



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y MOLECULARES INVOLUCRADAS EN LA ACUMULACIÓN
DE TERPENOS Y FLAVONOIDES EN *Lippia graveolens* Kunth BAJO CONDICIONES DE
ESTRÉS ABIÓTICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

AMANDA MORENO RODRÍGUEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. CESAR MATEO FLORES ORTIZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

COMITÉ TUTOR: Dra. MARÍA MARGARITA CANALES MARTÍNEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
Dr. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 junio de 2014, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **MORENO RODRÍGUEZ AMANDA**, con número de cuenta **508451092**, con la tesis titulada **“REPUESTAS FISIOLÓGICAS Y MOLECULARES INVOLUCRADAS EN LA ACUMULACIÓN DE TERPENOS Y FLAVONOIDES EN *Lippia graveolens* Kunth BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS ABIÓTICO”**, realizada bajo la dirección del **DR. CÉSAR MATEO FLORES ORTÍZ**:

Presidente: DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA
Vocal: DR. VICTOR MONTERO TAVERA
Secretario: DRA. MARÍA MARGARITA CANALES MARTÍNEZ
Suplente: DRA. ALMA DELFINA LUCÍA OROZCO SEGOVIA
Suplente: DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”
Cd. Universitaria, D.F., a 29 de septiembre de 2014.



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



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

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al CONACyT, por la beca otorgada con número de registro 210554.

A la UNAM por el apoyo recibido de PAEP, para llevar a cabo la estancia en el INIFAP de Celaya, Guanajuato; y por el apoyo para la impresión de tesis.

Al comité tutorial integrado por:

Dr. Cesar Mateo Flores Ortiz (Tutor principal)

Dra. Margarita Canales Martínez

Dr. Manuel Jiménez Estrada

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Este trabajo fue financiado por MGU, donante anónima radicada en España, por medio del proyecto MGU- Plantas útiles manejado por el Royal Botanic Gardens, Kew. Mi agradecimiento a esta persona y a todo el equipo de Millennium Seed Bank, Kew y del Banco de semillas en la FES-Iztacala.

A los miembros del comité tutorial: Dr. Cesar Flores, Dra. Margarita Canales y Dr. Manuel Jiménez por el tiempo, los consejos y la disposición para sacar este proyecto adelante.

A la Dra. Louise Colville por su conocimiento, su disponibilidad y paciencia.

A la Dra. Charlotte Seal, Dra. Tiziana Ulian, Dr. Hugh Pritchard, Dr. Wolfgang Stuppy por compartir su tiempo y experiencia en el MSB.

Al Dr. Geoffrey Kite y la Dra. Elaine Porter de Jodrell Laboratory, Kew Gardens por su ayuda, su tiempo y conocimientos en la identificación de flavonoides en LC-MS.

A Héctor Cervantes y Martín López por toda la ayuda en las recolectas y mediciones en campo.

Al Dr. Humberto Delgado y a Ricardo Martínez del INIFAP, Metepec, por sus comentarios al proyecto y por ser un ejemplo de dedicación y rigurosidad.

Al Dr. Víctor Montero Tavera y a todo su equipo del Laboratorio de Marcadores Moleculares del INIFAP, Celaya, especialmente a Paulina Rodríguez y a Eric Ruiz por brindarme su apoyo, tiempo, paciencia y sobretodo su amistad.

A la Dra. Alma Orozco por el apoyo constante y las enseñanzas.

Al Dr. Ignacio Peñalosa por ser un ejemplo a nivel académico y personal.

Al Dr. Hugo Perales por siempre tener la mejor disposición y por el préstamo de la fuente lumínica.

A Itzel Moctezuma quien me apoyó incondicionalmente en las primeras etapas del desarrollo de la tesis.

A la Dra. Martha Martínez y a la Dra. Gloria Garduño por su apoyo constante y la compañía en Campeche.

Al Dr. Jorge Campos por sus acertados comentarios y observaciones en el proceso de la candidatura.

Al Maestro Alejandro Cruz Monsalvo quien me guió en la parte molecular y en la secuenciación.

A la Dra. Rocío Cruz por su apoyo invaluable y su conocimiento.

A los miembros del Laboratorio de Fisiología Vegetal: Maestra Josefina Vázquez, Maestro Rafael Quintanar, Biol. Luis Barbo Hernández, Dr. Elías Piedra, Maestra Margarita Moreno y Maestra Marta Urzúa. Esta tesis no hubiera podido ser sin ustedes, como tampoco mi vida aquí. Gracias por la amistad y el cariño que me brindaron todos los días.

A mis compañeros en el Laboratorio: Nalleli, Martica, Anabel, Daniel, Paty y Cesar Alejandro por ayudarme siempre en lo que necesité y en especial, por alegrar los días de trabajo.

A Gera por el apoyo y la paciencia.

A Bibiana, Juan Felipe, Claudia, Alexandra, Ale, Laura, Carito, Jairo y Silke por ser mi parte de Colombia en México.

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

DEDICATORIA

A mis papás, Carlos Moreno B. y Elsa A. Rodríguez de Moreno, una diminuta muestra de mi cariño que ha sido por y para ustedes, y que no se compara con el amor infinito que me han dado.
Y a mis hermanos David y Carlitos, cuya presencia ha sido alegría y apoyo en mi vida.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 <i>Lippia graveolens</i> Kunth	11
1.2 ZONA DE ESTUDIO	12
1.3 METABOLITOS SECUNDARIOS	13
Relevancia	13
Biosíntesis de flavonoides y terpenos	14
Tricomas glandulares	15
Regulación molecular de <i>chs</i> y <i>tps</i>	16
Efecto de condiciones abióticas en su acumulación	18
2. HIPÓTESIS	19
3. OBJETIVOS	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS	21
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
5.1 Germinación y propagación	29
5.2 Identificación de flavonoides y terpenos en muestras foliares	30
5.3 Identificación de tricomas glandulares	33
5.4 Respuestas fisiológicas, fitoquímicas y moleculares en condiciones de estrés abiótico	
5.4.1 Tratamientos lumínicos	34
5.4.2 Tratamiento hídrico	38
5.4.3 Daño foliar mecánico	40
5.4.4 Respuestas en plantas silvestres	42
5.4.5 Análisis de componentes principales de todas las variables	46
6. DISCUSIÓN GENERAL	47
7. CONCLUSIONES	54
8. PERSPECTIVAS	55
9. REFERENCIAS	56
10. APÉNDICES	68
Artículo publicado “The effect of light and soil moisture on the accumulation of three flavonoids in the leaves of Mexican oregano (<i>Lippia graveolens</i> Kunth)”	69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Localización de los poblados de San Rafael y Zapotitlán Salinas dentro de la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán.
- Figura 2. Esquema de la ruta biosintética de los flavonoides.
- Figura 3. Esquema de la ruta biosintética de los terpenos.
- Figura 4. Morfología de tricomas glandulares en *Plectranthus madagascariensis*.
- Figura 5. Diseño experimental para evaluar el efecto de la luz azul y el flujo fotónico alto en plantas de *L. graveolens*.
- Figura 6. Diseño experimental para evaluar el efecto del daño mecánico en plantas de *L. graveolens*.
- Figura 7. Diseño experimental para evaluar el efecto del estrés hídrico en plantas de *L. graveolens*.
- Figura 8. Correlación entre las concentraciones del estándar interno, 4-isopropilfenol, y la altura obtenida en los cromatogramas.
- Figura 9. Porcentajes de germinación final en semillas de *L. graveolens* silvestres y provenientes de plantas de invernadero.
- Figura 10. Fotografía de rayos X de semillas de *L. graveolens* provenientes de individuos silvestres recolectadas en septiembre de 2011
- Figura 11. Cromatograma obtenido en LC-MS de extracto hexánico de muestra foliar de *L. graveolens* silvestre recolectada en San Rafael, Puebla.
- Figura 12. Distribución de tricomas glandulares y no glandulares con su base multicelular en hojas de un individuo del grupo control.
- Figura 13. Fotografía de un tricoma glandular tipo D en *L. graveolens*.
- Figura 14. Densidad de tricomas glandulares en haz y en envés de hojas de *L. graveolens* sometidas a luz azul por 8 horas y a flujo fotónico alto por 1 hora.
- Figura 15. Cuantificación de transcritos *chs* y *tps* en plantas de *L. graveolens* sometidas a luz azul y flujo fotónico alto.
- Figura 16. Asimilación de CO₂ y transpiración en plantas de *L. graveolens* con riego suspendido por una semana y en plantas control con riego al 80% de capacidad de campo.
- Figura 17. Concentración de terpenos y flavonoides obtenida en plantas de *L. graveolens* sometidas a estrés hídrico.
- Figura 18. Densidad de tricomas glandulares en haz y en envés de hojas de *L. graveolens* sometidas a estrés hídrico debido a una semana sin riego.
- Figura 19. Cuantificación de transcritos *chs* y *tps* en plantas de *L. graveolens* sometidas a estrés hídrico debido a una semana sin riego.
- Figura 20. Concentración de flavonoides en plantas de *L. graveolens* sometidas a daño mecánico foliar mecánico.
- Figura 21. Densidad de tricomas glandulares en haz y en envés de hojas de *L. graveolens* con daño foliar mecánico.
- Figura 22. Cuantificación de transcritos *chs* y *tps* en plantas de *L. graveolens* sometidas a daño foliar mecánico.
- Figura 23. Concentración de monoterpenos mayoritarios en muestras silvestres de *L. graveolens*, provenientes de San Rafael y de Zapotitlán Salinas, Puebla en dos épocas contrastantes del año.
- Figura 24. Concentración de flavonoides en plantas silvestres de *L. graveolens* de dos localidades en dos épocas contrastantes del año.
- Figura 25. Densidad de tricomas glandulares en haz y en envés de hojas de plantas silvestres de *L. graveolens* provenientes de dos localidades de Puebla, recolectadas en dos épocas del año.

Figura 26. Concentración de los transcritos *chs* y *tps* en muestras silvestres de *L. graveolens* de dos localidades en dos épocas contrastantes del año.

Figura 27. Análisis de componentes principales (PCA) de las muestras de todos los experimentos.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de los oligonucleótidos diseñados.

Tabla 2. Índices de germinación de semillas de *L. graveolens* provenientes de individuos silvestres y de individuos propagados en invernadero.

Tabla 3. Flavonoides identificados en hojas de *L. graveolens* y cromatograma obtenido en HPLC con la asignación de picos.

Tabla 4. Terpenos identificados en hojas de *L. graveolens*.

Tabla 5. Respuestas fisiológicas en plantas de *L. graveolens* control y bajo tratamiento lumínico.

Tabla 6. Concentración de flavonoides en hojas de *L. graveolens* tratadas con luz azul por 8 horas.

Tabla 7. Concentración de terpenos en hojas de *L. graveolens* tratadas con luz azul por 8 horas.

Tabla 8. Concentración de flavonoides en hojas de *L. graveolens* tratadas con flujo fotónico alto por 1 hora.

Tabla 9. Acumulación de terpenos, en mg/g tejido fresco, afectada por el tratamiento de flujo fotónico alto por 1 hora en hojas de *L. graveolens*.

Tabla 10. Parámetros fisiológicos afectados por el daño mecánico foliar en *L. graveolens*.

Tabla 11. Concentración de terpenos afectada por el daño mecánico ejercido en hojas de *L. graveolens*.

Tabla 12. Parámetros fisiológicos en plantas silvestres de *L. graveolens* de dos localidades, en dos épocas contrastantes del año.

Tabla 13. Concentración de terpenos en plantas silvestres de *L. graveolens* de dos localidades en dos épocas contrastantes del año. Los números indican diferencias significativas entre grupos.

Tabla 14. Comparación de la concentración de terpenos y flavonoides en plantas de *L. graveolens* provenientes de poblaciones silvestres y de invernadero.

RESUMEN

El orégano mexicano, *Lippia graveolens*, es una planta importante debido al elevado contenido de aceites esenciales utilizados con fines alimenticios y organolépticos. Aunque es una especie que no está amenazada o en riesgo, sus poblaciones silvestres presentan una alta demanda. El cultivo de *L. graveolens* es una estrategia potencial de conservación *ex situ*, sin embargo, esta práctica podría afectar las propiedades medicinales y aromáticas que caracterizan a esta especie.

En el presente estudio se evaluó el efecto de algunas condiciones abióticas: flujo fotónico alto, luz azul, estrés hídrico y daño mecánico, sobre la acumulación de flavonoides y terpenos y la densidad de tricomas glandulares en el haz y en el envés, y sobre la expresión de los transcritos chalcona sintasa (*chs*) y gama-terpineno sintasa (*tps*), genes que codifican para las enzimas en la ruta biosintética de flavonoides y terpenos, respectivamente. Así mismo, se evaluaron parámetros fisiológicos para detectar cambios estomáticos y de asimilación de CO₂ en cada uno de los tratamientos en invernadero. Las mismas variables se analizaron en individuos silvestres de dos localidades de Puebla, en dos épocas contrastantes del año, lluvias y secas. Los resultados obtenidos permiten establecer una clara asociación entre la acumulación de flavonoides, la densidad de tricomas glandulares y la concentración de transcritos de *chs* en plantas sometidas a tratamientos lumínicos. El tratamiento de flujo fotónico alto generó una respuesta más rápida en dichas variables (1 hora después de aplicado el tratamiento) en comparación con el tratamiento de luz azul, a las 12 horas. Los tratamientos de estrés hídrico y daño foliar mecánico mostraron efectos sobre la acumulación de algunos monoterpenos, como camfeno, α -felandreno, limoneno y alcanfor para el primer caso; y 3-thujeno, α -terpineno y terpinen-4-ol en hojas con daño foliar. Sin embargo, en estos dos tratamientos pocos o ningún flavonoide mostraron cambios significativos con respecto al control. Como se esperaba, debido a los reportes de regulación transcripcional en la biosíntesis de flavonoides, en todos los experimentos se observó una asociación entre la concentración de transcritos de *chs* y la acumulación de flavonoides, excepto en las plantas sometidas a daño mecánico. En este último tratamiento, la concentración de transcritos de *tps* disminuyó significativamente con respecto al control, en un 17%, así como la densidad de tricomas glandulares en el haz y en el envés, de 41 a 24 tricomas por milímetro cuadrado en el caso más contrastante, correspondiente a la cara axial de la hoja, 8 días después de aplicado el tratamiento. Los datos en campo mostraron patrones fitoquímicos variables, aunque con un patrón constante en la acumulación de monoterpenos mayoritarios según la localidad e independientemente de la temporada de recolecta, lo que sugiere la existencia de dos quimiotipos definidos por la presencia de carvacrol en las plantas de Zapotitlán Salinas y de *o*-cimeno y eucaliptol en las plantas de San Rafael. Se discute la acumulación diferencial de los compuestos mayoritarios asociada a su función fisiológica y protectora frente a condiciones adversas, como el flujo fotónico alto y el estrés hídrico, en relación con la actividad antioxidante reportada para estos metabolitos secundarios. La expresión de los dos transcritos analizados, *chs* y *tps*, se asoció positivamente con la acumulación de flavonoides y terpenos, respectivamente, bajo los tratamientos lumínicos y el tratamiento de estrés hídrico. Se concluye que en ambientes controlados, es posible manipular las condiciones ambientales para maximizar la inducción de compuestos medicinales particulares, sin afectar significativamente la asimilación de CO₂ y con un resultado relativamente homogéneo en la concentración de los metabolitos. El cultivo representa una estrategia viable y eficiente no solo con fines farmacológicos y alimenticios, sino también para aminorar el efecto de la recolecta indiscriminada en las poblaciones silvestres. Se resalta la contribución al conocimiento de la acumulación diferencial de metabolitos secundarios y sus transcritos asociados con condiciones controladas de luz y riego, así como un nuevo reporte del flavonoide crisina en esta especie. Palabras clave: *Lippia*, flavonoides, terpenos, tricomas, estrés hídrico, estrés lumínico, daño foliar

ABSTRACT

Lippia graveolens, Mexican oregano, is used as an aromatic spice and also in traditional medicine due to its high oil content. Although it is not an endangered species, high demand has led to exploitation of wild populations. Cultivation of *L. graveolens* would reduce the pressure on wild populations, but the effect of *ex situ* propagation on its medicinal properties requires evaluation. The aim of this study was to evaluate the effect of some abiotic conditions (high light, blue light, water stress and mechanical foliar damage) on flavonoid and terpenoid accumulation, density of glandular trichomes, expression of two transcripts involved in biosynthetic pathway of flavonoids and terpenoids, chalcone synthase (*chs*) and gamma-terpene synthase (*tps*), respectively. We evaluated, as well, physiological parameters in order to detect stomatal conductance variations and CO₂ assimilation rates under the treatments. Same variables were measured in wild plants from two populations in Puebla, in both, wet and dry, seasons of the year. We reported a positive relationship between flavonoids concentration, density of glandular trichomes and expression of *chs* under both light treatments. A faster response was observed under high light (after 1 hour) than blue light (after 12 hours). Water stress and foliar damage had effect on some monoterpenoids: camphene, α -phellandrene, limonene and alcamphor in the former, and 3-thujene, α -terpinen and terpinen-4-ol in the latter treatment. However, few or none flavonoid changed significantly respect to the control. All treatments showed a positive association between the concentration of *chs* and flavonoid accumulation, except in plants with foliar damage, which could suggest a post-transcriptional regulation.

Expression of *tps* decreased 17% in plants with foliar damage, and density of glandular trichomes also decreased in axial and abaxial surface after 4 and 8 days, from 41 to 24 trichomes/mm² on the axial surface of the leave at day 8th after the treatment. Analysis of wild plants showed a high variability in phytochemistry profile, although the same pattern in majoritary compounds from each population was stable in both seasons. This could represent two different chemotypes: carvacrol in plants from Zapotitlán Salinas, and *o*-cymene and eucalyptol in San Rafael's. It is discussed the antioxidative function and chemical structure of flavonoids as protective compounds under stress conditions, especially under light and water stress. We conclude that controlled environments give an effective tool to handle conditions to maximize the accumulation of particular medicinal compounds, without a negative impact on productivity, and in a homogeneous way. Cultivation represents a feasible strategy to improve food and medicinal quality in plants, and to reduce high demand in wild populations. Finally, we point out the contribution to knowledge of the differential accumulation of flavonoid and terpenoids, as well as their transcripts, under light and water conditions, and the new report of chrysin in this species.

Keywords: *Lippia*, flavonoids, terpenoids, trichomes, water stress, light stress, foliar damage

1. INTRODUCCION

Aunque las plantas han sido utilizadas desde tiempos antiguos con numerosos fines, en las últimas tres décadas el uso de productos naturales y, en particular de las plantas aromáticas, como alimento y medicina ha ido en incremento. Según la Organización Mundial de la Salud, cerca del 80% de la población mundial, especialmente en países en vías de desarrollo, recurre a los sistemas de medicina tradicional como principal herramienta para tratar diversas enfermedades (Gurib-Fakim, 2006). En el caso de las especies aromáticas, además de la importancia medicinal, los aceites esenciales son ampliamente utilizados en la industria alimenticia y cosmética (Soysal y Oztekin, 2001) y recientemente, se han aplicado como fuentes de una nueva generación de compuestos para la salud y la dieta humana y de especies de explotación pecuaria (Christaki *et al.*, 2012).

Esta gran demanda sobre las plantas aromáticas ha generado un incremento en la recolecta de las poblaciones silvestres para mantener el abastecimiento del mercado, de manera que ha surgido una imperiosa necesidad de desarrollar estrategias de conservación *ex situ* para plantas medicinales que posibiliten cubrir la alta demanda sin poner en riesgo las poblaciones en su hábitat natural. Dentro de estas prácticas de conservación se incluyen los bancos de germoplasma y el establecimiento de huertos y cultivos. Sin embargo, la acumulación de los compuestos activos puede diferir sustancialmente en las plantas propagadas en condiciones controladas y por lo tanto, modificar su actividad biológica.

La acumulación y biosíntesis de metabolitos secundarios es variable incluso dentro de una misma especie. En estos dos procesos influyen factores como temperatura, luz, disponibilidad de agua, momento y método de recolecta, presencia de patógenos o depredadores, fotoperiodo, edad y órgano o tejidos de las plantas, entre otros (Calixto, 2000). Y aunque un sistema controlado, como un invernadero, parecería una opción ideal para generar individuos con niveles consistentemente altos de un tipo de compuesto deseado (Fonseca *et al.*, 2006), aún no se ha estudiado con detalle la regulación de la biosíntesis de los mismos en condiciones de propagación en plantas aromáticas, con respecto a las poblaciones silvestres.

Por otro lado, se sabe que las plantas producen este tipo de metabolitos secundarios en respuesta a condiciones adversas que afectan su desarrollo y sobrevivencia. Es por esto que los procedimientos agrícolas estandarizados no pueden aplicarse a las especies medicinales, las cuales deben someterse a condiciones desfavorables que probablemente restrinjan su productividad y crecimiento.

Aunque *L. graveolens* no se encuentra catalogada como especie en riesgo o amenazada (NOM-059-SEMARNAT, 2001), el uso intensivo y no moderado la hacen vulnerable a disminuir sustancialmente su densidad poblacional y afectar su utilidad (Osorno-Sánchez *et al.*, 2012). Por este motivo, surge la necesidad de crear programas y estrategias de propagación de plantas silvestres con el fin de proveer cantidades suficientes de material vegetal según la demanda, y evitar con ello el daño y exterminio de especies nativas y silvestres, garantizando así la calidad de los recursos medicinales (Osuna *et al.*, 2005). En este contexto, es de gran importancia el conocimiento generado a partir del estudio sobre la inducción de compuestos con actividad biológica comprobada, la regulación de su biosíntesis en relación con los factores ambientales abióticos y bióticos determinantes en ésta, y los patrones de su acumulación diferencial con el fin de incrementar la eficiencia en el uso del recurso y, a mediano plazo, en la producción de nutraceuticos y productos farmacológicos de origen vegetal. El conocimiento que se obtenga de la fisiología y de los mecanismos moleculares en la acumulación de metabolitos secundarios,

en combinación con las técnicas de ingeniería genética y de conservación *ex situ*, permitirá crear estrategias para obtener plantas vigorosas que suplan necesidades en el manejo de enfermedades y/o que presenten tolerancia a algún tipo de estrés, o bien generar conocimiento aplicable en campo para el cultivo de este tipo de especies sin que se comprometa la síntesis y por lo tanto la acumulación de compuestos con actividad medicinal.

1.1 *Lippia graveolens*

Lippia graveolens Kunth in Humb., Bonpl. & Kunth, Nov. Gen. Sp. 2:266.1818, es una de las especies a las que se les conoce como orégano mexicano. Es un arbusto aromático perteneciente a la familia Verbenaceae, nativo del sur de Estados Unidos, México, Nicaragua y Honduras. En México crece de forma silvestre en regiones áridas y semiáridas de, al menos 24 Estados, en hábitats de suelos pedregosos entre los 400-2000 m de altitud, aunque más abundantemente entre los 1400-1800 m s.n.m. En la zona de estudio, Coxcatlán, Puebla, se ha reportado en huertos y barrancas de selva baja caducifolia y en tetecheras de *Neobuxbamia tetetzo* (Rosas, 2003). La parte aérea de la planta, incluyendo hojas, ramas, flores y frutos, se usa principalmente como alimento aromático en variedad de platillos y preparaciones como bebidas alcohólicas, productos horneados, carnes, condimentos, salsas, productos lácteos, en vegetales procesados y como pasabocas (Leung y Foster, 1996). México es el principal exportador, especialmente hacia los Estados Unidos. La mayor parte de la producción comercial se lleva a cabo en los Estados de Querétaro, San Luis Potosí, Zacatecas, Durango, Guanajuato y Jalisco y se estima que anualmente se recolectan 4000 toneladas de orégano mexicano, aunque bajo este nombre común se manejan cerca de 40 especies diferentes (Huerta, 1997). La recolección no cuenta con ningún manejo que permita la recuperación de las poblaciones ya que la época de corte coincide con la floración lo que limita su reproducción por semilla (Flores, 1991; Mata-González y Meléndez-González, 2005).

Además de ser una especie alimenticia, medicinalmente se usa en el tratamiento contra dolores de estómago y de oído, así como expectorante (Germosen-Robineau, 2003) y abortivo (Hernández *et al.*, 2005). La forma más común de uso es una decocción de hojas y tallos, el consumo en ayunas se asocia con el alivio de la tos, mientras que como abortivo se usa como agua de tiempo. Si se agregan más hojas y un poco de alcohol puede usarse para baños de asiento cuando hay comezón de la vagina. Las hojas soasadas se usan para heridas o granos, y el jugo de las mismas, en gotas o en aceite, para aliviar el dolor de oídos (Hernández *et al.*, 2003).

