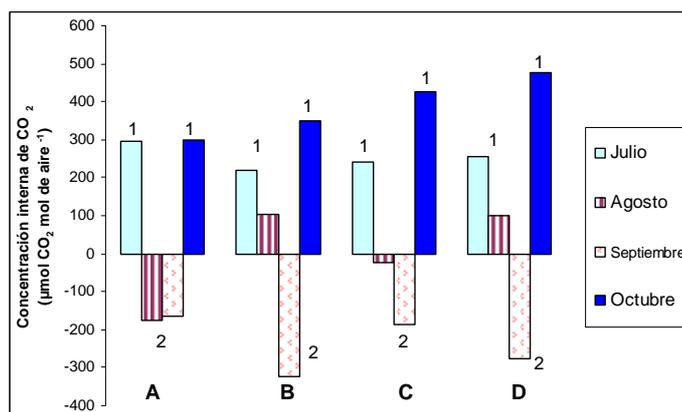


Figura 29. Promedios mensuales de la concentración interna de CO₂ de *C. tortuosa* bajo condiciones de cultivo: en nave con sombra 70% con riego óptimo \blacklozenge y estrés hídrico \blacksquare y en nave sin sombra con riego óptimo \blacktriangle y estrés hídrico \blackcross . Los números indican diferencias significativas $F_{(15, 32)} = 2.6183$ $P = 0.0109$. Todos los tratamientos tuvieron 3 réplicas.

La comparación de los parámetros fotosintéticos de las plantas en estado silvestre y en invernadero (t-student $\alpha \geq 0.005$) mostró que la asimilación de CO₂ fue significativamente mayor en invernadero que en campo y la concentración interna de CO₂ menor (figura 30).

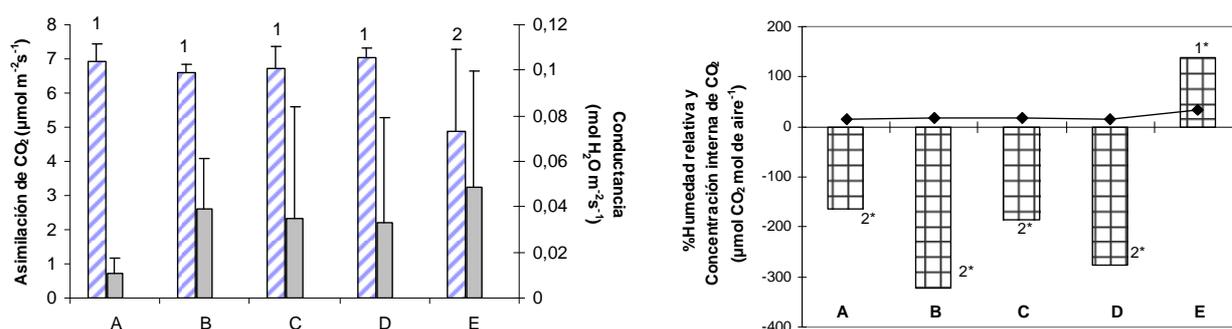


Figura 30. Asimilación de CO₂ \square conductancia estomática \blacksquare y concentración interna de CO₂ \boxplus en campo (E) e invernadero en nave de sombra 70% con riego óptimo (A), y estrés hídrico (B) y en nave sin sombra con riego óptimo (C) y estrés hídrico (D) en *C. tortuosa*. La línea \blacklozenge muestra la humedad relativa en cada condición. La numeración hace referencia a diferencias estadísticamente significativas t student ≥ 0.005 entre las muestras de campo (5 réplicas) y las de invernadero (3 réplicas en cada tratamiento).

En la figura 31 se puede observar una relación entre la asimilación de CO₂ en las 3 especies con la luminosidad en el invernadero y en algunos casos, con la temperatura, sin embargo no fue clara una asociación entre la conductancia estomática y la temperatura en ninguna de las naves del invernadero (Figura 32).

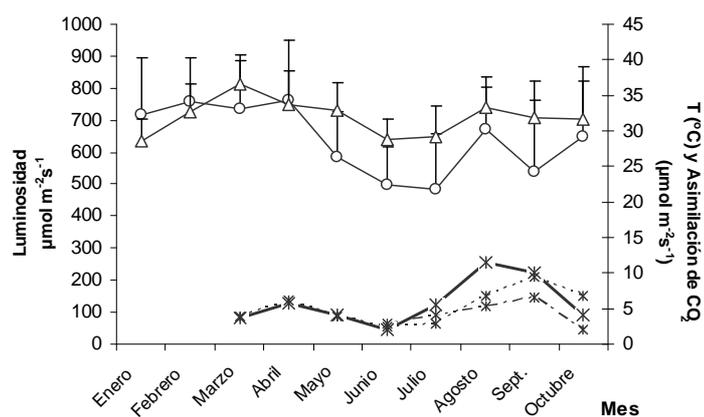


Figura 31. Promedios de temperatura Δ y luminosidad \circ en la nave de luz del invernadero en comparación con la asimilación de CO_2 *L. graveolens* (—), *G. glutinosum* (.....) y *C. tortuosa* (- - -) en la nave del invernadero sin sombra 70%.

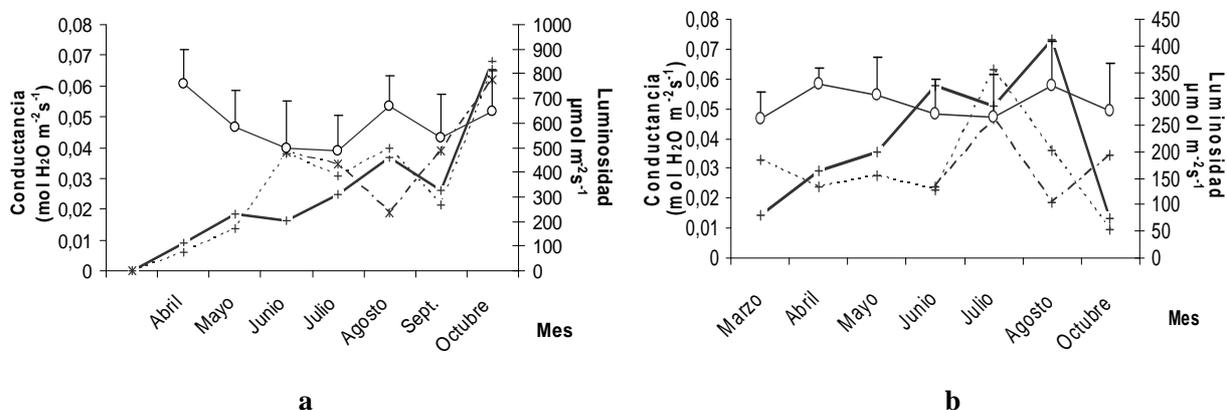


Figura 32. Promedios de luminosidad \circ en la nave sin sombra (a) y con sombra 70% (b) del invernadero en comparación con la conductancia estomáca de *L. graveolens* (—), *G. glutinosum* (.....) y *C. tortuosa* (- - -)

- Cuantificación de flavonoides

L. graveolens

La naringenina presentó máximos de absorbancia de 238, 288 y 332 nm y bajo el método de extracción definido y fue identificado en el tiempo de retención (tR) = ± 17.2 minutos (Anexo IV).

Las plántulas de los semilleros no presentaron este metabolito. Una vez tratadas, se observó una acumulación relativamente baja de abril a mayo en todos los tratamientos, excepto en la condición de sombra con estrés hídrico en el mes de junio. En el mes de agosto declinan los niveles de naringenina, de manera similar a lo obtenido en mayo (menos notorio en la nave de luz con riego óptimo) para un posterior aumento, estadísticamente significativo en el mes de septiembre, especialmente bajo la condición lumínica y de estrés hídrico que mostró el mayor valor a través del tiempo; mientras que la misma condición lumínica pero en riego óptimo fue mucho menor, con un

aumento significativo en el mes de octubre ($F_{(31, 69)} = 4.132 P = 0.0000$). La acumulación de naringenina en el mes de noviembre tendió a disminuir nuevamente en cada uno de los tratamientos (figura 33).

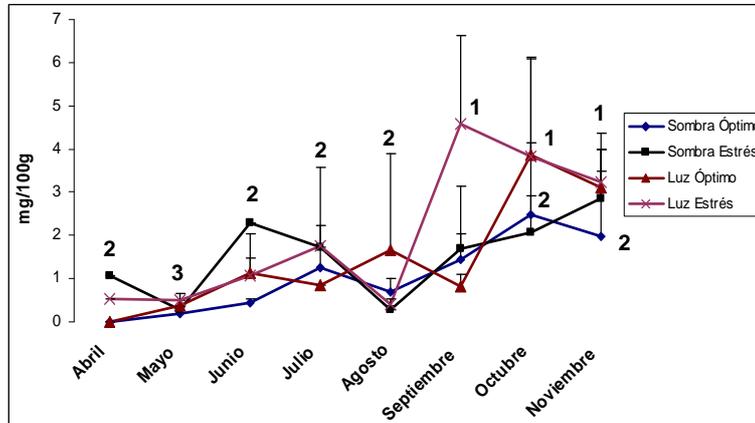


Figura 33. Promedios mensuales de la acumulación de naringenina (mg en 100g de planta) en *L. graveolens* bajo condiciones de cultivo: en nave con sombra 70% con riego óptimo \blacklozenge y estrés hídrico \blacksquare y en nave sin sombra con riego óptimo \blacktriangle y estrés hídrico \times . Los números indican diferencias significativas $F_{(31, 69)} = 4.132 P = 0.0000$

La acumulación de naringenina en plantas con flor no mostró diferencias entre ellas ni con las plantas sin flor. Los datos obtenidos en campo, San Rafael y San Martín, mostraron una elevada variabilidad en la concentración del metabolito, aún entre individuos de la misma localidad (figura 34), aunque sin diferencias significativas entre ellos. La comparación con los datos de invernadero durante el mismo mes tampoco resultó diferente al aplicar la prueba t-student ($\alpha \geq 0.05$) entre los dos grupos, sin embargo, al discriminar los lugares y meses de colecta, y todos los tratamientos en invernadero se obtuvieron diferencias importantes. En primer lugar, los datos provenientes de las muestras de San Martín no mostraron diferencias con las de San Rafael ni con las de invernadero durante el mes de septiembre. La acumulación de naringenina fue mayor en San Rafael durante el mes de mayo, con diferencias significativas en comparación con lo obtenido en invernadero en mayo y septiembre ($F_{(9, 31)} = 3.1689 P = 0.007916$), y las muestras de San Rafael correspondientes al mes de septiembre no mostraron diferencias con las concentraciones bajo condiciones de invernadero durante el mismo mes (Figura 35).

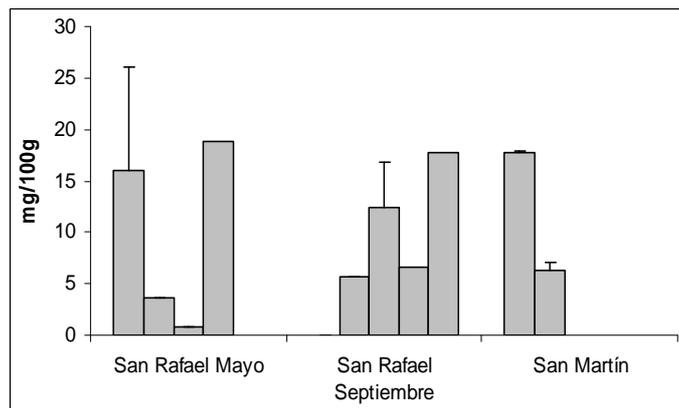


Figura 34. Acumulación de naringenina en *L. graveolens* en estado silvestre en los poblados de San Rafael y San Martín. Cada barra representa un individuo. Año 2008.

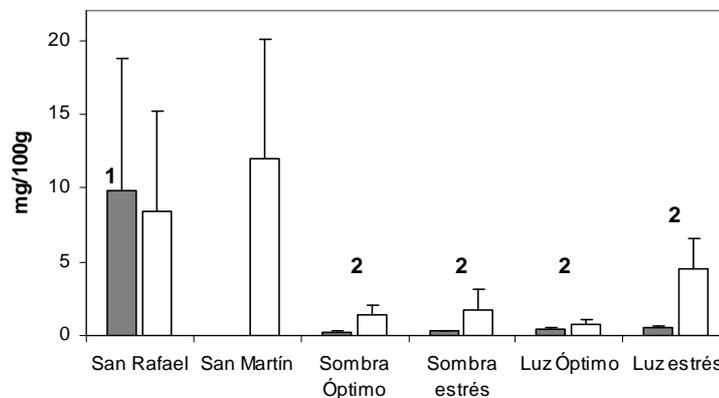


Figura 35. Promedios de las concentraciones de naringenina en *L. graveolens* en estado silvestre, colectas muestras en San Rafael y San Martín, en comparación con las concentraciones en invernadero bajo cada uno de los tratamientos de luminosidad (con/sin sombra 70%) y riego óptimo y estrés hídrico. La numeración hace referencia a las diferencias significativas $F_{(9, 31)} = 3.1689$ $P = 0.007916$

En todos los cromatogramas se observó de manera evidente un pico con un tR de ± 4.1 minutos que, por comparación con otros estudios en la misma especie (Lin *et al.*, 2007) y sus máximos de absorción (238, 288, 360 nm) se logró identificar como una pentahidroxi flavanona-glucósido (Anexo V). La mayor acumulación de esta flavanona se presentó en los últimos meses (septiembre, octubre y noviembre) con un máximo de 91.83 mg/100g en la condición de sombra con estrés hídrico en octubre (Figura 36). Estos valores anteriormente mencionados tuvieron diferencias significativas ($F_{(27, 68)} = 7.026$ $P = 0.0000$) con el resto de tratamientos. A diferencia de la naringenina, en plántulas de semilleros hubo, en promedio, una concentración de 2.27 mg/100g de pentahidroxi flavanona-glucósido.

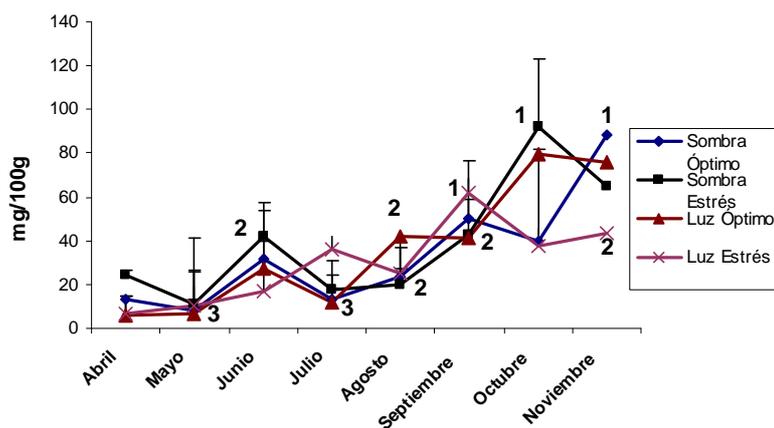


Figura 36. Promedios mensuales de la acumulación de pentahidroxi flavanona-glucósido en *L. graveolens* bajo condiciones de cultivo: en nave con sombra 70% con riego óptimo \blacklozenge y estrés hídrico \blacksquare y en nave sin sombra con riego óptimo \blacktriangle y estrés hídrico \times . Los números indican diferencias significativas $F_{(27, 68)} = 7.026 P = 0.0000$

De manera similar a la naringenina, su glucósido, la naringina, se cuantificó mediante la comparación del cromatograma obtenido del estándar auténtico de este metabolito SIGMA-ALDRICH®, con iguales máximos de absorción que la naringenina pero con un tiempo de retención de ± 7.3 minutos (Anexo IV). El comportamiento de este metabolito no mostró una tendencia clara a través del tiempo (Figura 37), y las concentraciones fueron mucho menores que las obtenidas para la naringenina y la pentahidroxi flavanona-glucósido.

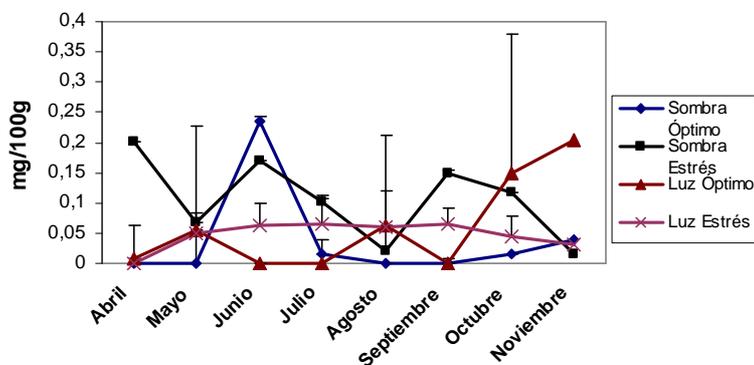


Figura 37. Promedios de acumulación de naringina en *L. graveolens* bajo condiciones de cultivo: en nave con sombra 70% con riego óptimo \blacklozenge y estrés hídrico \blacksquare y en nave sin sombra con riego óptimo \blacktriangle y estrés hídrico \times

La comparación con los valores obtenidos para las muestras colectadas en campo mostraron variabilidad entre localidades y dentro de éstas. La mayor concentración en San Rafael fue 60.3 mg/100g y el menor de 11.6 mg/100g; no hubo diferencias significativas entre las muestras colectadas en mayo y las de septiembre de esta localidad. En comparación con los datos obtenidos en invernadero bajo condiciones lumínicas de estos 3 flavonoides, se observó que la naringenina fue mayor en las plantas silvestres, a diferencia de la naringina; y la pentahidroxi flavanona-glucósido

presentó valores altos en invernadero, mayores que en San Rafael ($F_{(8, 72)} = 22.497$ $P = 0.0000$) y menores (no significativamente) con San Martín (Figura 38).

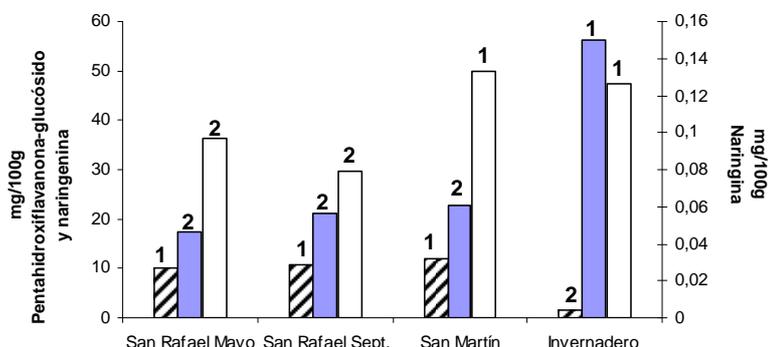


Figura 38. Comparación de la acumulación de los flavonoides naringenina , naringina y pentahidroxi flavanona-glucósido en *L. graveolens* en campo e invernadero en la nave sin sombra y con estrés hídrico en septiembre de 2008. La numeración hace referencia a diferencias significativas $F_{(8, 72)} = 22.497$ $P = 0.0000$

En la nave con el sistema de fertirrigación se desarrollaron individuos vigorosos y más desarrollados que las plantas tratadas (Figura 39), pero sus niveles de pentahidroxi flavanona-glucósido (t-student $\alpha \geq 0.005$) y de naringenina fueron estadísticamente menores como puede observarse en la figura 40. Estas plantas no presentaron naringina.



Figura 39. Planta y hoja de *L. graveolens* con riego enriquecido con nutrientes suministrado de forma permanente mediante sistema de fertirrigación (a) y en tratamiento de sombra 70% con riego óptimo (b) y sin sombra con estrés hídrico (c).