Como otras especies de la familia Verbenaceae, *L. graveolens* se caracteriza por su alto contenido de aceite esencial rico en los monoterpenos fenólicos timol y carvacrol (Vernin *et al.*, 2001). El primero muestra una actividad primordialmente fungicida y el segundo actividad antimicrobiana (Liolios *et al.*, 2009; García-García *et al.*, 2011; Cueto-Wong *et al.*, 2010). Existe una gran variabilidad fitoquímica reportada para esta especie desde 0.43 al 45.9% de contenido de timol y de 0 a 52.3% en el de carvacrol (Castillo-Herrera *et al.*, 2007). Esto se ha atribuido a variaciones estacionales y geográficas que generan variabilidad intra e interpoblacional en esta especie (Hernández *et al.*, 2009b). La composición y el contenido del aceite han mostrado variaciones según la madurez de la planta (Silva y Dunford, 2005), la calidad de la luz (Bueno-Durán *et al.*, 2013), el estrato (superior o inferior) de la planta (Alaniz-Gutiérrez *et al.*, 2000) y la época y el método de recolecta (Rhyu, 1979) lo cual genera repercusiones en la calidad del aceite esencial y en su bioactividad. Además del aceite esencial, en *L. graveolens* también se han reportado varios flavonoides en la parte aérea de la planta, incluyendo flavonas, flavonoles, flavanonas e hidrochalconas (Lin *et al.*, 2007), cuyo contenido total ha mostrado actividad antioxidante

evaluada por el método de radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo, DPPH (González-Güereca *et al.*, 2007; Martínez-Rocha *et al.*, 2008). Varios flavonoides de esta especie se han evaluado individualmente y han demostrado actividades biológicas importantes. Tal es el caso de la naringenina como antiestrogénico, hipoglicémico, antiinflamatorio e hipocolesterolémico (Jeon *et al.*, 2007; Hirai *et al.*, 2007); la naringina, forma glicosilada de la naringenina, la cual reduce la hiperlipidemia (Lopes *et al.*, 2000); el eriodictiol como antioxidante (Johnson *et al.*, 2009) y la pinocembrina como antifúngico y antibacteriano (Bremner y Meyer, 1998). Lo anterior corrobora de forma científica el conocimiento tradicional sobre el uso de esta especie en el tratamiento de diversas enfermedades, principalmente infecciosas.

1.2 ZONA DE ESTUDIO

San Rafael y Zapotitlán Salinas se encuentran dentro de la reserva de la biosfera de Tehuacán-Cuicatlán (Figura 1), una provincia fitogeográfica que abarca 10 000 km² considerada como un centro de megadiversidad y endemismo a nivel mundial por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), con un endemismo del 30% en plantas vasculares (Dávila, 1993). Su abanico aluvial forma parte de la sierra Mazateca, situada en la porción sureste del valle de Tehuacán: N18°12'-18°14' W97°07'- 97°09'. Este valle, según lo propuesto por Rzedowski (1986), 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. La zona se caracteriza por presentar clima seco, pero está 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 del 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 de altitud. Los géneros botánicos restringidos, es decir que son endémicos de esta región en particular (Méndez-Larios *et al.*, 2004) son *Oaxacania*, *Pringlechloa* y *Soligia*.

San Rafael (N 18°12'21", W 97°07'59" W a 989 m de altitud) presenta un nivel de pluviosidad de 395 mm anuales (Medina, 2000) y una temperatura media anual de 22 °C, que varía entre 25 °C en mayo y abril y 18 °C en enero (Blanckaert *et al.*, 2004); la vegetación predominante es bosque tropical caducifolio donde abundan las especies *Escontria chiotilla* (F.A.C. Weber) Rose y *Pachycereus weberi* (J. Coulter) Backeb (Valiente-Banuet *et al.*, 2000). El suelo de la zona es poco desarrollado que puede ser regosol o xerosol. Zapotitlán Salinas (N 18° 19'73" W 97°27'36.8" a 1 433 m de altitud) tiene un tipo de suelo comúnmente de yeso y caliza, con altos contenidos de sales; su precipitación anual es de 380 mm con lluvias escasas e irregulares y, cuando se presentan son de tipo torrencial. El promedio de temperatura anual es de 21.2 °C (Arias Toledo *et al.*, 2000). La figura 1 muestra la localización de los dos municipios dentro de la reserva de Biosfera Tehuacán-Cuicatlán.

Los habitantes de San Rafael y Zapotitlán Salinas manejan un amplio conocimiento etnobotánico, en el cual el uso medicinal es uno de los principales. En San Rafael, de un total de 374 especies pertenecientes a 249 géneros y 87 familias, cerca de 368 son usadas por habitantes de la comunidad para uno o varios fines (Rosas, 2003), principalmente como ornamentales, alimenticias y medicinales. Cifra similar al dato de 289 plantas útiles de la región reportado por Paredes-Flores (2001). El amplio uso de la flora 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 (Blanckaert *et al.*, 2004).

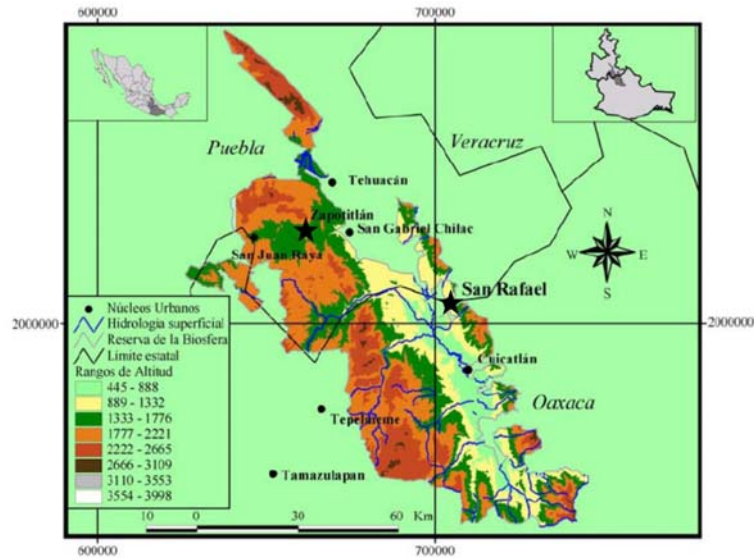


Figura 1. Localización de los poblados de San Rafael y Zapotitlán Salinas dentro de la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán.

El orégano mexicano es utilizado en esta región para tratar enfermedades gastrointestinales y como analgésico mediante infusiones o extractos alcohólicos de la parte aérea (Hernández *et al.*, 2003; Canales *et al.*, 2006; Paredes-Flores *et al.*, 2007).

1.3 METABOLITOS SECUNDARIOS

Relevancia

Desde que Kössel (1891) hizo la distinción entre metabolismo primario y secundario en plantas, el estudio de los compuestos secundarios ha ido en aumento. Actualmente se calcula la existencia de aproximadamente 200 000 metabolitos especializados (Mithofer y Boland, 2012), de los cuales se han aislado y caracterizado alrededor de 30 000, de los cuales cerca de 1 700 corresponden a compuestos volátiles (Dicke y Loreto, 2012). El término “secundario” hacía referencia a que los metabolitos primarios se encuentran presentes en todas las células vivientes capaces de dividirse mientras que los secundarios se encontraban sólo incidentalmente y no eran esenciales para la vida de la planta. Para ese entonces se afirmó que esos compuestos no tenían funciones claras y que eran, en términos generales, residuos del metabolismo primario. El gasto energético que involucra la biosíntesis de estos compuestos es muy alto y reduce sustancialmente la cantidad de carbono fijado por la planta. De modo que el papel de los metabolitos secundarios para la planta no es tan secundario como se creía en un inicio, puesto que son compuestos con importantes funciones ecológicas y protectoras, y además presentan un fenotipo plástico ya que su producción depende de diversos factores bióticos y abióticos.

Dentro de las funciones ecológicas se incluyen las de defensa contra la amplia gama de organismos que afectan negativamente a la planta (parásitos, herbívoros, patógenos, competidores) y la comunicación y asociación con los organismos que ejercen un efecto positivo en ella (polinizadores, dispersores, hongos micorrízicos, rizobios en la nodulación). Las funciones protectoras de los metabolitos secundarios incluyen la disminución, prevención o reparación de los efectos perjudiciales generados por los rayos UV, altas o bajas temperaturas, el estrés hídrico, salino u osmótico, además de la protección al herbivorismo, parasitismo y agentes patógenos (Edreva *et al.*, 2008). Se ha demostrado que una población vegetal con una mezcla relativamente homogénea de metabolitos secundarios es más

susceptible a sufrir ataques por parte de patógenos que una planta o grupo de ellas, cuando tienen una mezcla heterogénea de metabolitos (Castellanos y Espinosa-García, 1997). Por otra parte, los metabolitos secundarios pueden ejercer funciones fisiológicas para la misma planta que los produce, en el caso de algunas hormonas. Hartmann (1996) definió el metabolismo secundario como singular, diverso, adaptativo, prescindible para el crecimiento y desarrollo, pero indispensable para la sobrevivencia. Es una definición funcional, pero actualmente imprecisa, ya que en los últimos años los metabolitos secundarios se han descrito como componentes importantes en los programas moleculares que contribuyen al desarrollo y crecimiento normal de las plantas (Broun, 2005).

Biosíntesis de flavonoides y terpenos

Los flavonoides son sustancias fenólicas que además de incluir los pigmentos de las flores, actúan en las plantas como antioxidantes, antimicrobianos, fotorreceptores, atractivos visuales, repelentes contra herbívoros (Pietta, 2000; Yuting *et al.*, 1990), inhibidores de enzimas y agentes quelantes de metales tóxicos. Además, están asociados a procesos de fotosensibilidad y transferencia de energía, morfogénesis, fotosíntesis y en la regulación de hormonas de crecimiento vegetal (Di Carlo *et al.*, 1999). Su actividad como protectores contra la radiación solar de onda corta (280-320 nm) se ha estudiado ampliamente (Middleton y Teramura, 1993; Reuber *et al.*, 1996; Zhang y Björn, 2009). El esqueleto básico de los flavonoides se origina de la condensación de tres moléculas de malonil CoA con una molécula de 4-cumaroil-CoA, reacción catalizada por la chalcona sintasa (CHS) para formar tetrahidroxichalcona, a partir de la que pueden sintetizarse isoflavonas. El siguiente paso es la conversión de la tetrahidroxichalcona a naringenina por medio de la chalcona isomerasa (CHI), paso considerado como el punto de ramificación en la biosíntesis de todos los flavonoides (Winkel-Shirley, 2001), como se observa en la Figura 2.

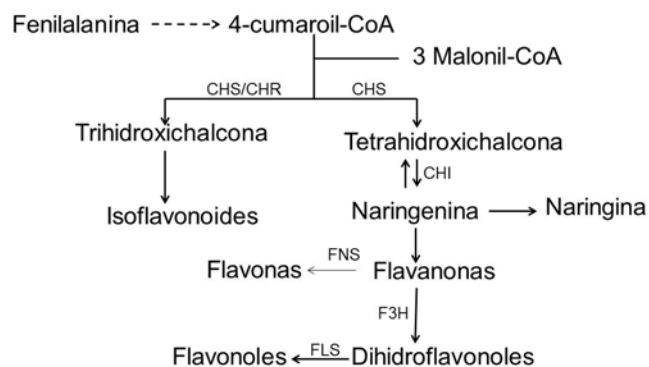


Figura 2. Esquema de la ruta biosintética de los flavonoides. CHS: Chalcona sintasa, CHR: Chalcona reductasa, CHI: Chalcona isomerasa, F3H: Flavanona 3β-hidroxiylasa, FNS: Flavona sintasa, FLS: Flavonol sintasa. Modificado de Winkel-Shirley (2001).

Los terpenos son compuestos con una estructura general de isopreno y sus esqueletos de carbono están contruidos por la unión de dos o más de estas unidades de 5 carbonos. Se clasifican de acuerdo con el número de isoprenos que los conforman y abarcan compuestos volátiles -mono y sesquiterpenos-, diterpenos que son menos volátiles y terpenos no volátiles que incluyen los triterpenos y los esteroides. Biológicamente cumplen diversas funciones, como atracción de polinizadores, defensa contra depredadores o parásitos, mediación de la competencia vegetal por efectos alelopáticos sobre otras plantas y adaptación climática (Kessler y Baldwin, 2001; Pichersky y Gershenzon, 2002). Muchos mono, sesqui y diterpenos son tóxicos a herbívoros y microorganismos y pueden actuar como

compuestos de defensa. También se han encontrado en hojas dañadas por insectos, y se cree que estos terpenos atraen a depredadores y parasitoides de éstos (Tholl, 2004). En el metabolismo primario, los terpenos juegan papeles esenciales en el crecimiento vegetal y desarrollo como hormonas (ej. giberelinas y ácido absísico), pigmentos fotosintéticos (fitol, carotenoides) o componentes de membrana (esteroles).

Los terpenos se forman por medio de dos vías metabólicas independientes: La primera de ellas se conoce como MEP (metileritritolfosfato) o DOX (1-desoxi-D-xilulosa). En esta vía, el isopentenil pirofosfato (IPP) se forma en el cloroplasto y da origen a la mayoría de monoterpénos y diterpenos volátiles. La segunda ruta biosintética es conocida como MVA (ácido mevalónico), que toma lugar en el citosol y retículo endoplásmico y produce los sesquiterpenos (Jansen y De Groot, 2004). Luego, el dimetilalil pirofosfato (DMAPP) se combina secuencialmente con varias unidades de IPP mediante enzimas llamadas preniltransferasas para sintetizar el prenil bifosfato acíclico, el geranil bifosfato (GPP, C10), el farnesil bifosfato (FPP, C15) o geranilgeranil bifosfato (GGPP, C20). Estos intermediarios centrales se transforman en monoterpénos (C10), sesquiterpenos (C15) y diterpenos (C20) mediante la catálisis de un gran grupo de enzimas llamadas terpeno sintasas (Figura 3). Los productos primarios de estas enzimas pueden ser posteriormente modificados por transformaciones enzimáticas secundarias, incluyendo la oxidación, reducción e isomerización, produciendo un gran número de derivados del terpeno (Aubourg *et al.*, 2002). En general, la vía MVA provee precursores para sesquiterpenos y esteroides, mientras que la vía MEP para monoterpénos, diterpenos y carotenoides. La ruta que se activa por herbivoría usualmente es la MVA y los elicitores estimulan la biosíntesis vía MEP (Bartram *et al.*, 2006).

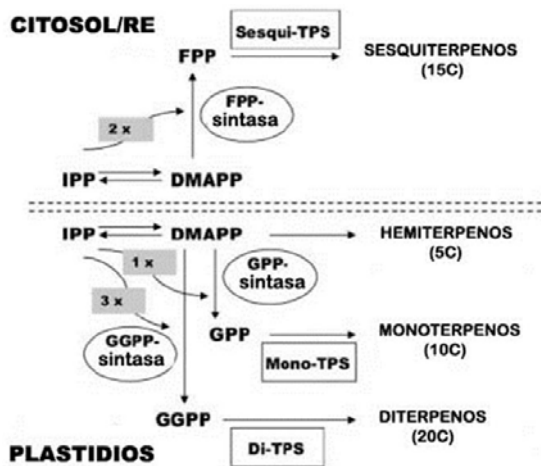


Figura 3. Esquema de la ruta biosintética de los terpenos. RE: retículo endoplasmático, TPS: terpeno sintasa, FPP: farnesil bifosfato, DMAPP: dimetilalil pirofosfato, IPP: isopentenil pirofosfato, GPP:geranil bifosfato, GGPP:geranilgeranil bifosfato. Modificado de Aubourg *et al.*, 2002.

Tricomas glandulares

Los tricomas glandulares se componen de células secretoras subepidérmicas cubiertas por una cavidad subcuticular de almacenamiento y son reconocidos como sitios de biosíntesis, secreción y acumulación de aceite esencial (Gershenzon *et al.*, 1989), aunque pueden acumular otro tipo de metabolitos como flavonoides (Bosabalidis *et al.*, 1998) y polisacáridos (Werker, 1993). Existe evidencia sobre la relación del tamaño, la densidad y el contenido de los tricomas glandulares con algunos factores ambientales como la calidad y cantidad de luz, la duración del fotoperíodo (Snyder y Hyatt, 1984) así como la disponibilidad de nutrientes en el suelo (Briskin *et al.*, 2000). El primer reporte sobre la morfología de tricomas glandulares en el género *Lippia* fue en *L. citriodora* (Casadoro y Rascio, 1982) quienes

describen tres tipos de tricomas, dos de ellos corroborados en trabajos posteriores (Argyropoulou *et al.*, 2010).

La densidad de estos organelos se ha asociado con el balance hídrico de la planta, la protección contra la radiación excesiva y la defensa contra herbívoros (Kennedy, 2003). En estudios recientes y gracias a nuevas metodologías, se han aislado los tricomas glandulares lo que ha permitido el análisis preciso de rutas metabólicas y estudios enzimáticos particulares, además de los análisis diferenciales de transcriptomas que han demostrado la regulación en las rutas biosintéticas de compuestos lipídicos y de metabolitos secundarios, así como de la expresión de genes vinculados a estas mismas rutas (Soetaert *et al.*, 2013) en células basales y apicales dentro del mismo tricoma.

Los tricomas glandulares son diversos en formas, tamaños, anatomía, funciones y patrones de desarrollo, lo cual permite constituirlos como un criterio para la clasificación de las plantas (Bosabalidis, 2002). Morfológicamente, se diferencian dos tipos de tricomas glandulares: peltados y capitados (Maffei y Codignola, 1990). Los primeros tienen una gran célula basal, otra aplanada que conforma el tallo y cabeza multicelular, mientras que los capitados son usualmente más pequeños y numerosos y varían considerablemente en su estructura, según la especie (Figura 4). Se ha reportado variación inter e intraespecífica en la densidad y distribución de los tricomas glandulares, así como en su contenido incluso, entre tricomas aislados de una sola hoja o entre los tricomas del haz y del envés (Dahling *et al.*, 1992; Bosabalidis y Skoula, 1998).

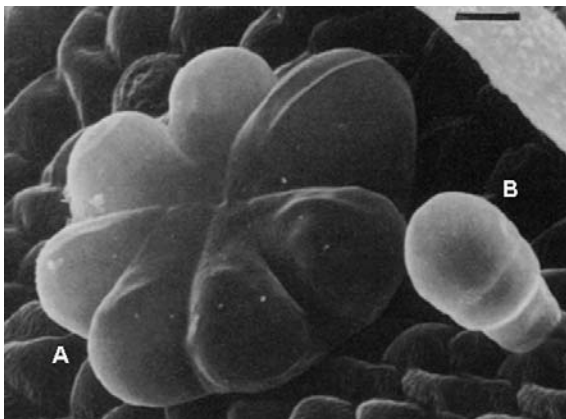


Figura 4. Morfología de tricomas glandulares en *Plectranthus madagascariensis*. Barra de escala = 10 μm A: Tricoma peltado B: Tricoma capitado. Tomado de Ascensao *et al.* (1998).

Regulación molecular de *chs* y *tps*

El perfil de metabolitos secundarios es el resultado de un equilibrio entre síntesis, almacenamiento y degradación de los mismos, modulado por la genética de la especie y los factores abióticos que incluyen el suelo, condiciones ambientales como estrés hídrico, lumínico y salino, y los bióticos como la flora asociada, los polinizadores, herbívoros y depredadores (Tomas-Barberan y Robins, 1997) y los métodos de cultivo (Núñez, 2004). Se ha demostrado que existe una regulación espacial y temporal en genes específicos, la cual responde a estímulos endógenos y ambientales (Tholl, 2006).

La ruta biosintética de los flavonoides en *Arabidopsis* es uno de los modelos disponibles para estudiar la regulación de su expresión genética en plantas. En plántulas de esta especie se distinguen dos tipos de genes co-regulados en su ruta biosintética: los genes biosintéticamente tempranos, EBG, por sus siglas en inglés (*early biosynthetic genes*) que se inducen antes que los genes tardíos, LBG (por *late*

biosynthetic genes) (Pelletier y Shirley, 1996). El factor ambiental asociado a la regulación de los genes involucrados en la biosíntesis de flavonoides es la luz, del tipo UV y azul (Jenkins, 1998). Desde hace cerca de dos décadas, se han descrito dos factores de transcripción importantes en la regulación de la biosíntesis de flavonoides: bHLH (*basic helix loop helix*) –codificado por el gen RED- y MYB (Broun, 2005). Estudios con T-DNA del virus del mosaico de la coliflor indican que estos elementos controlan la activación de genes involucrados en la acumulación de productos naturales específicos durante el desarrollo de la planta (Borevitz *et al.*, 2000). Algunos factores tipo MYB incluyen PAP1 y PAP2 presentes en *Arabidopsis* y en tabaco, los cuales aumentan la expresión de los genes *chs* y *pal* (fenilalanina amonio liasa); TT2 y TT8 (proteína tipo bHLH) controlan la producción de taninos condensados en la testa de las semillas de *Arabidopsis* (Debeaujon *et al.*, 2000). En otros géneros como *Petunia* (Debeaujon *et al.*, 2003) y *Anturrium* (Schwinn *et al.*, 2006) se ha descrito el factor PH4 y en arroz el denominado OsC1-MYB (Ithal y Reddy, 2004). En maíz, el gen P1 codifica para el factor de transcripción R2R3-MYB que regula la acumulación de flavonas (Grotewold *et al.*, 1998). Otra familia reconocida de factores de transcripción asociada con la síntesis de flavonoides es NAC, una de las más abundantes con cerca de 150 miembros en *Arabidopsis* y arroz (Gong *et al.*, 2004; Xiong *et al.*, 2005).

Existe escasa información disponible sobre factores de transcripción en la biosíntesis de isoprenoides, lo que marca una diferencia contundente con los flavonoides. Los estudios se han encaminado hacia la caracterización de los genes involucrados en la biosíntesis de estos compuestos y en evaluar los cambios temporales a nivel enzimático, proteínico, de abundancia de transcritos y productos. Los resultados indican que la mayoría de genes están regulados transcripcionalmente, con una actividad transcripcional inmediata de los genes involucrados en los primeros pasos de la ruta biosintética de mono, sesqui y diterpenos (Steele *et al.*, 1998).

Toda la variedad de estructuras terpénicas son formadas por las enzimas terpeno sintasas (TPS) (Davis y Croteau, 2000) cuyos mecanismos de reacción se han descrito recientemente (Degenhardt *et al.*, 2010). Los genes que codifican para estas enzimas se han clasificado, con base en su arquitectura, en dos grupos: los del grupo I tienen una secuencia inusual que codifica para un motivo de 200 aminoácidos que está ausente en los miembros del otro grupo, denominado grupo III (Trapp y Croteau, 2001). Existen muchos genes *tps*, incluso para una sola especie. Se conoce ampliamente la localización de 40 genes tipo *tps* para *Arabidopsis* (Aubourg *et al.*, 2002) y otros han sido aislados y caracterizados en diferentes especies, incluyendo coníferas (Phillips *et al.*, 2003), maíz (Lin *et al.*, 2008) y algunas especies de la familia Lamiaceae (Kampranis *et al.*, 2007; Crocoll *et al.*, 2010). El conjunto de terpeno sintasas comparte motivos altamente conservados en su secuencia de aminoácidos, como el motivo RR y el motivo DDxxD. El primero de ellos está en el N-terminal y parece ser imprescindible durante la isomerización de geranil pirofosfato a linalil pirofosfato, un mecanismo común en la formación de monoterpenos cíclicos (Williams *et al.*, 1998). La expresión de estos genes es regulada positivamente por daño mecánico (Byun-McKay *et al.*, 2003), ácido jasmónico y ataque de insectos (Miller *et al.*, 2005). La evolución de las terpeno sintasas en familias multigénicas, su habilidad de formar varios productos y la expresión diferencial hace de la síntesis de terpenos un proceso altamente complejo y plástico (Tholl, 2006).

La magnitud de las respuestas moleculares es modificada por factores bióticos y/o abióticos específicos. Los límites entre estos factores son fácilmente distinguibles, pero sus efectos a nivel molecular y celular se muestran cada vez más difusos a medida que se avanza en el conocimiento. En algunos casos es clara la activación de un gen o grupo de ellos por un factor abiótico, como el caso de la familia de genes que

codifican para *chs*, cuya región promotora contiene elementos regulatorios en *cis*, llamados caja G (Claudot *et al.*, 1999), que son secuencias de ADN reguladas, en su mayoría, por luz. Las proteínas vegetales que se unen a estos elementos pertenecen a la familia bZIP. La expresión de los genes *chs* y *pal* es regulada por factores ambientales como la radiación UV (Park *et al.*, 2007), deficiencia de boro (Camacho *et al.*, 2002), heridas en las hojas (Richard *et al.*, 2000), interacciones planta-microorganismos, así como por ataque de patógenos (Zhu *et al.*, 1996).

Además de la regulación positiva, varios estudios indican que existen represores que pueden activar algunos factores regulatorios para inhibir los genes involucrados en la síntesis de compuestos secundarios (Kasan, 2006). Este tipo de represores se han asociado con el control de respuestas a ABA, frío, estrés salínico, sequía y estrés oxidativo, como el motivo AtERF4 de *Arabidopsis* que contiene dominios que pueden unirse a los elementos regulatorios de muchos genes asociados con respuestas de defensa (Yang *et al.*, 2005). En el caso de mono y sesquiterpenos de *Ocimum*, los altos niveles de las enzimas involucradas en la biosíntesis de sesquiterpenos, acoplados con niveles bajos de la actividad de PAL, tienden a restringir la ruta de fenilpropanoides mientras se incrementa el flujo de la ruta de los terpenos (Iijima *et al.*, 2004).

Efecto de condiciones abióticas sobre la acumulación de metabolitos secundarios

Bajo condiciones de estrés biótico o abiótico, las plantas originan una variedad de respuestas para tratar de contrarrestar el mismo. Estas respuestas surgen gracias a la acción de moléculas-señal que activan otras moléculas o que modifican directamente el material genético, encendiendo genes de defensa que codifican para una serie de productos, entre ellos los metabolitos secundarios, capaces de regular el estado redox de la planta, ejercer una actividad antimicrobiana o antifúngica frente a un patógeno, regular el flujo fotónico en condiciones de exceso lumínico, o incluso participar en la regulación de la apertura estomática (Madhava Rao, 2006).

Los diferentes tipos de estrés abiótico, definido éste como una influencia que se sale de los parámetros o rangos normales de control homeostático (Lerner, 1999), son causados comúnmente por carencia de agua, salinidad, alta o baja temperatura o luz, deficiencia o exceso de nutrientes, metales pesados, contaminantes, etc., en sí mismos o en combinaciones. El estrés causado por factores abióticos altera el metabolismo de las plantas generando efectos negativos en el crecimiento, desarrollo y productividad. La sequía es el principal factor limitante en sistemas agrícolas, ya que reduce la productividad, especialmente en zonas semiáridas y áridas a nivel mundial. El déficit hídrico resulta de pocas y erráticas lluvias en la zona, pobre almacenamiento de agua en el suelo y cuando la tasa de transpiración excede la toma de agua por parte de las plantas. A nivel celular, esto resulta en la concentración de solutos, pérdida de la turgencia, cambio en el volumen celular, alteración en los gradientes de potencial hídrico, cambio en la integridad de la membrana, desnaturalización de proteínas, entre otros.

Otro factor ambiental de gran importancia es la luz, y específicamente la calidad de la luz, que juega un rol esencial en la dinámica y arquitectura de las plantas (Ballaré *et al.*, 1997), cuyos pigmentos fotosintéticos absorben principalmente en las longitudes de onda azules y rojas. Las variaciones en la luz azul son percibidas por dos tipos de fotorreceptores: criptocromos y fototropinas, los primeros activos entre 390-530 nm y los segundos muestran un claro pico de actividad a 450 nm (Christie *et al.*, 1996). Los cambios en la luz azul afectan los componentes del balance de energía y la dinámica del intercambio de gases a través de las fluctuaciones en el funcionamiento estomático (Lawson, 2009). Además del tipo de luz, la cantidad es otro de los factores ambientales que más limita la eficiencia de la fotosíntesis y la

productividad en las plantas. Cuando la energía lumínica absorbida excede la capacidad para su uso, entonces la eficiencia fotosintética se reducirá debido a la aparición de especies reactivas de oxígeno, que pueden dañar el aparato fotosintético y los componentes del cloroplasto.

El conocimiento que se obtenga sobre las condiciones particulares que generan la acumulación de un metabolito o un grupo de ellos, es de suma importancia ya que permite controlar y dirigir la propagación de plantas con uso medicinal eficazmente, sin generar pérdida significativa en su productividad ni de sus propiedades biológicas, además de implementar una estrategia concreta de conservación *ex situ* de dicha especie enmarcada en el contexto de la conservación sostenible y al uso racional de la biodiversidad.

2. HIPÓTESIS

Debido a que la producción de metabolitos secundarios surge en respuesta a estímulos abióticos o bióticos, como mecanismo de defensa, se espera una mayor acumulación de éstos, así como un aumento en la transcripción de los genes que codifican enzimas involucradas en sus rutas biosintéticas, en condiciones de estrés. Particularmente, se infiere que existirá una mayor acumulación de flavonoides hidroxilados en condiciones de flujo fotónico alto, en conjunto con un aumento en la concentración de transcritos del gen chalcona sintasa (*chs*) bajo esta misma condición. En cuanto a los terpenos, se espera una mayor concentración de éstos y de los transcritos del gen terpineno sintasa (*tps*) en plantas sometidas a daño foliar mecánico, en comparación con las plantas control.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Analizar cambios fisiológicos y moleculares puntuales asociados con la acumulación de terpenos y flavonoides en *Lippia graveolens* Kunth bajo diferentes condiciones abióticas, por medio del análisis del efecto de estrés hídrico por suspensión de riego, flujo fotónico alto de $2000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ por una hora, presencia de luz azul 8 horas y daño foliar mecánico sobre la productividad y acumulación de flavonoides y terpenos, y de los niveles de expresión de los genes chalcona sintasa (*chs*) y gamma-terpineno sintasa (*tps*) involucrados en la biosíntesis de flavonoides y terpenos, respectivamente.

3.2 Objetivos particulares

- Determinar los rangos de estrés hídrico y riego óptimo para la especie bajo condiciones de invernadero.
- Evaluar el efecto del estrés hídrico, el flujo fotónico alto, la presencia de luz azul y el daño foliar mecánico sobre la productividad y la acumulación de flavonoides y terpenos en hojas de *L. graveolens*.
- Determinar los niveles de expresión de los genes *chs* y *tps* en plantas de *L. graveolens* sometidas a estrés hídrico, flujo fotónico alto, presencia de luz azul y daño foliar mecánico en condiciones controladas.
- Comparar la densidad de tricomas glandulares en la epidermis del haz y del envés de las hojas de *L. graveolens* en cada uno de los tratamientos con respecto al grupo control.
- Comparar el contenido de terpenos y flavonoides de plantas en estado silvestre provenientes de San Rafael, Coxcatlán, Puebla con plantas propagadas en invernadero.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Elección de la especie

Se eligió la especie *Lippia graveolens* Kunth, perteneciente a la familia Verbenaceae, por su importancia alimenticia y medicinal en la zona de estudio (Hernández *et al.*, 2003). Es una especie perenne cuya composición fitoquímica ha sido ampliamente descrita (Compadre *et al.*, 1987; Pino *et al.*, 1989; Vernin *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2007), y los usos etnobotánicos han sido validados (Canales, 2005; González-Güereca *et al.*, 2007; Martínez-Rocha *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2009a). Por otra parte, se cuenta con antecedentes respecto a su propagación en invernadero y sobre la acumulación de flavonoides en condiciones controladas (Moreno, 2009). Ya que es una especie de hábito herbáceo y perenne, su crecimiento es rápido lo que facilita su estudio y resulta en un modelo experimental útil para este tipo de trabajos.

Recolección de semillas e ingreso al banco

Para la recolección se emplearon los métodos recomendados por el Royal Botanic Gardens, Kew (Van Slageren, 2003) en los cuales se recomienda un mínimo de 5 000 semillas provenientes de al menos 15 individuos, de los cuales no se debe recolectar más de un 30% de las semillas de cada uno. El ingreso al banco de semillas se realizó de acuerdo con los métodos convencionales empleados para el almacenamiento a largo plazo en el Banco de Semillas de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Se recolectaron semillas en San Rafael, Coxcatlán, Puebla, N18°12'21.0" W97°07'59.0" y N18°12'08" W97°08'15.8" entre 952-989 m de altitud, en dos fechas de la época de lluvias (septiembre y octubre de los años 2010 y 2011) para evaluar sus tasas de germinación.

Germinación de semillas

Las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1% durante 5 min, el cual fue removido en 3 enjuagues con agua destilada. Las semillas se dejaron en imbibición en agua destilada 12 h y luego se sembraron en agar bacteriológico al 1%. La germinación fue definida como el momento en que emerge la radícula (Debeaujon *et al.*, 2000) y fue registrada durante 25 días en semillas recolectadas en septiembre y octubre de 2011, separadas por el color de su testa en claras y oscuras. Esta discriminación de color se hizo para determinar diferencias en los parámetros de germinación entre estos dos grupos. Así mismo, al obtener frutos de estas plantas se recolectaron las semillas obtenidas en invernadero y también se evaluó su germinación en el cuarto de crecimiento a una temperatura promedio de 25 °C, humedad relativa máxima de 82% y un fotoperiodo de 16/8 h. Los ensayos se hicieron por triplicado, n=20 semillas silvestres y n=10 semillas provenientes de invernadero por réplica, y los resultados se expresaron en términos de porcentaje de germinación, tiempo promedio de germinación (TPG), tasa máxima de germinación (TMG) y sincronía (S). Los ajustes del modelo para obtener los parámetros previamente mencionados, se explican en el apartado de análisis estadísticos (Ver página 29).

Propagación en invernadero- tratamientos abióticos

Las plántulas obtenidas en los ensayos de germinación y con un mínimo de 4 hojas verdaderas, se trasplantaron a macetas de 76.2 cm con una mezcla de sustrato de agrolita:tierra 1:1 saturada con solución Hoagland y se establecieron en el invernadero de la FES-Iztacala, UNAM en Tlalnepantla, Estado de México, ubicado en las coordenadas N 19°31'17.7" W 99°11'19.5" a 2 254 m s.n.m. Las condiciones ambientales del invernadero (temperatura y luminosidad) se registraron cada 30 minutos por medio de un dispositivo HOBO UA002-64 Pendant temp/light, Serial 986598, versión 1.0.6. Las plantas se mantuvieron en condiciones óptimas de riego, a 80% de capacidad de campo con agua destilada y cada 3 meses se adicionó solución Hoagland completa (Apéndice 1), para evitar deficiencias

nutricionales (Moreno, 2009). Al cumplir 8 meses de edad fisiológica, las plantas se dividieron en 4 lotes de 12 individuos, para ser sometidas a las diferentes condiciones abióticas, que se detallan a continuación. Las respuestas fisiológicas, concentración de terpenos y flavonoides, concentración de transcritos de los genes chalcona sintasa *chs* y terpineno sintasa *tps* y el número de tricomas glandulares en el haz y en el envés de plantas tratadas y en plantas control, se analizaron en el tejido foliar de las plantas. En cada uno de los tratamientos abióticos, los primeros muestreos en las hojas (antes de las 24 h) se destinaron para los análisis moleculares (concentración de transcritos de *chs* y *tps*) y las muestras foliares tomadas a partir de las 24 h (y las del tiempo cero) se tomaron para el análisis de flavonoides, terpenos y densidad de tricomas glandulares. Todas las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y fueron almacenadas a -70 °C hasta su respectivo análisis.

- **Tratamientos lumínicos: flujo fotónico alto y luz azul**

El flujo fotónico alto se aplicó con una fibra óptica Hansatech LS2, serie 9093 de 120 V, 60 Hz y 120 VA (1/planta) con valores de hasta 2000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. La duración del tratamiento fue de una hora. Entre el foco de la fibra óptica y la planta se adaptó un filtro de agua para evitar el aumento de la temperatura, de modo que la diferencia de temperatura debajo del foco y la nave del invernadero no excedió 1 °C. La distancia entre el foco y la planta fue de 15 cm. Para el tratamiento de luz azul, se utilizaron lámparas de 40 W de 1.2 m de longitud Interlectric Biliblue® F40T12 BBY, U.S.A. con longitud de onda 400-500 nm, por un tiempo continuo de 8 h (modificado de Ebisawa *et al.*, 2008) durante el día (Luz natural + luz azul). Las plantas se ubicaron dentro de una cámara construida con policarbonato de 7 mm, de 1.20 m de longitud, 70 cm de altura y 60 cm de profundidad, de forma que las lámparas estaban a 20-25 cm de distancia de las hojas apicales de las plantas (Ebisawa *et al.*, 2008). El promedio de flujo fotónico dentro de la cámara fue de 550-697 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, medido con el radiómetro acoplado al IRGA Li-COR modelo Li-6400. Dentro de la cámara, las plantas se rotaron cada 2 horas para homogenizar el tratamiento. Los muestreos se realizaron inmediatamente antes de iniciar el tratamiento (tiempo cero), y posteriormente a las 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h, día 8 y día 15 (Figura 5A). Estos tiempos de muestreo fueron seleccionados con base en previos reportes de expresión de transcritos y de acumulación de flavonoides en diferentes condiciones lumínicas. En *Trifolium repens* tratada con UV, a los 12 días se reportó el aumento significativo de quercetina (Hoffman *et al.*, 2000); en uva, *Vitis vinifera* var. Silvaner, expuesta a diversos tratamientos lumínicos aumentaron sus compuestos fenólicos después de 7 días de tratamiento (Kolb *et al.*, 2001); mientras que Logemann *et al.* (2000) observaron un aumento significativo de *chs* bajo tratamiento de UV en células de perejil, *Petroselinum crispum*.

En la evaluación del efecto del flujo fotónico alto se adicionó el muestreo de 1 h (Figura 5B). La toma de muestras de las hojas se hizo desde la parte apical hacia la basal en 4 plantas tratadas y 4 plantas control.

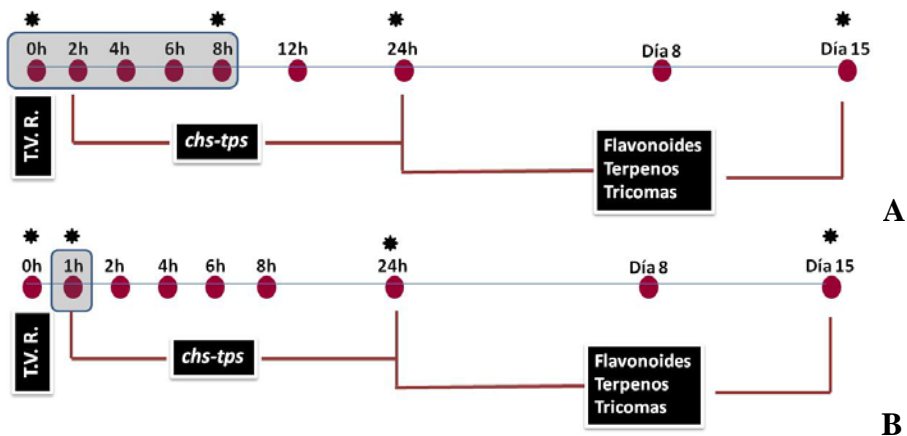


Figura 5. Diseño experimental para evaluar el efecto de la luz azul (A) y del flujo fotónico alto (B) en plantas de *L. graveolens*. El recuadro gris indica el momento y duración de la aplicación del tratamiento. ● Tiempos de muestreo. *Medición de parámetros fisiológicos. T.V.R.: Todas las variables de respuesta.

• **Daño foliar mecánico**

En plantas de 9 meses de edad mantenidas en un cuarto de crecimiento, cada una aislada dentro de un recipiente plástico transparente, se llevó a cabo el experimento de daño foliar mecánico. El daño foliar se hizo con una perforación manual, realizando dos orificios de 5 mm de diámetro (Opitz *et al.*, 2008), en 3 hojas del segundo nodo. Las muestras foliares se tomaron a las 0, 3, 6, 12 y 24 h para los análisis de expresión de los genes terpineno sintasa *tps* y chalcona sintasa *chs*, con base en previos resultados en algodón (*Gossypium hirsutum*) de Opitz *et al.*, (2008) con el aumento significativo de terpenos 7 días después de aplicar daño mecánico, y en *Medicago truncatula* (Cox y Korth, 2002) quienes reportaron el aumento en la expresión de genes asociados a la biosíntesis de terpenos, asociado al daño mecánico en hojas. Para evaluar la densidad de tricomas glandulares y la concentración de terpenos y flavonoides se tomaron muestras de hojas a las 0, 24 h, día 4 y día 8. Los parámetros fotosintéticos se registraron a las 0 h, 24 h, día 2 y día 8 del experimento (Figura 6). El ensayo se hizo por cuadruplicado en plantas tratadas y plantas control.

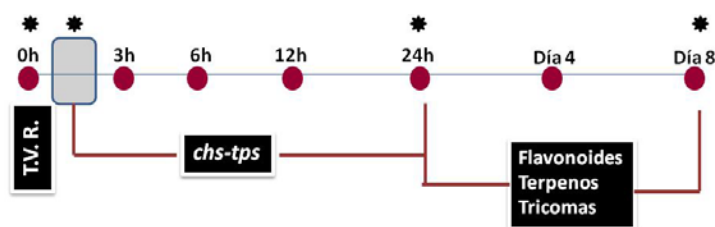


Figura 6. Diseño experimental para evaluar el efecto del daño mecánico en plantas de *L. graveolens*. El recuadro gris indica el momento y duración de la aplicación del tratamiento. ● Tiempos de muestreo. *Medición de parámetros fisiológicos. T.V.R.: Todas las variables de respuesta.

• **Estrés hídrico**

Para analizar el estrés hídrico, a un grupo de plantas de 8 meses de edad en condiciones óptimas de riego a 80% de capacidad de campo, se les anuló el riego durante una semana. La humedad aprovechable después de una semana sin riego fue de 33 a 40%. Las plantas sometidas a estas dos condiciones de humedad presentaron un potencial hídrico de -0.38 y -7.8 MPa, respectivamente. La medición del

potencial hídrico se realizó en 5 cámaras psicrométricas acopladas a un microvoltímetro dew point HR33-T (Logan, USA).

Los muestreos para el análisis de transcritos, concentración de flavonoides y terpenos, y densidad de tricomas glandulares se hicieron en el tiempo cero (previo al sometimiento del estrés), el día 4 y el día 7 después de la suspensión del riego, como se muestra en la Figura 7. Luego de la re-hidratación se midieron los parámetros fisiológicos en plantas tratadas para comparar con los valores del grupo control (n=4).



Figura 7. Diseño experimental para evaluar el efecto del estrés hídrico en plantas de *L. graveolens*. El recuadro gris indica el momento y duración de la aplicación del tratamiento. ● Tiempos de muestreo. * Medición de parámetros fisiológicos.

Parámetros fisiológicos

Estos parámetros incluyeron fijación de CO₂, conductancia estomática, transpiración y concentración interna de CO₂ (C_i). Los datos se registraron mediante un Analizador Infrarrojo de Gases Portátil (IRGA), LICOR 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 de la hoja de 25 °C y una radiación fotosintéticamente activa (PAR) de 1500 μmol m⁻²s⁻¹. Se seleccionaron hojas totalmente expandidas y apicales (1-2 nodo) para hacer los registros.

Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios

• Terpenos

De las muestras foliares pulverizadas con nitrógeno líquido, se hizo un extracto hexánico el cual se dejó en agitación continua a 150 rpm por 2 horas. Posteriormente, se centrifugó a 15 777 g durante 3 minutos en una centrífuga 5415C (Brinkmann Instruments, Inc., New York, USA), previa inyección en el CG-EM. Cada muestra se inyectó de modo split (volumen de inyección de 1 μL en proporción 80:1) a un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6850, equipado con una columna capilar Agilent 19091s-433E HP-5; S 5% fenil metil siloxano (30 m x 0.25 mm, 0.25 μm); acoplado a un espectrómetro de masas (EM) 5975C VL MSD, Agilent technologies.

La temperatura del inyector fue de 270 °C. Se usó helio como gas acarreador (20 mL min⁻¹) y la temperatura del horno fue programada con una temperatura inicial de 70 °C por 2 minutos, seguida de una rampa de 20 °C min⁻¹ a 230 °C (0 min) y luego 8 °C min⁻¹ a 280 °C (5 min). Los parámetros de operación del EM fueron los siguientes: voltaje de ionización 70 eV, temperatura de la fuente de ionización electrónica de 230 °C, temperatura del cuadrupolo de 150 °C y un rango de escaneo de 35 a 750 unidades de masa atómica. Todos los terpenos fueron identificados con el software Agilent Technologies usando la biblioteca NIST08; el timol (CAS 89-83-8) y el carvacrol (CAS 499-75-2) se identificaron por medio de la comparación con los picos y patrones de fragmentación de los estándares auténticos Sigma-Aldrich. La cuantificación se obtuvo a partir del 4-isopropilfenol (Sigm-Aldrich, CAS 99-89-8) a una concentración final de 25 μg/mL, adicionado como estándar interno (Abu-Lafi *et al.*, 2008) a cada extracto. La Figura 8 muestra del rango de linealidad entre las concentraciones del estándar interno y la integración de los picos.

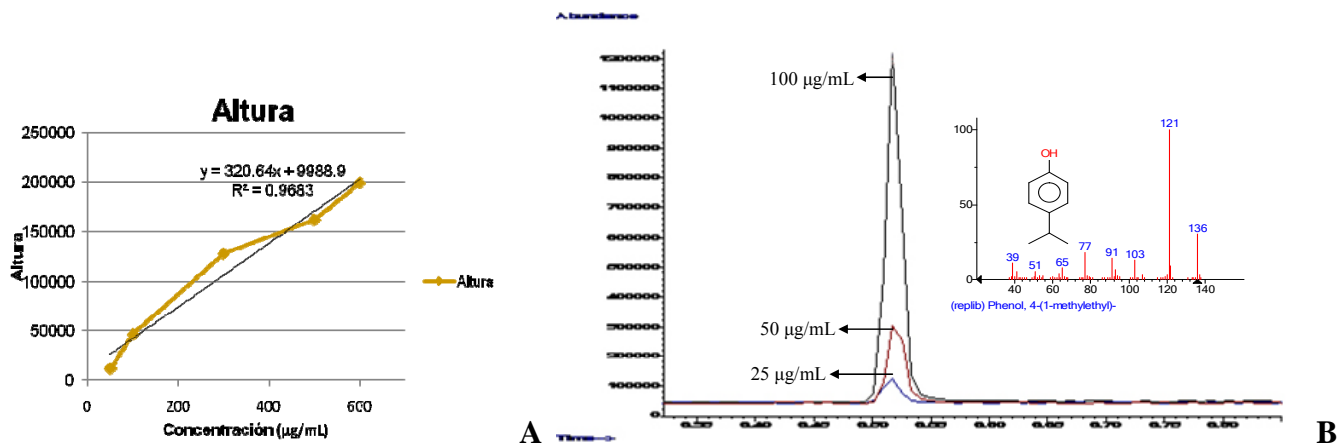


Figura 8. Correlación entre las concentraciones del estándar interno, 4-isopropilfenol, y la altura (A). Cromatograma de los picos de las diferentes concentraciones del estándar interno, con su estructura y patrón de fragmentación (B).

• Flavonoides

El material foliar (10 mg) liofilizado (Freezone 4.5, LabConco, Kansas, USA) fue extraído en 1 mL de metanol al 80% a temperatura ambiente y centrifugado a 15 777 g durante 3 minutos en una centrífuga 5415C (Brinkmann Instruments, Inc., New York, USA). La identificación de todos los flavonoides se llevó a cabo por medio de la inyección de 2 µL del sobrenadante en un equipo de cromatografía líquida acoplado a un detector de espectrometría de masas¹ (LC-MS), con un HPLC Accela ThermoScientific, USA (bomba, inyector y detector) con una columna Phenomenex Kinetex C18 (150 mm x 2.1 mm; 2.6 µm) de Phenomenex, USA. La fase móvil fue de agua/metanol/acetonitrilo+ácido fórmico 1% con el siguiente gradiente: 90:0:10 (t=0min), 0:90:10 (t=20min), 0:90:10 (t=25min), 90:0:10 (t=27min), 90:0:10 (t=37 min) y una tasa de flujo de 400µL min⁻¹. El detector PDA (*photodiode array*) configurado en un rango de longitud de onda de 200 a 600 nm y una tasa de escaneo de 1 scan s⁻¹. Los espectros de masas se obtuvieron por medio de LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific, USA). La detección se realizó por medio de ionización electrospray (ESI) en los modos positivo y negativo, con un flujo de gas a 20 unidades arbitrarias, la temperatura capilar de 300 °C, fuente de voltaje de +/- 3.50 kV y la fuente de corriente a 100 µA.

Con base en las identificaciones hechas por medio del LC-MS, las cuantificaciones de todas las muestras se realizaron en un equipo HPLC 1100 (Hewlett-Packard, USA), usando la misma columna y fase móvil con el siguiente gradiente: 90:0:10 (t=0min), 90:0:10 (t=5min), 50:40:10 (t=11min), 0:90:10 (t=30min) con un flujo de 150 µL min⁻¹. El detector DAD se estableció a 260 nm. La concentración de cada flavonoide identificado se obtuvo con su coeficiente de extinción (Bednar y Hadcock, 1988; Vladimirov *et al.*, 2009; Chirikova *et al.*, 2010). Para evitar errores originados de la degradación de compuestos, las determinaciones por medio de cromatografía líquida se realizaron antes de las 24 h después de la extracción. Cada muestreo se analizó en 4 repeticiones de cada grupo experimental.

Cuantificación de los transcritos *chs* y *tps*

La cuantificación de los transcritos de *chs* y *tps* bajo diferentes tratamientos abióticos y en muestras silvestres se realizó mediante hibridación dot blot. Se buscaron secuencias génicas reportadas para *chs* y *tps* de las familias filogenéticamente relacionadas con Verbenaceae, ya que no existen reportes en la base de datos para *L. graveolens*, en el banco de información genética presente en el GenBank². Con

¹ Dr. Geoffrey Kite, Jodrell Laboratory, KEW Gardens, Richmond, Reino Unido.