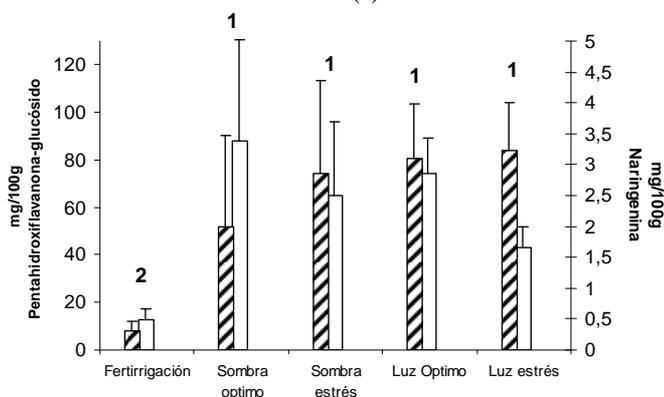


Figura 40. Acumulación de naringenina y pentahidroxi flavanona-glucósido en plantas de *L. graveolens* desarrolladas con sistema de fertirrigación y bajo tratamientos en invernadero (con/sin sombra y riego óptimo y estrés hídrico). La numeración indica diferencias significativas t-student $\alpha \geq 0.005$

G. glutinosum

El flavonoide 5,7-dihidroxi-3,6,8,2'4'5'-hexametoxiflavona presentó absorbancias máximas de 252, 268 y 346 nm con un tR de 8.8 minutos.

En las plantas provenientes de Puebla, la mayor acumulación de este compuesto se obtuvo en la condición sin sombra con estrés hídrico, con un valor de 106.53 mg/100g (figura 41). Las plántulas de semilleros (de aproximadamente un mes de edad) presentaron 22.48 mg/100g, en contraste con las plántulas de igual edad y provenientes de Tepeji del Río, con 0.52 mg/100g del flavonoide.

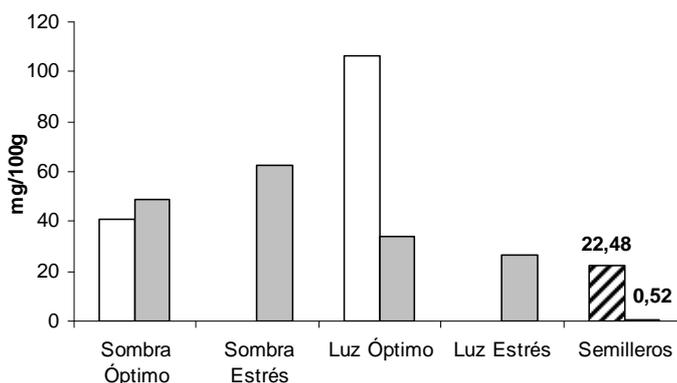


Figura 41. Acumulación de 5,7-dihidroxi-3,6,8,2'4'5'-hexametoxiflavona en *G. glutinosum* proveniente de Puebla durante el primer (barras vacías) y segundo muestreo (barras con color), y de plántulas establecidas en semilleros antes de la aplicación de tratamientos

Una vez sometidas a los tratamientos lumínicos e hídricos, las plantas provenientes de Tepeji del Río mostraron las mayores concentraciones de flavonoides en la nave sin malla sombra en casi todos los meses, excepto en julio. Septiembre (excepto en condición de luz con estrés hídrico) y noviembre fueron los meses con los menores valores de acumulación de este flavonoide como puede verse en la figura 42 ($F_{(27, 41)} = 9.620$ $P = 0.00102$).

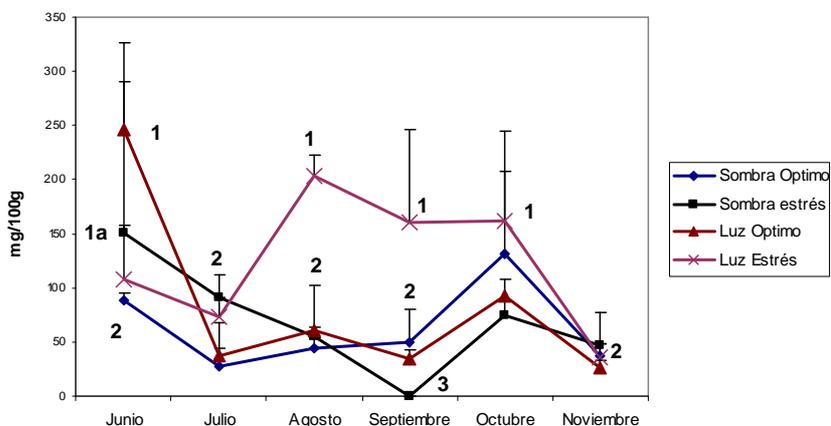


Figura 42. Promedios mensuales de la acumulación de 5,7-dihidroxi-3,6,8,2'4'5'-hexametoxiflavona en *G. glutinosum* bajo condiciones de cultivo en nave con sombra 70% con riego óptimo \blacklozenge y estrés hídrico \blacksquare y en nave sin sombra con riego óptimo \blacktriangle y estrés hídrico \blackcross . La numeración indica diferencias significativas $F_{(27, 41)} = 9.620$ $P = 0.00102$

Con respecto a lo observado en campo, las plantas de San Rafael en el mes de septiembre mostraron la mayor acumulación de este flavonoide con 247.94 mg/100g sin ser estadísticamente mayor que lo obtenido en invernadero bajo condiciones de luz y estrés hídrico a pesar de las diferencias evidentes en porte, edad y estado fisiológico. Ninguna de las muestras colectadas en San Martín presentó el metabolito (Figura 43). Las plantas desarrolladas en la nave de fertirrigación, con suministro permanente de agua con nutrientes, mostraron un gran desarrollo vegetativo con respecto a las tratadas (figura 44), sin embargo la acumulación del flavonoide fue significativamente menor t-student .

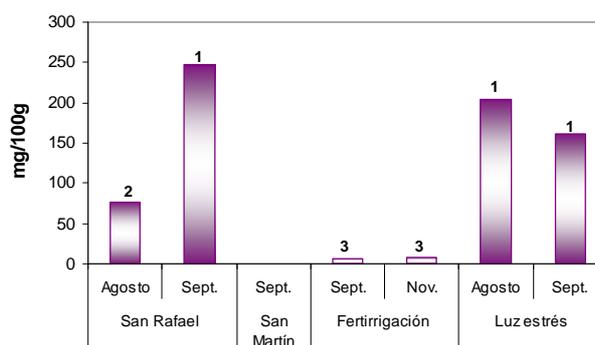


Figura 43. Acumulación de 5,7-dihidroxi-3,6,8,2'4'5'-hexametoixiflavona en *G. glutinosum* en campo (San Rafael y San Martín), en invernadero en nave de fertirrigación y en nave sin sombra bajo estrés hídrico. La numeración hace referencia a diferencias estadísticamente significativas t-student $\alpha \geq 0.005$

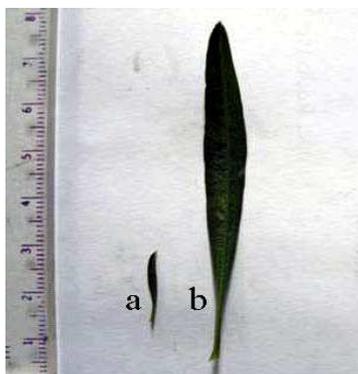


Figura 44. Comparación del desarrollo vegetativo de *G. glutinosum* con estrés hídrico (a) y bajo riego por fertirrigación (b)

C. tortuosa

La fisetina, con máximos de absorbancia de 256, 300sh, 358 presentó las mayores concentraciones en condiciones de alta luminosidad (nave sin malla sombra), con su valor más alto en el mes de agosto bajo riego óptimo, con 0.0424 mg/100g, significativamente mayor ($LSD \geq 0.05$) a los valores más bajos como fueron los resultados en condiciones de sombra en julio, agosto (con riego óptimo) y septiembre (con estrés hídrico). Durante los otros meses de muestreo la condición lumínica con estrés hídrico presentó las mayores acumulaciones de este metabolito (Figura 45).

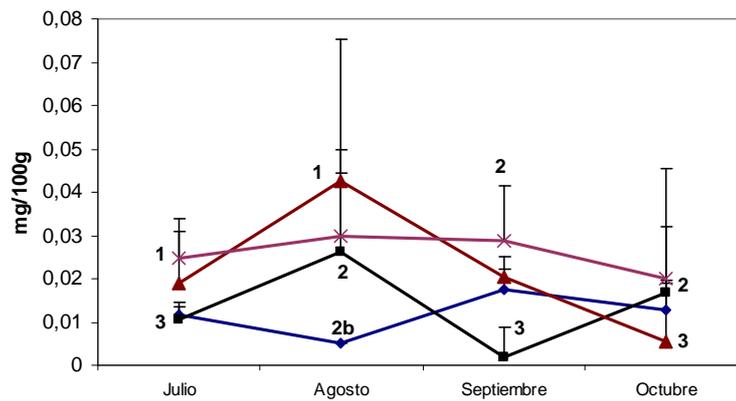


Figura 45. Promedios mensuales de la acumulación de fisetina en *C. tortuosa* bajo condiciones de cultivo: en nave con sombra 70% con riego óptimo \blacklozenge y estrés hídrico \blacksquare y en nave sin sombra con riego óptimo \blacktriangle y estrés hídrico \times . La numeración indica diferencias significativas LSD $\alpha \geq 0.005$

Estos datos en comparación con lo obtenido en campo muestran que las plantas del poblado de San Rafael acumulan significativamente más fisetina que las plantas bajo condiciones de invernadero en el mes de septiembre y las provenientes de San Martín (t-student $\alpha \geq 0.005$), pero entre éstas dos últimas no se encontraron diferencias significativas (figura 46).

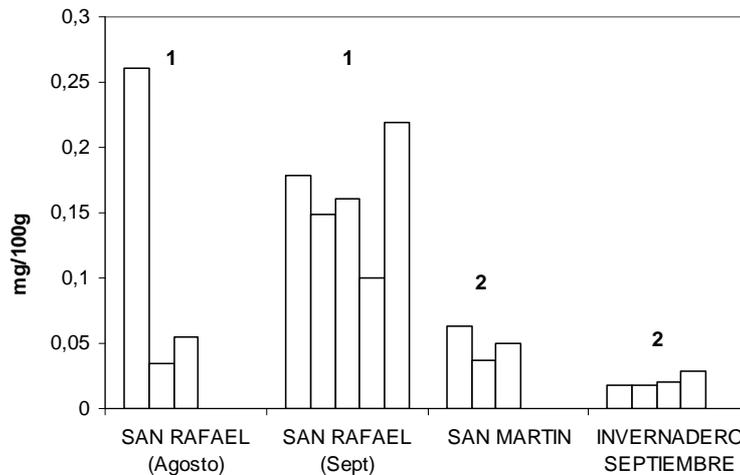


Figura 46. Acumulación de fisetina en *C. tortuosa* silvestre (San Rafael y San Martín), donde cada barra corresponde a un individuo; y bajo condiciones de cultivo en el mes de septiembre de 2008, donde cada barra representa un tratamiento diferente, en su orden: sombra 70% con riego óptimo, sombra 70% con estrés hídrico, sin sombra con riego óptimo y sin sombra con estrés hídrico. La numeración muestra diferencias significativas t-student $\alpha \geq 0.005$.

Se realizó un ensayo con las plantas establecidas en invernadero provenientes de San Rafael en el último mes de muestreo. La mayor de concentración de fisetina se dio en la condición lumínica con estrés hídrico (Figura 47). Estadísticamente no se observaron diferencias significativas entre las dos localidades (t-student $\alpha \geq 0.05$); sin embargo una prueba *post-hoc* de comparación de medias

(LSD \geq 0.05) estableció diferencias entre los grupos de las mayores concentraciones con los grupos de menores concentraciones del compuesto.

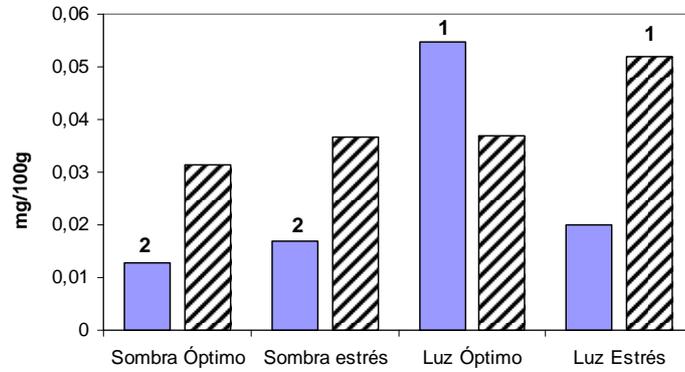


Figura 47. Acumulación de fisetina en *C. tortuosa* establecida en invernadero a partir de semillas provenientes de Zapotitlán de las Salinas  y San Rafael  en el mes de octubre de 2008. Los números hacen referencia a diferencias significativas LSD \geq 0.05

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Germinación y propagación en invernadero

Los porcentajes de germinación de *C. tortuosa* fueron mayores en los lotes de semillas almacenadas por 5 años. Mendoza Orozco (2006) en sus estudios llevados a cabo en Tehuacán con semillas del género *Castela*, obtuvo resultados de hasta 70% en semillas recién colectadas versus 23% en semillas con 12 meses de almacenamiento, lo que difiere a nuestros resultados, en el que el lote de semillas almacenadas presentó una mayor tasa máxima de germinación y menor tiempo promedio de germinación. Éste hecho muestra que, probablemente, las semillas recién colectadas no se encontraban viables, mientras que el tiempo de almacenamiento pudo permitir su maduración. Las semillas pertenecientes a la familia Simaroubaceae presentan cotiledones axilares gruesos y curvos, lo que las ubica en el grupo de semillas con latencias de tipo fisiológica, física o combinada (fisiológica y física), según Finch- Savage y Leubner- Metzger (2006). Este tipo de latencias pueden ser causadas por las capas impermeables de la semilla, que dificultan el paso del agua para su germinación (Baskin y Baskin, 2004) y esto explicaría sus bajas tasas germinativas y los largos periodos de germinación. No se descarta que también las semillas requieran un evento de post-maduración para completar el desarrollo, lo que en algunas especies se relaciona con una deficiencia de ácido giberélico endógeno o con la falta de madurez morfoanatómica del embrión (Baskin y Baskin, 1998). Las semillas de *C. tortuosa* fueron almacenadas a -20°C deteniendo su metabolismo, sin embargo, es posible afirmar que tuvieron las condiciones adecuadas de almacenamiento ya que evitó la deterioración temprana y se mantuvo la calidad durante más tiempo ya que la temperatura de almacenamiento y la humedad relativa del ambiente son los factores más importantes que afectan el mantenimiento de la calidad de la semilla (Cordero y Oliveros, 1983).

En el caso de las semillas de *L. graveolens* no hubo diferencia significativa entre los porcentajes de germinación de semillas almacenadas por 2 años y las colectadas previamente a los experimentos; a pesar de que su almacenamiento se llevó a cabo a temperatura ambiente, las semillas no perdieron viabilidad. Esto es relevante en términos prácticos ya que las comunidades de esta zona estarían en capacidad de almacenar semillas de esta especie para su propagación sin que pierdan viabilidad.

Por su parte, con las semillas de *G. glutinosum* se obtuvo un alto porcentaje de germinación en semillas almacenadas por 6 años y un alto número de semillas germinadas con el material colectado poco antes de los experimentos. Esto indica que las semillas se encontraban viables al momento de la siembra. Lo anterior podría estar relacionado con el tipo y la morfología del embrión, que en la

mayoría de especies de la familia Asteraceae tienen embrión axilar y por lo tanto se agrupan sus semillas en el grupo de semillas sin latencia o con latencia de tipo fisiológica (Finch- Savage y Leubner- Metzger, 2006). De manera similar, Baskin *et al.* (1998) clasifican esta especie como no latente.

Las diferencias en la germinación de los lotes con y sin almacenamiento puede deberse también a los efectos maternos fenotípicos, los cuales ocurren cuando el ambiente ejerce una influencia sobre la madre de manera que es expresada posteriormente en las características de su descendencia (Valencia-Díaz y Montaña, 2005). En semillas estos efectos son el resultado de las diferencias en el ambiente durante su maduración, la disponibilidad de recursos o por diferencias, en una misma planta, en las tasas de desarrollo en la estructura de las semillas o del fruto (Wulff, 1995 y Silvertown, 1984). De modo que variaciones ambientales, como temperatura o precipitación, puede ejercer una influencia en las características de las semillas, como su tamaño y calidad.

El establecimiento y sobrevivencia en invernadero se dificultó debido a un amplio número de variables, entre ellas: la ausencia de suministro permanente de nutrientes, la aplicación de los tratamientos de estrés en plantas inmaduras y el temprano trasplante de las plántulas. Parsons (1978) asegura que el tránsito de la fase de plántula a estados de crecimiento más avanzados es crítico, ya que las características de los sitios de establecimiento son determinantes de las oportunidades de su crecimiento. El desarrollo radical limitado en este estado probablemente sea el principal obstáculo para su permanencia, esto sumado a la alta retención de agua que presenta el sustrato utilizado en los experimentos, que lo hacen muy compacto y dificulta el desarrollo radical. La importancia del sustrato para el establecimiento y germinación de *Castela* en la zona de Tehuacán ha sido analizada por autores como Osorio *et al.* (1996) y Sanders (1998) quienes han mostrado que en esta zona predominan los suelos de textura arenosa y no salina. Por su parte, Mendoza Orozco (2006) supone, de acuerdo con sus resultados, que los suelos de textura franco-arcillosa podrían favorecer la germinación y el desarrollo en las primeras etapas de las plantas, pero posteriormente un suelo arenoso sería más favorable para su crecimiento.

Una vez establecidas las plantas en invernadero con mayores porcentajes de sobrevivencia, se observó que el desarrollo vegetativo fue más evidente en condiciones con riego óptimo y, en el caso de *L. graveolens*, también en época de floración. En cuanto a este último aspecto, se ha descrito para

plantíos de la especie *L. palmeri* en el Estado de Sonora que el mejor momento de colecta de follaje es justamente durante la floración, que se produce en verano (Ortega *et al.*, 2008).

En algunas especies ha sido estudiado el efecto del déficit de agua sobre el desarrollo y morfología vegetal, en aspectos como el peso seco, el área foliar, el incremento en la relación de la longitud radicular/ parte aérea y altura (Sánchez-Blanco, 2008), aún ante altas concentraciones de CO₂ (Bhattacharya *et al.*, 1990). Bajo un déficit hídrico, así sea leve, el efecto más importante es la reducción de crecimiento, especialmente la expansión celular – más vulnerable aún que la división celular- ya que la turgencia de las células en crecimiento brinda la fuerza motriz para la expansión, y la tasa real de la extensión está dada por el potencial hídrico y la extensibilidad (Sánchez- Díaz y Aguirreola, 1997); además, la fotosíntesis y la transpiración se afectan debido a la reducción de turgencia, al cierre estomático y al bloqueo de la difusión de CO₂ hacia el mesófilo (Kumar *et al.* 1994).

Es de esperar, también, que cuando hay suministro permanente de nutrientes el desarrollo vegetativo y la sobrevivencia es aún mayor que cuando no lo hay, evidenciado en las plántulas de *G. glutinosum* y *L. graveolens* con un sistema de fertirrigación de manera constante y suplementado con nutrientes. Las mayores concentraciones en la solución suministrada a estas plantas permanentemente fueron de nitrógeno y calcio. El nitrógeno es esencial, es requerido en grandes cantidades por la planta y es uno de los factores limitantes en su crecimiento (Garnica *et al.*, 2009); por su parte, del calcio actualmente se sabe con certeza su papel importante como regulador en el crecimiento y desarrollo en las plantas, interviniendo en procesos como la división celular, el crecimiento celular polarizado, el movimiento de cloroplastos y la homeostasis de la planta mediante bombas y canales de este ion, entre otros (Hepler, 2005).

Por otro lado, desde junio y hasta octubre hubo floración en plantas de *L. graveolens* establecidas en el invernadero, iniciando en la condición de sombra 70% y posteriormente en la nave de luz. Martin y Hutchins (1980) reportan los meses de floración en Nuevo México para esta especie desde marzo y hasta octubre; sin embargo, en el mes de marzo las plantas eran aún muy inmaduras, con tan solo 2 meses desde su germinación; sólo hasta después de un año se observó este proceso en las plantas establecidas bajo riego continuo mediante fertirrigación. Se sabe que el fotoperiodo determina en muchas especies vegetales el número de días de la emergencia a la floración (Villaruel *et al.*, 1996) y la formación de las flores, por lo general en largos periodos de luz (Hartmann, 1947; Mustilli y Bowler, 1997; Szmidt- Jaworska *et al.*, 2004), ya que la planta cuenta con mecanismos que le

permiten percibir las condiciones lumínicas para optimizar los procesos fotosintéticos y así regular su crecimiento y desarrollo mediante transducción de señales que involucran fitocromos y citocromos que originan la activación de genes específicos (Cashmore, 1997). Otros estudios han documentado la influencia del fotoperiodo, puntualmente en la floración y fructificación de plantas de desierto (Turner y Randall, 1987; Friedel *et al.*, 1994; Abd El-Ghani, 1997). Esto explica el tiempo de floración con el aumento del fotoperiodo en el mes de junio, en el invernadero, donde aumentaron las horas de luz a casi 14 diarias (Figura 15). El hecho de la floración, en términos aplicables, es de gran importancia porque provee una herramienta de reproducción sexual en términos de una estrategia de propagación de esta especie silvestre.

Parámetros fisiológicos

Los parámetros fisiológicos en condiciones iniciales, en las 3 especies, no mostraron mayores diferencias, lo cual era de esperarse ya que estas condiciones eran homogéneas. Sin embargo, se observaron diferencias en *L. graveolens* con mayores tasas de asimilación de CO₂ en las plantas bajo condición de sombra que en los semilleros, lo que se explica por el aumento en el tamaño de la hoja y en el número de éstas, de manera similar a lo obtenido por Oh *et al.* (2009) con plantas de lechuga bajo condiciones “protectoras” y en cámara de crecimiento.

Una vez sometidas las plantas a los tratamientos de riego y luz, la asimilación de CO₂ fue por lo general mayor en la condición de riego óptimo y en la nave con mayor luminosidad (*L. graveolens*), excepto en los meses de junio y julio que registraron, en promedio, los menores valores de luminosidad y temperatura, opuesto a lo ocurrido en agosto y septiembre con los mayores registros de ambos parámetros ambientales. Por otro lado, como era de esperarse la conductancia estomática fue mayor en condiciones de sombra y bajo un riego óptimo, excepto en octubre cuando cayó drásticamente la tasa fotosintética. Se estableció una relación inversa entre fotosíntesis y concentración interna de CO₂, más evidente en condiciones de estrés hídrico, lo que puede deberse a que el carbono asimilado es rápidamente utilizado en el proceso de la fotosíntesis por la planta, en vez de acumularlo.

Contrario a la generalidad teórica de la relación positiva entre conductancia estomática y fotosíntesis (Chaves, 1991; Zhou *et al.*, 2007), debida a que la conductancia estomática regula tanto la pérdida de vapor de agua como el ingreso de CO₂, por lo que su función es no solamente minimizar la transpiración, sino también maximizar la fotosíntesis (Sánchez-Blanco, 2008; Tartachnyk y Blanke,

2008), en nuestros resultados, no coinciden temporalmente los mayores valores de asimilación de CO₂ con las mayores conductancias estomáticas. Este hecho puede estar directamente asociado a que las 3 especies presentan un metabolismo tipo C3 (véase cortes histológicos de cada una en el anexo VIII) en el cual la regulación estomática no es extremadamente fina, el cierre de los estomas no es rápido ni eficaz frente a cambios de luminosidad o concentraciones de CO₂ (Akita y Moss, 1972).

El conteo de estomas realizado en preparaciones de cada una de las especies, mostró que la densidad estomática de *L. graveolens* y *G. glutinosum* concuerda con lo reportado para especies C3, con valores entre 40 y 300 estomas/mm² (Leegod, 1993) aunque a diferencia de lo reportado para la mayoría de especies (Sánchez-Díaz y Aguirreola, 2000), presentaron mayor número de estomas en el haz. En *L. graveolens* se observaron estomas grandes y en su mayoría claramente abiertos, mientras que *G. glutinosum* presentó estomas más pequeños y numerosos (Ver Anexo IX). En ambas especies hubo en promedio, mayor densidad estomática en las plantas establecidas en sombra, lo cual es de esperarse, ya que esta nave presentó una menor temperatura y luminosidad y mayor humedad relativa; además se ha establecido que la disminución en la cantidad de estomas por mm² aumenta la resistencia estomática y así se evita el exceso de transpiración (Cañizares *et al.*, 2003). Las preparaciones de *C. tortuosa*, debido a la morfología misma de la hoja y a la presencia de ceras, no fueron útiles para estimar la densidad estomática por lo que se requiere aplicar una metodología con la que se pueda obtener la epidermis foliar únicamente.

A pesar de que se ha descrito (Sánchez-Díaz y Aguirreolea, 2000a) que la apertura estomática es estimulada por la irradiación (PAR), los resultados obtenidos no muestran una clara relación entre estas dos variables (figura 32), excepto en algunos casos en *L. graveolens*: de mayo a octubre en la nave de luz y de junio a octubre en la nave de sombra. Esto puede deberse sustancialmente a la heterogeneidad de la conductancia estomática, que depende de diversos factores: la especie, la forma de imponer el estrés hídrico, las fluctuaciones diarias de temperatura y humedad, el número de estomas y su disposición espacial en la hoja, la edad foliar, la nutrición, entre otros. De otro lado, a pesar de la relación existente entre la temperatura y la apertura estomática, la magnitud de la respuesta depende de la presión de vapor. Estudios como el de Lauer y Boyer (1992) han demostrado que el cierre de estomas impide la circulación de agua entre xilema y floema, bloqueando el transporte de asimilados hacia los órganos de consumo antes de que ocurra una limitación en el aporte de CO₂ o la tasa fotosintética, lo que permitiría explicar la baja conductancia estomática simultánea a altas tasas fotosintéticas, previas al descenso de esta última en el mes de

octubre. Es relevante señalar que los menores registros de conductancia estomática se presentaron en agosto, mes en que se registró un aumento en la temperatura dentro del invernadero, así que es probable que como un mecanismo para evitar la evapotranspiración frente a las altas temperaturas, las plantas cerraron sus estomas y así evitar la embolia y la cavitación, fenómenos comunes en plantas bajo déficit hídrico y con hojas muy pequeñas (Sánchez-Díaz y Aguirreola, 2000).

Es interesante el hecho de que en *G. glutinosum* y *C. tortuosa* durante los meses de mayor flujo fotónico y temperatura no mostraron una alta asimilación de CO₂, ésta se presentó cuando ambos parámetros ambientales disminuyeron. Una hipótesis a este hecho puede basarse en la fotoinhibición, que según Broetto *et al.* (2007) se genera en plantas expuestas a una irradiación excesiva y es un proceso asociado a la inducción mecanismos protectores en la disipación de energía, generados por daños en el centro de reacción del fotosistema II (PSII) causados por la luz,. En nuestros registros, la disminución en la asimilación de CO₂ de estas especies en el mes de octubre estuvo acompañada de un aumento conspicuo en la conductancia estomática, probablemente debido al nivel de humedad relativa en este mes (datos no mostrados), que coincidió que con el fin de la época de lluvias.

El mecanismo que podría explicar los fenómenos anteriormente señalados podría estar asociado los llamados efectos no estomáticos, que se han reportado para explicar las bajas tasas fotosintéticas, e incluyen la disminución de en la tasa de transporte electrónico (Kaiser, 1987) con efectos en la funcionalidad del PS II (Bilger *et al.*, 1995) o en la eficiencia efectiva fotoquímica debido a la aparición de una fuente alternativa de electrones como las especies reactivas, particularmente superóxidos, que gracias a las superóxido-dismutasas producen peróxido de hidrógeno el cual retira electrones del transporte fotosintético lo que explicaría bajas tasas fotosintéticas a pesar de elevada conductancia estomática (Tartachnyk y Blanke, 2008). Se ha sugerido que las respuestas metabólicas bajo condiciones de estrés hídrico y altas irradiancias ocurren indirectamente como consecuencia del estrés oxidativo, más que como una respuesta directa debida a la sequía (Flexas *et al.*, 2006).

La controversia sobre las causas de la disminución de la fotosíntesis en condiciones de sequía, por cierre estomático o disfuncionalidad metabólica en las plantas C3 ha llevado a numerosos estudios en el tema, concluyendo que la limitación estomática es la responsable al inicio del estrés y mientras éste se acentúa, se produce gradualmente el desacople metabólico (Zhou *et al.*, 2007; Flexas y Medrano, 2002). Esto puede resultar evidente en los meses de mayores tasas fotosintéticas en las 3

especies (agosto-septiembre) y concentraciones negativas de CO₂ intracelular y la subsecuente caída de la asimilación de CO₂ en el mes de octubre, con un aumento en la concentración de CO₂ (Ci). Se ha sugerido que cuando Ci disminuye indica que las limitaciones estomáticas son las dominantes, y cuando el estrés hídrico se hace aún más fuerte, Ci frecuentemente aumenta como reflejo de la predominancia de limitaciones no estomáticas en la fotosíntesis (Flexas y Medrano, 2002). Estos señalamientos corroboran la hipótesis de la disminución fotosintética debida a comportamiento en el PSII, a nivel bioquímico como la actividad de la Ribulosa 1,5 carboxilasa-oxigenasa (RUBISCO), la regeneración de la Ribulosa 1, 5 Bifosfato (RuBP) y la síntesis de ATP (Griffiths y Parry, 2002; Medrano *et al*, 2002; Parry *et al.*, 2002; Ramachandra Reddy *et al*, 2004) o a nivel electrónico, debido a que con las bajas tasas de fotosíntesis el poder reductor del NADPH no está siendo utilizado para la asimilación de carbono, y como la capacidad de captura de energía fotónica primaria en las plantas es insensible al estrés, estas continúan con el transporte de electrones hacia el NADP⁺, cada vez más escaso. De esta manera, el flujo lento de electrones en la cadena transportadora del cloroplasto y el desbalance redox resultantes pueden ocasionar daño fotónico a los centros de reacción del fotosistema II, inhibición de la vía oxidativa pentosa fosfato y el uso preferente de O₂ en vez del NADP⁺ como último aceptor de electrones en la cadena fotosintética, generando especies reactivas de oxígeno (Noctor *et al.*, 2002) lo que se relaciona directamente con la mayor acumulación de flavonoides (como agentes antioxidantes) bajo condiciones de estrés.

Lo anteriormente explicado se observó bajo todos los tratamientos, excepto bajo la condición de sombra con riego óptimo en *L. graveolens* y *G. glutinosum* lo que demuestra que efectivamente, eran condiciones menos estresantes para las plantas.

La comparación de los parámetros fisiológicos entre las plantas establecidas en invernadero y en estado silvestre mostró que no hubo diferencias en la fotosíntesis (excepto en *C. tortuosa*), pero sí en la conductancia que fue mayor en campo, lo que se relaciona directamente con la mayor humedad registrada: 37.016 ±7.34% en San Rafael y 87.08 ±4.38% en Tehuacán frente a 16.54 ±1.4% en invernadero en el mismo mes, lo cual permite la apertura estomática y de ese modo se explica también la mayor concentración interna de CO₂ en las plantas silvestres. La menor tasa fotosintética en *C. tortuosa* en campo, a pesar de la alta concentración de CO₂, muestra que los procesos metabólicos en campo son diferentes a las plantas en campo que, se sugiere, utilizan de manera inmediata el carbono fijado; mientras que en las primeras éste si se concentra en la célula.

La ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre parámetros fotosintéticos, en algunos meses, de plantas sometidas a riego óptimo y a estrés hídrico muestra que, probablemente, ambos tratamientos indujeron la característica de estrés teniendo en cuenta las altas temperaturas registradas que promueven una rápida evaporación del agua, sumado a la alta retención de agua disponible por el sustrato. Una evidencia de esto es que con el tiempo, aún las plantas sometidas a un riego óptimo, tendían a perder sus hojas, que es la estrategia de estas plantas para reducir la pérdida de agua durante la época de sequía en condiciones naturales (Pavón y Briones, 2001).

Cuantificación de metabolitos secundarios

Las concentraciones de naringenina fueron similares con lo reportado en especies reconocidas por su alto contenido de este compuesto como la naranja, con 11.3 mg/100g (Justesen *et al.*, 1998) y el tomate de 1.8 a 9.04 mg/100g (Raffo *et al.*, 2006). Con respecto a los datos descritos para *L. graveolens* por Lin *et al.* (2007), coincidieron con nuestros resultados para la naringenina (reporte de 3.3 a 4.18 mg/100g) pero la pentahidroflavanona-glucósido fue mucho mayor en el presente estudio que lo reportado, con valores hasta de 91.8mg/100g y de 9.37 mg/100g, respectivamente.

En el caso de la 5,7-dihidroxi-3,6,8,2',4',5'-hexametoxiflavona de *G. glutinosum* la concentración obtenida en nuestros resultados, con un máximo de 246.7 mg/100g fue mayor a lo reportado por Canales *et al.* (2006) en plantas silvestres de esta especie en Tepeji del Río (0.005%).

Las mayores concentraciones de flavonoides se obtuvieron en la condición de luz; para la naringenina y 5,7-dihidroxi-3,6,8,2',4',5'-hexametoxiflavona bajo el tratamiento de estrés hídrico (Figuras 33 y 42), la fisetina en luz óptimo (Figura 45) y la pentahidroflavanona-glucósido bajo estrés hídrico en la nave de sombra (Figura 36). En el caso de la naringenina, por ejemplo, el aumento en la acumulación entre la condición de luz y riego óptimo con las plantas en la misma nave pero sometidas a estrés hídrico aumentó en más de 400%.

Ha sido ampliamente reportada la relación entre la producción de compuestos flavonoides y la radiación lumínica. Recientemente se ha enfocado el estudio a la activación del metabolismo secundario, particularmente con las vías que permiten la acumulación de antioxidantes, incluyendo los fenilpropanoides (Oh *et al.*, 2009) como parte integral de la adaptación de las plantas y en asociación con diferentes tipos de estrés como la sequía, alta luminosidad, UV y bajas temperaturas (Chappell y Halbrock, 1984; Dixon y Paiva, 1995; Janas *et al.*, 2002; Sofó *et al.*, 2005; Rudikovskaya *et al.*, 2008). La asociación entre luz y metabolitos secundarios se ha establecido aún

en especies comerciales, por ejemplo, los viñedos con poca luminosidad tienen menores concentraciones de compuestos terpénicos (Catania y Avagnina 2007; Langenheim, 1994).

La producción de flavonoides en relación a la adaptación de las plantas a condiciones de estrés, como la luz, se ha descrito bajo el fundamento de su papel como antioxidantes (Dixon y Paiva, 1995; Hernández *et al.*, 2004; Keles y Oncel, 2002; Yaginuma *et al.*, 2002). La hipótesis de fotoinhibición (Close y McArthur, 2002) predice que cualquier factor que aumente la presión oxidativa genera el incremento de compuestos fenólicos, de manera que una de las principales funciones de estos compuestos se enfoca a proteger a la planta de las altas radiaciones.

La mayor acumulación de flavonoides bajo la condición de estrés hídrico en la mayoría de muestreos (excepto en el mes de agosto en *L. graveolens* y de septiembre en *G. glutinosum* y *C. tortuosa* en la nave de sombra) muestra que además de la luz, el estrés inducido por la limitación de agua es también determinante en este tipo de compuestos, contrario a lo obtenido para aceites esenciales en la especie *L. berlandieri* con un tratamiento de estrés hídrico similar al usado en el presente estudio (Turgut Dunford y Vázquez, 2005).

En *G. glutinosum* y *C. tortuosa*, la mayor acumulación de flavonoides se dio el mes previo al mes en el que se registraron las mayores tasas fotosintéticas, los máximos registros de ambas variables no coincidieron. La naringenina de *L. graveolens* tuvo su mayor acumulación un mes después a las mayores tasas fotosintéticas, mientras que la pentahidroxi-flavanona registró la mayor concentración simultáneamente a un descenso en la tasa fotosintética. En el caso de la naringenina este fenómeno podría explicarse con base en la producción de precursores y de intermediarios de los compuestos gracias a la fotosíntesis, que incluyen la eritrosa 4-fosfato, fosfoenolpiruvato y el acetyl-CoA, además la generación de ATP y NADPH como fuente de energía utilizada en la síntesis de compuestos fenólicos (Zagoskina *et al.*, 2005).

Los casos de *G. glutinosum* y *C. tortuosa* y la pentahidroxi-flavanona de *L. graveolens* pueden resolverse a la luz de la llamada hipótesis de balance crecimiento- diferenciación, GDBH por sus siglas en inglés, la cual divide el desarrollo en 2 procesos: crecimiento, que incluye división celular y alargamiento; y la diferenciación que incluye maduración celular, especialización y la producción de compuestos de defensa. Ambos procesos se manejan bajo el mismo *pool* de recursos y están negativamente correlacionados con el crecimiento, predominante bajo condiciones ambientales desfavorables, y con la diferenciación cuando los recursos son limitados. Ya que la fotosíntesis continúa bajo condiciones desfavorables los compuestos de defensa se sintetizan cuando las reservas

de carbono no están siendo utilizadas para el crecimiento. Esta hipótesis en un contexto ilimitado de nutrientes sugeriría que la síntesis de compuestos secundarios no sería costosa, ya que no compite directamente por recursos para el crecimiento y que los cambios en los suplementos del sustrato están altamente vinculados con la regulación en la formación de dichos compuestos; y por otro lado, no explicaría la acumulación de los flavonoides, en este caso, en las plantas que si bien no se desarrollan vegetativamente de manera abrupta se encuentran en etapas de crecimiento. Por estas razones se generó un modelo basado en la demanda y que reconoce la importancia de luz, nutrientes y otros recursos en la determinación de los patrones de defensa de las plantas. Esta hipótesis plantea que especies que crecen en hábitats pobres tienen típicamente tasas lentas de crecimiento y vidas medias largas en las hojas, las cuales tienen grandes contenidos de compuestos defensivos, generalmente inmóviles, lo que les permite protegerse (Gershenzon, 1994).