² <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

estas secuencias se realizó un análisis BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) con el fin de identificar secuencias con alto grado de identidad para los genes de interés. Con éstas se realizó un alineamiento múltiple, mediante el programa CLUSTAL W, con el propósito de encontrar zonas conservadas y diseñar sobre éstas los oligonucleótidos para cada gen. Para diseñar los oligonucleótidos de *chs* se alinearon 15 secuencias y para *tps*, 10 (Apéndice 2). La tabla 1 muestra las características de los oligonucleótidos diseñadas para cada gen.

Tabla 1. Características de los oligonucleótidos diseñados

Gen	Secuencia forward	Secuencia reverse	Producto (pb)	Tm (°C)
chalcona sintasa (<i>chs</i>)	5'-CATGATGTACCAGCAGG-3'	5'-CTTCCTCATCTCATCCA-3'	553	56
γ -terpineno sintasa (<i>tps</i>)	5'-GAGGCAAGGTGGTTCATCG-3'	5'-CCACTACTCTGTCTCTTGC-3'	187	46

El diseño de los oligonucleótidos se verificó mediante PCR punto final utilizando como molde ADN extraído de las muestras foliares de los grupos control y las muestras silvestres utilizando el kit DNazol® (Invitrogen CA, USA). El producto de la amplificación fue secuenciado³ y la secuencia fue nuevamente analizada mediante BLAST para comprobar que el amplicón obtenido correspondiera con un fragmento del gen de interés. Para γ -terpineno sintasa, el análisis mostró un 100% de identidad con la γ -terpineno sintasa de *Thymus vulgaris*, con números de acceso JQ957864.1, JQ957865.1 y JQ957866.1; y la secuencia obtenida de *chs*, un 86% de identidad con la secuencia del mismo gen de *Scutellaria altissima* (No. acceso JX98544.1) y *S. sp. "zhongdianensis"* (No. acceso JX985455.1), especies de la familia Lamiaceae. Las condiciones de amplificación fueron: volumen final de la mezcla de 25 μ L, considerando 2.5 μ L de amortiguador PCR 10X, 1.25 μ L de MgCl₂ 50 mM, 1 μ L de mezcla de dNTPs 10 mM, 0.2 μ L de Taq DNA polimerasa Platinum (Invitrogen, CA, USA, CAT 10966-030), 1 μ L de cada cebador 5' y 3' 10 μ M, 1 μ L de ADN total y 17 μ L de agua destilada y estéril. Las condiciones de la PCR consistieron de un ciclo inicial de 95 °C por 3 min (desnaturalización) seguido de 30 ciclos de 95 °C por 40 s (desnaturalización), 56 °C y 46 °C para *chs* y *tps*, respectivamente, por 50 s (alineamiento), 72 °C por 1.15 min (extensión) y un ciclo final a 72 °C por 5 min (extensión final) en un termociclador Select BioProducts, modelo Select cycler (NJ, USA). Los amplicones fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 1% conteniendo bromuro de etidio. Se usó como marcador de peso molecular 1KB PLUS (Invitrogen, CA, USA).

Para la técnica de hibridación dot-blot⁴, se extrajo el RNA total de todas las muestras foliares (experimentos y muestras silvestres) mediante el kit TRIzol (Invitrogen, CA, USA. CAT No. 15596-018) y se sintetizó cDNA con la enzima reverso transcriptasa SuperScript III (Invitrogen, CA, USA. CAT No.18064-014). Los niveles basales de expresión de todas las muestras se estandarizaron con base en el gen de expresión constitutiva 26S, el cual es un gen ribosómico constitutivo, mediante RT-PCR modificando el número de ciclos hasta que todas las muestras tuvieron la misma intensidad del fragmento amplificado (Ruiz Nieto *et al.*, 2013). Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 21 μ L conteniendo 12 μ L de agua estéril, 2 μ L de dNTP's (10 mM), 2 μ L de PCR amortiguador 10X, 0.8 μ L de MgCl₂ (50 mM), 2 μ L del par de oligonucleótidos correspondiente (10 mM), 0.2 μ L de Taq (5U/ μ l) y 1 μ L de ADNc de primera cadena. Las condiciones de las reacciones

³ Servicio en el Laboratorio de Bioquímica Molecular, FES Iztacala. M. en C. Alejandro Cruz Monsalvo

⁴ Realizado en INIFAP, campus Celaya, Guanajuato. Asesorado por el Dr. Víctor Tavera Montero, Ing. Eric Ruiz y la Ing. Paulina Rodríguez.

fueron: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, 95 °C por 1 min, 60 °C por 2 min y 72 °C por 2 min. Los productos de la reacción se analizaron por electroforesis en agarosa al 1% con amortiguador TBE 1X (EDTA 1 mM pH 8, ácido bórico 40 mM, Tris 40 mM) a 120 V. Los geles se revelaron con bromuro de etidio y se fotografiaron en un fotodocumentador BIO-RAD (CA, USA) Modelo Universal Hood II.

La sonda se obtuvo mediante la amplificación un fragmento de cada gen por medio de RT-PCR, como se describió anteriormente, y se purificó (QIAquick gel extraction kit Qiagen, Alemania) a partir del producto de PCR, en el caso de *tps* que se obtuvo una sola banda. Para *chs* se purificó a partir del gel, ya que se presentaron amplificaciones inespecíficas. La cuantificación de la sonda se midió en un espectrofotómetro Nanodrop ThermoScientific 8000 y se corroboró por medio de una electroforesis en gel de agarosa. La concentración final para la sonda fue de 200 y 1000 ng, para *chs* y *tps*, respectivamente y se marcaron por medio del kit “BIOTIN DECALABEL DNA LABELING KIT” de ThermoScientific (MA, USA), adicionando 10 µL del decanucleótido en buffer de reacción 5X y 24 µL de agua libre de nucleasas. Se mezcló el contenido y se dio un pulso por 5 s. Posteriormente, se incubó a baño María 8 min y se enfrió inmediatamente en hielo. A esta mezcla se le adicionó lo siguiente, en la oscuridad: 5 µL de la mezcla de marcaje con biotina (Labeling mix) y 1 µL del fragmento Klenow exo-5U/ µL. La mezcla se incubó a 37 °C en el termociclador hasta el momento de su uso (alrededor de 15 h). La sonda se desnaturalizó en baño María 5 min y se enfrió en hielo inmediatamente.

Antes de imprimir las muestras en la membrana, correspondientes al ADN complementario de doble cadena (cdsDNA) de cada individuo, éstas se desnaturalizaron en baño María por 10 minutos y se colocaron en hielo inmediatamente. Se utilizó la membrana de nylon Amersham HybondTM-N⁺ de GE Healthcare Life Sciences (UK), la cual fue cargada con 1.5 µL de cada cdsDNA (cada individuo de cada experimento). Como control negativo se usó agua y una sonda diferente a la de interés, y como control positivo una muestra cuya expresión del gen de interés fue previamente comprobada, mediante RT-PCR. El cdsDNA se fijó por medio del programa C2 del horno UV Linker, marca BioRad. Este programa, dentro de la aplicación “Crosslinking” es de 50 mJ por 300 s.

Las soluciones de pre-hibridación e hibridación (Biotin Chromogenic detection Kit, ThermoScientific, MA, USA), a un volumen final de 30 mL cada una, se prepararon con 1.93 mL de agua MiliQ estéril, 1.07 mL de SDS 14%, 3 mL de solución de Denhardt y 9 mL de SSC 20X. En la oscuridad se adicionaron 15 mL de formamida y se dejó en incubación 4 h a 46 °C, en agitación continua a 7 rpm en el horno de hibridación para la pre-hibridación, y 18 h a la misma velocidad en el caso de la hibridación. Los lavados se hicieron con SSC 2X y SDS 0.1% y SSC 0.1X y SDS 0.1% y con la solución bloqueo/lavado 1X. La solución de bloqueo 1% se incubó a temperatura ambiente por 30 min en agitación continua y, después de desecharla, se añadió la solución de conjugado de streptavidina-AP la cual se incubó a temperatura ambiente por 30 min. La solución de detección 1X se dejó en las membranas por 10 min en agitación continua y la solución de substracción 1X 20 horas a temperatura ambiente, en agitación constante a 7 rpm. Finalmente, las membranas se enjuagaron con agua MiliQ estéril y se tomaron las fotografías de éstas en transiluminador con luz blanca por medio de un fotodocumentador BIO-RAD Modelo Universal Hood II. Se realizaron análisis densitométricos de las imágenes obtenidas mediante el software TotalLabQuant TL1201D v2009.

Identificación y cuantificación de tricomas glandulares

Las hojas provenientes de plantas de invernadero se analizaron inmediatamente después de ser muestreadas, en fresco. Las hojas de plantas silvestres, recolectadas en campo, fueron fijadas en

amortiguador de fosfato dipotásico 0.2 M y glutaraldehído 3% (modificado de Argyropoulou *et al.*, 2010) pH 7.2, a 4 °C para mantener las estructuras y evitar su degradación o lisis. Se realizaron cortes longitudinales de 0.5 cm² en las hojas y se montaron sobre soportes de aluminio, con cinta adhesiva doble faz de carbono (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA. Cat No. 77817-12). Ensayos preliminares no mostraron diferencias entre hojas sin y con cubierta de oro. Las fotografías fueron tomadas en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6380LV (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) con un voltaje de aceleración de 10 kV. Se tomaron 3 fotografías a 100X en cada una de las tres réplicas, tanto de las muestras silvestres, como en las de plantas de invernadero. El conteo de los tricomas glandulares en el haz y en el envés de la epidermis se realizó en las fotografías digitales tomadas de la parte central de la hoja, usando el programa ImageJ V. 1.46.

Respuestas en plantas silvestres

En dos localidades de la reserva de Tehuacán-Cuicatlán, San Rafael y Zapotitlán Salinas, en la estación seca (mayo) y en la estación lluviosa (septiembre) se midieron los mismos parámetros fisiológicos que en las plantas de invernadero, con el IRGA Li-Cor Li6400 y se tomaron muestras para determinar la acumulación de flavonoides y terpenos, densidad de tricomas glandulares y la expresión de los transcritos *chs* y *tps*. Las muestras destinadas a los análisis para contenido de flavonoides se recolectaron en bolsas de papel, para ser liofilizadas en un liofilizador Freezone 4.5 (LabConco, Kansas, US). Las muestras tomadas para el análisis de terpenos se almacenaron en nitrógeno líquido hasta el momento de su extracción mientras que las destinadas al conteo de tricomas glandulares se fijaron en amortiguador de fosfato dipotásico pH 7.2, con glutaraldehído 3% hasta su montaje. Las hojas tomadas para cuantificar la expresión de transcritos se depositaron en tubos eppendorf con 1.5 mL de solución AllProtect de Qiagen (CAT 76405). Un espécimen de herbario de cada localidad, San Rafael y Zapotitlán Salinas, se encuentra depositado en el Herbario de la FES Iztacala, bajo los números 42699 IZTA y 42780 IZTA, respectivamente.

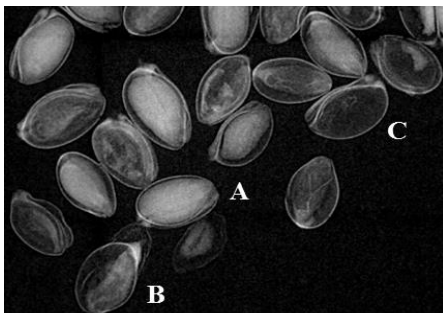
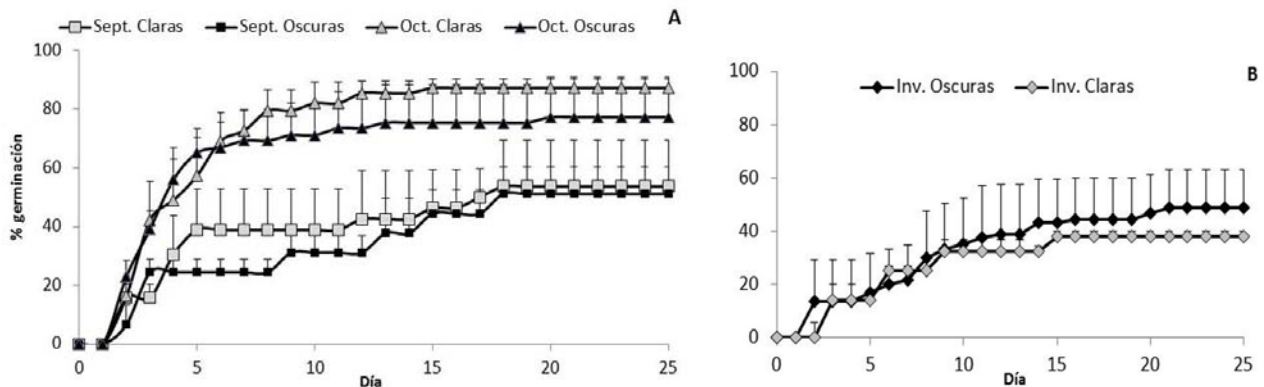
Análisis estadísticos

Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de 2 vías para comparar entre los grupos experimentales y entre los tiempos de muestreo en cada uno de los experimentos $\alpha \geq 0.05$, para cada uno de los parámetros fotosintéticos, cada flavonoide, cada terpeno y para los datos de densidad de tricomas glandulares. En los casos en los que existieron diferencias significativas se aplicó la prueba *post hoc* LSD ($\alpha \geq 0.05$). Para la comparación de medias entre dos grupos, como silvestre *vs.* invernadero y control *vs.* tratamiento, se aplicó una prueba t student, significancia del $\alpha \geq 0.05$ con el programa GenStat 11. Para asociar el conjunto de variables de cada experimento, se realizó un análisis de componentes principales usando el programa R® versión 3.0.2. En cuanto a los datos de germinación, el porcentaje acumulado de cada réplica 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 GenStat 11.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Germinación y propagación

La germinación final, en la que se tomaron en cuenta sólo las semillas viables, evaluadas el día 25 post-siembra mediante el ensayo de corte de testa, mostró que los mayores porcentajes de germinación se obtuvieron con las semillas silvestres con testa clara, en especial las recolectadas en Octubre con un valor de 87.2%. Mientras que las semillas obtenidas en invernadero presentaron valores de 48.9 y 38.09% en las semillas oscuras y claras, respectivamente (Figura 9). Un análisis de las semillas mediante rayos X (22.0 kV, 0.30 mA y 3.84 mA) en un equipo Faxitron⁵ mostró que la mayoría de semillas recolectadas en septiembre son inmaduras, con un embrión incompleto o sin él (Figura 10), lo cual explica los bajos porcentajes de germinación. A pesar de que las semillas provenientes de plantas de invernadero presentaron embriones completos y maduros, su germinación fue menor. Es probable que se deba a algún tipo de latencia o de vigor diferencial de las plantas, originado de las condiciones de crecimiento en el invernadero. Estos análisis se llevaron a cabo en tres réplicas (n=30) de semillas de plantas silvestres y una réplica (n=10) de semillas provenientes de individuos propagados en invernadero.



Los modelos sigmoideos y gaussianos (Tabla 2) aplicados al porcentaje de germinación acumulado en cada grupo de semillas, mostraron que los parámetros germinativos de las semillas provenientes de plantas de invernadero y de plantas silvestres recolectadas en septiembre no difieren y presentan los valores más bajos. Por el contrario, las semillas recolectadas en individuos silvestres en el mes de octubre presentaron mayor tiempo promedio de germinación ($F_{(4,14)}=3.74$ $P=0.041$) y sincronía ($F_{(4,14)}=7.76$ $P=0.004$) con respecto a las semillas provenientes de individuos de invernadero. Este dato

⁵ Análisis realizados en Millennium Seed Bank, Kew Gardens, Wakehurst Place, Reino Unido.

es relevante ya que demuestra que tan sólo dos semanas de diferencia en la fecha de recolecta podrían ser determinantes en los resultados germinativos, más que el efecto del color de la testa. Sin embargo, esta última variable está estrechamente vinculada con el estado de maduración de los embriones, pero también con los compuestos que contenga como fenoles polimerizados y compuestos fenólicos que actúan como defensa química contra microorganismos, y física incrementando la resistencia mecánica (Mohamed-Yasseen *et al.*, 1994).

Tabla 2. Índices de germinación de semillas de *L. graveolens* provenientes de individuos silvestres (recolectadas en septiembre y octubre) y de individuos propagados en invernadero. TMG: tasa máxima de germinación, TPG: tiempo promedio de germinación, S: sincronía. Promedios de ensayos por triplicado (n=20) ± error estándar. Las letras representan diferencias significativas entre grupos $p \leq 0.05$

Origen	Silvestres Septiembre		Silvestres Octubre		Invernadero
	Testa clara	Testa oscura	Testa clara	Testa oscura	
TMG (No. semillas/día)	5.4±2.6	21.1±12.2	14.8±3.4	15.8±1.2	6.8±2.1
TPG (días)	5.3±2.5 ^b	4.3±6.4 ^b	14.3±3.2 ^a	15.4±1.6 ^a	6.6±2 ^{ab}
S	0.06±0.04 ^b	0.01±0.007 ^b	0.16±0.02 ^a	0.18±0.05 ^a	0.08±0.03 ^{ab}
Porcentaje final de germinación (%)	53.7 ^b	51.1 ^b	87.2 ^a	77.2 ^a	43.5 ^b

Este resultado coincide con lo obtenido por otros autores en especies como *Panicum miliaceum* (Khan *et al.*, 1996), *Phaseolus vulgaris* (Powell *et al.*, 1986), *Vigna unguiculata* (Legesse y Powell, 1992) y mostaza (Ochuodho y Modi, 2010) quienes sustentan que esta diferencia se debe básicamente a la dureza y grosor de la testa. Las semillas más oscuras pueden presentar una testa más gruesa con mayor número de células, o mayor densidad, una barrera química que puede conformada por polifenoles o lignanos, lo que limita la toma de agua y por lo tanto, reduce la germinación.

Aunque el tiempo promedio de germinación (TPG) y la sincronía (S) mostraron diferencias entre grupos, la tasa máxima de germinación (TMG), no. Las diferencias temporales podrían estar dadas por el estado de madurez del embrión, como se mencionó anteriormente o bien, debido 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), lo cual podría estar afectando las semillas de plantas de invernadero que a pesar de ser de dimensiones mayores (Apéndice 3), los valores de germinación fueron tan bajos como las semillas inmaduras silvestres recolectadas en septiembre. 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). Según Schmitt *et al.* (1992) y posteriormente Van Hinsberg (1998) demostraron que para *Plantago lanceolata* propagada en invernadero, la expresión del genotipo materno durante la germinación depende de la luz en la que se desarrolle la progenie.

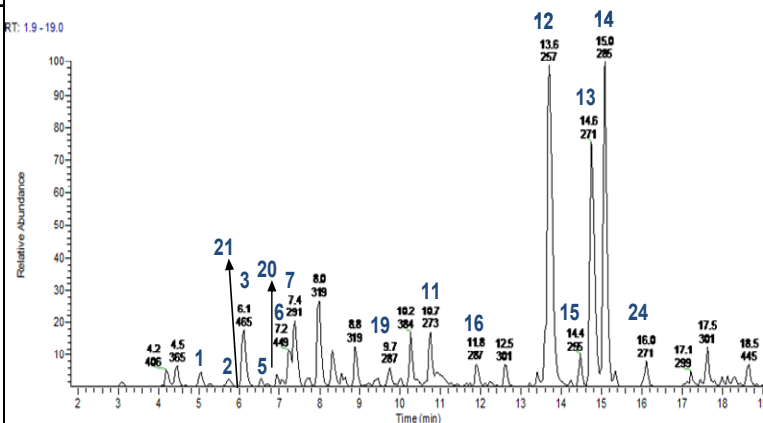
5.2 Identificación de flavonoides y terpenos

La estandarización del métodos de identificación de flavonoides en LC-MS y posteriormente las modificaciones hechas en el HPLC, realizadas con las muestras de individuos silvestres recolectadas en época de lluvias, que era de las que se tenía mayor cantidad de tejido, permitió identificar 24 flavonoides en las muestras foliares de *L. graveolens*. La tabla 3 muestra el compuesto, con los máximos de

absorción en UV. La mayoría de los compuestos identificados han sido previamente reportados para esta especie (Domínguez *et al.*, 1989; Lin *et al.*, 2007; González-Güereca *et al.*, 2007).

Tabla 3. Flavonoides identificados en hojas de *L. graveolens* con su tiempo de retención (tR), peso molecular (PM) y sus máximos de absorción UV (A). Cromatograma obtenido en LC-MS con la asignación de picos (B).

No.	Nombre	tR (min)	PM	UV max (nm)
1	Pentahidroxiflavanona hexósido-A	5.08	467	237,285,361,395sh
2	Pentahidroxiflavanona hexósido-B	5.75	467	237,285,361,395sh
3	6-hidroxiluteolina hexósido-A	6.1	465	234,280,344,396
4	6-hidroxiluteolina hexósido-B	HPLC	465	234,280,344,396
5	Taxifolina	6.47	305	288
6	Scutelareina 7-O-hexósido	7.2	449	233,280,336,380sh
7	3-hidroxifloretin 6'-O-hexósido	7.4	453	234,285,379
8	Floridzina	HPLC	437	234
9	Eriodictiol	9.34	289	288
10	Quercetina	HPLC	302	256,266sh,370
11	Naringenina	10.7	273	292
12	Pinoembrina	13.6	257	289
13	Galangina	14.6	271	265,310,359,396sh
14	Galangina metil eter	15	285	234,265,312,336,379sh
15	Crisina	14.4	255	314
16	Kaemferol	11.8	287	265
17	6-metilscutelareina	HPLC	300	276
18	6,7-dimetilscutelareina	HPLC	314	278
19	Scutelareina	9.7	286	235,290,361
20	Lipiosido I	6.93	539	234
21	Lipiosido II	5.85	555	233
22	Luteolina	10.8	286	256,266sh,348
23	Sakuranetina	HPLC	286	290,336sh
24	Pinostrobrina	16	270	288



A.

B.

Dentro de los flavonoides que están presentes en las hojas se encuentran flavonoles, flavanonas y dihidrochalconas. Los lipiosidos I y II, ya reportados para *L. graveolens*, corresponden al ácido 6'-O-trans-cafeoil-carioptosídico (Rastrelli *et al.*, 1998). La crisina, identificada solo en algunas muestras (tratamiento de estrés hídrico y de daño mecánico) no ha sido reportada para esta especie, de modo que su autenticidad debe ser confirmada por comparación con el estándar. Las dos pentahidroxiflavanonas identificadas tienen la misma aglicona, por lo que es probable que sean isómeros, como lo discuten Lin *et al.* (2007).

En cuanto a terpenos, en todo el conjunto de muestras fueron identificados 48 compuestos por medio de CG-EM. Estos compuestos incluyen monoterpenos, sesquiterpenos y un triterpeno (Tabla 4); previamente reportados por varios autores (Compadre *et al.*, 1987; Rivero-Cruz *et al.*, 2011).

Tabla 4. Terpenos identificados en hojas de *L. graveolens* por CG-EM y su tiempo de retención (tR). *Biciclo= biciclo(3.1.0)hexan-2-ol,2-metil-5-(1-metiletil),(1 α ,2 β ,5 α)

Compuesto	tR (min)	Compuesto	tR (min)
Monoterpenos		terpinen-4-ol	6.25
3-thujeno	3.71	α -terpineol	6.34
1-R- α -pineno	3.94	Anisol,2-isopropil-5-metil	6.62
Camfeno	4.1	Linalol	6.7
4(10)thujeno	4.32	Timol	7.0
β -felandreno	4.33	Carvacrol	7.1
2(10)-pineno	4.39	<i>o</i> -acetiltimol	7.53
Camfor	4.39	Sesquiterpenos	
β -pineno	4.4	Cariofileno	8.1
β -mirceno	4.45	α -cariofileno	8.3
α -pineno	4.57	Germacreno	8.44
α -terpineno	4.62	β -cubebeno	8.5
α -felandreno	4.64	γ -cadideno	8.69
3-careno	4.7	Cadinol	9.07
<i>m</i> -cimeno	4.82	Oxido de cariofileno	9.1
<i>p</i> -cimeno	4.83	γ -eudesmol	9.4
<i>o</i> -cimeno	4.83	β -eudesmol	9.5
Limoneno	4.88	α -eudesmol	9.57
Eucaliptol	4.9	Cadina 3,9 dieno	9.6
γ -terpineno	5.1	Eugenol	9.74
Biciclo*	5.2	Naftaleno	9.98
Terpineol	5.31	Eudesm-4(14)-en-11-ol	10.46
Limonano	5.44	Espatulenol	17.5
β -linalol	5.48	Triterpeno	
Alcanfor	6.0	Escualeno	17.6
Endoborneol	6.18		

La figura 11 muestra un cromatograma obtenido en CG-EM a partir del extracto hexánico de una muestra silvestre, proveniente de San Rafael, con la asignación de algunos de los picos.