La mayoría de flavonoides estudiados, excepto la 5,7-dihidroxi-3,6,8,2',4',5'-hexametoxiflavona de *G. glutinosum* cuyas plántulas establecidas en los semilleros presentaron el compuesto (hasta 22.48 mg/100g) y la fisetina de *C. tortuosa*, tendieron a aumentar su concentración a través del tiempo, con poca o ninguna concentración de estos metabolitos en plántulas establecidas en semilleros. Estudios en otras especies han mostrado acumulación diferencial de metabolitos tanto en órganos como en etapas de crecimiento, lo cual se relaciona directamente con la etapa de desarrollo en la cual se usa una planta para su fin medicinal. Ejemplos de ellos son *Siphonochilus aethiopicus* (Zingiberaceae) con la disminución de actividad del extracto de las hojas después de la senescencia, mientras que en la raíz aumentó, *Eucomis autumnalis* la cual mostró los valores más altos de actividad hacia el final de la estación de crecimiento, poco antes del inicio de la latencia (Taylor y Van Staden 2001 y 2002) y los bulbos maduros mostraron mayor actividad en comparación con los jóvenes. En *L. graveolens* la acumulación de aceites esenciales -timol y carvacrol- también aumenta con la madurez de la planta (Silva y Dunford, 2005). Las diferencias en la acumulación espacial y temporal se deben al tipo de metabolito, la especie y dentro de ella, la bioquímica tiene una gran influencia: las rutas biosintéticas y fenómenos como la glicosilación.

Los flavonoides se derivan de la ruta de los fenilpropanoides, los aminoácidos fenilalanina y tirosina (que provienen de la vía del shikimato) juegan un papel importante como precursores de una amplia gama de compuestos fenólicos. El anillo B y parte del anillo heterocíclico del esqueleto flavonoide es dado por la esterificación del conjugado ácido hidroxicinámico-CoA, ordinariamente el 4 cumaroil-CoA, mientras que el anillo A se origina de unidades de acetato vía malonil-CoA. Ambos

precursores son derivados de carbohidratos (Harborne, 1994), punto en el cual vuelve a jugar un papel importante la regulación entre el metabolismo primario y el secundario frente a las condiciones medioambientales en las cuales se encuentre la planta. En muchos casos, la producción de metabolitos secundarios está indirectamente asociada a la luz, que de acuerdo a su cantidad y calidad pueden inducir o no tener un efecto especial sobre el desarrollo de la planta, favorable para la biosíntesis o acumulación de estos compuestos. Por ej. *Digitalis lanata* acumula digoxina en sus hojas durante su estadio vegetativo, con un máximo durante su estado maduro, mientras que en el invierno (flujo fotónico menor, de $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) la acumulación se ve limitada (Linley *et al.*, 1985). De este modo, se discute que bajo condiciones estresantes puede presentarse catabolismo de metabolitos primarios o una nueva distribución de éstos, para compensar el bajo metabolismo primario (Brugidou *et al.*, 1988, Flesch *et al.*, 1992), exponiendo el conocido dilema de crecer o defenderse para las plantas (Herms y Mattson, 1992).

Un punto interesante por recalcar es la glicosilación de sustancias bioactivas, la cual genera compuestos de mayor polaridad que son fisiológicamente más rápidamente disponibles (Tumanova *et al.*, 2002). Debido a que se ha sugerido que la glicosilación puede influir en la estabilización de metabolitos secundarios (Harborne, 1980), se esperaría que en el caso de *L. graveolens* el glucósido de la naringenina (naringina) fuera más abundante, lo que no ocurrió. Sin embargo se ha descrito en flavonoides que la acilación permite absorción de rayos UV-B mientras que los compuestos salicilatos son menos efectivos para este fin (Fischbach *et al.* 1999; Turunen *et al.*, 1999) lo que muestra una clara ventaja de las agliconas bajo condiciones de estrés, que puede ser el caso de la naringenina frente a la escasa concentración de naringina acumulada (Figura 38).

Las plantas de *L. graveolens* con flor no presentaron diferencias en cuanto a la concentración de naringenina ni pentahidroxiflavanona-glucósido, y en contraste con algunos reportes sobre la disminución de flavonoides después de la época de floración (Karlová, 2006), los compuestos cuantificados en esta especie tendieron a aumentar su concentración.

Las plantas desarrolladas en la nave con fertirrigación, mostraron gran desarrollo vegetativo pero la concentración de las flavonoides correspondientes fue significativamente menor a las tratadas (Figuras 40 y 43). Esto puede deberse a que los macronutrientes del suelo son transformados mediante el metabolismo primario de la planta, generando así las macromoléculas que permiten el crecimiento de la misma y por lo tanto el metabolismo secundario queda suspendido y más aún, si la

planta no se encuentra bajo ninguna condición de estrés en la cual la síntesis de metabolitos secundarios actúa como una defensa ante los mismos. Este hecho contrasta con la gran cantidad de metabolito en las plantas tratadas y especialmente con la concentración en plantas secas, como *G. glutinosum* en el mes de noviembre con 79.261 mg/100g. No se ha visto una correlación entre la producción de biomasa por planta y el contenido de aceites esenciales en *Melissa officinalis* aunque sí una correlación negativa entre el contenido de sus aceites esenciales y parámetros fenotípicos espaciales: ramas de plantas durante un periodo de 2 meses mostraron menores valores de aceites que ramificaciones menores o de crecimiento más lento (Adzet *et al.*, 1992). Nuestros resultados son consistentes con la llamada hipótesis de balance crecimiento- diferenciación, que establece que la disponibilidad de nutrientes en el suelo puede aumentar o disminuir la concentración de metabolitos secundarios: el crecimiento de la planta en relación directa con los nutrientes e inversamente asociado con la acumulación de compuestos fenólicos (Hale *et al.*, 2005) y además con el modelo de competición por proteína (PCM) propuesto por Jones y Hartley (1999) el cual sugiere que la síntesis de proteínas y la síntesis fenólica compiten por el uso del precursor de fenilalanina. Ambos propuestos muestran una clara regulación entre el metabolismo primario y el secundario.

Aunque la generalidad observada en campo fue una mayor concentración de metabolitos en comparación con las plantas de invernadero, existió una alta variabilidad en estas muestras, lo que concuerda con las observaciones fluctuantes y diferenciales, según época y sitio de colecta, realizadas por otros investigadores (Martínez, 2007. Información personal); además se debe tener en cuenta que en el invernadero las condiciones ambientales son relativamente constantes mientras que las variaciones en zonas áridas son drásticas, incluso las diarias, a lo que se suma la presencia de depredadores como se observó en San Rafael en *L. graveolens* en el mes de septiembre (Anexo X). Sin embargo, no hay reportes de flavonoides en este género que involucren alguna asociación ecológica con depredadores, contrario a lo que ocurre con los aceites vegetales (Gleiser y Zygadlo, 2007; Kembro *et al.*, 2009), lo cual explicaría la ausencia de diferencias en campo entre plantas con marcas de depredación y sin éstas. En las otras dos especies no se evidenció depredación, como ya había sido reportado para *C. tortuosa* en la región de Zapotitlán Salinas (Mendoza Orozco y Godinez Alvarez, 2007). Otros factores que probablemente se suman a la alta variabilidad en la acumulación de flavonoides en campo es la edad de las plantas, mayor que las establecidas en invernadero de tan sólo un año, las condiciones microambientales y la mayor radiación PAR en campo. Se ha reportado que bajas irradiaciones PAR incrementan la sensibilidad a la radiación UV-

B (Caldwell *et al.*, 1998; Warren *et al.*, 2003) con base en las observaciones de mayor acumulación de compuestos que absorben estas radiaciones en plantas establecidas en espacios abiertos que en las de espacios cerrados, lo que sugiere que las primeras están más protegidas que las segundas.

Estudios similares sobre la evaluación de compuestos fenólicos bajo diversas condiciones de radiaciones y estrés hídrico en otras especies (Turtola, 2005) han mostrado igualmente variaciones amplias, aún dentro de la misma especie y bajo condiciones homogéneas, esto es, sin comparar invernadero y campo, con resultados de incremento, descenso o invariabilidad de la concentración de fenoles bajo estas condiciones. En *L. graveolens*, estudios en aceites esenciales (Silva y Dunford, 2005) mostraron mayores concentraciones de 1.8 cineole y carvacrol en plantas de invernadero, pero menor acumulación de timol frente a plantas silvestres.

De modo general, aunque la cantidad de metabolitos secundarios está claramente influenciada por disponibilidad de recursos abióticos e influencias bióticas, la variación en la composición de la mezcla está, fuertemente determinada por control genético; y ambos (cantidad total y composición) pueden estar afectados por presiones bióticas determinando la sobrevivencia de la planta. Actualmente hay gran cantidad de estudios que involucran estos parámetros (Vincent *et al.*, 2005; Pelt *et al.*, 2003) de modo que la variabilidad genética individual, y más al tratarse de especies silvestres, influyen en los resultados variables obtenidos. Y finalmente en el presente estudio se analizaron entre 1 y 3 metabolitos de cada especie, y como se sabe, la distribución del carbono en el metabolismo secundario se divide en varias vías alternativas y ramificadas por lo que el comportamiento de otras flavonas podría estar variando de una manera independiente a las contempladas aquí. De hecho, la naringenina es un punto central para estas ramificaciones, generando flavonoles, flavonas, isoflavonas, dihidroflavonoles, etc. (Pelt *et al.*, 2003).

Considerando los resultados del presente estudio sobre el efecto de las condiciones de cultivo sobre la acumulación de compuestos flavonoides, es posible afirmar que éstos contribuyen de manera importante a una nueva línea de investigación que pretende manejar la concentración de metabolitos secundarios en especies de uso medicinal bajo condiciones controladas, de modo que sea posible obtener plantas con su actividad medicinal al tiempo que se conserven *ex situ* estas especies de gran demanda. Aunque no son suficientes los datos obtenidos, se espera que aporten a otros estudios similares y puedan tener una aplicación práctica, eficiente y útil frente a las problemáticas humanas sin dejar de lado el uso sustentable de los recursos.

CONCLUSIONES

Para las semillas de las especies *Gymnosperma glutinosum* y *Lippia graveolens* la desinfección es suficiente para lograr la germinación. En el caso de *Castela tortuosa* es necesaria una escarificación con ácido sulfúrico concentrado.

Los porcentajes de germinación de *L. graveolens* muestran que las semillas pueden ser almacenadas a temperatura ambiente hasta por 2 años sin que se pierda la viabilidad. En el caso de *G. glutinosum* el almacenamiento a -20°C mantuvo la viabilidad de las semillas hasta por 6 años.

La sobrevivencia y establecimiento de las plantas se logró con la adición de solución nutritiva Hoagland y el trasplante de plántulas mayores de 3 cm de la cámara de incubación a macetas en invernadero. En el caso de *C. tortuosa* la siembra directa sobre los almácigos en el invernadero, sin pasar por el cuarto de incubación, logra un alto porcentaje de sobrevivencia.

El riego óptimo del sustrato utilizado (mezcla de agrolita y tierra en proporción 1:2) fue 100-80% de humedad, correspondiente a un potencial hídrico de 0.3 a 0.5 atmósferas (-0.033 a -0.055 MPa, respectivamente) y el estrés hídrico con un porcentaje de humedad del suelo entre 60 y 40%, correspondiente a 13 y 15 atmósferas (-1.43 y -1.65 MPa, respectivamente).

Los tratamientos lumínicos e hídricos, además de otros factores como el fotoperiodo, influyen en la fijación de carbono, reflejada en las tasas fotosintéticas y concentraciones internas de dióxido de carbono. La conductancia estomática se vio asociada directamente con la humedad ambiental y en algunos casos, inversamente con la fotosíntesis, por lo que se sugiere que están en juego mecanismos no estomáticos que expliquen las bajas asimilaciones de CO₂ en los últimos meses de muestreo, y a al metabolismo C₃ que presentan las especies estudiadas.

La mayor acumulación de flavonoides se presentó en condiciones lumínicas altas; este parámetro no coincidió con las mayores tasas fotosintéticas. En *L. graveolens* se acumuló en mayor concentración y bajo todos los tratamientos la pentahidroxi flavanona-glucósido con valores de hasta 91.83 mg/100g y la naringina fue la de menor concentración. La mayor acumulación de naringenina fue de 4.575 mg/100g, mientras que el máximo obtenido de la 5,7-dihidroxi-3,6,8,2',4',5'-

hexametoxiflavona de *G. glutinosum* fue de 246.7 mg/100g y la fisetina en *C. tortuosa* con concentraciones muy bajas, fue de 0.0424 mg/100g.

Las concentraciones de flavonoides en las tres especies estudiadas fueron mayores en condiciones silvestres, no obstante, esta condición fue muy variable a pesar de que los individuos muestreados se encontraban cercanos.

Se resalta la independencia entre el desarrollo vegetativo de las especies y la producción de metabolitos secundarios, en los casos de *G. glutinosum* y *L. graveolens*.

PROPUESTAS

Como consecuencia de los resultados obtenidos en este estudio se proponen alternativas que podrían mejorar a éstos y por ende en las aplicaciones correspondientes. Ellas incluyen otros manejos en la propagación, como un tipo de sustrato con menos retención de agua, por ejemplo con la adición de tezontle o mayor proporción de agrolita; la adición permanente de solución nutritiva y realizar el trasplante en plantas con mayor tamaño. Sería conveniente, así mismo iniciar la aplicación de tratamientos a las plantas con un mayor desarrollo vegetativo.

Con base en los resultados de los parámetros fotosintéticos de estas 3 especies silvestres, se considera que la época idónea para la siembra de las semillas podría estar en los meses de junio o julio, de modo que se eviten los meses más fríos del año.

ANEXOS

I. Composición de solución Hoagland

Para 20 litros:

Macronutrientes

KH_2PO_4	2.72g
KNO_3	10.11g
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	16.41g
MgSO_4	4.8156g

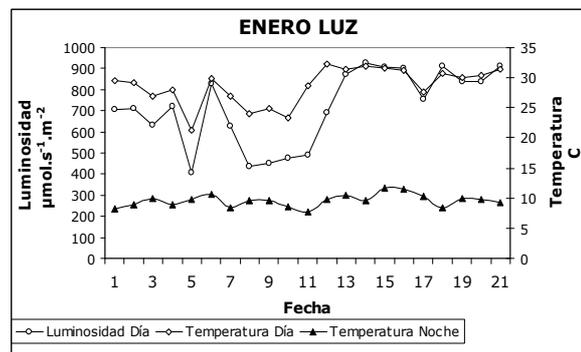
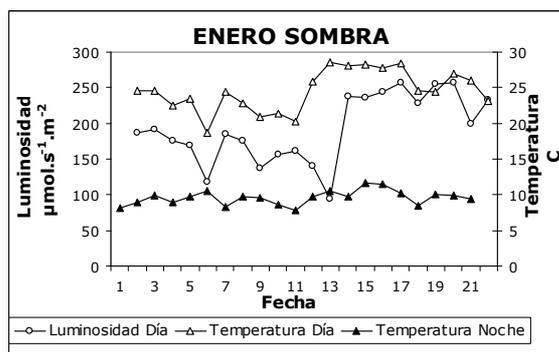
Micronutrientes

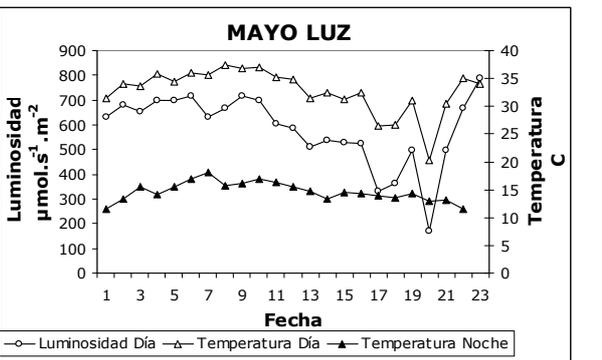
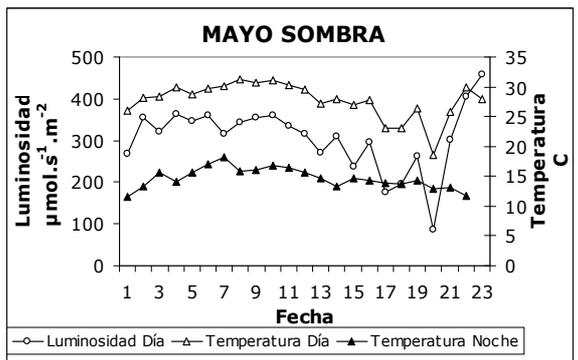
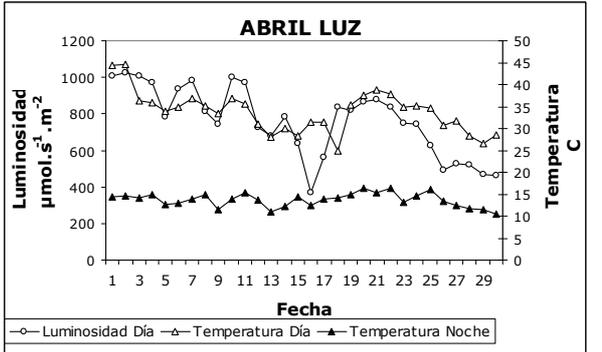
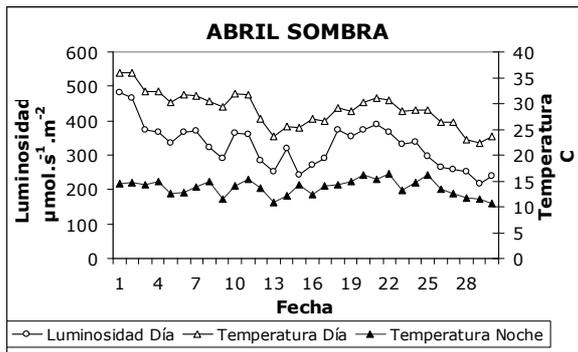
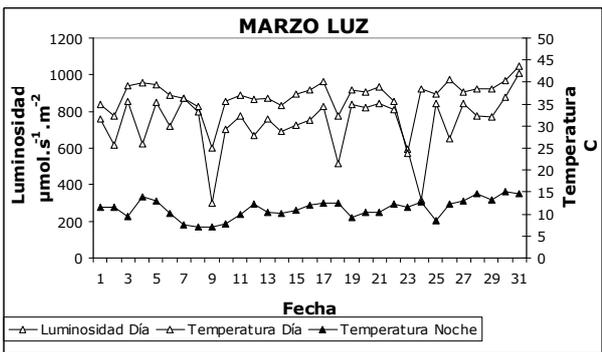
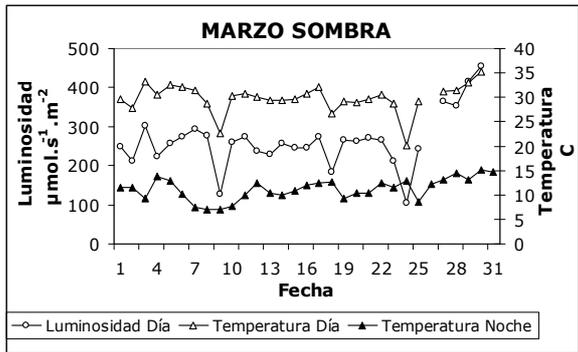
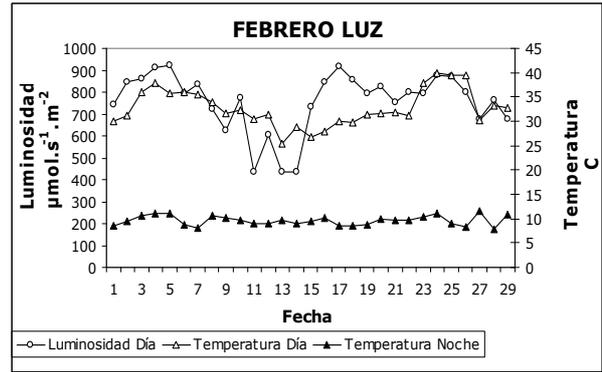
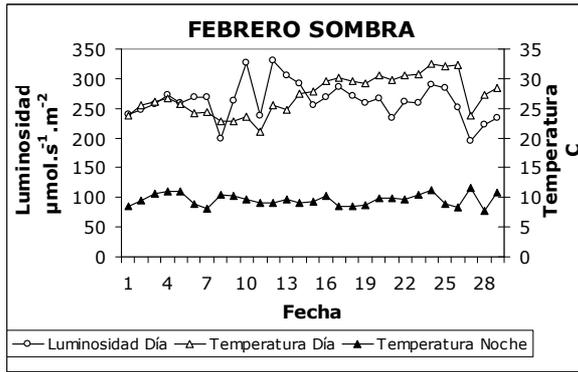
H_3BO_3	1.43g
ZnSO_4	0.11g
CuSO_4	0.04g
H_2MoO_4	0.01g

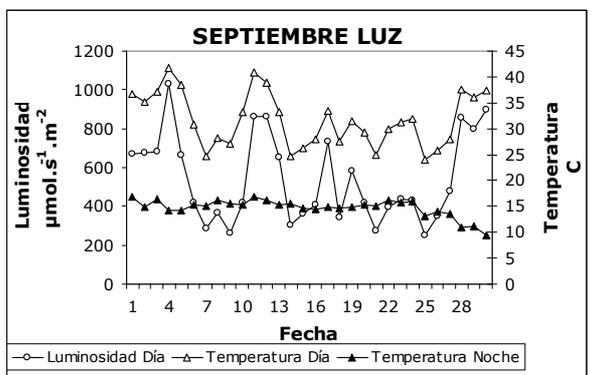
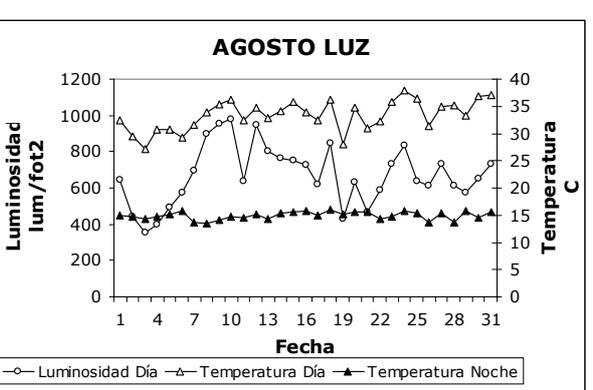
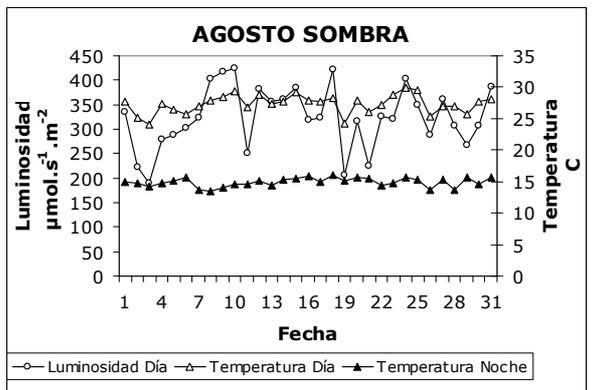
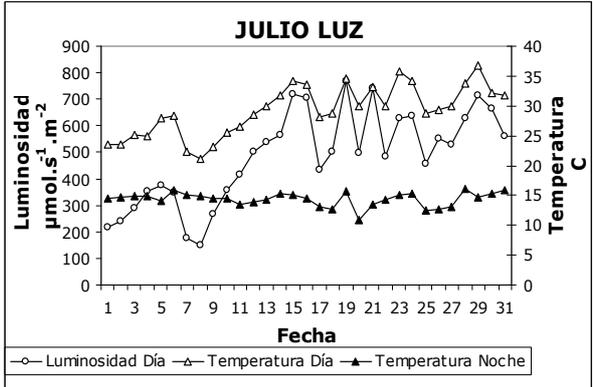
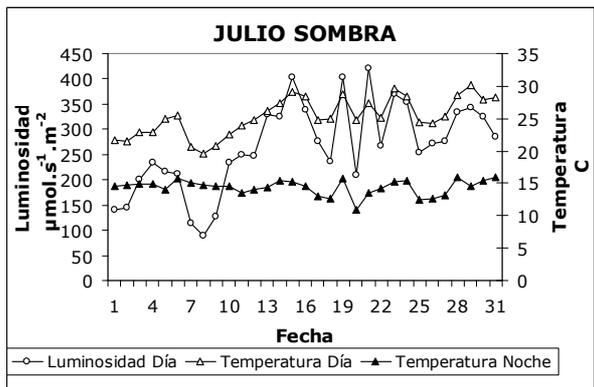
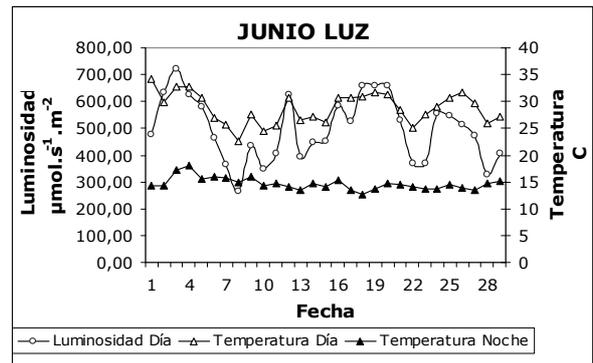
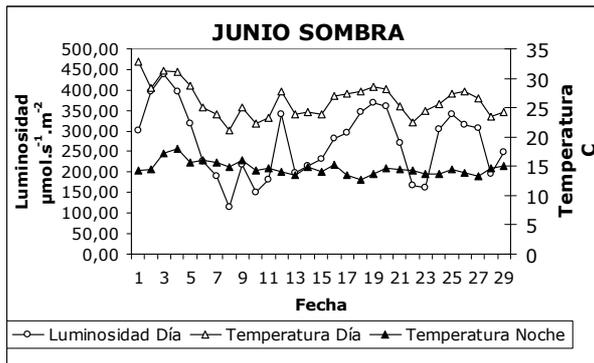
II. Composición de solución nutritiva suministrada por fertirrigación

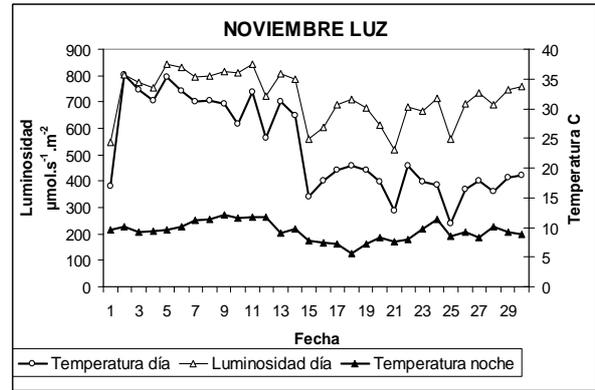
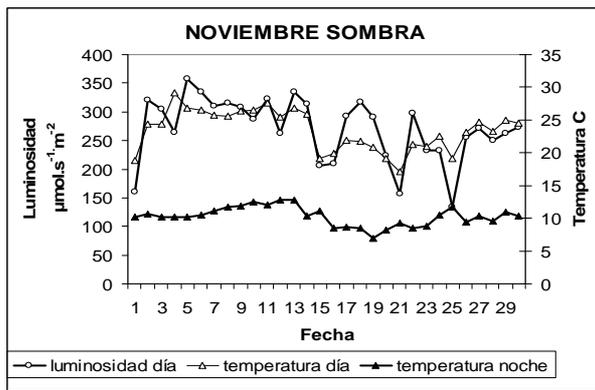
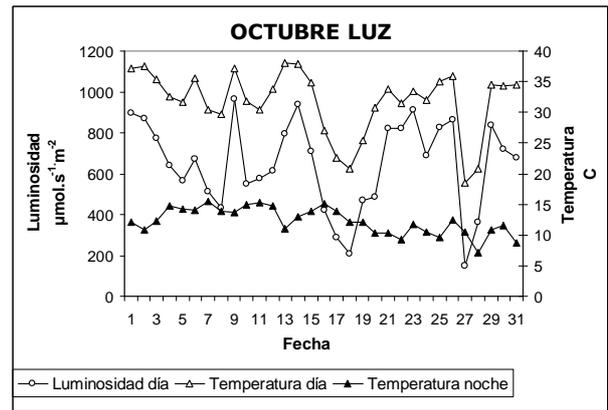
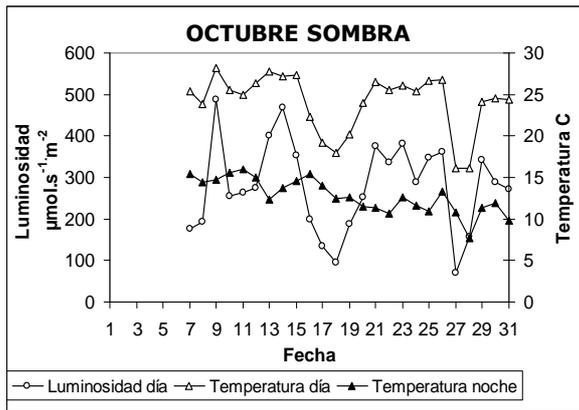
K	200 ppm
Ca	150 ppm
N	190 ppm
S	70 ppm
Mg	45 ppm
P	35 ppm
Fe	1.0 ppm
Mn	0.5 ppm
B	0.5 ppm
Zn	0.15 ppm
Cu	0.10 ppm
Mo	0.05 ppm

III. Promedios diarios de luminosidad y temperatura en los meses del experimento en cada nave del invernadero.

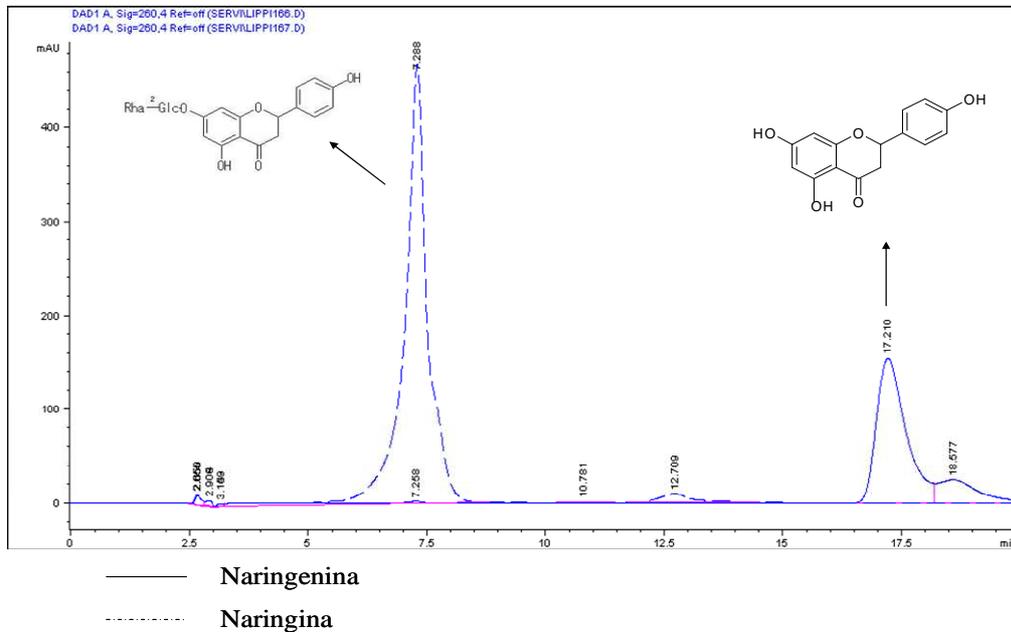


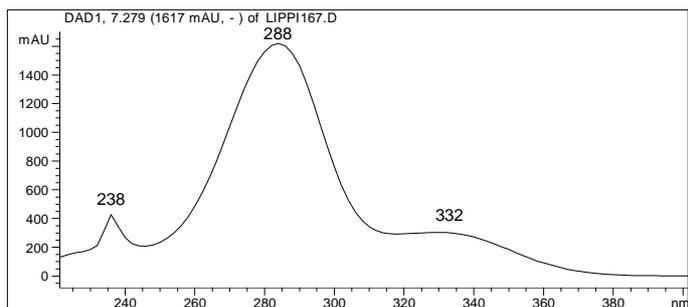




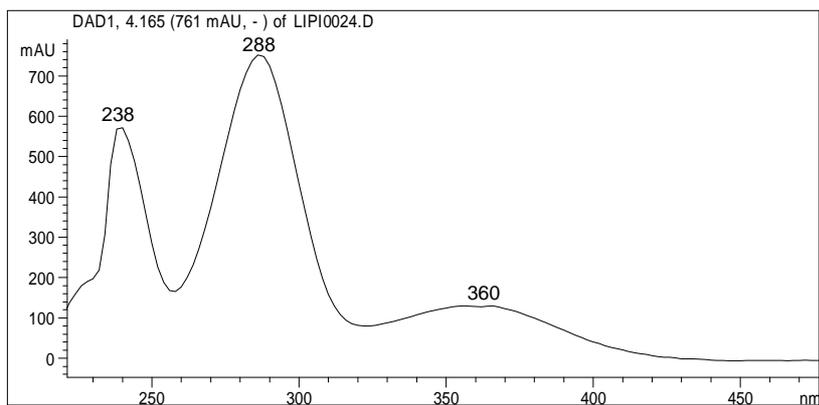
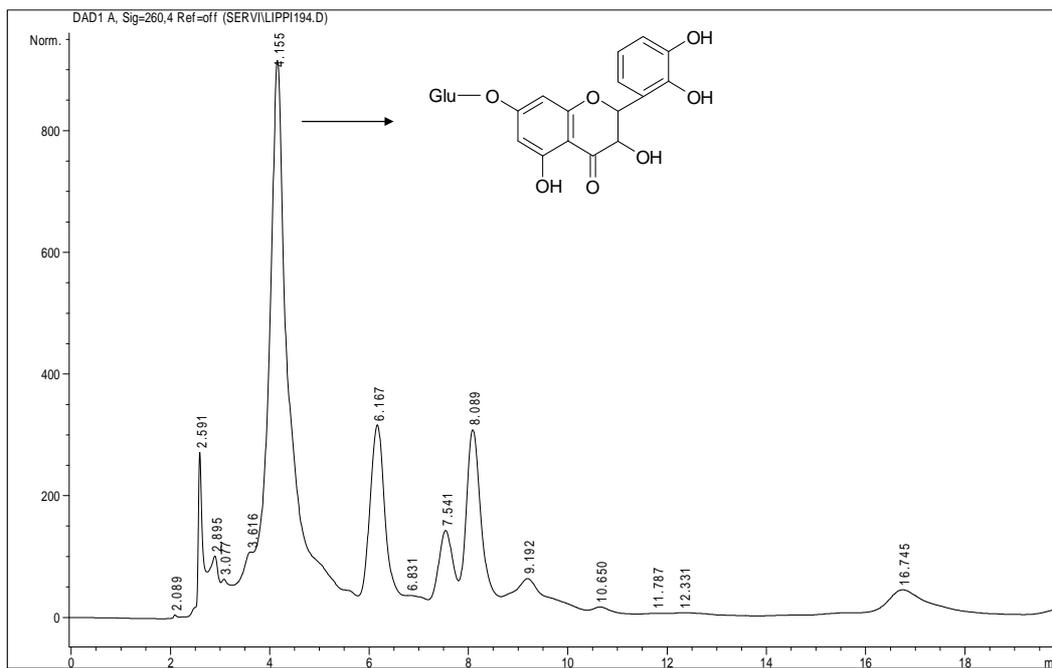


IV. Cromatograma de líquidos y espectro ultravioleta de la naringenina y naringina

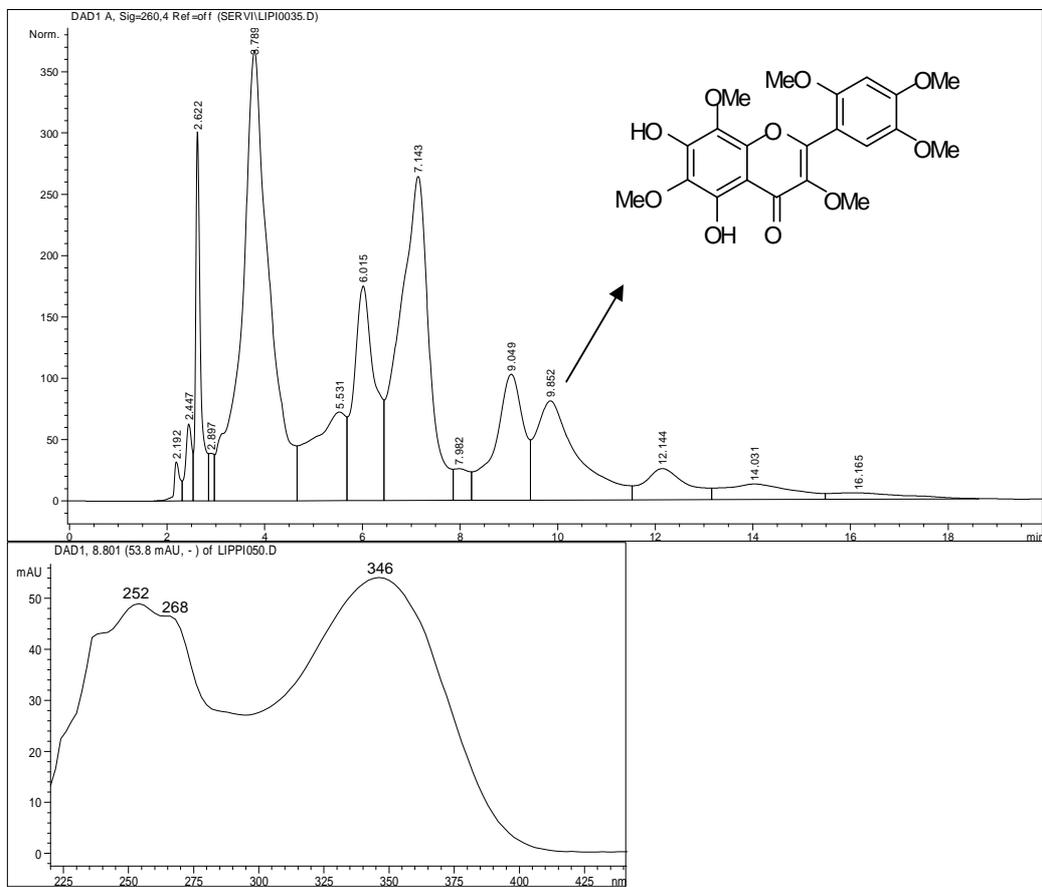




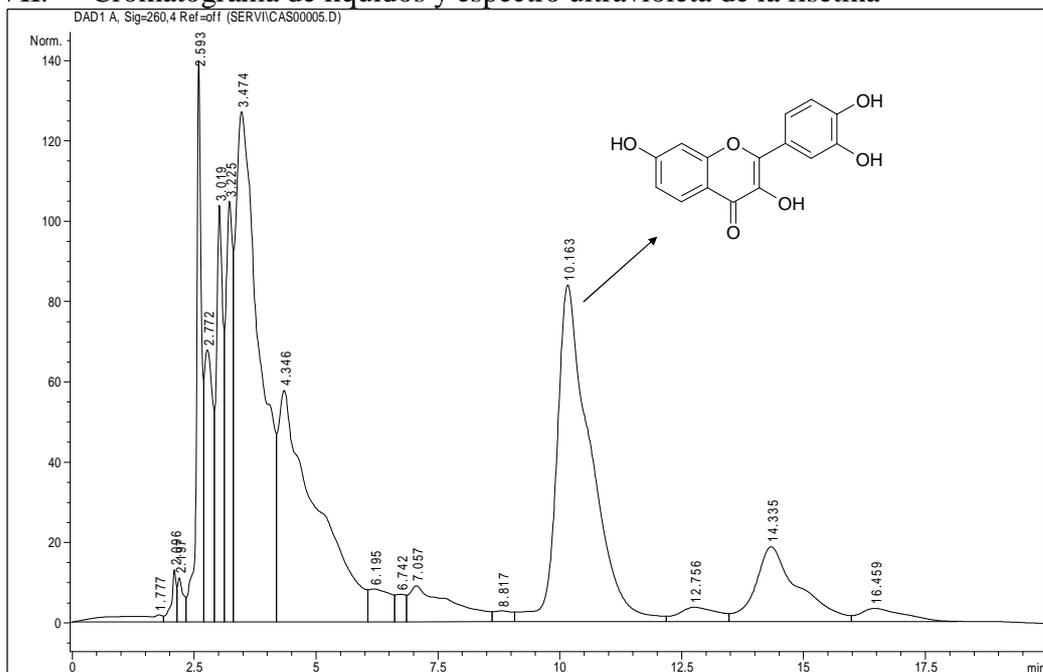
V. Cromatograma de líquidos y espectro ultravioleta de la pentahidroflavanona-glucósido