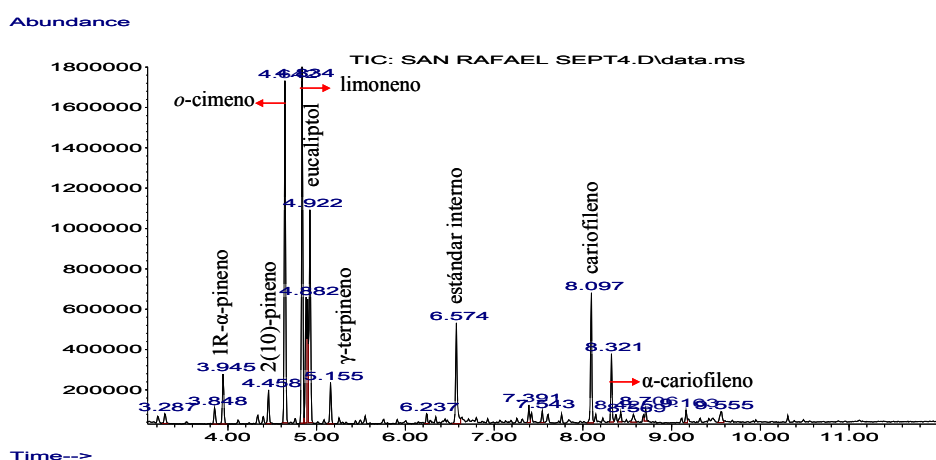


Figura 11. Cromatograma obtenido en CG-EM de extracto hexánico de muestra foliar de *L. graveolens* silvestre recolectada en San Rafael, Puebla.

5.3 Identificación de tricomas glandulares

Se lograron identificar tricomas no glandulares y glandulares en el haz y en el envés de las hojas provenientes de organismos silvestres y de individuos propagados en invernadero. La figura 12 muestra la distribución de ambos tipos de tricomas en cada una de las caras foliares.

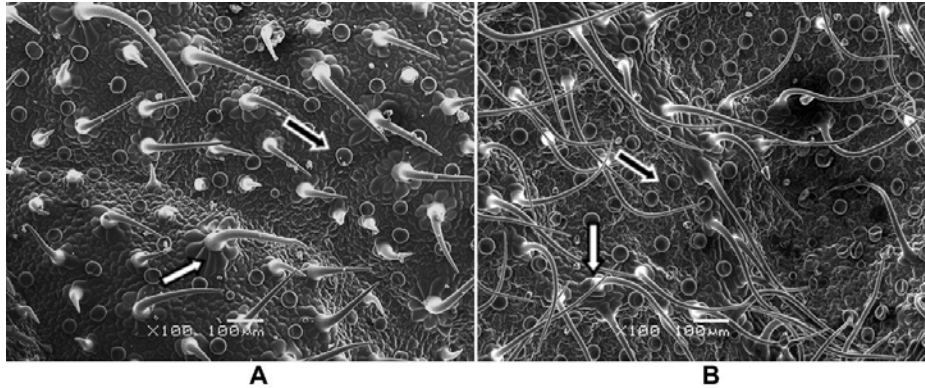


Figura 12. Distribución de tricomas glandulares (flechas negras) y no glandulares (flechas blancas) con su base multicelular en hojas de un individuo del grupo control en haz (A) y en envés (B). 100X.

Argyropoulou *et al.* (2010) en su estudio morfoanatómico e histoquímico en *L. citriodora* describieron cuatro tipos de tricomas glandulares, nombrados A, B, C y D que difieren en tamaño, forma, contenido y en el número de células basales. En el presente estudio con *L. graveolens* se identificaron tricomas glandulares correspondientes al tipo D, que son tricomas glandulares con cabeza unicelular de gran tamaño y esférica, tallo también unicelular y corto (Figura 13). Estos mismos autores discuten que la morfología de esos tricomas tipo D es similar a la de tricoma peltado. Sin embargo, los tricomas peltados presentan cabezas multicelulares (Werker *et al.*, 1985; Bosabalidis, 2002). Debido a su abundancia, el conteo se centró solamente en los tricomas glandulares tipo D, también reportado en *L. scaberrima* (Combrinck *et al.*, 2007), bajo el nombre de “tricomas grandes” (*large trichomes*, en inglés). Aunque las dimensiones de estos tricomas varían, en promedio tienen $40 \mu\text{m}^2$ y $34 \mu\text{m}$ de alto, en concordancia con lo reportado por este último autor.

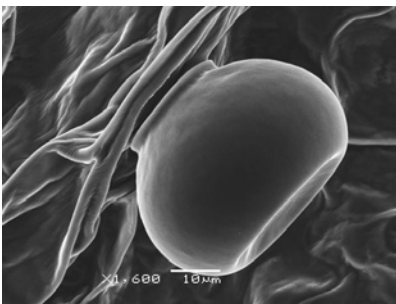


Figura 13. Fotografía de un tricoma glandular tipo D en *L. graveolens*. 1600X

Como se observa en la Figura 12, el envés presentó una mayor densidad de tricomas glandulares. Este hecho ha sido previamente reportado en otras especies como *Artemisia annua* (Kjær *et al.*, 2012), las Lamiaceae *Mentha piperita* (Maffei *et al.*, 1989), *Teucrium salviastrum* (Cavaleiro *et al.*, 2002), *T. scorodonia* (Autunes y Sevinat-Pinto, 1991), *Perovskia atriplicifolia* (Zamfirache *et al.*, 2009) y *Plectranthus madagascariensis* (Ascensao *et al.*, 1998).

5.4 Respuestas fisiológicas, fitoquímicas y moleculares en condiciones de estrés abiótico

5.4.1 Tratamientos lumínicos

* Parámetros fisiológicos

Aunque las plantas sometidas a flujo fotónico alto por 1 h aumentaron la tasa fotosintética y la concentración interna de CO₂, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Por otro lado, el tratamiento de luz azul generó una disminución significativa de la conductancia estomática ($F_{(2,27)}=2.01$ $P=0.15$) y de la concentración interna de CO₂ ($F_{(2,27)}=7.82$ $P=0.002$) después de 8h de tratamiento, pero a los 15 días éste último parámetro y la transpiración aumentaron significativamente con respecto al control (Tabla 5).

Tabla 5. Respuestas fisiológicas en plantas de *L. graveolens* control (C) y bajo tratamiento lumínico (Tmto). Los asteriscos indican diferencias significativas $p \leq 0.05$ entre grupo control y tratado.

Parámetro fisiológico	LUZ AZUL					FLUJO FOTÓNICO ALTO						
	0h	8h		Día 15		0h	1h		24 h		Día 15	
		C	Tmto	C	Tmto		C	Tmto	C	Tmto	C	Tmto
Fijación de CO ₂ ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	4.93±1.10	6.94±1.32	6.39±0.6	2.24±0.48	2.8±0.77	3.22±0.41	1.89±0.82	3.02±0.69	4.53±2.71	5.38±1.03	5.4±1.56	5.24±1.02
Conductancia estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0.21±0.37	0.19±0.26*	0.05±0.01	0.03±0.03	0.04±0.03	0.02±0.002	0.017±0.007	0.01±0.006	0.03±0.02	0.04±0.005	0.04±0.01	0.04±0.02
Transpiración ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0.78±0.54	1.85±0.11	1.62±0.02	0.52±0.22*	0.76±0.33	0.55±0.05	0.69±0.28	0.59±0.22	0.95±0.46	1.19±0.21	1.25±0.15	0.83±0.35
Conc. interna de CO ₂ ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol aire}^{-1}$)	146.75±32.22	162.05±87.95*	122.35±31.75	188.36±36.43*	221±101.02	181±24.6	172.3±61.5	314.9±142.9	156.2±55.6	136.9±24.3	177.7±62.2	102.5±55.8

Estos resultados demuestran que, al menos el tratamiento de flujo fotónico alto ($2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ por 1 h), no generó una condición de estrés en las plantas de esta especie con edad fisiológica de 8 meses. Por el contrario, después de 1 h aumentó la tasa fotosintética, probablemente debido a la activación del fotosistema II y de todo el aparato fotosintético, contando además con la condición óptima de riego en las que se encontraba este grupo experimental. Estudios similares en otras especies como soya, la irradiación de $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ durante 25 minutos generó una apertura progresiva de los estomas como respuesta al aumento en la densidad del flujo fotónico fotosintético y por lo tanto la tasa de asimilación neta de CO₂ aumentó (Lichtenthaler y Bukart, 1999). Esta especie, adaptada a zonas áridas y semi-áridas tolera condiciones más prolongadas de fuerte irradiación. En condiciones naturales, se ha registrado en la zona de estudio PAR hasta de $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en época de sequía, momento en el que la planta pierde sus hojas para evitar la evapotranspiración.

Por otra parte, los efectos de la luz azul no se vieron reflejados en la tasa de asimilación de CO₂ pero sí en los demás parámetros, como la conductancia estomática, la cual ha sido asociada con la apertura de estomas (Talbot *et al.*, 2003; Shimazaki *et al.*, 2007). Sin embargo, en condiciones de PAR constante, como en el presente estudio, se ha reportado que la luz azul induce el cierre estomático (Barillot *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos coinciden con estos antecedentes, ya que se observó una disminución significativa de la conductancia estomática en las plantas tratadas por 8 h (Tabla 5). Sin embargo, se ha discutido que además del cierre de estomas debido a la luz azul, la compleja respuesta estomática desencadena un descenso en la concentración interna de CO₂ (Ci), lo cual pueda a su vez, reabrir los estomas (Jenkins, 1998). Es interesante este hecho puesto que en el presente experimento las plantas tratadas disminuyeron su Ci con respecto a las plantas control. Dos semanas después del experimento,

las plantas no mostraron diferencias en su tasa fotosintética ni estomática e incluso, la transpiración y la Ci fueron significativamente mayores que las registradas en las plantas que no recibieron tratamiento. Se ha reportado que la apertura o cierre estomático ocurre inmediatamente después de la exposición y luego se reestablece (Loreto *et al.*, 2009), por lo que las diferencias observadas en ese momento, probablemente no se deben al tratamiento lumínico.

* Acumulación de terpenos y flavonoides

El tratamiento de luz azul fue el que evidenció mayor efecto sobre la acumulación de flavonoides, con un aumento significativo en la concentración de 11 compuestos en el tratamiento con respecto al grupo control $p \leq 0.05$. Algunos de ellos aumentaron su acumulación 8 días después de aplicado el tratamiento: 6-hidroxiluteolina hexósido B, 1.56 veces con respecto al control ($F_{(3,24)}=7.46$ $P=0.001$), la taxifolina 1.52 veces ($F_{(3,24)}=13.26$ $P < 0.001$), galangina 1.29 y galangina metil éter 1.4 veces con respecto al control ($F_{(3,24)}=2.14$ $P=0.12$ y $F_{(3,24)}=3.06$ $P=0.04$, respectivamente). El eriodictiol y la naringenina incrementaron su concentración en todos los tiempos de muestreo, hasta 1.58 y 1.66 veces por encima del control ($F_{(3,24)}=3.73$ $P=0.02$ y $F_{(3,24)}=3.22$ $P=0.04$, respectivamente). La scutelareina 7-O-hexósido disminuyó su concentración frente al control a las 24 horas después de la aplicación del tratamiento 1.5 veces con respecto al control ($F_{(3,24)}=2.05$ $P=0.1$) (Tabla 6).

Tabla 6. Concentración de flavonoides (mg/g tejido seco) en hojas de *L. graveolens* tratadas con luz azul por 8 horas (Tmto) que mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (C), señaladas con un asterisco ($p \leq 0.05$). Promedios de 4 réplicas \pm error estándar.

Flavonoide	0h	24h		Día 8		Día 15	
		C	Tmto	C	Tmto	C	Tmto
6-hidroxiluteolina hexósido-B	0.34 \pm 0.05	0.9 \pm 0.47	0.9 \pm 0.26	0.85 \pm 0.22	1.33 \pm 0.23*	0.62 \pm 0.15	0.66 \pm 0.09
Taxifolina	0	0.23 \pm 0.053	0.32 \pm 0.05	0.21 \pm 0.04	0.32 \pm 0.05*	0.23 \pm 0.07	0.21 \pm 0.06
Scutelareina 7-O-hexósido	0.59 \pm 0.01	1.21 \pm 0.28*	0.83 \pm 0.27	0	1.24 \pm 0.25*	0.8 \pm 0.08	1.86 \pm 0.2*
3-hidroxifloretin 6'-O-hexósido	0.31 \pm 0.03	0.44 \pm 0.13	0.58 \pm 0.12*	0.61 \pm 0.05	0.78 \pm 0.16	0.63 \pm 0.16	0.89 \pm 0.2*
Floridzina	0.15 \pm 0.02	0.16 \pm 0.04	0.26 \pm 0.07*	0.1 \pm 0.008	0.13 \pm 0.01*	0.08 \pm 0.02	0.08 \pm 0.006
Eriodictiol	0.28 \pm 0.03	0.26 \pm 0.04	0.41 \pm 0.1*	0.26 \pm 0.004	0.37 \pm 0.12*	0.18 \pm 0.03	0.27 \pm 0.05*
Quercetina	0.19 \pm 0.01	0.14 \pm 0.02	0.18 \pm 0.02*	0.15 \pm 0.02	0.17 \pm 0.02*	0.11 \pm 0.02	0.12 \pm 0.02
Naringenina	0.62 \pm 0.07	0.41 \pm 0.02	0.62 \pm 0.08*	0.38 \pm 0.15	0.63 \pm 0.21*	0.24 \pm 0.05	0.39 \pm 0.1*
Pinocembrina	1.18 \pm 0.1	0.72 \pm 0.36	1.31 \pm 0.21*	0.84 \pm 0.22	1.45 \pm 0.23*	0.43 \pm 0.14	0.52 \pm 0.24
Galangina	1.72 \pm 0.65	1.91 \pm 0.52	2.08 \pm 0.45	1.64 \pm 0.63	2.12 \pm 0.29*	1.01 \pm 0.02	0.84 \pm 0.5
Galangina metil éter	0.8 \pm 0.09	0.73 \pm 0.62	1 \pm 0.18	0.84 \pm 0.31	1.18 \pm 0.18*	0.44 \pm 0.01	0.42 \pm 0.21

Por su parte, la mayoría de terpenos en este tratamiento disminuyeron significativamente su concentración (tabla 7) con respecto al control, excepto el α -felandreno ($F_{(3,24)}=4.42$ $P=0.046$) después de 15 días de tratamiento que aumentó 4.5 veces, el *o*-cimeno 1.4 veces el día 8 después de aplicado el tratamiento ($F_{(3,24)}=5.41$ $P=0.005$) y el γ -eudesmol a los 15 días con un aumento de 30 veces por encima de la concentración del grupo control.

Tabla 7. Concentración de terpenos (mg/g tejido fresco) en hojas de *L. graveolens* tratadas con luz azul por 8 horas que mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control * $p \leq 0.05$ Promedios de 4 réplicas \pm error estándar.

Terpeno	0h	24h		Día 8		Día 15	
		C	Tmto	C	Tmto	C	Tmto
1-R- α -pineno	0.23 \pm 0.13	1 \pm 0.79*	0.25 \pm 0.1	0.04 \pm 0.01	0.08 \pm 0.06	0.12 \pm 0.02	0.2 \pm 0.07
Eucaliptol	1.19 \pm 0.86	2.19 \pm 0.72*	0.82 \pm 0.29	0.39 \pm 0.16	0.21 \pm 0.17	0.6 \pm 0.24	0.7 \pm 0.25
α -terpineol	0.15 \pm 0.1	0.24 \pm 0.04*	0.1 \pm 0.04	0.04 \pm 0.02	0.02 \pm 0.02	0.06 \pm 0.03	0.11 \pm 0.04
Alcanfor	0.04 \pm 0.04	0.13 \pm 0.07*	0.03 \pm 0.02	0.02 \pm 0.02	0.02 \pm 0.02	0.05 \pm 0.03	0.04 \pm 0.04
o-cimeno	0.97 \pm 0.49	0.51 \pm 0.25	0.44 \pm 0.17	0.09 \pm 0.04	0.13 \pm 0.1*	0.85 \pm 0.25	0.76 \pm 0.08
terpinen-4-ol	0.08 \pm 0.02	0.06 \pm 0.002	0.09 \pm 0.04	0.01 \pm 0.009	0.01 \pm 0.005	0.08 \pm 0.03*	0.04 \pm 0.02
Timol	4.96 \pm 3.4	1.48 \pm 1.66	0.16 \pm 0.08	0.0003 \pm 0.0003	0.006 \pm 0.007	12.75 \pm 4.27*	2.61 \pm 2.14
α -felandreno	0.66 \pm 0.75	1.21 \pm 0.97	1.75 \pm 0.79	0.1 \pm 0.08	0.7 \pm 0.69	0.29 \pm 0.13	1.31 \pm 0.56*
γ -eudesmol	0.014 \pm 0.017	0.02 \pm 0.016*	0.002 \pm 0.003	0	0	0.003 \pm 0.001	0.09 \pm 0.004*

El tratamiento de flujo fotónico alto también indujo el incremento significativo de la mayoría de flavonoides a las 24h: scutelareina-7-O-hexósido aumentó 1.3 veces con respecto al control ($F_{(3,24)}=2.23$ $P=0.1$), pinocembrina 1.62 veces ($F_{(3,24)}=5.85$ $P=0.004$), 6,7-dimetilscutelareina 1.5 veces y el kaempferol aumentó 33.3 veces con respecto al control ($F_{(3,24)}=10.4$ $P=<0.001$ y ($F_{(3,24)}=3.02$ $P=0.09$, respectivamente). Al día 8 aumentó 3 veces con respecto al control la 6-hidroxiluteolina-hexósido B ($F_{(3,24)}=8.12$ $P=<0.001$), mientras que el día 15 la floridzina, aumentando 1.86 veces ($F_{(3,24)}=5.42$ $P=0.05$). Los siguientes flavonoides aumentaron significativamente en dos momentos: taxifolina (1.41 y 2.4 veces más que el control; $F_{(3,24)}=10.36$ $P=<0.001$), quercetina (1.5 y 1.45 veces con respecto al control; $F_{(3,24)}=1.92$ $P=0.1$), naringenina (1.79 y 1.95 veces más que el control; $F_{(3,24)}=11.06$ $P=<0.001$), galangina (1.5 y 2 veces más; $F_{(3,24)}=5.60$ $P=0.025$) y galangina metil éter (1.73 y 1.9 veces más que el control; $F_{(3,24)}=10.56$ $P=0.003$). Los anteriores resultados se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8. Concentración de flavonoides (mg/g tejido seco) en hojas de *L. graveolens* tratadas con flujo fotónico alto por 1 hora (Tmto) que mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (C), ** $p \leq 0.05$ * $p \leq 0.1$ Promedios de 4 réplicas \pm error estándar.

Flavonoide	0h	24h		Día 8		Día 15	
		C	Tmto	C	Tmto	C	Tmto
6-hidroxiluteolina hexósido-B	0.34 \pm 0.05	1.16 \pm 0.47	1.45 \pm 0.32	0.08 \pm 0.02	0.24 \pm 0.1**	0.6 \pm 0.44	1.1 \pm 0.39
Taxifolina	0	0.17 \pm 0.09	0.24 \pm 0.01**	0.02 \pm 0	0.07 \pm 0.01	0.1 \pm 0.04	0.24 \pm 0.05**
Scutelareina 7-O-hexósido	0.59 \pm 0.01	0.48 \pm 0.06	0.65 \pm 0.07**	0.18 \pm 0.02	0.3 \pm 0.08	0.58 \pm 0.38	0.82 \pm 0.37
Floridzina	0.15 \pm 0.02	0.1 \pm 0.02	0.11 \pm 0.01	0.03 \pm 0.008	0.06 \pm 0.02	0.07 \pm 0.03	0.13 \pm 0.06**
Quercetina	0.19 \pm 0.01	0.12 \pm 0.006	0.15 \pm 0	0.06 \pm 0.02	0.09 \pm 0.02**	0.11 \pm 0	0.16 \pm 0.08**
Naringenina	0.62 \pm 0.07	0.28 \pm 0.05	0.36 \pm 0.03	0.14 \pm 0.03	0.25 \pm 0.04*	0.22 \pm 0.09	0.43 \pm 0.19**
Pinocembrina	1.18 \pm 0.1	0.56 \pm 0.16	0.91 \pm 0.13**	0.34 \pm 0.07	0.48 \pm 0.06	0.65 \pm 0.28	0.97 \pm 0.34
Galangina	1.72 \pm 0.66	1.37 \pm 0.45	2.08 \pm 0.45*	0.92 \pm 0.25	1.39 \pm 0.22	1.61 \pm 0.55	3.26 \pm 1.04**
Galangina metil éter	0.8 \pm 0.09	0.69 \pm 0.18	1.19 \pm 0.06**	0.36 \pm 0.13	0.63 \pm 0.09	0.72 \pm 0.22	1.37 \pm 0.4**
Kaempferol	0.43 \pm 0.04	0.009 \pm 0	0.3 \pm 0.06**	0.08 \pm 0.02	0.16 \pm 0.04	0.11 \pm 0.04	0.21 \pm 0.07
6,7-dimetilscutelareina	0.31 \pm 0.04	0.14 \pm 0	0.21 \pm 0.03**	0	0	0	0

Bajo este mismo tratamiento, la concentración de algunos terpenos: eucaliptol ($F_{(3,24)}= 2.91 P=0.05$), α -terpineol ($F_{(3,24)}= 1.73 P=0.1$), cariofileno ($F_{(3,24)}= 1.87 P=0.1$), α -cariofileno ($F_{(3,24)}= 2.33 P=0.1$), limonano ($F_{(3,24)}= 3.59 P=0.070$) y 3-careno ($F_{(3,24)}= 4.78 P=0.039$) aumentaron significativamente con respecto al control (Tabla 9), la mayoría de ellos a las 24 horas después del tratamiento. Este incremento fue evidente en el limonano pues con respecto al control aumentó 167.5 veces a las 24 horas y de 11 veces a los 8 días. El 3-careno aumentó 32.5 y 18 veces, respectivamente, mientras que en los demás compuestos el incremento estuvo entre 5 y 8 veces más con respecto al control.

Tabla 9. Acumulación de terpenos, en mg/g tejido fresco, afectada por el tratamiento de flujo fotónico alto por 1 hora en hojas de *L. graveolens* ** $p \leq 0.05$ * $p \leq 0.1$ Promedios de 4 réplicas \pm error estándar.

Terpeno	0h	24h		Día 8		Día 15	
		C	Tmto	C	Tmto	C	Tmto
Eucaliptol	0.28 \pm 0.14	0.05 \pm 0.03	0.26 \pm 0.13**	0.3 \pm 0.28	0.31 \pm 0.19	0.04 \pm 0.03	0.12 \pm 0.05
α -terpineol	0.02 \pm 0.007	0.004 \pm 0.002	0.01 \pm 0.003	0.02 \pm 0.02	0.019 \pm 0.009	0.004 \pm 0.002	0.02 \pm 0.01*
3-careno	0.04 \pm 0.03	0.008 \pm 0.003	0.26 \pm 0.19**	0.02 \pm 0.008	0.36 \pm 0.29**	0.005 \pm 0.001	0.005 \pm 0.001
Cariofileno	0.07 \pm 0.03	0.01 \pm 0.002	0.08 \pm 0.05*	0.08 \pm 0.09	0.11 \pm 0.08	0.01 \pm 0.008	0.03 \pm 0.01
α -cariofileno	0.03 \pm 0.01	0.006 \pm 0.001	0.04 \pm 0.02*	0.04 \pm 0.04	0.04 \pm 0.03	0.008 \pm 0.004	0.01 \pm 0.006
Limonano	0.02 \pm 0.01	0.004 \pm 0.001	0.67 \pm 0.05*	0.01 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01*	0.02 \pm 0.02	0.01 \pm 0.01

* Densidad de tricomas glandulares

En las hojas de las plantas tratadas con luz azul, la densidad de tricomas glandulares aumentó tanto en el haz como en el envés a 24 horas de aplicado el tratamiento ($F_{(3,88)}=12.18 P=<0.001$); pero el día 8 disminuyó. El aumento en el número de tricomas glandulares fue evidente en las hojas tratadas con flujo fotónico alto, especialmente en el envés de las hojas (Figura 14), con un aumento conspicuo el día 15 post-tratamiento ($F_{(3,88)}=5.49 P=0.002$).