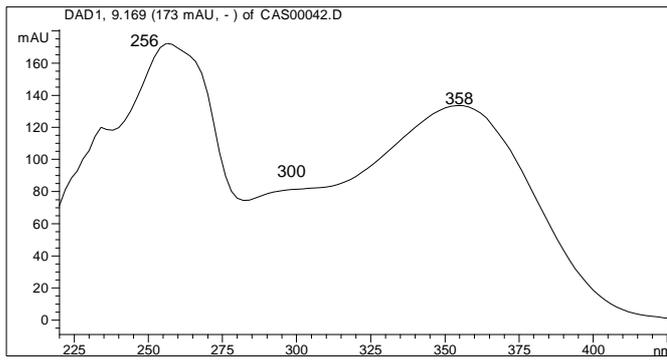


VI. Cromatograma de líquidos y espectro ultravioleta de la 5,7-dihidroxi-3,6,8,2'4'5'-hexametoxiflavona

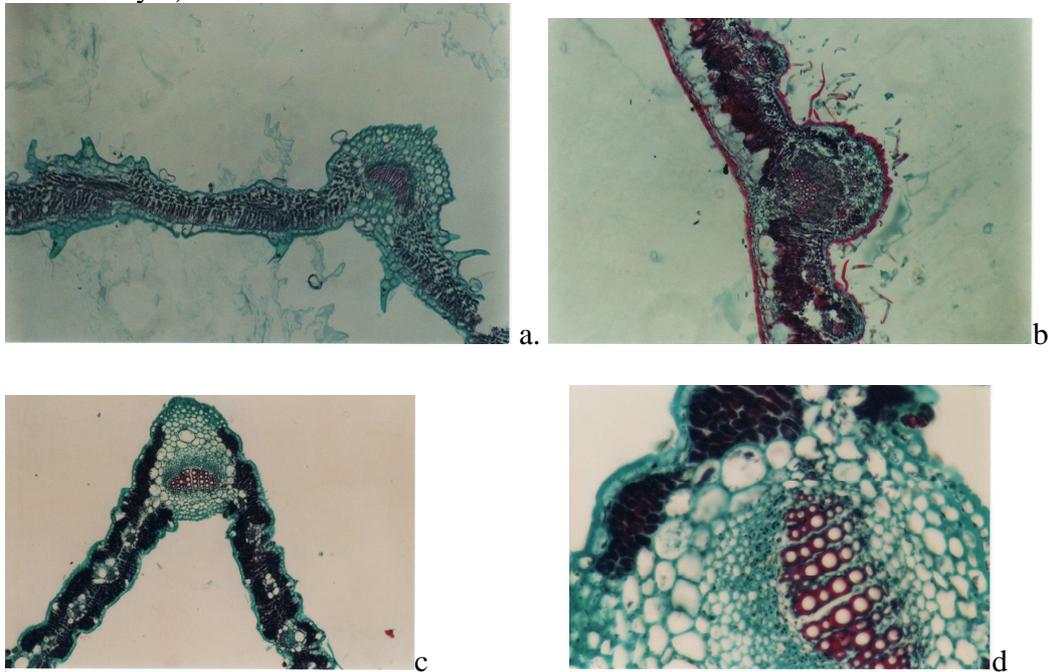


VII. Cromatograma de líquidos y espectro ultravioleta de la fisetina



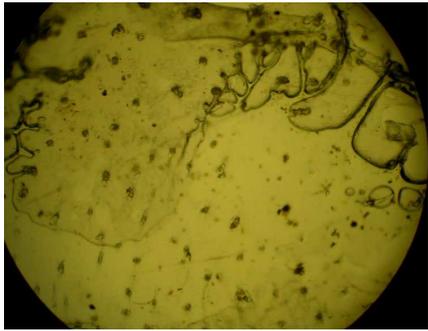


VIII. Fotografías de cortes de las especies *L. graveolens* (a), *C. tortuosa* (b) y *G. glutinosum* (c y d).

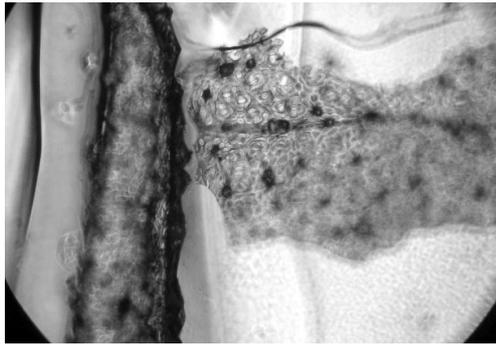


IX. Montaje de las hojas de cada especie bajo cada tratamiento, en lamina portaobjetos con barniz para observar densidad estomática. Observación a 10X en Microscopio Nikon Labophot-2. Se muestra el promedio de estomas observados por campo.

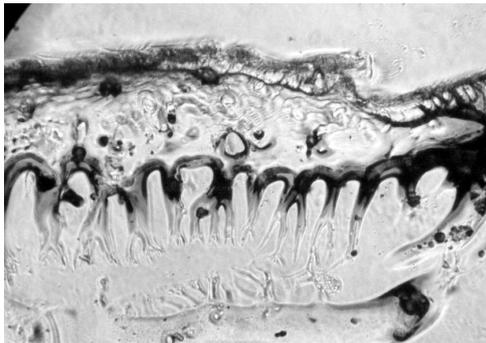
Especie	Cara foliar	SOMBRA		LUZ		ASPERSIÓN
		Riego óptimo	Estrés hídrico	Riego óptimo	Estrés hídrico	
<i>L. graveolens</i>	Envés	5,5	6,12	2,7	2,6	4
	Haz	11,71	16,3	7,18	4,4	7
<i>G. glutinosum</i>	Envés	3	4	6	2	4,8
	Haz	13	6	14,6	3,3	3,6
<i>C. tortuosa</i>	Envés	2,5	3	2	2,5	
	Haz	1	0	3	0	



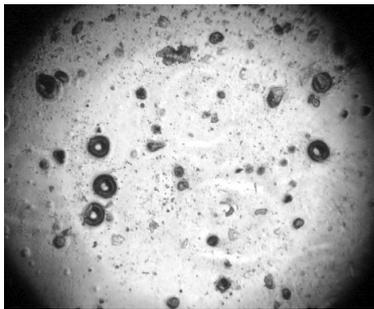
G. glutinosum sombra óptimo (haz)



G. glutinosum luz óptimo (haz)



G. glutinosum de nave de aspersión (envés)



L. graveolens sombra óptimo (envés)

X. Fotografías de *L. graveolens* con evidencia de herbivoría en San Rafael, Coxcatlán, Puebla. Septiembre de 2008.



LITERATURA CITADA

- ABD EL-GHANI, M. M. 1997. Phenology of ten common plant species in western Saudi Arabia. *Journal of Arid Environments* 35: 673–683.
- ABE, N., SATO, H. y SAKAMURA, S. 1987. Antifungal Stress Compounds from Adzuki Bean, *Vigna angularis*, treated with *Cephalosporium gregatum* Type B. *Agricultural and Biological Chemistry* 51: 349-353.
- ADZET, T., PONZ, R., WOLF, E. y SCHULTE, E. 1992. Genetic variability of the essential oil content of *Melissa officinalis*. *Planta Medica* 58: 558-561.
- AGUILAR, A., CAMACHO, J. R., CHINO, S., JACQUEZ, P y LÓPEZ, E. M. 1994. Plantas medicinales del herbario IMSS. México. 199 pp.
- AGUILAR, A. M. 2006. Actividad antimicrobiana de *Ceiba parvifolia* rose de San Rafael, Coxcatlán, Puebla. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Tesis de Licenciatura Biología. México.
- AKAISHI, T., MORIMOTO, T., SHIBAO, M. WATANABE, S., SAKAI-KATO, K., UTSUNOMIYA-TATE, N., UTSUNOMIYA-TATE, N. y ABE, K. 2008. Structural requirements for the flavonoid fisetin in inhibiting fibril formation of amyloid β protein. *Neuroscience Letters* 444: 280–285.
- AKITA, S. y MOSS, D. N. 1972. Differential stomatal responses between C3 and C4 species to atmospheric CO₂ concentration and light. *Crop Sciences* 12: 789-793
- AMARAL, D. F., ARRUNDA, M. S. P., ARRUDA, A. C., MÜLLER, A. H., PANTOJA, L. M. J. y Da S. LIMA, T. M. 2001. Flavones of leaves of *Ficus gomelleira*. *Journal of the Brazilian Journal Society* 12(4): 538-541.
- ANDRADE-RODIRGUEZ, I. A. 2005. Efecto antimicrobiano de la raíz de *Gymnosperma glutinosum* (Spreng) Less (Popote). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 2005.
- ARGUETA, V. A., CANO, A. L., RODSARTE, M. E., 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana III. Instituto Nacional Indigenista. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana.
- ARROYO, R. 1992. Contribución al estudio fitoquímico de *Gymnospera glutinosum*. Tesis Química. FES Cuautitlán. 45 pp.
- BADARY, O., ABDEL-MAKSOU, S., AHMED, W. A. y OWIEDA, G. H. 2005. Naringenin attenuates cisplatin nephrotoxicity in rats. *Life Sciences* 76: 2125–2135.
- BALUCHNEJADMOJARAD, B. y ROGHANI, M. 2006. Effect of Naringenin on Intracerebroventricular Streptozotocin-Induced Cognitive Deficits in Rat: A Behavioral Analysis. *Pharmacology* 78:193–197.

- BASKIN, C. C., BASKIN, J. M. y VAN AUKEN, O. W. 1998. Role of temperature in dormancy break and/or germination of autumn-maturing Achenes of eight perennial Asteraceae from Texas, U.S.A. *Plant Species Biology* 13 (1): 13-20.
- BASKIN, C. C. y BASKIN, J. M. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14: 1–16.
- BASTIDE, P., MALHURET, R., CHALCHAT, J. C., GARRY, R. P. H. y MICHET, A. 1987. Correlation Composition Chimique / Activite antimicrobienne. *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, Tomo V: Contribution a la Comparaison de 2 Methodes de Determination Des Cmi. *Plantes medicinales et phytotherapie* 25: 184-193.
- BETANCOURT, A. S. Y. y GUTIÉRREZ D., M. A. 1999 Proyecto Mercados Verdes Herbolarios. Informe técnico final. Fondo de América del Norte para la Cooperación Ambiental (FANCA), Ecología Y Desarrollo de Tlaxcala y Puebla A.C. México, D.F. 250 pp.
- BHATTACHARYA, N. C., HILEMAN, D. R., GHOSH, P. P., MUSSER, R. L., BHATTACHARYA, S. y BISWAS, P. K. 1990. Interaction of enriched CO₂ and water stress on the physiology of and biomass production in sweet potato grown in open-top chambers. *Plant Cell Environment* 13: 933–940.
- BILGER, W., SCHREIBER, U. y BOCK, M. 1995. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecologia* 102: 425–432.
- BLANCKAERT, I. 2001. An ethnobotanic survey of homegardens in San Rafael Coxcatlán, Valley of Tehuacán-Cuicatlán, México. M.Sc. Thesis, F.L.T.B.W., Katholieke Universiteit Leuven, Belgium.
- BLANCKAERT, I., SWENNEN, R. L., PAREDES FLORES, M., ROSAS LOPEZ, R. y LIRA SAADE, R. 2004. Floristic composition, plant uses and management practices in homegardens in San Rafael Coxcatlán, valley of Tehuacán-Cuicatlán, México. *Journal of arid environments* 57:39-62.
- BORRADAILE, N. M., CARROLL, K. K. y KUROWSKA, E. M. 1999. Regulation of HepG2 cell apolipoprotein B metabolism by the citrus fruit flavanones hesperetin and naringenin. *Lipids* 34: 591-598.
- BROETTO, F., MONTEIRO DUARTE, H. y LÜTGE, U. 2007. Responses of chlorophyll fluorescence parameters of the facultative halophyte and C₃-CAM intermediate species *Mesembryanthemum crystallinum* to salinity and high irradiance stress. *Journal of plant physiology* 164 (7): 904-912.
- BRUGIDOU, C., JACQUES, M., COSSON, L., JARREAU, F. X. y OGERAU, T. 1988. Growth and digoxin content in *Digitalis lanata* in controlled conditions and natural environment. *Planta medica* 3: 262-265.

- BYE, R. 1998. La intervención del hombre en la diversificación de las plantas en México. En *Diversidad Biológica de México. Orígenes y distribución*. Ramamoorthy, T. P., Bye, R., Lot, A., Fa, J. (compiladores). Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México. 689-713 pp.
- CALDERON, J. S., SEGURA-CORREA, R., CESPEDES, C. L., y TOSCANO, R. A. 2001. Crystal and molecular structure of (-)-17-hidroxy-neo-clerod-3-en-15-oic acid from *Gymnosperma glutinosum*. *Analytical science*. 17: 1467-1468.
- CALDWELL, M. M., BJÖRN, L. O., BORNMAN, J. F., FLINT, S. D., KULANDAIVELU, G., CTERAMURA, A. H. y TEVINI, M. 1998. Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 46: 40-52.
- CALIXTO, J. 2005. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin American, a personal view. *Journal of Ethnopharmacology* 100:131-134.
- CALZADO-FLORES, C. C., VERDE, S. J., MORALES, V. M. y SEGURA, L. J. J. 2000. Possible inhibition of *Entamoeba invadens* encystation by *Castela texana*. *Archives of Medical Research* 31: S196-S197.
- CANALES, M. 2005. Base fitoquímica del uso tradicional de plantas para el tratamiento de enfermedades de posible origen bacteriano en San Rafael, Coxcatlán, Puebla. Tesis para obtener el grado académico de Doctora en ciencias biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México, Fes-Iztacala. México, junio de 2005. 155 pp.
- CANALES, M., HERNÁNDEZ, J., CABALLERO, A., ROMO DE VIVAR, A., AVILA, G., DURAN, A. y LIRA, R. 2005. Informat consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. *Journal of Ethnopharmacology* 97: 429-439.
- CANALES, M., HERNÁNDEZ, J., CABALLERO, A., ROMO DE VIVAR, A., DURAN, A. y LIRA, R. 2006. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales de San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacan- Cuicatlán, Puebla, México. *Acta Botanica* 75: 21-46.
- CANALES, M., HERNÁNDEZ, T., SERRANO, R., HERNÁNDEZ, L. B., DURAN, A., RÍOS, V., SIGRIST, S., HERNÁNDEZ, H. L. H., GARCIA, A. M., ANGELES-LÓPEZ, O., FERNÁNDEZ-ARAIZA, M. A. y AVILA, G. 2007. Antimicrobial and general toxicity activities of *Gymnosperma glutinosum*: A comparative study. *Journal of ethnopharmacology*. 110 (2): 343-347.
- CAÑIZARES, A., SANABRIA, M. H., RODRÍGUEZ, D. A. y PEROZO, Y. 2003. Características de los estomas, índice y densidad estomática en las hojas de lima Tahití (*Citrus latifolia* Tanaka) injertada sobre ocho patrones cítricos. *Revista UDO Agrícola* 3(1): 59-64.
- CASHMORE, A. R. 1997. The cryptochrome family of photoreceptors. *Plant Cell Environment* 20: 764-767.
- CATANIA, C. y AVAGNINA, S. 2007. Los aromas responsables de la tipicidad y de la vinicidad. En: *Curso superior de degustación de vinos*. EEA Mendoza. INTA. Capítulo 13.

CHAPPEL, J. y HALBROCK, 1984. Transcription of plant genes in response to UV light or fungal elicitor. *Nature* 311: 76-78.

CHAUDHURI, S. K. y KUBO, I. 1992. Two quassinoids glicosides from *Castela tortuosa*. *Phytochemistry* 31(11): 3961-3964.

CHAVES, M. M. 1991. Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of experimental botany* 42: 1-16.

CHEN, I. F. y BREEN, K. 2000. On the ability of four flavonoids, baiclein, luteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the fenton reaction of the iron-ATP complex. *BioMetals* 13: 77-83.

CLOSE, D. C. y McARTHUR, C. 2002. Rethinking the role of many plant phenolics – protection from photodamage not herbivores? *Oikos* 99: 166-172.

CORDERO, J. y OLIVEROS, M. 1983. Efecto de varias condiciones de almacenamiento sobre la germinación de semillas de *Andropogon gayanus*. *Agronomía tropical* 33(1-6): 177-189.

CUNNINGHAM, A.B., 1993. African medicinal plants: setting priorities at the interface between conservation and primary healthcare. *People and Plants Working Paper 1*. UNESCO, Paris.

DAMUDE, N. y BENDER, K. C. 1999. *Texas Wildscapes: Gardening for Wildlife*. Austin, Texas: Texas Parks and Wildlife Press. www.wildflower.org/plants/result.php?id_plant=LIGR6

DAVILA, P.J.L., VILLASEÑOR, R., MEDINA, A., RAMÍREZ, A., SALINAS, J., SÁNCHEZ-KEN, Y., TENORIO, P. 1993. Listado Florístico de México. X. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Instituto de Biología, UNAM, México

DÁVILA, P., ARIZMENDI, MA. DEL C., VALIENTE-BANUET, A., VILLASEÑOR, J. L., CASAS, A., LIRA, R. 2002. Biological diversity in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico. *Biodiversity and Conservation* 11: 421-442.

De FREITAS, M. V., NETTO, R. D., Da COSTA, H. J. C., De SOUZA, T. M., COSTA, J. O., FIRMINO, C. B. y PENHA-SILVA, N. 2008. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. *Toxicology in vitro* 22(1): 219-224.

DIAZ DE LEON, C. 2005. Revisión sobre los nortriterpenos aislados de la familia Simaroubaceae, y sobre un arbusto medicinal mexicano “chaparro amargoso” *Castela erecta* Subsp. texana. Tesis para obtener el título de Químico fármaco biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. México. 94 Pp.