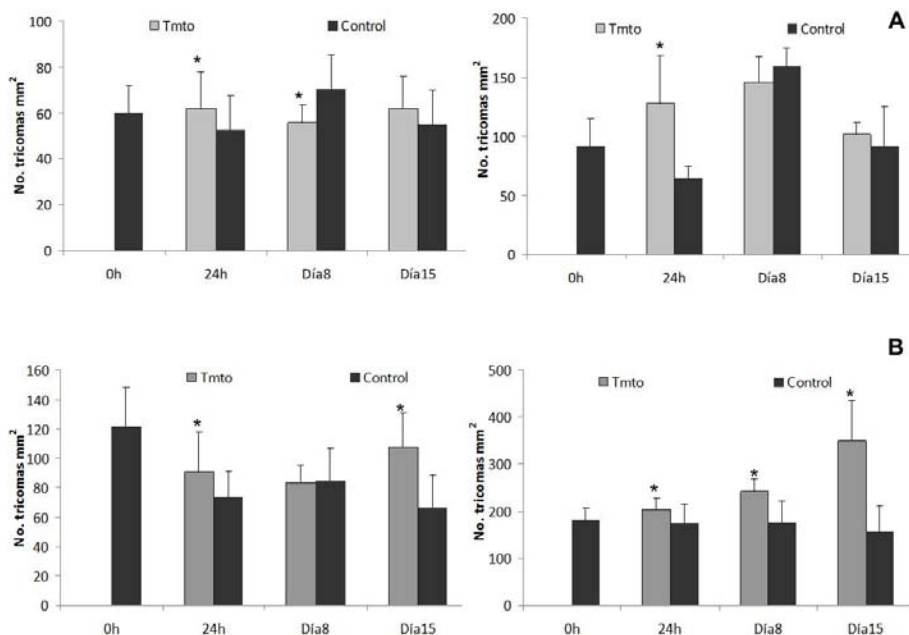


Figura 14. Densidad de tricomas glandulares en haz (izquierda) y en envés (derecha) de hojas de *L. graveolens* sometidas a luz azul por 8 h (A) y a flujo fotónico alto por 1 h (B). Los asteriscos muestran los grupos que mostraron diferencias significativas con respecto al control $p \leq 0.05$

* Expresión de *chs* y *tps*

Mediante la técnica de hibridación dot blot se identificó el aumento significativo del transcrito del gen *chs* en plantas tratadas con luz azul y flujo fotónico alto, a las 12h e inmediatamente después de la aplicación del tratamiento, respectivamente ($t < 0.05$). Los transcritos del gen *tps* bajo estos tratamientos disminuyeron en primera instancia (a las 8 h en plantas tratadas con luz azul y a las 4 h en plantas tratadas con flujo fotónico alto), pero luego incrementaron su concentración (Figura 15).

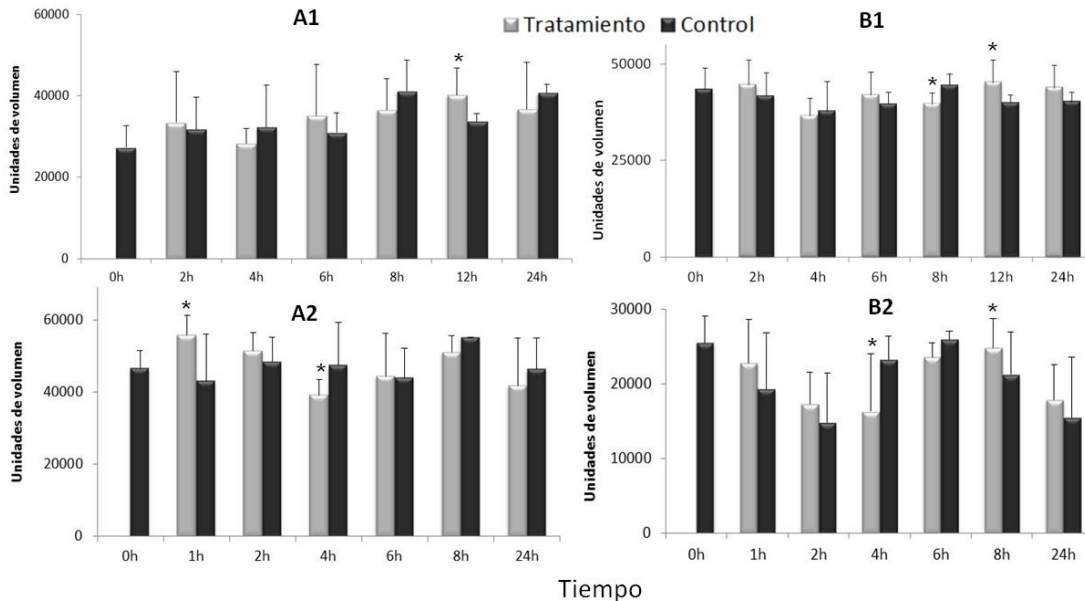


Figura 15. Cuantificación de transcritos *chs* (A) y *tps* (B) en plantas de *L. graveolens* sometidas a luz azul (1) y flujo fotónico alto (2). Los asteriscos muestran los grupos que mostraron diferencias significativas con respecto al control $t \leq 0.05$.

5.2 Tratamiento hídrico

* Parámetros fisiológicos

En las plantas con suspensión de riego por una semana, la tasa fotosintética ($F_{(3,24)}=84.59$ $P < 0.001$) y la transpiración ($F_{(3,24)}=32.88$ $P < 0.001$) disminuyeron significativamente en comparación con las plantas control. La rehidratación no logró re-establecer las condiciones fisiológicas (Figura 16), evidenciado además con la mortalidad de plantas 2 semanas después del experimento. El efecto negativo del déficit hídrico sobre la fotosíntesis ha sido ampliamente reportado (Chaves *et al.*, 2003; Flexas *et al.*, 2004). El déficit hídrico reduce la conductancia estomática antes de que el potencial hídrico de la hoja caiga a niveles críticos con el fin de evitar las consecuencias adversas en los tejidos foliares y en el sistema de transporte de agua. El cierre estomático genera una limitación estomática para la fotosíntesis. Bajo un estrés hídrico severo, la eficiencia del fotosistema II también disminuye (Da Graça *et al.*, 2010) y esto tiene como consecuencia que la tasa de asimilación de CO_2 descienda. Además, un déficit hídrico prolongado induce la cavitación de los elementos del xilema, lo que limita aún más la llegada de agua disponible a las hojas (Guyot *et al.*, 2012), amplificando los efectos en la conductancia estomática y en la actividad fotosintética. Después de la re-hidratación no hubo recuperación de los parámetros fotosintéticos, lo que demuestra que la suspensión de riego por una semana en esta especie genera consecuencias irreversibles en la asimilación fotosintética.

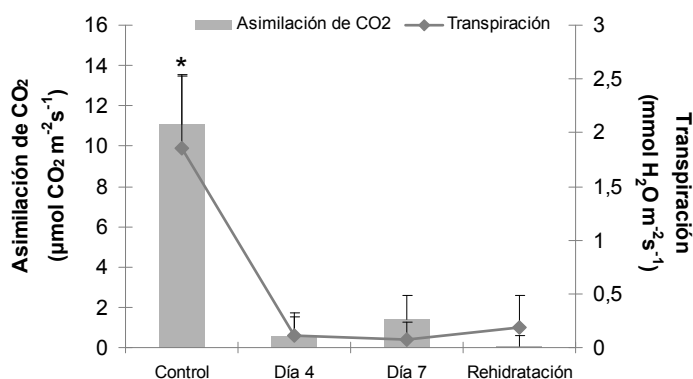


Figura 16. Asimilación de CO₂ y transpiración en plantas de *L. graveolens* con riego suspendido por una semana y en plantas control con riego al 80% de capacidad de campo. Las barras indican el error estándar de 4 réplicas y, * las diferencias significativas $p \leq 0.05$

* Acumulación de terpenos y flavonoides

Los monoterpenos camfeno ($F_{(2,9)}=5.41$ $P=0.029$), α -felandreno ($F_{(2,9)}=2.50$ $P=0.13$), limoneno ($F_{(2,9)}=6.22$ $P=0.02$) y alcanfor ($F_{(2,9)}=4.42$ $P=0.046$) aumentaron su concentración con el tratamiento hídrico, con respecto al control 3.2, 5.86, 3.8 y 3.4 veces, respectivamente. El timol presentó las mayores concentraciones en el grupo control ($F_{(2,9)}=5.42$ $P=0.028$), 47 veces por encima de las plantas tratadas. Por su parte, solo dos flavonoides aumentaron su concentración en este tratamiento: la galangina metil eter ($F_{(2,9)}=3.03$ $P=0.099$) (1.9 veces con respecto al control) y el kaempferol ($F_{(2,9)}=26.04$ $P<0.001$); éste último en ambos muestreos realizados después de la suspensión de riego (Figura 17).

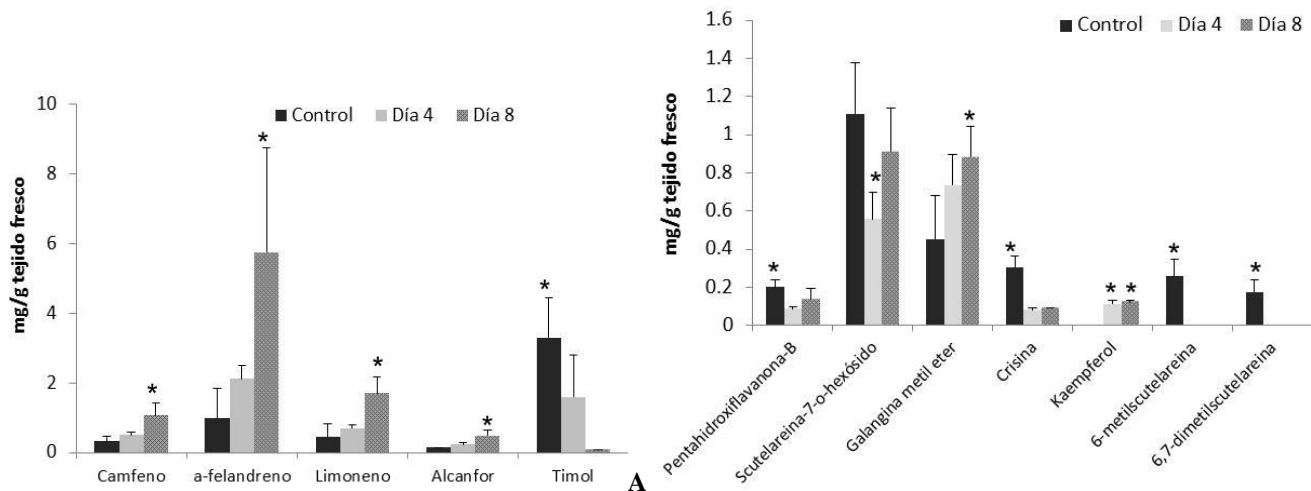


Figura 17. Concentración de terpenos (A) y flavonoides (B) obtenida en plantas de *L. graveolens* sometidas a estrés hídrico. Las barras indican el error estándar de 4 réplicas y * las diferencias significativas $p \leq 0.05$

* Densidad de tricomas glandulares

Este parámetro solo mostró diferencias en el haz de las hojas, con un incremento significativo al completarse la semana sin riego ($F_{(2,33)}=3.81$ $P=0.032$). El envés no presentó diferencias entre grupos experimentales (Figura 18).

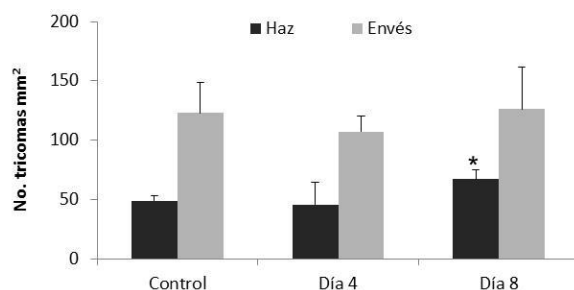


Figura 18. Densidad de tricomas glandulares en haz y en envés de hojas de *L. graveolens* sometidas a estrés hídrico. Los asteriscos muestran los grupos que mostraron diferencias significativas con respecto al control $p \leq 0.05$

* Expresión de *chs* y *tps*

La concentración de los transcritos del gen *chs* aumentó significativamente en las plantas sometidas a estrés hídrico ($t < 0.05$), con respecto al control (Figura 19). No hubo diferencias en la expresión de *tps*.

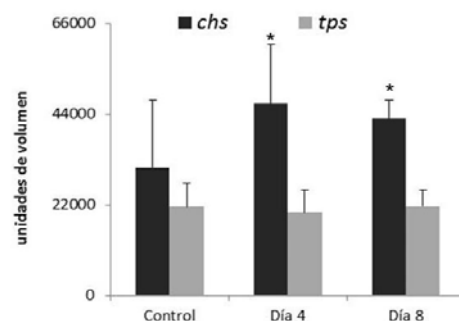


Figura 19. Cuantificación de transcritos *chs* y *tps* en plantas de *L. graveolens* sometidas a estrés hídrico debido a una semana sin riego. Los asteriscos muestran los grupos que presentaron diferencias significativas con respecto al control $t \leq 0.05$

5.4.2 Daño foliar mecánico

* Parámetros fisiológicos

Aunque la asimilación de CO_2 aumentó inmediatamente después del daño mecánico ($F_{(4,30)} = 273.4$ $P < 0.001$) y a partir de las 24 horas disminuyó, la conductancia estomática y la transpiración ($F_{(4,30)} = 5.23$ $P = 0.003$) aumentaron a través del tiempo (Tabla 10), pero con respecto al control disminuyeron sus valores.

Tabla 10. Parámetros fisiológicos afectados por el daño mecánico foliar en *L. graveolens*. * muestran las diferencias significativas del tratamiento (Tmto) con respecto al grupo control $p \leq 0.05$

Parámetro fisiológico	0h	1h		24h		Día 4		Día 8	
		Control	Tmto	Control	Tmto	Control	Tmto	Control	Tmto
Asimilación de CO_2 ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	7.2±2.3	14.1±1.4	18.4±3.1*	9.1±1	10.5±0.8	0.8±0.5	0.6±0.2	3.7±1	1.1±0.6
Conductancia estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0.1±0.02	0.2±0.1*	0.05±0.008	0.1±0.02	0.1±0.02	0.2±0.07	0.1±0.06	0.2±0.02	0.2±0.06
Transpiración ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	4.1±0.7	2.1±0.3	2.9±1	4±0.7	4.1±0.6	5.5±0.8*	3.2±1.3	6±0.4	6.1±1.3

Contrario a lo que se ha reportado sobre disminución de la tasa fotosintética en hojas sometidas a daño mecánico (Hlavackova *et al.*, 2002; Chin-Chen *et al.*, 2004; Schwachtje y Baldwin, 2008), se observó un aumento inmediatamente después del daño y posteriormente no se encontraron diferencias significativas en con respecto al grupo control. Sin embargo, las mediciones fotosintéticas en los estudios mencionados se han realizado en momentos posteriores a 24 horas y/o en la hoja afectada. En *L. graveolens* los registros se llevaron a cabo en hojas que no habían sido dañadas, por lo que es probable que se hayan detectado respuestas sistémicas al daño mecánico local. Por otra parte, se ha reportado el origen fotosintético, en términos del origen de carbono asimilado en este proceso como precursor de algunos monoterpenos (Loreto *et al.*, 1996; Schurmann *et al.*, 1993; Loreto *et al.*, 2000) después de un ataque de herbívoro. El hecho de que la tasa de asimilación de CO₂ aumentara sistémicamente después del daño (la medición del parámetro fotosintético no se realizó en la misma hoja dañada), podría tener un vínculo con la demanda de carbono para afrontar el daño. La disminución inmediata en la conductancia estomática probablemente obedezca a la inminente pérdida de agua y solutos que tiene lugar en la superficie expuesta después del daño al tejido (Howe, 2004), especialmente en un ensayo como éste en el que las plantas se encontraban aisladas en un recipiente plástico que propiciaba un micro-ambiente de alta humedad.

* Acumulación de terpenos y flavonoides

Del conjunto de terpenos que mostraron diferencias debido al tratamiento, el terpinen-4-ol ($F_{(3,24)}= 2.6$ $P=0.076$) y el cariofileno ($F_{(3,24)}= 7.03$ $P=0.001$) aumentaron su concentración a las 24h después de hecho el daño foliar, 3.7 y 2.4 veces con respecto al control. Otros tres monoterpenos tuvieron un incremento y un decremento en diferentes momentos del experimento, y otros dos monoterpenos, el 1-R- α -pineno y el γ -terpineno ($F_{(3,24)}= 3.8$ $P=0.02$ y $F_{(3,24)}= 5.09$ $P=0.03$, respectivamente) disminuyeron la concentración en los grupos tratados con respecto a su control (Tabla 11).

Tabla 11. Concentración de terpenos (mg/g tejido fresco) afectada por el daño mecánico ejercido en hojas de *L. graveolens*. Las barras indican el error estándar de 4 réplicas. Se resaltan las diferencias significativas ** $p \leq 0.05$ * $p \leq 0.1$. Biciclo= = biciclo(3.1.0)hexan-2-ol,2-metil-5-(1-metiletil),(1 α ,2 β ,5 α)

Terpeno	0h	24h		Día 4		Día 8	
		C	Tmto	C	Tmto	C	Tmto
3-thujeno	1.61±0.59	1.26±0.53	3.13±1.63**	4.55±0.47**	2.73±0.55	2.56±1.36**	0.7±0.3
terpinen-4-ol	0.23±0.15	0.23±0.05	0.86±0.24*	0.56±0.5	0.7±0.28	0.04±0.04	0.06±0.07
Cariofileno	4.7±1.64	4.2±0.9	10.09±3.24**	18.4±6.25	14.8±5.68	5.71±3.35	2.55±0.61
1-R- α -pineno	0.91±0.64	1.21±0.58	1.5±0.5	3.92±1.9**	1.76±0.44	0.82±0.4	0.49±0.24
Biciclo	0.06±0.08	1.37±0.47**	0	1.15±0.17	3.07±1.29**	0.19±0.14	0.36±0.29
γ -terpineno	7.02±4.56	6.89±4.31	5.79±4.74	14.06±6.8**	3.2±1.9	5.63±4.62	1.77±1.45
α -terpineno	1.73±0.75	0.31±0.09	2.23±1.4*	1.17±0.98	0.4±0.46	2.8±1.9*	0.22±0.01

Por otro lado, los flavonoides que se vieron afectados por el daño mecánico, fueron tres: 6-metilscutelareina ($F_{(3,24)}= 1.85$ $P=0.1$), 6,7-dimetilscutelareina ($F_{(3,24)}= 1.69$ $P=0.1$) y crisina ($F_{(3,24)}= 1.72$ $P=0.18$). Todos disminuyeron alrededor de 1.5 veces con respecto al control (Figura 20). Es importante anotar que la crisina solo se presentó en las plantas de los experimentos de daño foliar y estrés hídrico.

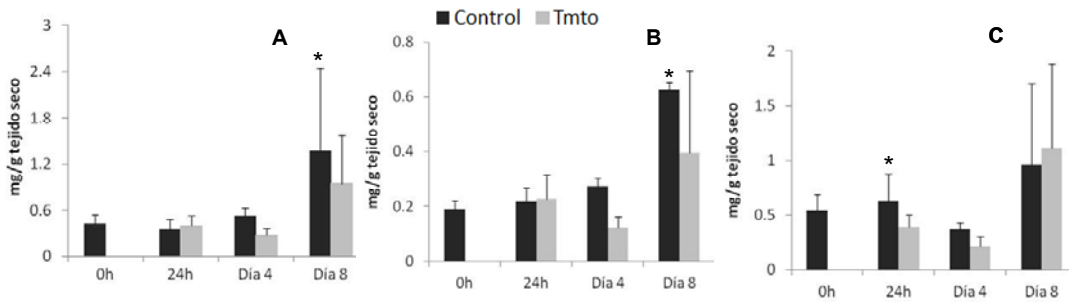


Figura 20. Concentración de flavonoides en plantas de *L. graveolens* sometidas a daño mecánico foliar mecánico. A: 6-metilscutelareina, B: 6,7-dimetilscutelareina, C: crisina. Las barras indican el error estándar de 4 réplicas y * las diferencias significativas $p \leq 0.1$

* Densidad de tricomas glandulares

El número de tricomas disminuyó tanto en el haz ($F_{(3,88)} = 42.82$ $P < 0.001$) como en el envés ($F_{(3,88)} = 24.95$ $P < 0.001$) en las plantas tratadas. En el haz a los 4 y 8 días post-tratamiento y en el envés solo el día 8 después de realizado el daño foliar (Figura 21).

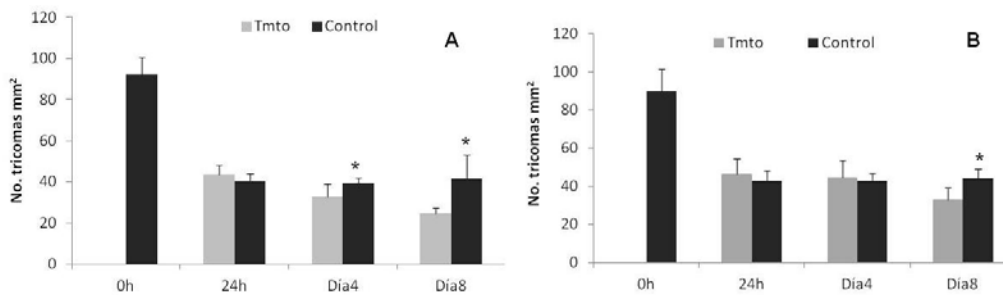


Figura 21. Densidad de tricomas glandulares en haz (A) y en envés (B) de hojas de *L. graveolens* con daño mecánico. Los asteriscos muestran los grupos que presentaron diferencias significativas con respecto al control $p \leq 0.05$

* Expresión de *chs* y *tps*

La concentración de los transcritos del gen *chs* en plantas sometidas a daño foliar mecánico aumentó 3 horas después del tratamiento. Por el contrario, la concentración de los transcritos del gen *tps* disminuyó a las 6 horas, con respecto al control (Figura 22).

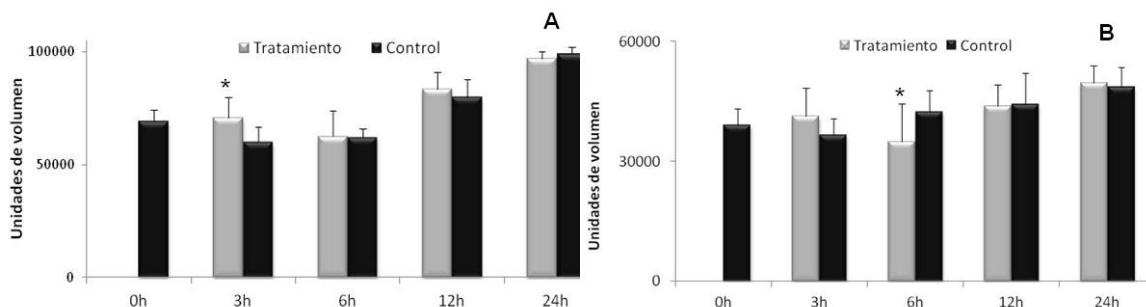


Figura 22. Cuantificación de transcritos *chs* (A) y *tps* (B) en plantas de *L. graveolens* sometidas a daño foliar mecánico. Los asteriscos muestran los grupos que mostraron diferencias significativas con respecto al control $t \leq 0.05$

5.4.4 Respuestas en plantas silvestres

Los parámetros fisiológicos de asimilación de CO₂ ($F_{(1,15)} = 28.29$ $P < 0.001$), conductancia estomática $F_{(1,15)} = 9.91$ $P = 0.007$) y transpiración $F_{(1,15)} = 12.55$ $P = 0.003$) fueron mayores en épocas de lluvias en las

dos localidades, siendo mayores en Zapotitlán Salinas (Tabla 12). La concentración interna de CO₂, por el contrario, fue menor en la época de sequía ($F_{(1,13)}=6.08$ $P=0.028$). Hubo diferencias estadísticas en la humedad relativa durante la época de secas en San Rafael y en Zapotitlán Salinas, 33.9% y 25.6% respectivamente, pero no en la irradiación ($t \leq 0.05$) con un promedio de 1226.8 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Mientras que la diferencia de la humedad relativa en San Rafael alcanzó el 44.6% en contraste con 25.6% de humedad en la época de sequía.

Tabla 12. Parámetros fisiológicos en plantas silvestres de *L. graveolens* de dos localidades, en dos épocas contrastantes del año. Los números indican las diferencias significativas entre los grupos $p \leq 0.05$

Parámetro fisiológico	San Rafael		Zapotitlán Salinas	
	Sequía	Lluvias	Sequía	Lluvias
Asimilación de CO ₂ ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	1.80±0.27 ^{2a}	2.42±0.44 ^{2ab}	1.01±0.48 ^{2b}	9.32±1.79 ¹
Conductancia estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	0.002±0.003 ³	0.011±0.0004 ²	0.01±0.015 ²	0.04±0.004 ¹
Transpiración ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	0.09±0.04 ²	0.4±0.15 ²	0.11±0.03 ²	0.85±0.33 ¹
Conc. interna de CO ₂ ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol aire}^{-1}$)	42.04±7.59 ²	28.07±15.38 ²	305.23±156.9 ¹	10.17±6.81 ²

Las diferencias señaladas anteriormente en la humedad de cada localidad y época, explican los mayores valores de fijación de CO₂, conductancia estomática y transpiración. La apertura estomática en condiciones favorables de humedad, permite la entrada de CO₂ sin pérdida de vapor de agua, lo que se traduce en un incremento en la asimilación de CO₂. Por su parte, la relación inversa de éste parámetro con la Ci ha sido reportada previamente en esta especie (Moreno, 2009) y podría estar asociado al hecho de que en condiciones de sequía (temperaturas e irradiación elevadas, déficit hídrico prolongado) exista fotoinhibición, de modo que el CO₂ que logra entrar a la célula pese a la disminución de conductancia estomática, no puede ser fijado debido a la inhabilidad bioquímica para llevar a cabo dicho proceso.