DIRECCIÓN GENERAL DE ESTADÍSTICA E INFORMACIÓN AMBIENTAL. 2002. Informe de la situación del Medio Ambiente en México. Compendio de las estadísticas ambientales. Capítulo 6: Biodiversidad. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. http://www.semarnat.gob.mx/estadisticas_2000/informe_2000/img

DIXON, R. A. y PAIVA, N. L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism *Plant cell* 7: 1086-1097.

- DOMINGUEZ, X. y TORRE, A. 1974. Two pentamethoxylated flavonoids from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochemistry* 13: 1624-1625.
- DOU, J., McCHESNEY, J., SINDELAR, R., GOINS, K. y WALKER, L. 1996. A new quassinoid from *Castela texana*. *Journal of Natural Products* 59: 73-76.
- EL-MAHDY, M., ZHU, Q., WANG, Q. E., WANI, G., PATNAIK, S., ZHAO, Q., ARAFA, E. S., BARAKAT, B., MIR, S. N. y WANI, A. A. 2008. Naringenin protects HaCaT human keratinocytes against UVB-induced apoptosis and enhances the removal of cyclobutane pyrimidine dimers from the genome. *Phytochemistry and photobiology* 84: 307-316.
- EKAMBARAN, G., RAJENDRAN, P., MAGESH, V., y SAKTHISEKARAN, D. 2008. Naringenin reduces tumor size and weight lost in N-methyl-N'-nitro-Nnitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in rats. *Nutrition Research* 28: 106-112.
- FENNELL, C., LIGHT, M., SPARG, S., STAFFORD, G., VAN STADEN, J. 2004. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: agricultural and storage practices. *Journal of ethnopharmacology* 95:113-121.
- FERNANDEZ, N. 1999. Análisis de la dinámica de comunidades vegetales con relación a la evolución del paisaje en la zona semiárida de Coxcatlán, Puebla. Tesis Maestría. UNAM. México. 109 pp.
- FINCH- SAVAGE, W. E. y LEUBNER- METZGER, G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New phytologist* 171(3): 501- 523.
- FISCHBACH, R. J., KOSSMANN, B., PANTEN, H., STEINBRECHER, R., HELLER, W., SEIDLITZ, H. K., SANDERMANN, H., HERTKORN, N. y SCHNITZLER J. P. 1999. Seasonal accumulation of ultraviolet-B screening pigments in Needles of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst). *Plant, Cell and Environment* 22:27-37.
- FLESCH, V., JACQUES, M., COSSON, L., TENG, B. P., PETIARD, V. y BALZ, J. P. 1992. Relative importance of growth and light level on terpene content of *Gingo biloba*. *Phytochemistry* 31(6): 1941-1945.
- FLEXAS, J. y MEDRANO, H. 2002. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of botany* 89: 183-189.
- FLEXAS, J., BOTA, J., GALMÉS, J., MEDRANO, H. y RIBAS-CARBÓ, M. 2006. Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiologia Plantarum* 127: 343-352.
- FRIEDEL, M. H., NELSON, D. J., SPARROW, A. D., KINLOCH, J. E. y MACONOCHIE, J. R. 1994. Flowering and fruiting of arid zone species of *Acacia* in central Australia. *Journal of Arid Environments* 27: 221-239.
- GAITAN. I. C. 2007. Actividad de doce plantas nativas guatemaltecas contra *Sporothrix schenckii*. www.usac.edu.gt/investigacion/iiqb/qb6.doc

- GALLUZZO, P., ASCENZI, P., BULZOMI, P. y MARINO, M. 2008. The nutritional flavanone naringenin triggers antiestrogenic effects by regulating estrogen receptor α palmitoylation. *Endocrinology* 149 (5): 2567-2575.
- GAO, K., HENNING, S. M., NIU, Y., YOUSSEFIAN, A. A., SEERAM, N. P., y XU, A. 2006. The citrus flavonoid naringenin stimulates DNA repair in prostate cancer cells. *Journal of Nutritional Biochemistry* 17(2): 89-95.
- GARCIA, E. 1988. Modificaciones al sistema climático de Koppen. Instituto de Geografía. UNAM. 259 pp.
- GARNICA, M., HOUDUSSE, F., YVIN, J. C. y GARCÍA-MINA, J. M. 2009. Nitrate supply induces changes in polyamine content and ethylene production in wheat plants grown with ammonium. *Journal of Plant Physiology* 166 (4):363-374.
- GEISSMAN, T. A. y ELLESTAD, G. A. 1962. The structure of chaparrin and a note on glaucarubol. *Tetrahedron Letters* 3:1083-1088.
- GERMOSEN-ROBINEAU, L. Ed. 2003. Farmacopea vegetal caribeña. 2ª edición. Gramil. <http://www.funredes.org/tramil/>
- GERSHENZON, J. 1994. Metabolic costs of terpenoids accumulation in higher plants. *Journal of chemical ecology* 20(6): 1281-1328.
- GLEISER, R. M. y ZYGADLO, J. A. 2007. Insecticidal properties of essential oils from *Lippia turbinata* and *Lippia polystachya* (Verbenaceae) against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research* 101(5): 1349-1354.
- GONZÁLEZ, M. C., SOTO-HERNÁNDEZ, M., KITE, G. y MARTÍNEZ, M. 2007. Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK var. *berlandieri* Schauer). *Revista de Fitotecnia Mexicana* 30(1): 43-49.
- GRIFFITHS, H. y PARRY, M. A. J. 2002. Plant responses to water stress. *Annals of Botany*. 89, 801- 802.
- HABTEMARIAM, S. 1997. Flavonoids as inhibitors or enhancers of the cytotoxicity of tumor necrosis factor- α in L-929 tumor cells. *Journal of natural products* 60: 775-778.
- HADDAD, A. Q. , VENKATESWARAN, V., VISWANATHAN, L., TEAHAN, S. J., FLESHNER, N. E. y KLOTZ, L. H. 2006. Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines. *Prostate Cancer Prostatic Diseases* 9: 68-76.
- HALE, B. K., HERMS, D. A., HANSEN, R. C., CLAUSEN, T. P., y ARNOLD, D. 2005. Effects of drought stress and nutrient availability on dry matter allocation, phenolic glycosides, and rapid induced resistance of poplar to two lymantriid defoliators. *Journal of Chemicals ecology* 31(11): 2601-2620.
- HAMALAINEN, M., NIEMINEN, R., VUORELA, P., HEINONEN, M. y MOIIANEN, E. 2007. Anti-Inflammatory Effects of Flavonoids: Genistein, Kaempferol, Quercetin, and Daidzein Inhibit

STAT-1 and NF-KB Activations, Whereas Flavone, Isorhamnetin, Naringenin, and Pelargonidin Inhibit only NF-KB Activation along with Their Inhibitory Effect on iNOS Expression and NO Production in Activated Macrophages. *Mediators of inflammation* vol. 2007, Article ID 45673, 10 pages, 2007. doi:10.1155/2007/45673

HARBORNE, J. B. 1980. Plant phenolics. In: BELL, E. A., CHARLWOOD, B. V. (eds) *Encyclopedia of Plant Physiology*. Vol. 8. Secondary Plant Products, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. 329-395 Pp.

HARBORNE, J. y BAXTER, H. Eds. 1983. *Phytochemical Dictionary. A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*. Taylor & Frost, London. 791 pp.

HARBORNE, J. B. 1994. The flavonoids: advances in research since 1986. Capítulo 11: Biosynthesis of flavonoids. Chapman & Hall. Reino Unido. 499-536 Pp.

HARBORNE, J. B. 1998. *Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plant analysis*. 3a edición. Chapman & Hall. London, U. K. 40-106 Pp.

HARTMANN, H. T. 1947. Some effects of temperature and photoperiod on flower formation and runner production in the strawberry. *Journal of plant physiology* 22(4): 407-420.

HEINRICH, M., ROBLES, M., WIST, J. E., ORTIZ DE MONTELLANO, B. R., y RODRIGUEZ, E. 1998. Ethnopharmacology of mexican Asteraceae (Compositae). *Annual review of pharmacology and toxicology*. 38: 539-565.

HEO, H. J., KIM, D. O., SHIN, S. C., KIM, M. J., KIM, B. G., y SHIN, D. H. 2004. Effect of antioxidant flavanone, naringenin, from *Citrus junos* on neuroprotection. *Journal of agricultural and food chemistry* 52: 1520-1525.

HEPLER, K. 2005. Calcium: a central regulator of plant growth and development. *Plant cell* 17: 2142- 2155.

HERMS, D. A. y MATTSON, W. J. 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *The Quarterly Review of Biology* 67: 283-335.

HERNÁNDEZ, I., ALEGRE, L. y MUNNÉ-BOSCH, S. 2004. Drought-induced changes in flavonoids and other low molecular weight antioxidants in *Cistus clusii* grown under Mediterranean field conditions. *Tree Physiology* 24:1303–1311.

HERNANDEZ, T., CANALES, M., AVILA, J. G., DURAN, A., CABALLERO, J., ROMO, V. A., LIRA, R. 2003. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla, México. *Journal of Ethnopharmacology* 88: 181-188.

HERNÁNDEZ, T., CANALES, M., CABALLERO, DURAN, A. y LIRA, R. 2005. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional sobre plantas utilizadas para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales en Zapotitlán de las Salinas, Puebla, México. *Interciencia* 30 (9): 17-27.

- HERNÁNDEZ-XOLOCOTZI, E. 1993. Utilización de los recursos vegetales en México. Logros y perspectivas del conocimiento de los recursos vegetales de México en vísperas del siglo XXI. Memorias de la Jornada conmemorativa del Bicentenario Profesional del Botánico José Mariano Mocino. Instituto de Ecología A. C., Xalapa. 58-62 pp.
- HESS, S., ALVAREZ, J. L., ITURRA, G. y ROMERO, M. 2002. Evidence of UVB differential response in *Sophora microphylla* from shady and sunny places. Boletín de la Sociedad Chilena de Química 47 (4).
- HIRAI, S., KIM, Y. I., GOTO, T., KANG, M. S., YOSHIMURA, M., OBATA, A., Yun, R. y KAWADA, T. 2007. Inhibitory effect of naringenin chalcone on inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. Life Sciences 81: 1272–1279.
- HORIE, T., OHTSURU, Y., SHIBATA, K., YAMASHIATA, K., TSUKAYAMA, M., y KAWAMURA, Y. 1998. C-NMR spectral assignment of the A-ring of polyoxygenated flavones from *Gymnosperma glutinosum*. Phytochemistry 47: 865- 874.
- HUANG, Z., WANG, B., EAVES, D. H., SHIKANY, J. M. y PACE, R. D. 2007. Phenolic compound profile of selected vegetables frequently consumed by african americans in the southeast United States. Food chemistry 103: 1395-1402.
- HUERTA, C. 1997. Orégano mexicano: oro vegetal. Biodiversitas 15: 8-13
- INFORME FINAL UBIPRO. 2006. <http://www.iztacala.unam.mx/dip/pdfs/informe20052006.pdf>
- JANAS, K. M., CVIKROVÁ, M. P., PALAGIEWICZ, A., SZAFRANSKAK, O. y SMYKM, M. 2002. Constitutive elevated accumulation of phenylpropanoids in soy bean roots at low temperature. Plant Science 163:369–373.
- JIMÉNEZ, J., NAVARRO, M. C., MONTILLA, M. P., MARTÍN, A., y MARTÍNEZ, A., 1993. *Thymus zygis* oil: its effects on CC14-induced hepatotoxicity and free. Journal of essential Oil Research. 5: 153-158.
- JEON, S. M., KIM, H. K., DO, G. M., JEON, T. S., BOK PARK, Y. y CHOI, M. S. 2007. Hypocholesterolemic and antioxidative effects of naringenin and its two metabolites in high-cholesterol fed rats. Translational Research 149(1): 15- 21.
- JONES, C. G. y HARTLEY, S. E. 1999. A protein competition model of phenolic allocation. Oikos 86: 27-44.
- JUSTESEN, U., KNUTHSEN, P. y LETH, T. 1998. Quantitative analysis of flavonoids, flavons, and flavanons in fruits, vegetables and beverages by high performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric definition. Journal of chromatography A 799: 101-110.
- KAISER, W. M. 1987. Effect of water deficit on photosynthetic capacity. Physiologia plantarum 71: 142-149.
- KAMPKÖTTER, A., GOMBITANG, C. N., ZURAWSKI, R. F., TIMPEL, C., CHOVOLOU, Y., WÄTJEN, W. y KAHL, R. 2007. Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on

thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans*. Archives of Toxicology 81:849–858.

KANNO, S. I., TOMIZAWA, A., OHTAKE, T., KOIWAI, K., UJIBE, M. e ISHIKAWA, M. 2006. Naringenin-induced apoptosis via activation of NF- κ B and necrosis involving the loss of ATP in human promyeloleukemia HL-60 cells. Toxicology Letters 166: 131–139.

KARLOVA, K. 2006. Accumulation of flavonoid compounds in flowering shoots of *Achillea collina* Becker ex. Rchb. Alba during flower development. Horticultural sciences 33(4): 158-162.

KELES, Y. y ONCEL, I. 2002. Response of antioxidative defence system to temperature and water stress combinations in wheat seedlings. Plant Science 163:783–790.

KEMBRO, J. M., MARÍN, R. H., ZYGADLO, J. A. y GLEISER, R. M. 2009. Effects of the essential oils of *Lippia turbinata* and *Lippia polystachya* (Verbenaceae) on the temporal pattern of locomotion of the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae. Parasitology research. In press.

KHAN, N., AFAG, F., SYED, D. N. y MUKHTAR, H. 2008. Fisetin, a novel dietary flavonoid, causes apoptosis and cell cycle arrest in human prostate cancer LNCaP cells. Carcinogenesis 29(5): 1049-1056

KUBO, I., MURAI, Y. y CHAUDHURI, K. 1992. Structure of chaparramarin, a new quassinoid from *Castela tortuosa*. Phytochemistry 31(9): 3262-3264.

KUBO, I., y CHAUDHURI, S. K. 1993. A quassinoid glucoside from the bark of *Castela tortuosa*. Phytochemistry 32(1): 215-217.

KUBO, I., MURAI, Y. y CHAUDHURI, K. 1993. Castelalin, a quassinoid from *Castela tortuosa*. Phytochemistry 33(2): 461-463.

KUMAR, A., SINGH, D. P. y SINGH, P. 1994. Influence of water stress on photosynthesis, transpiration, water use and efficiency and yield of *Brassica juncea* L. Field Crop Research 37: 95-101.

KUNTZ, S., WENZEL, U. y DANIEL, H. 1999. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. European Journal of Nutrition 38:133–142.

LAMBERS, H., CHAPIN, F. S., PONS, T. L. 1998. Plant physiological ecology. Springer USA: 427 pp.

LANGENHEIM, J. H. 1994. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. Journal of chemical ecology 20(6): 1223-1280.

LAUER M. J. y BOYER J. S. 1992. Internal CO₂ measured directly in leaves. Abscisic acid and low leaf water potential cause opposing effects. Plant Physiology 98 (4): 1214-1219.

Lawrence Review of Natural Products. 1992. Copyright 1994 by Facts and Comparisons (ISSN 0734-4961). 111 West Port Plaza Suite 400, St. Louis, Missouri 63146-3098.

LEE, W. R., SHEN, S. C., LIN, H. Y., HOU, W. C., YANG, L. L. y CHEN, Y. C. 2002. Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase 3 and Ca²⁺-dependent endonuclease. *Biochemical Pharmacology* 63: 225–236.

LEE, E. R., YONG-JIN, K., HYUN-JEONG, K., CHOI, H. Y., KANG, G. H., KIM, J. H., KIM, B. W., JEONG, H. S., PARK, Y. S. y CHO, S. G. 2008. Regulation of apoptosis by modified naringenin derivatives in human colorectal carcinoma RKO Cells. *Journal of cellular biochemistry* 104: 259–273.

LEEGOD, R. 1993. Carbon dioxide concentrating mechanisms. En: LEA, J. P. y LEEGOD, R. C. Eds. *plant Biochemistry and plant biology*. Jhon Wiley and sons. United Kingdom. 42-72 Pp.

LEUNG, A.Y. y FOSTER, S. 1995. *Encyclopedia of Common Natural Ingredients* 2nd Ed. John Wiley & Sons, New York. 649 pp.

LEUNG, A.Y. y FOSTER, S. 1996. Oregano. In: Leung, A.Y., Foster, S. (Eds.). *Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics*, second ed. Wiley, New York, pp. 398–400.

LIN, L. Z., MUKHOPATHYAY, S., ROBBINS, R. J. y HARNLY, J. M. 2007. Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. *Journal of Food Composition and Analysis* 20: 361–369.

LINLEY, P. A., HARKISS, K. J. y MESBOH, M. K. 1985. A radiotracer study of the biotransformation of cardiac glycosides in *Digitalis lanata*. *Fitoterapia* 56(5): 267-274.

MAHER, P., AKAISHI, T. y ABE, K. 2006. Flavonoid fisetin promotes ERK-dependent long-term potentiation and enhances memory. *PNAS* 103 (44): 16568-16573.

MALDONADO, E. SEGURA, S. R. ORTEGA, A., CALDERON J. S. y FRONCZEK, F. R. 1994. Ent-labdane and neo cloredane diterpenes from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochemistry* 35: 721-724.

MARKHAM, K. y RYAN, K. 1996. Sunburnt Plants: What will the ozone hole do to New Zealand's plant life? New Zealand science online. nzsm.spis.co.nz/article96.htm

MARTIN, W. C. y HUTCHINS, C. R. 1980. *A flora of New México*. Volumenes 1 y 2. A. R. Ganter Verlag K. G. Alemania. 1276 Pp.

MARTINEZ, M. 1967. *Las plantas medicinales de México*. Ed. Botas, sexta edición. México. 299-300 pp.

MARTINEZ, M. 1987. *Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas*. Fondo de Cultura Económica, Mexico: 270.

MARTINEZ, R., CALDERON, S. J., TOSCANO, R. A. VALLE, A. L. y MENDOZA, C. H. M. 1994. Ent- Neoclerodane diterpenes from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochemistry* 35: 1505-1507.

MARTINEZ, M. A. y BETANCOURT, Y. 2006. El mercado de plantas medicinales en México: situación actual y perspectivas de desarrollo. Disponible en *Cuadernos de Bioética* [versión digital], sección Plantas medicinales ISSN 0328-8390. <http://www.prodiversitas.bioetica.org/nota65.htm>.

MARTINEZ-ROCHA, A., PUGA, R., HERNANDEZ-SANDOVAL, L., LOARCA-PIÑA, G. y MENDOZA, S. 2008. Antioxidant and Antimutagenic Activities of Mexican Oregano (*Lippia graveolens* Kunth). *Plant Foods for Human Nutrition* 63: 1-5.

Mc VAUGH. R. 1909. Flora Novo-Galiciana, a descriptive account of the vascular plants of Western México. Vol 12. Compositae. Anderson, W. R. Ed. 1984. The University of Michigan Press. USA. 483-485 Pp.

MEDINA L. R. y CHIANG C. F. 2001. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Instituto de Biología, UNAM 32:1-5.

MEDRANO, H. ESCALONA, J. M. BOTA, GULÍAS, J. y FLEXAS, J. 2002. Regulation of photosynthesis of C3 plants in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. *Annals of Botany*. 89, 895-905.

MENDOZA-OROZCO, M. 2006. Características demográficas de *Castela tortuosa* Liebm. en dos terrazas aluviales con distinto grado de deterioro en el Valle de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Tesis profesional, Fes-Iztacala. 51 Pp.