Los monoterpenos mayoritarios en las plantas silvestres mostraron diferencias entre localidades y momento de recolecta. Las plantas provenientes de San Rafael mostraron altas concentraciones de eucaliptol y *o*-cimeno ($F_{(1,16)}=20.62$ $P < 0.001$ y $F_{(1,16)}=13.27$ $P=0.002$) con los mayores valores en época de secas; mientras que las plantas de Zapotitlán Salinas acumulan carvacrol, en concentraciones significativamente mayores durante la época de lluvias y timol en época de secas ($t \geq 0.05$) (Figura 23).

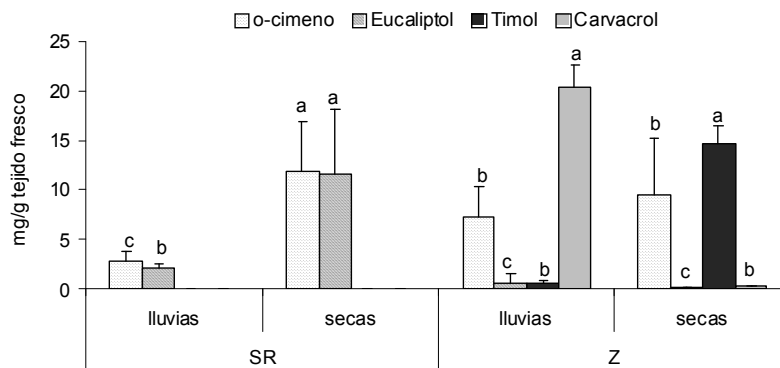


Figura 23. Concentración de monoterpenos mayoritarios en muestras silvestres de *L. graveolens*, provenientes de San Rafael (SR) y de Zapotitlán Salinas (Z), Puebla en dos épocas contrastantes del año. Las barras indican error estándar y las letras, las diferencias significativas de cada uno de los compuestos ($p \leq 0.05$).

Además de los compuestos mayoritarios de los individuos silvestres, otros también presentaron diferencias significativas en sus concentraciones (Tabla 13), por lo general los valores más altos se presentaron en la época de sequía en las plantas de San Rafael, excepto por el α -felandreno y el cariofileno.

Tabla 13. Concentración de terpenos (mg/g tejido fresco) en plantas silvestres de *L. graveolens* de dos localidades en dos épocas contrastantes del año. Las letras indican diferencias significativas entre grupos por cada compuesto. \pm Error estándar de 4 réplicas.

Compuesto	San Rafael		Zapotitlán Salinas		ANOVA
	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	
1-R- α -pineno	3.70 \pm 1.7 ^a	1.07 \pm 0.33 ^b	0.11 \pm 0.006 ^c	0.14 \pm 0.08 ^b	F _(1,16) =8.56 P=0.01
Camfeno	0.99 \pm 0.65 ^a	0.49 \pm 0.44 ^b	0 ^b	0.05 \pm 0.02 ^b	F _(1,16) =4.69 P=0.046
2(10)-pineno	0.27 \pm 0.35 ^b	0.13 \pm 0.11 ^b	0.24 \pm 0.09 ^b	0.57 \pm 0.17 ^a	F _(1,16) =2.23 P=0.15
α -felandreno	0.69 \pm 0.56 ^b	2.56 \pm 0.96 ^a	0 ^b	0.06 \pm 0.02 ^b	F _(1,16) =16.93 P=<0.001
Limoneno	2.3 \pm 0.66 ^a	1.18 \pm 0.37 ^b	0.22 \pm 0.09 ^c	0.11 \pm 0.06 ^c	F _(1,16) =30.13 P=<0.001
Terpinen-4-ol	1.91 \pm 1.3 ^a	0.26 \pm 0.1 ^b	0.15 \pm 0.02 ^b	0.15 \pm 0.006 ^b	F _(1,16) =3.4 P=0.08
α -terpineol	0.62 \pm 0.33 ^a	0.116 \pm 0.02 ^b	0.01 \pm 0.01 ^b	0.026 \pm 0.02 ^b	F _(1,16) =7.47 P=0.015
Cariofileno	1.63 \pm 0.59 ^a	1.57 \pm 0.43 ^a	1.04 \pm 0.21 ^a	0.95 \pm 0.36 ^b	F _(1,16) =3.67 P=0.074

Por otro lado, los flavonoides, las pentahidroflavonas-hex A y B (F_(1,8)=10.58 P=0.012 y F_(1,8)=48.76 P=<0.001), así como las 6-hidroxiluteolinas-hex A y B (F_(1,8)=35.35 P=<0.001 y F_(1,8)=32.44 P=<0.001) fueron significativamente mayores en su concentración en época de lluvias, especialmente en Zapotitlán Salinas. La quercetina (F_(1,8)=17.56 P=0.003) y la 6,7-dimetilscutelareina (F_(1,8)=5.85 P=0.04), por el contrario, tuvieron valores más altos en la época de secas (Figura 24). Las flavanonas pinocembrina, naringenina y galangina también presentaron mayor concentración en la época de secas, aunque las diferencias no resultaron estadísticamente significativas, y por lo tanto no se muestran en la figura.

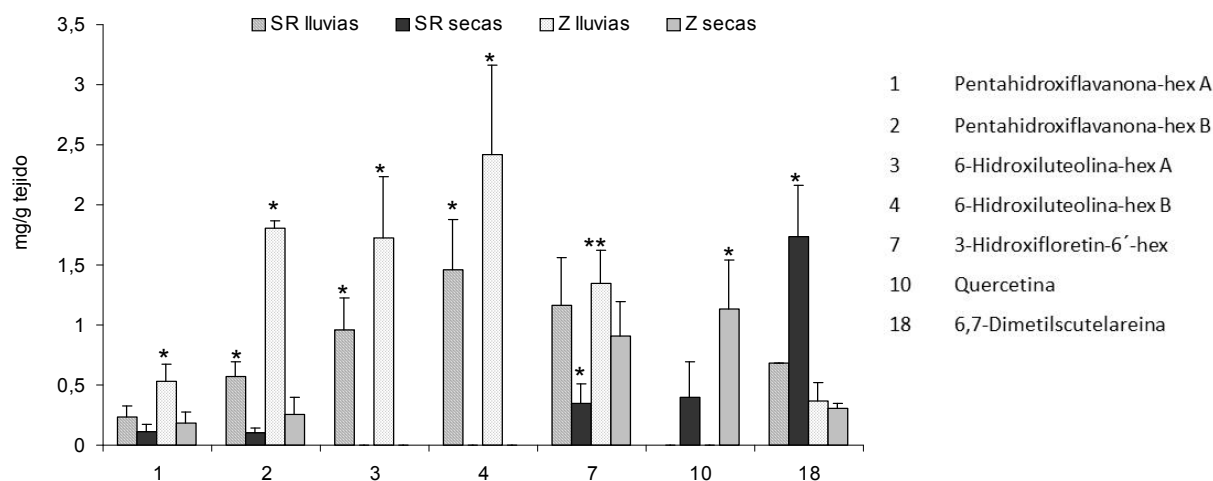


Figura 24. Concentración de flavonoides en plantas silvestres de *L. graveolens* de dos localidades en dos épocas contrastantes del año. Los asteriscos indican las diferencias significativas en cada uno de los compuestos $p \leq 0.05$

Al comparar las concentraciones de metabolitos en las plantas silvestres con los de las plantas en invernadero, se observó que algunos terpenos mostraron diferencias. Las concentraciones de los monoterpenos α -felandreno (F_(2,10)=4.74 P=0.036), *o*-cimeno (F_(2,10)=5.37 P=0.026) y el γ -terpineno

($F_{(2,10)}=5.86$ $P=0.021$) fueron significativamente más altas en plantas crecidas en invernadero (Tabla 14), mientras que el eucaliptol ($F_{(2,10)}=8.56$ $P=0.007$) y el timol ($F_{(2,10)}=5.19$ $P=0.028$) presentaron mayor concentración en las plantas silvestres. Los flavonoides, sin embargo, no mostraron diferencias entre los dos grupos, excepto la pentahidroxiflavanona-hex B ($F_{(2,6)}=9.43$ $P=0.01$) con un alto contenido en las muestras provenientes de Zapotitlán Salinas. Cabe mencionar que aunque los flavonoides mayoritarios como pinocebrina y galangina presentaron valores más altos en las plantas de invernadero bajo condiciones lumínicas particulares (alta intensidad y luz azul), las diferencias no resultaron estadísticamente significativas con respecto a los valores obtenidos en plantas silvestres.

Tabla 14. Comparación de la concentración de terpenos y flavonoides en plantas de *L. graveolens* provenientes de poblaciones silvestres y de invernadero. Los números indican diferencias significativas entre grupos $p \leq 0.05$. \pm Error estándar de 4 réplicas. [§]Indica el tratamiento en el que se obtuvo la mayor concentración en plantas propagadas en invernadero.

Compuesto	San Rafael	Zapotitlán Salinas	Invernadero	Tratamiento [§]
α -felandreno	0.69 \pm 0.56 ²	0.03 \pm 0 ²	4.30 \pm 2.9 ¹	Estrés hídrico día 8
<i>o</i> -cimeno	11.8 \pm 5.07 ²	7.08 \pm 1.33 ³	35.6 \pm 13.2 ¹	Daño, Control
Eucaliptol	11.6 \pm 3.74 ¹	0.13 \pm 0.07 ²	4.38 \pm 1.18 ²	Estrés hídrico día 8
γ -terpineno	0.44 \pm 0.41 ²	0.92 \pm 0.4 ²	14.06 \pm 6.84 ¹	Daño, control
Timol	0 \pm 0 ²	14.6 \pm 1.8 ¹	9.26 \pm 7.04 ²	Daño, día 4
Carvacrol	0 \pm 0 ²	7.0 \pm 3.5 ¹	4.6 \pm 3.2 ¹	Daño, control
Pentahidroxiflavanona-hex B	0.57 \pm 0.12 ²	1.8 \pm 0.06 ¹	0.46 \pm 0.28 ²	Luz azul, día 15
Pinocebrina	0.95 \pm 0.3 ²	0.72 \pm 0.37 ²	1.45 \pm 0.23 ¹	Luz azul, 24h
Galangina	1.84 \pm 0.7 ²	1.91 \pm 1.73 ²	3.26 \pm 1.04 ¹	Alta intensidad, día 4

La densidad en los tricomas glandulares en las muestras silvestres mostró comportamientos contrarios en el haz y en el envés. En el haz, las hojas de Zapotitlán Salinas recolectadas en época de secas tuvieron la mayor cantidad de tricomas glandulares por área ($F_{(1,59)}=9.66$ $P=0.003$), sin diferencias significativas entre localidades (Figura 25); mientras que en el envés la mayor densidad se obtuvo en la época de lluvias ($F_{(1,59)}=13.86$ $P < 0.001$). La densidad de tricomas fue sustancialmente mayor en las hojas silvestres en comparación con la obtenida en plantas de invernadero de todos los tratamientos ($t \geq 0.05$), excepto en plantas sometidas a flujo fotónico alto cuyos valores no mostraron diferencias con los de las plantas provenientes de San Rafael y de Zapotitlán de Salinas.

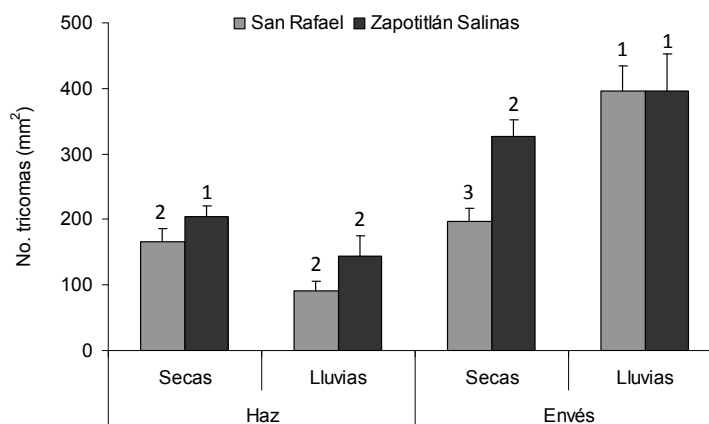


Figura 25. Densidad de tricomas glandulares en haz y en envés de hojas de plantas silvestres de *L. graveolens* provenientes de dos localidades de Puebla, recolectadas en dos épocas del año. Las barras indican el error estándar de 5 réplicas y los números las diferencias significativas en haz y en envés $p \leq 0.05$

La concentración de ambos transcritos, *chs* y *tps*, en las plantas silvestres fue mayor en época de lluvias, excepto para las muestras de Zapotitlán Salinas las cuales presentaron una concentración significativamente mayor del transcrito *tps* en época de secas ($t \geq 0.05$) (Figura 26), en evidente relación con la acumulación de timol, producto de la enzima γ -terpineno sintasa.

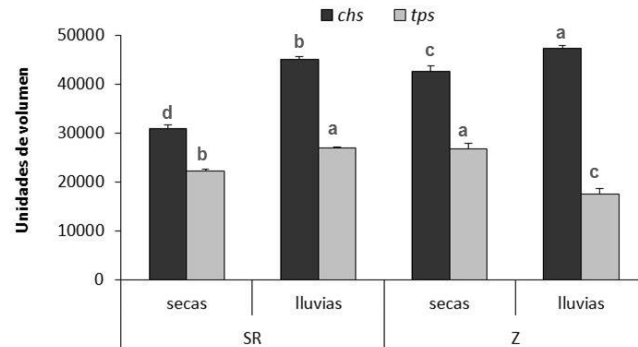


Figura 26. Concentración de los transcritos *chs* y *tps* en muestras silvestres de *L. graveolens* de dos localidades en dos épocas contrastantes del año. Las letras indican las diferencias significativas de cada uno de los genes $t \geq 0.05$

5.4.5 Análisis de componentes principales de todas las variables

El análisis multivariado de componentes principales (PCA) agrupando todas las variables en todos los experimentos abióticos, mostró una asociación del aumento de los tricomas en el haz y en el envés con los tratamientos de flujo fotónico alto y de luz azul en relación con el aumento en la concentración de los flavonoides 6-hidroxiluteolina-hex, pinocembrina y galangina que fueron los compuestos mayoritarios; mientras que las respuestas obtenidas en el experimento de daño mecánico se asoció prioritariamente con terpenos, en especial sesquiterpenos como cariofileno y β -cubebeno e inversamente con la densidad de tricomas glandulares (Figura 27). Algunos flavonoides se asociaron en este análisis probablemente por ser compuestos minoritarios y estar presentes solo en algunos grupos experimentales (crisina, por ej.) como se observa en la parte superior de la figura.

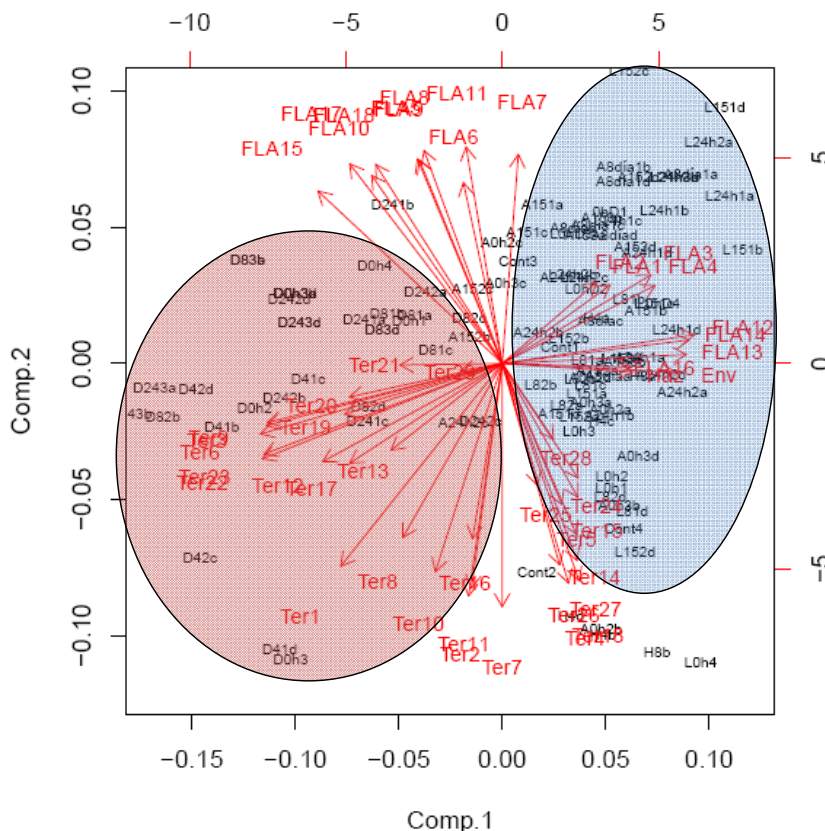


Figura 26. Análisis de componentes principales (PCA) de las muestras de todos los experimentos ($n=128$) en relación con la acumulación de terpenos (Ter), flavonoides (FLA), densidad de tricomas glandulares en haz (haz) y en envés (env). La letra inicial de las muestras indica el tipo de condición abiótica D: daño mecánico (en óvalo rosa), L: luz azul, A: flujo fotónico alto (en óvalo azul), H: estrés hídrico. Proporción acumulada de los 3 primeros componentes= 98%

6. DISCUSION GENERAL

Los tratamientos abióticos manejados en el presente estudio afectaron diferencialmente los parámetros fotosintéticos en *L. graveolens*. El efecto negativo sobre éstos fue esencialmente debido al déficit hídrico generado con la suspensión de riego por una semana. Los tratamientos lumínicos generaron respuestas inmediatas, en la conductancia estomática y en la concentración interna de CO₂ en el caso del tratamiento de luz azul por 8 h; y un aumento de la asimilación de CO₂ con flujo fotónico alto por 1 h. Lo que demuestra la tolerancia de la especie a condiciones adversas, por un tiempo corto. El daño mecánico incrementó la tasa fotosintética sistémica inmediatamente después de la aplicación del tratamiento lo que podría representar un mecanismo para aumentar el CO₂ fijado como materia prima para sintetizar los compuestos (químicos y estructurales) que contrarresten el efecto del daño.

En general, se observó un aumento significativo de la mayoría de flavonoides bajo los tratamientos lumínicos, asociados al aumento en la densidad de tricomas glandulares en el haz y el envés de las hojas. Para los tricomas de tipo D, que fue el tipo de tricoma identificado y cuantificado en este estudio, se ha determinado que su contenido es heterogéneo e incluye sustancias de diversa polaridad. Se ha sugerido que en este tipo de estructuras, la célula basal contiene temporalmente fotosintatos, que son transportados hacia el tallo y cabeza del tricoma donde tiene lugar la síntesis de los componentes del aceite esencial, entre otras sustancias que pueden incluir también flavonoides (Ascensao *et al.*, 1999; Ascensao y Pais, 1998), las cuales son almacenadas en la capa de la(s) célula(s) que hacen parte de la cabeza del tricoma y continuamente se filtran a través de la pared celular para cubrir la superficie de la hoja y así proteger a la planta de microorganismos, herbívoros y radiación ultravioleta.

Comparativamente, el número de tricomas observado fue mayor al reportado en otras especies del género *Lippia* y de familias botánicas emparentadas. Por ejemplo, *L. citriodora* (Argyropoulou *et al.*, 2010) en el envés presentó 5 veces más tricomas que en el haz, con 71 y 14 tricomas en toda una hoja desarrollada, respectivamente; en *Prostanthera ovalifolia* se reportaron 25 tricomas/mm² en ambas caras foliares (Gersbach, 2002); y en cultivares de *Origanum vulgare* se reportan entre 95 y 56 tricomas/mm² (Crocoll *et al.*, 2010), en contraste con los valores de 300/mm² tricomas glandulares en las hojas de las plantas sometidas a flujo fotónico alto (Figura 14) 15 días después de aplicado el tratamiento.

El hecho de que el número de tricomas haya aumentado significativamente a través del tiempo sugiere que esto pueda deberse a un efecto acumulativo de la intensidad de la luz o que es el tiempo necesario para obtener una respuesta fenotípica debido a un factor ambiental. Muchos trabajos han profundizado en el conocimiento de la densidad de tricomas en varias especies y los resultados han sido controversiales. En *Artemisia* se ha reportado que en el estadio de primordios jóvenes se ha dado por terminada la diferenciación de estas estructuras (Duke y Paul, 1993; Davies *et al.*, 2009); otros autores sugieren que la máxima densidad de tricomas se alcanza cuando la hoja llega a su tamaño máximo y posteriormente el número decrece (Shanker *et al.*, 1999; Lommen *et al.*, 2006). Lo cierto es que existen variaciones en este parámetro en la mayoría de especies evaluadas a través del tiempo, y además de incluir explicaciones innatas, ya que la densidad inicial parece ser un rasgo hereditario (Graham *et al.*, 2010), existen otros factores que pueden afectar la densidad de tricomas glandulares, como los factores ambientales tales como la luz (Tattini *et al.*, 2000), agua, fotoperiodo (Snyder y Hyatt, 1984), la altitud y los cambios estacionales (Kofidis y Bosabalidis, 2008); además de factores genéticos y fenológicos, entre otros (Kjaer *et al.*, 2012).

Particularmente, en las plantas tratadas con flujo fotónico alto, la densidad de tricomas se asoció con el aumento en la concentración de los terpenos β -mirceno, β -felandreno, naftaleno y β -cubebeno (Figura

27). De manera interesante, los resultados del tratamiento de luz azul mostraron la misma relación con los sesquiterpenos mencionados, pero no con flavonoides. La asociación positiva de acumulación de terpenos y luz ha sido previamente reportada en especies herbáceas y árboles (Tingey *et al.*, 1987; Staudt y Lhoutellier, 2011). La activación por luz de varias enzimas en la vía MEP puede estar vinculada con esta relación positiva (Rasulov *et al.*, 2010; Rivasseau *et al.*, 2009; Schnitzler *et al.*, 2010). Y aunque por lo general los sesquiterpenos se sintetizan en el citosol, muchos precursores se intercambian entre los compartimentos (Bick y Lange, 2003). Cerca del 80% de los precursores de la vía MEP pueden contribuir a la síntesis de sesquiterpenos (Arimura *et al.*, 2009), lo que podría explicar su acumulación en relación a la luz. Se ha propuesto que la emisión de compuestos volátiles media la termotolerancia y la protección contra el estrés oxidativo eliminando las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés, *reactive oxygene species*) que se puedan generar bajo esta condición (Güllüce *et al.*, 2003).

El aumento de los flavonoides con respecto a la cantidad y tipo de luz, en especial UV-, UV-B y luz azul, ha sido ampliamente demostrada (Fuglevand *et al.*, 1996; Alba *et al.*, 2000; Faktor *et al.*, 1997), con evidencia de su papel como antioxidante. Los flavonoides han demostrado presentar una función asociada con su estructura, siendo determinante el arreglo espacial de los sustituyentes y el número total de grupos hidroxilo, sobretodo en el anillo B, en la actividad antioxidante (Cao *et al.*, 1997; Sekher *et al.*, 2001). Estos grupos hidroxilo donan hidrógeno y un electrón a los radicales hidroxilo, peroxilo y peroxinitrito estabilizando la molécula. Además, el ángulo de torsión en el anillo B con respecto al resto de la molécula también influye. Los flavonoles tienden a ser planos mientras que las flavonas y flavanonas están levemente girados. La planicidad permite la conjugación y resonancia de los electrones y una mayor estabilidad (Heim *et al.*, 2002). Todo lo anterior explica el aumento en la mayoría de flavonoides en el tratamiento de alto flujo fotónico, la mayoría de ellos hidroxilados en el anillo B incluyendo un flavavanol (taxifolina), flavonas (6-hidroxiluteolina-hexósido) y flavonol (quercetina). Estos dos últimos con reportes de su incremento debido a la luz y no del tratamiento hídrico en *Ligustrum vulgare* (Guidi *et al.*, 2008). La mayoría de compuestos incrementaron su concentración a las 24 h de flujo fotónico alto, y el día 8 en luz azul; corroborando la primera parte de la hipótesis planteada en el presente trabajo, lo cual indica que la intensidad de luz es una condición que regula la acumulación de flavonoides hidroxilados.

Es interesante resaltar que esto concuerda con el incremento significativo en la expresión del gen chalcona sintasa *chs*, más sobre expresada ante flujo fotónico alto (1 h después del tratamiento) que la expresión del gen de plantas sometidas a luz azul por 8 horas (12 h después del tratamiento). Se ha demostrado una relación causal directa entre la luz y los picos de detección de RNAm de chalcona sintasa, la enzima y los productos en células cultivadas de perejil en las primeras 10-24 horas (Schmeltzer *et al.*, 1988), lo que concuerda con los resultados del presente trabajo. Los antecedentes en este tópico señalan que la rápida síntesis de flavonoides es resultado de una activación genética dependiente de la luz (así como de radiaciones UV), lo que apoya fuertemente el papel de estos compuestos como pigmentos foto-protectores. Esta activación viene dada por la regulación de la caja G, secuencias de ADN de la región promotora de *chs* (Morishita *et al.*, 2009). Estudios recientes han contribuido al conocimiento en este campo, describiendo otros promotores, como P1 en maíz, cuya actividad responde a la radiación UV-B (Rius *et al.*, 2012). La activación puede estar regulada positivamente por ROS (Mackerness *et al.*, 2001; Babu *et al.*, 2003). Se ha sugerido que los flavonoides pueden jugar un papel importante en mantener la concentración de ROS a niveles subtóxicos (Gould *et al.*, 2002; Agati *et al.* 2007).