MENDOZA-OROZCO, M. y GODINEZ-ALVAREZ, H. 2007. El chaparro amargoso ¿Atrapado sin salida? *Ciencias* 86: 34-36.

MILLER, V., WINKEL, G., OVE, L. y HOSSAINI, A. 2004. The citrus-derived flavonoid naringenin exerts uterotrophic effects in female mice at human relevant doses. *Basic and clinical pharmacology and toxicology* (94): 30–36.

MIRANDA, F. 1948. Datos sobre la vegetación en la cuenca alta del Papaloapan. *Anales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México*.19: 333-364

MIRANDA, F. y HERNÁNDEZ, E. 1963. Los tipos de vegetación en México y su clasificación. *Boletín de la sociedad botánica de México* 29: 29-179.

MIYAKADO, M., OHNO, N., YOSHIOKA, H., MABRY, T. J., y WHIFFIN, T. 1974. Gymnospermin: A new labran triol from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochemistry* 13: 189- 190.

MUSTILLI, A. C. y BOWLER, C. 1997. Tuning into the signals controlling photoregulated gene expression in plants. *EMBO Journal* 16: 5801–5806.

NAHMIA, Y., GOLDWASSER, J., CASALI, M., VAN POLL, D., WAKITA, T., CHUNG, R. T. y YARMUSH, M. L. 2008. Apolipoprotein B dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology* 47(5):1437-1445.

NASH, D. L. y L. O. WILLIAMS (EDS.). 1976. Flora of Guatemala, Compositae. Part XII. Fieldiana Botany 24: 96-97.

NESTOR, G. 2006. Iluminación del acuario plantado. Sociedad acuariológica del Plata. www.sadelplata.org

NICE, J. 1990. Hierbas medicinales y recetas caseras. Ed. Paidós. México. 239 pp.

NOCTOR, G. VELJOVIC-JOVANOVIC, S. DRISCOLL, S. NOVITSKAYA, L. y FOYER, C. H. 2002. Drought and oxidative load in the leaves of C₃ plants: A predominant role for photorespiration? Annals of Botany. 89: 841-850.

NUÑEZ, M. J. 2004. Metabolitos secundarios bioactivos aislados de *Maytenus chiapensis* y *Crossopetalatum uragoga* (Celastraceae). Tesis doctoral. México. 55pp. dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2216376&orden=101970&info=link

OBLEDO, E. N., JAVIEL-ROBLES E., GARCIA-FAJARDO J. A. y RAMIREZ-CORDOVA J. J. 2002. Antimicrobial activity of the essential oil of Mexican oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.) against pathogens of *Agave tequilana* Weber var. azul. International Journal of Experimental Botany 51: 249-254.

OH, M. M., TRICK, H. N. y RAJASHEKAR, C. B. 2009. Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. Journal of plant physiology 166: 80-91.

OLIVAS-SANCHEZ, M. P. 1999. Plantas medicinales del Estado de Chihuahua. Volumen 1. Centro de estudios biológicos CEB. Universidad Autónoma de Juárez. México.

OLIVEROS, G. O. 2000. Descripción estructural de las comunidades vegetales en las terrazas fluviales del Río el Salado en el Valle de Zapotitlán de las Salinas Puebla. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México, México. Pp. 94.

OLVERA-CARRILLO, Y. 2001. Estudio ecofisiológico de la germinación, sobrevivencia y crecimiento de *Opuntia tomentosa* S. D. en la Reserva del Pedregal de San Angel. Tesis de Licenciatura Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. México.

ORTEGA, M. M., ROBLES, M. R., BORBOA, J. y ESPINOZA, M. 2008. El cultivo de orégano *Lippia palmeri* Watson, en el estado de Sonora. RESPYN Edición Especial No. 1. www.respyn.uanl.mx/especiales/2008/ee-01-2008/documentos/carteles/15_Corella-Bernal.pdf

OSORIO, O., VALIENTE-BANUET, A., DÁVILA, P., y MEDINA, R. 1996. Tipos de vegetación y diversidad β en El Valle de Zapotitlán de las Salinas, Puebla, México. Boletín de La sociedad de botánica de México 59: 35-38.

PAREDES, F. M. 2001. Estudios etnobotánicos en Zapotitlán de las Salinas Puebla. Tesis, Licenciatura. Biología. UNAM. Fes-Iztacala. México.

- PARSONS, L. R. 1978. Water relations, stomatal behavior, and root conductivity of red osier dogwood during acclimation to freezing temperatures. *Plant Physiology* 62: 64-70.
- PARK, J. B. 1999. Flavonoids are potential inhibitors of glucose uptake in U937 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 260: 568–574.
- PARRY, M. A. J. ANDRALOJC, P. J. KHAN, S. LEA, P. J. y KEYS, A. J. 2002. Rubisco activity: Effects of drought stress. *Annals of Botany*. 89: 833-839.
- PASCUAL, M.E., SLOWING, K., CARRETERO, E., SÁNCHEZ MATA, D. y VILLAR, A., 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology, 1 review. *Journal of Ethnopharmacology* 76, 201–214.
- PAVON, N. P. y BRIONES, O. 2001. Phenological patterns of nine perennial plants in an intertropical semi-arid mexican scrub. *Journal of arid environments* 49: 265-277.
- PELT, J. L., DOWNES, W. A., SCHOBORG, R. V. y McINTOSH, C. A. 2003. Flavanone 3-hydroxylase expression in *Citrus paradise* and *Petunia hybrida* seedlings. *Pytochemistry* 64: 435-444.
- PETERS, N. K. y LONG, S. R. 1988. Alfalfa Root Exudates and Compounds which Promote or Inhibit Induction of *Rhizobium meliloti* Nodulation Genes. *Plant Physiology* 88: 396-400.
- PIETTA, P. G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products* 63:1035-1042.
- PLOCHMANN, K., KORTE, G., KOUTSILIERI, E., RICHLING, E., RIEDERER, P., RETHWILM, A., SHREIER, P. y SCHELLER, C. 2007. Structure–activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 460(1): 1–9.
- RAFFO, A., LA MALFA, G., FOGLIANO, V., MAIANI, G. y QUAGLIA, G. 2006. Seasonal variations in antioxidant components of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* cv. Naomi F1). *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 11–19.
- RAGHUWANSHI, A., DUDEJA, S. S. y KHURANA, A. L. 1994. Effect of temperature on flavonoid production in pigeonpea [*Cajanus cajan* (L) Millsp] in relation to nodulation. *Biology and fertility of soils* 17(4): 314-316.
- RAMACHANDRA-REDDY, A., VISWANATHA CHAITANYA, K. y VANDAN, M. 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*. 161: 1189-1202.
- RAMIREZ, R. G., GONZALEZ-RODRIGUEZ, H., RAMIREZ-ORDUÑA, R., CERRILLO-SOTO, M. A., y JUAREZ-REYES, A. S. 2006. Seasonal trends of macro and micro minerals in 10 browse species that grown in northeastern Mexico. *Animal feed science and technology* 128: 155-164.
- RASTRELLI, L., CACERES, A., MORALES, C., De SIMONE, F. y AQUINO, R. 1998. Iridoids from *Lippia graveolens*. *Phytochemistry* 49 (6):1829-1832.

- ROSAS, L. R. 2003. Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán. Tesis Profesional Facultad de Estudios Superior Autónoma de México, México.
- RUDI KOVSKAYA, E. G., FEDOROVA, G. A., DUDAREVA, L. V., MAKAROVA, L. E. y RUDI KOVSKII, A. V. 2008. Effect of growth temperature on the composition of phenols in pea roots. *Russian Journal of plant physiology* 55(5): 712-715.
- RUELA DE SOUSA, R., SOUZA-QUEIROZ, C. K., SANTOS-SOUZA, A. C., GURGUEIRA, S. A., CAVALLARI, A., MIRANDA, M. A. PEPPELENBOSCH, M. P., VERÍSSIMA-FERREIRA, C. y AOYAMA, H. 2007. Phosphoprotein levels, MAPK activities and NFkB expression are affected by fisetin. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 22(4): 439-444.
- RUH, M. F., ZACHAREWSKY, T., CONNOR, K., HOWELL, J., CHEN, I. y SAFE, S. 1995. Naringenin: a weakly estrogenic bioflavonoid that exhibits antiestrogenic activity. *Biochemical Pharmacology* 50:1485-1493
- RUSSELL, G. B. 1986. Phytochemical resources for crop protection, *N. Z. J. Technology* 2: 127-134.
- RZENDOWSKI, J. 1986. *Vegetación de México*. Limusa. México. 432 pp.
- RZEDOWSKI, G. C. DE, J. RZEDOWSKI. 2001. *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán, México. 1406 pp.
- SALGUEIRO, L. R., CAVALEIRO, C., GONÇALVES, M. J. y PROENÇA Da CUNHA, A. 2003. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. *Planta Medica* 69 (1): 80-83.
- SAMANO, T. L. 1995. *Antigüo herbario medicinal Azteca*. Gómez- Gómez editores. México, D. F. México. Pp: 9, 46.
- SÁNCHEZ-BLANCO M. J., ALVAREZ, S., NAVARRO, A. y BAÑÓN, S. 2008. Changes in leaf water relations, gas exchange, growth and flowering quality in potted geranium plants irrigated with different water regimes. *Journal of Plant Physiology* 166(5): 467-476.
- SÁNCHEZ- DÍAZ, M. y AGUIRREOLA, J. 2000. Transporte de agua y balance hídrico en la planta. En: AZCÓN-BIETO, J. y TALÓN, M. *Fundamentos de fisiología vegetal*. Capítulo 4. Mc Graw-Hill Interamericana. Barcelona, España. 45-64 Pp.
- SÁNCHEZ- DÍAZ, M. y AGUIRREOLA, J. 2000a. Movimientos estomáticos y transpiración. En: AZCÓN-BIETO, J. y TALÓN, M. *Fundamentos de fisiología vegetal*. Capítulo 3. Mc Graw-Hill Interamericana. Barcelona, España. 31-44 Pp.
- SANDERS, C. A. 1998. Crucifixion thorn *Castela emory* (Gray). Herbarium, Department of Botany and Plant Sciences, University of California. http://www.blm.gov/ca/pdfs/cdd_pdfs/crucif1.PDF

- SEERAM, N. P., LEE, R., SCHEULLER, H. S., y HEBER, D. 2005. Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. *Food Chemistry* 97: 1–11.
- SEMARNAT. 2001. *Gymnosperma glutinosum*. Especies con usos no maderables en bosques de encino, pino y pino-encino en los Estados de Chihuahua, Durango, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca.
- SENGUPTA, B., BANERJEE, A. y SENGUPTA, P. K. 2004. Investigations on the binding and antioxidant properties of the plant flavonoid fisetin in model biomembranes. *FEBS Letters* 50: 77-81
- SERRANO, R. 2004. Estudio comparativo de la actividad antibacteriana de *Gymnosperma glutinosum* (Spreng) Less. de dos localidades: San Rafael Coxcatlán, Puebla y Tepeji del Rio, Hidalgo. Universidad Nacional Autónoma de México. Fes-Iztacala. Licenciatura Biología. México.
- SILVA, R. y DUNFORD, N. 2005. Bioactive Components of Mexican Oregano Oil as Affected by Moisture and Plant Maturity. *Journal of essential Oil Research* 17: 668-671.
- SILVERTOWN, J. W. 1984. Phenotypic variety in seed germination behavior: the ontogeny and evolution of somatic polymorphism in seeds. *The american naturalist* 124: 1-16.
- SOFO, A., TUZIO, A. C., DICHIO, B. y XILOYANNIS, C. 2005. Influence of water deficit and rewatering on the components of the ascorbate–glutathione cycle in four interspecific *Prunus* hybrids. *Plant Science* 169:403–412.
- SOTO, M. E., GÓMEZ-POMPA, A. y GIDDINS, L. Ed. 1999. Bioclimatología de flora de Veracruz. Instituto de Ecología, A. C. Xalapa, Veracruz. México.
http://www.ecologia.edu.mx/diagnostico/bioclimas/comunes/textocomun/cons_edit.html
- SOTO, M. H. 2007. Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK var. *berlandieri schauer*). *Revista Fitotecnia Mexicana*. Año/vol. 30, número 001. Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. Chapingo, México. pp. 43-49
- STRITTMATTER, C.D., RIVERO, M., WAGNER, M., KADE, M., RICCO, R. A. y GURNI, A.A. 1991. *In vivo* and *in vitro* flavonoid production in *Lotus tenuis*. *Lotus newsletter* 22: 14-17.
- SZMIDT-JAWORSKA, A., JAWORSKI, K., TRETYN, A. y KOPCEWICZ, J. 2004. The involvement of cyclic GMP in the photoperiodic flower induction of *Pharbitis nil*. *Journal of plant physiology* 161: 277-284.
- TARTACHNYK, I. I. y BLANKE, M. M. 2008. Temperature, evapotranspiration, and primary photochemical responses of apple leaves to hail. *Journal of plant physiology* 164: 1847-1852.
- TAYLOR, J. L. S. y VAN STADEN, L. 2001. The effect of age, season and growth conditions on anti-inflammatory activity in *Eucomia autumnalis* plant extracts. *Plant growth regulation* 34: 39-47.
- TAYLOR, J. L. S. y VAN STADEN, L. 2002. The effect of cold storage during winter on the levels of COX-1 inhibitory activity of *Eucomia autumnalis* extracts. *South African journal of botany* 68:157-162.

- TOMAS-BARBERÁN, F. y ROBINS, R. J. 1997. Introduction: Phytochemistry of fruit and vegetables. Oxford University Press. New York, USA. 1-9 pp.
- TUMANOVA, E., PATOV, S., VASILY PUNEGOV, V., KUTCHIN, A. V., FROLOVA, L. L. y KODESS, M. I. 2002. Kennigs-knorr's glycosylation of monoterpenoids from vegetative essential oils. Chemistry and computational simulation. *Butlerov communications* 2(7): 89-90.
- TURGUT-DUNFORD, N. y VÁZQUEZ, S. 2005. Effect of water stress on plant growth and thymol and carvacrol concentrations in mexican oregano grown under controlled conditions. *Journal of applied horticulture* 7(1): 20-22.
- TURNER, F. B. y RANDALL, D. C. 1987. The phenology of desert shrubs in southern Nevada. *Journal of Arid Environments* 13: 119–128.
- TURTOLA, S. 2005. The effects of drought stress and enhanced UV-B radiation on the growth and secondary metabolism of boreal conifer and willow seedlings. University of Joensuu. PhD dissertations in biology 39: 82 Pp.
- TURUNEN, M., HELLER, W., STICH, S., SANDERMANN, H., SUTINEN, M. L. y NOROKORPI, Y. 1999. The effects of UV exclusion on the soluble phenolics of young Scots pine seedlings in the subarctic. *Environmental Pollution* 106:219-228.
- UENG, Y. F., CHANG, Y. L., ODA, Y., PARK, S. S., LIAO, J. F., LIN, M. F. y CHEN, C. F. 1999. *In vitro* and *in vivo* effects of naringin on cytochrome P450-dependent monooxygenase in mouse liver. *Life Sciences* 65: 2591–2602.
- VALENCIA-DIAZ, S. y MONTAÑA, C. 2005. Temporal variability in the maternal environment and its effect on seed size and seed quality in *Flourensia cernua* DC. (Asteraceae). *Journal of arid environments* 63(4): 686-695.
- VAN GENUCHTEN, M. 1980. A closed form equation for predicting the hydraulic conductivity of unsaturated soils. *Soil Science Society of America Journal*. 44: 892-898.
- VAN STADEN, J., 1999. Medicinal plants in southern Africa: utilization, sustainability, conservation —can we change the mindsets? *Outlook on Agriculture* 28: 75–76.
- VAN SLAGEREN, M. W. 2003. The Millennium Seed Bank: building partnerships in arid regions for the conservation of wild species. *Journal of Arid Environments* 54: 195-201.
- VERNIN, G., LAGEOT, C. y GAYDOU, E. M. 2001. Analysis of the essential oil of *Lippia graveolens* HBK from El Salvador. *Flavour and Fragrance Journal*. Volume 16 (3): 219-226.
- VILLARROEL, D. A., OLIVEROS, M. A. y MILLÁN, A. J. 1996. Una alternativa a la floración prematura de la soya en el trópico. *Fonaiap Divulga* 54.
- VILLASEÑOR, J. L. y F. J. ESPINOSA GARCÍA, 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica, México, D. F.

VILLASEÑOR, J. L. 2003. Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México. *Interciencia* 28(3):160-166.

VINCENT, D., LAPIERRE, C., POLLET, B., CORNIC, G., NEGRONIC, L. y ZYVI, M. 2005. Water deficits affect caffeate *O*-methyltransferase, lignification and related enzymes in maize leaves. A proteomic investigation. *Plant Physiology* 137: 949-960.

WANG, L. H. y LI, W. H. 2007. General method for determining flavonoids in medicinal plants and raw cosmetics using HPLC with a photodiode array detector. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 41(4): 225-231

WARREN, J. M., BASSMAN, J. H., FELLMAN, J. K., MATTINSON, D. S. y EIGENBRODE, S. 2003. Ultraviolet-B radiation alters phenolic salicylate and flavonoid composition of *Populus trichocarpa* leaves. *Tree Physiology* 23: 527-535.

WULFF, R. D. 1995. Environmental maternal effects on seed quality and germination. En: KIEGEL, J. y GALILI, G. Eds. *Seed development and germination*. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. 491-505 Pp.

YAGINUMA, S., SHIRAIISHI, T., OHYA, H. E IGARASHI, K. 2002. Polyphenol increases in safflower and cucumber seedlings exposed to Sorong visible Light with limited water. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 66: 65-72.

XU, Y. C., LEUNG, S.W.S., YEUNG, D.K.Y., HU, L.H., CHEN, G. H., CHE, C. M. y MAN, R. Y. K. 2007. Structure-activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery. *Phytochemistry* 68 (8): 1179-1188.

YEN-CHOU, C., SHING-CHUAN, S., WOAN-ROUH, L., HUI-YI, L., CHING-HUAI, K., CHUN-MING, S. y LING-LING, Y. 2002. Wogonin and fisetin induction of apoptosis through activation of caspase 3 cascade and alternative expression of p21 protein in hepatocellular carcinoma cells SK-HEP-1. *Archives of toxicology* 76: 351-356.

YU, S., FANG, N. y MABRY, T. J. 1988. Flavonoids from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochemistry* 27 (1): 171-177.

ZAGOSKINA, N. V., ALYAVINA, A. K., GLADISHKO, T. O., LAPSHIN, P. V., EGOROVA, E. A. y BUKHOV, E. G. 2005. Ultraviolet rays promote development of photosystem II photochemical activity and accumulation of phenolic compounds in tea callus culture (*Camellia sinensis*). *Russian Journal of Plant Physiology* 52(6): 731-739.

ZAVALA-NIGOA J., LOARCA-PIÑA, G. y GARCÍA-GASCA T. 2006. Evaluación del contenido fenólico, capacidad antioxidante y actividad citotóxica sobre células caco-2 del extracto acuoso de orégano (*Lippia graveolens* Kunth). Segundo Congreso Nacional de Química Médica. Querétaro, México. Septiembre.

ZHOU, Y., MING-LAM, H. y ZHANG, J. 2007. Inhibition of photosynthesis and energy dissipation induced by water and high light stresses in rice. *Journal of experimental botany* 58(5): 1207-1217.