Para la enzima γ -terpineno sintasa cuyo producto es el γ -terpineno, precursor inmediato de los monoterpenos fenólicos timol y carvacrol (Poulose y Croteau, 1978), el nivel de expresión también aumentó más rápidamente con el tratamiento de flujo fotónico alto (después de 8 h) que con luz azul (después de 12 h). Aunque ninguno de estos 3 terpenos mostró diferencias significativas en su acumulación, sí mostraron un aumento con respecto al control. Después de 15 días del tratamiento de luz azul, el γ -terpineno aumentó 1.7 veces con respecto al control, y el timol y carvacrol aumentaron a las 24 horas, 9.2 y 1.4 veces con respecto al control, respectivamente. Resultados similares se han reportado para *L. graveolens* tratada con luz azul (Bueno-Durán *et al.*, 2013), condición que no generó estrés fisiológico pero sí el aumento de la concentración de timol.

En el tratamiento de flujo fotónico alto, el γ -terpineno aumentó 3.25 veces con respecto a su control. De manera que la luz, tipo y cantidad, aumentan la expresión de los genes *chs* y *tps* en plantas de *L. graveolens*, generando un incremento en la concentración de los productos de las enzimas que cada uno de estos genes codifica, los cuales pueden actuar como atenuantes del flujo fotónico alto disminuyendo el exceso de radicales libres generados por este factor. Una manera de probar lo anterior, sería por medio de un western blot posterior a la RT-PCR, de forma que revele la cantidad de proteína activa después del tratamiento.

Los resultados obtenidos en condiciones de estrés hídrico y de daño mecánico, difirieron notablemente de los resultados obtenidos con los tratamientos lumínicos. Los terpenos, más que los flavonoides, se asociaron con estas dos condiciones (Figura 17 y Tabla 11) mientras que los tricomas glandulares no aumentaron conspicuamente su densidad. Es relevante mencionar que la asociación en las respuestas genéticas y enzimáticas bajo estas dos condiciones abióticas ya ha sido previamente reportada, y está relacionada a su vez con la respuesta local (entendida como la respuesta en el área vecina al daño, según lo define Bowles, 1993) y la síntesis de etileno, posterior al daño mecánico (Delessert *et al.*, 2004) que activa los genes asociados al estrés hídrico. #

Es interesante resaltar el incremento de kaempferol en plantas con riego suspendido por 4 y 8 días (Figura 17), con valores de cero en las plantas control y de 0.11 y 0.12 mg/g de tejido fresco en plantas tratadas, respectivamente. Este es un flavonol que ha sido reportado en experimentos de invernadero con plantas de *Cistus ladanifer* sometidas a estrés hídrico (Chaves *et al.*, 1997). Estos autores discuten que los flavonoides más metilados son más hidrofílicos que los menos metilados, lo que sugiere que la acumulación de dichos flavonoides corresponde a un mecanismo de defensa contra el estrés hídrico provocado por el déficit de agua. El otro flavonoide que incrementó su concentración en las plantas sometidas a estrés hídrico fue la galangina metil-eter, otro flavonol, que se encuentra metilado. Sin embargo, en nuestro estudio la 6-metilscutelareina y la 6,7-dimetilscutelareina disminuyeron respecto al control lo que refleja una clara discrepancia. La concentración de los transcritos de *chs* aumentó significativamente tanto en el día 4 como el día 8 sin riego, lo que sugiere que antes de alcanzar el punto máximo de estrés fisiológico, se activó la ruta biosintética dirigida particularmente a flavonoles.

En este mismo tratamiento aumentaron su concentración los monoterpenos camfeno, α -felandreno, limoneno, alcanfor y endo-borneol, todos en el día 8, es decir, en el punto de máximo estrés, lo cual está asociado con la actividad antioxidante, importante para contrarrestar el exceso de ROS generadas durante el estrés hídrico (Tattini *et al.*, 2004; Guidi *et al.*, 2008). Además, la deshidratación genera el rompimiento del polímero de almidón, incrementando la concentración de compuestos de bajo peso molecular (Chaves, 1991) que pueden ser usados en la síntesis de metabolitos de defensa. Plántulas de

perejil sometidas a déficit hídrico también mostraron el aumento de varios componentes del aceite esencial, entre ellos el β -felandreno (Petropoulos *et al.*, 2008).

Aunque el transcrito de *tps* en este tratamiento no mostró diferencias significativas, los productos de la enzima fueron siempre mayoritariamente acumulados en las plantas control, lo que corrobora resultados previos en los que se demuestra que el déficit hídrico es irrelevante en la acumulación de timol y carvacrol en *L. graveolens* (Silva y Dunford, 2005), el orégano europeo (*Origanum vulgare*) (Said Al-Ahl y Hussein, 2010) y en la albahaca de clavo, *Ocimum gratissimum* (Osuagwu *et al.* 2010).

En el daño mecánico se observó el aumento de algunos terpenos (3-thujeno, p-menth-1-en-4-ol, α -terpineno y cariofileno) a las 24 h, y simultáneamente la disminución de otros. Las plantas responden al daño mecánico y al ataque de herbívoros con un complejo de vías de señalización que unen la producción de señales químicas y físicas en el sitio del daño y la activación en la expresión de genes y otros procesos celulares. Existen respuestas sistémicas (Howe, 2004) que corresponden a las evaluadas en el presente estudio y que han demostrado ser la prioridad para la planta por encima de la respuesta local. Algunos estudios mencionan que esta respuesta sistémica se da sólo en la parte apical, por encima de la zona donde se ha generado el daño, lo que requiere detallarse según la especie. Lo que sí ha sido recientemente evidenciado, es el patrón de emisión de compuestos volátiles con el patrón de transcritos de sesquiterpeno sintasas, incrementando la biosíntesis de estos compuestos, como el cariofileno (Kollner *et al.*, 2013). Para la *tps* (gama-terpineno sintasa) no hay estudios previos que indiquen su expresión diferencial bajo condiciones abióticas. Los resultados aquí expuestos mostraron una disminución significativa de este gen después de 6 h de realizado el daño mecánico (Figura 22). Sin embargo, dos de los productos de esta enzima, timol y carvacrol, aumentaron su concentración a las 24 h del tratamiento 3.4 y 1.9 veces, respectivamente, con respecto al control aunque sin diferencias significativas. A partir del día 4 después del tratamiento las concentraciones de estos monoterpenos disminuyeron comparados con el control.

Litvak y Monson (1998) también observaron que las emisiones en coníferas decrecían a través del tiempo (3 a 4 días) después del daño mecánico, y se ha discutido que una causa de esta disminución paulatina sea debido a que una capa de isoprenoides puede solidificarse y sellar la herida (Michelozzi, 1999). Sin embargo, esto sólo aplica para las emisiones locales o en las zonas adyacentes a la herida. La segunda hipótesis sugiere que la reducción en la emisión de terpenos puede reflejar el tiempo durante el cual los reservorios (glándulas o ductos) se vacían. Este tiempo dependerá entonces, de la volatilidad de los compuestos y del tamaño interno del pool (Loreto *et al.*, 2000). Esta puede ser también la razón que explique el incremento en la acumulación de timol y carvacrol, no significativo, con relación a la disminución del transcrito de *tps*. A pesar de esto, es llamativo el hecho de que el timol y el carvacrol, monoterpenos con actividad antifúngica, antimicrobiana y asociados con procesos de herbivoría (Hummelbrunner y Isman, 2001; Braga *et al.*, 2008) no aumentaron significativamente bajo este tratamiento, por lo que la segunda parte de la hipótesis, en la que se esperaba un aumento de compuestos conocidos por sus propiedades protectoras a la herbivoría ante el daño mecánico, no se cumplió. El resultado deja abierta la posibilidad de que el daño por sí solo no sea suficiente para activar la vía de señalización para la biosíntesis de estos dos compuestos en el orégano mexicano, y que sean necesarios los elicitores liberados durante el proceso alimenticio de los hervívoros para la inducción y emisión de estos compuestos. Esto ha sido comprobado experimentalmente en otras especies al tratar las plantas con ácido jasmónico, metil jasmonato, coronalon (un derivado sintético del jasmonato) o alameticina (un

elicitador fúngico) generan respuestas de defensa como la emisión de ciertos volátiles, emitidos también después del ataque de un herbívoro (Howe, 2004; Huang *et al.*, 2010).

De manera contrastante, los transcritos de *chs* aumentaron significativamente a las 3 h del daño foliar, pero ningún flavonoide aumentó su concentración. A pesar de que la gran mayoría de autores reportan el control transcripcional para este gen y sostienen que la expresión es constitutiva pero el aumento en la magnitud de esta expresión puede ser inducible por factores bióticos o abióticos (Block *et al.*, 1990; Hartmann *et al.*, 2005; Beritognolo *et al.*, 2002). Incluso en circunstancias de daño mecánico y a nivel sistémico (Richard *et al.*, 2000) también se ha reportado un control a nivel enzimático (Knogge *et al.*, 1986). Los resultados expuestos aquí sugieren que modificaciones post-traduccionales podrían regular la síntesis del producto de *chs*. Hay múltiples formas en las que las plantas pueden incrementar la concentración de un compuesto de defensa: aumentar la tasa de síntesis, inhibir la tasa de degradación o transportarlo de un órgano a otro (Baldwin, 1991) y la complejidad en estos procesos es alta y la respuesta plástica, por lo que es necesario estudios a nivel genético, enzimático y fitoquímico.

#

Los compuestos asociados mediante el análisis de componentes principales, con la densidad de tricomas glandulares no correspondieron necesariamente con los compuestos que vieron afectada su concentración con alguna condición abiótica. Esto no representa más que la posibilidad de que existan monoterpenos acumulados en los tricomas glandulares que no sean inducidos sino constitutivos. O bien, que además de producirse glándulas o tricomas nuevos, los existentes aumenten su contenido, como se ha descrito en algodón (Opitz *et al.*, 2008) y por lo tanto, la densidad no se vio afectada. Son necesarios estudios detallados en tricomas aislados que permitan establecer la naturaleza y la funcionalidad de los mismos en *L. graveolens*.

Plantas silvestres

En las muestras provenientes de individuos silvestres, se obtuvo una gran variación de compuestos secundarios, especialmente en los terpénicos. Este hecho ha sido frecuentemente mencionado en los estudios fitoquímicos de este género (Maia *et al.*, 2003, Stashenko *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2007) y adjudicado a las diferencias ligadas a las mismas poblaciones (Kintzios, 2002), el momento y el lugar de procedencia, factores microclimáticos, condiciones de almacenamiento y al procesamiento de la muestra (Lin *et al.*, 2007; Calvo-Irabien *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2009b). Debido a que en campo las plantas están expuestas a gran cantidad de factores, es difícil establecer cuál ejerce mayor o menor efecto, así como aislarlos ya que son interdependientes entre sí. Una óptima estrategia para solucionar esto podría contemplar obtener dos generaciones filiales y sembrar su progenie tanto en campo como en invernadero evaluando condiciones particulares. Para algunas poblaciones silvestres de *L. graveolens* en Jalisco, se ha reportado que el calor y la sequía son factores asociados con el contenido de aceite esencial (Uribe-Hernández *et al.*, 1992); mientras que en *L. junelliana* la estacionalidad de mes con mes afecta la composición de su aceite esencial (Juliani *et al.*, 2002), y en *L. scaberrima* la composición del mismo varió significativamente entre individuos, incluso dentro de la misma localidad (Combrick *et al.*, 2007); diferencias atribuidas a variaciones genéticas y a pequeñas diferencias del micro ambiente.

Las variaciones fitoquímicas han sido reportadas también en condiciones de invernadero, e incluso en muestras cultivadas de *O. vulgare* en cuanto a composición y cantidad del aceite esencial (Kintzios, 2002); probablemente debidas a variaciones genéticas del germoplasma y semillas. En condiciones controladas, Van Dam y Vrieling (1994) reportaron que un tercio de la variación en las concentraciones de pirrolizidina en *Cynoglossum officinale*, excluyendo los efectos maternos, se debían a la variación genética, la cual puede ser mayor en plantas silvestres (Zangerl y Berenbaum, 1990; Aharoni *et al.*,

2003). Por otra parte, no solo las variaciones genéticas juegan un papel en la variabilidad de una respuesta ante una condición externa (factor ambiental o biótico) sino el umbral o la susceptibilidad de cada individuo (Coleman y Jones, 1991). Esto es, que un estímulo en particular puede o no inducir la acumulación de metabolitos secundarios dependiendo la cantidad del mismo o del número de veces estimule (Van Dam y Vrieling, 1994).

Existen, sin embargo, algunos perfiles constantes o generalizados que pueden permitir el establecimiento de quimiotipos, basados en el aroma predominante que emite la hoja (Bueno-Durán *et al.*, 2012). Los datos obtenidos con el análisis de las hojas provenientes de San Rafael y Zapotitlán Salinas muestran que en las primeras preponderan como compuestos mayoritarios el eucaliptol y/o *o*-cimeno, mientras que los individuos de Zapotitlán Salinas tuvieron altas concentraciones de carvacrol y timol (Figura 23), como se ha reportado previamente en esta localidad (Hernández *et al.*, 2009b). Esto podría corresponder a dos quimiotipos claramente diferenciados, ya que mantienen la acumulación mayoritaria de los mismos compuestos en diferentes épocas del año.

Aunque los compuestos mayoritarios de las plantas de San Rafael presentan concentraciones mayores en época de secas, el carvacrol en las muestras de Zapotitlán Salinas es significativamente mayor en época de lluvias. Es muy probable que estas respuestas diferenciales estén basadas en la funcionalidad de cada compuesto. Mientras que el *o*-cimeno y el eucaliptol presentan actividad antioxidante (Damien *et al.*, 2000; Moteki *et al.*, 2002), eficaces en contrarrestar las ROS generadas ante las condiciones extremas de calor e irradiación en época de secas; el carvacrol es relevante en condiciones de lluvias como agente antifúngico (Hernández *et al.*, 2008, Azirak y Rencuzogullari, 2008; Liolios *et al.*, 2009) para prevenir ataques de hongos que se reproducen en condiciones de elevada humedad. Hernández *et al.* (2009b) reportaron actividad antimicrobiana del extracto hexánico de esta especie ubicada en Zapotitlán Salinas, exclusivamente en época de lluvias. Este hecho se asoció claramente con los patrones de expresión de *tps*, con una reducción significativa de sus transcritos en época de secas (Figura 26).

Aunque las diferencias estadísticamente significativas en la concentración de flavonoides de plantas silvestres mostraron incrementos en la época de lluvias para la mayoría de ellos, en época de secas aumentaron la quercetina y 7-*O*-scutelareina-hexósido (Figura 24), flavonoides con capacidad antioxidante comprobada. Lo anterior corrobora la idea planteada por Vogel *et al.* (2011) en la que el cultivo de plantas de una misma especie proveniente de diferentes regiones puede generar información valiosa respecto a los determinantes genéticos y ambientales en las diferencias basales y en las respuestas interpoblacionales. Esto asociado a la importancia de los perfiles fitoquímicos en la calidad de los aceites esenciales aprovechables para el humano en ámbitos alimenticios y medicinales.

La comparación descriptiva de la composición fitoquímica entre las plantas de invernadero (teniendo en cuenta el valor promedio más alto de cada experimento) con las de poblaciones silvestres mostró que algunos terpenos presentan concentraciones más altas en el último grupo, como era de esperarse (Tabla 14). Sin embargo, el *o*-cimeno y el α -felandreno presentaron concentraciones más altas en las plantas de invernadero (en condiciones control y bajo déficit hídrico, respectivamente), y los niveles de carvacrol en plantas de invernadero sometidas a daño mecánico tuvieron valores semejantes a las plantas de Zapotitlán Salinas. En *Origanum syriacum* se reportó recientemente (Zein *et al.*, 2012) que las plantas cultivadas presentan mayores cantidades de timol y carvacrol que las silvestres. Sin embargo, el trabajo no precisa las condiciones de cultivo.

Para los flavonoides, la comparación fue más homogénea, con diferencias exclusivamente en la pentahidroxi flavanona-B, mayoritariamente acumulada en plantas de Zapotitlán Salinas. Soriano-Melgar (2012) reportaron en *Turnera diffusa* diferencias en la composición de flavonoides entre plantas cultivadas y silvestres, pero no en su actividad antioxidante. Es un ejemplo claro de actividad sinérgica, no solo de un tipo de compuestos, sino de varios de ellos que pueden incluir terpenos e incluso otras vías de señalización inmediatas como la generación de peróxido de hidrógeno y la actividad de varias enzimas; y además demuestra la posibilidad de obtener un grupo de compuestos deseados en condiciones controladas, comparables a lo obtenido en plantas silvestres. Las diferencias en las respuestas entre plantas de campo e invernadero pueden estar relacionadas con el efecto de las condiciones no controladas en las primeras, además de factores como la talla y edad que en los individuos silvestres sobrepasan por mucho a las de invernadero.

El número de tricomas glandulares fue evidentemente mayor en las plantas silvestres que en las de invernadero, y más aún en las provenientes de Zapotitlán Salinas (Figura 25). Montenegro *et al.* (1981) han afirmado que la abundancia de tricomas glandulares y no glandulares aumenta en los órganos de las plantas que crecen en zonas áridas o semiáridas. Conforme a esta afirmación, Andersen *et al.* (2006) describieron, entre múltiples aspectos morfológicos de *Lippia turbinata*, una mayor densidad y mayor tamaño de tricomas glandulares en el envés de las hojas de plantas crecidas en ambientes xerófitos con respecto a las plantas crecidas en ambientes mesófilos. Así mismo, la densidad de tricomas descrita por estos autores fue mucho menor en plantas de cultivo *in vitro*, de manera similar a lo registrado en el presente estudio con las plantas crecidas en invernadero. Kofidis *et al.* (2003) establecieron para *Origanum vulgare* que la altitud se asocia con la densidad de tricomas glandulares, siendo las plantas de zonas a baja altitud las que mayor número de tricomas presentan en el envés lo cual puede ser aplicado para *L. graveolens*. El aumento en la densidad de tricomas puede disminuir el movimiento de aire en la superficie foliar y permitir la retención del vapor de agua que difunde del interior al exterior por lo que aumenta la humedad relativa. Además, la capa de metabolitos secretada por estos tricomas puede incrementar la reflectancia de la luz, regulando la temperatura de la hoja (Wagner, 1991). Todo esto demuestra el papel protector de los tricomas glandulares ante condiciones adversas de exceso de luz y escasez de humedad, condiciones presentes en las dos localidades estudiadas, y controladas y con valores menores en el ambiente de invernadero.

7. CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio revelan de forma novedosa para *Lippia graveolens*, la relación entre la acumulación de compuestos secundarios con la expresión de dos genes involucrados en las rutas biosintéticas de flavonoides y terpenos, *chs* y *tps* respectivamente, y con la densidad de tricomas glandulares en plantas sometidas a diferentes tratamientos abióticos en condiciones controladas y en plantas silvestres de dos poblaciones de Puebla, México.

Los factores abióticos de luz, estrés hídrico y daño foliar mecánico afectan la composición fitoquímica de *L. graveolens*, y aunque no generen necesariamente una condición de estrés fisiológico, los parámetros estomáticos se ven afectados. La suspensión de riego por una semana fue el único tratamiento que repercutió negativa e irreversiblemente en la tasa de asimilación de CO₂ en *L. graveolens*.

Los tratamientos lumínicos, flujo fotónico alto por una hora y luz azul por 8 horas, incrementaron la concentración de flavonoides desde las 24 horas, en relación positiva con el aumento en la concentración de los transcritos del gen *chs*, 1 hora después de aplicado el tratamiento en el caso del flujo fotónico alto, y 12 horas en las plantas tratadas con luz azul. La densidad de tricomas glandulares también se vio asociada positivamente con ambos tratamientos y con la acumulación de los flavonoides 6-hidroxiluteolina-hexósido, pinocembrina y galangina.

Los tratamientos de estrés hídrico y daño mecánico generaron respuesta en los terpenos, más que en los flavonoides. Las plantas con déficit hídrico acumularon kaempferol y galangina metil éter únicamente, asociados con el incremento en los transcritos de *chs*. El daño mecánico no produjo el incremento significativo de ningún flavonoide, solamente de algunos monoterpenos y un sesquiterpeno (cariofileno), los cuales tendieron a disminuir a través del tiempo al igual que la densidad de tricomas glandulares.

Las muestras silvestres presentaron, en general, mayor concentración de metabolitos secundarios y de tricomas glandulares que las plantas tratadas en invernadero, lo que refleja las ventajas de los mismos en ambientes extremos donde incide la combinación de altas temperaturas, radiación solar, escasez de agua y presencia de depredadores. Los resultados de contenido de monoterpenos en plantas silvestres en diferentes épocas de recolecta podrían indicar la presencia de quimiotipos determinados por la acumulación mayoritaria de carvacrol, en el caso de la población de Zapotitlán Salinas y otro quimiotipo definido por la ausencia o concentración mínima de timol y concentraciones mayoritarias de *o*-cimeno y/o eucaliptol.

La expresión de transcritos *chs* y *tps* en los diferentes tratamientos y en plantas silvestres corrobora la regulación transcripcional de éstos. Sin embargo, la respuesta ante daño mecánico no fue la misma, lo que sugiere que la actividad de *chs* pueda intervenir una regulación post-traduccional.

Finalmente, se concluye que la manipulación de una condición en particular para generar un estrés regulado permite la acumulación de algunos compuestos particulares, pero también puede disminuir la de otros. Es importante tener en mente el objetivo o los compuestos que se quieran acumular mayoritariamente. La propagación en invernadero es una estrategia factible y eficiente para obtener el incremento en la acumulación de un tipo de compuestos, de forma más homogénea y predictiva. El conocimiento obtenido a partir de estudios integrales de fisiología, fitoquímica y biología molecular en

condiciones particulares de crecimiento permite conocer la plasticidad de las vías metabólicas de las plantas y por lo tanto, manejar o direccionar su funcionamiento.

8. PERSPECTIVAS

Los resultados del presente trabajo ofrecen un panorama integral en el manejo de esta especie medicinal que puede aplicarse a cualquier otra, ya sea con fines de producción controlada de un tipo de compuesto o bien, la conservación *ex situ* del material vegetal.

Puntualmente, se considera necesario evaluar las respuestas en grupos homogéneos de plantas: reproducidas vegetativamente, clonas, variedades o reproducir semilla de un solo parental, con el fin de disminuir la gran variabilidad que se presenta, y más en las especies silvestres. El estudio de un mayor número de poblaciones naturales es una herramienta útil que vincula el perfil fitoquímico con posibles quimiotipos, los cuales pueden brindar mayor potencial en la búsqueda de nutraceuticos y fármacos de origen natural. Se ha reportado que algunas especies del género *Lippia* se muestran genéticamente estables al transferirse del medio natural a propagación controlada (Combrick *et al.*, 2007; Juliani *et al.*, 2002) lo cual representa una ventaja en la selección de individuos con un determinado perfil fitoquímico.

Los estudios enzimáticos y de regulación molecular que incluyan otros puntos de la ruta biosintética representan una necesidad científica que permitirá aplicar el conocimiento eficaz y controladamente, con resultados constantes. Así mismo, el estudio detallado de los tricomas glandulares en cuanto a su morfología, secreción, desarrollo y de sus efectos durante la recolecta y el manejo post-cosecha pueden brindar soluciones prácticas y fundamentadas en el manejo del recurso.

La manipulación de las condiciones ambientales mostraron respuestas evidentes en *L. graveolens*. Sin embargo, a excepción del déficit hídrico, los parámetros fisiológicos no se vieron drásticamente afectados. Sería conveniente evaluar las respuestas ante condiciones más prolongadas o agudas; y así mismo evaluar otro tipo de factores excluidos en el presente trabajo, como radiación ultravioleta, luz roja, ácido jasmónico y la presencia de herbívoros que incluyan otras metodologías, como el uso de equipos de fluorescencia que permitan discriminar el efecto sobre PSII, PSI y las tasas de transporte electrónico. Esto aportaría invaluablemente explicaciones bioquímicas sobre la resistencia y adaptabilidad de esta especie a condiciones extremas como escasez de agua, altas temperaturas e irradiaciones, lo cual también representa una ventaja en términos de exigencia de su cultivo y propagación.

Las condiciones evaluadas brindan una herramienta útil en la propagación de esta especie, en invernaderos o huertos que permitan el uso del material vegetal a lo largo del año, sin efecto de la sequía sobre la pérdida de follaje, y con el conocimiento para obtener la acumulación puntual de un determinado grupo de compuestos de utilidad medicinal y aromática.

9. REFERENCIAS

- ABU-LAFI, S., ODEH, I., DEWIK, H., QABAJAH, M., HANUS, L. O. y DEMBITSKY, V. M. 2008. Thymol and carvacrol production from lives of wild palestinian *Majorana syriaca*. Bioresource Technology 99:3914-3918.
- AGATI, G., MATTEINI, P., GOTI, A. y TATTINI, M. 2007. Chloroplast-located flavonoids can scavenge singlet oxygen. New Phytologist 174: 77-89.
- AHARONI, A., GIRI, A., DEUERLEIN, S., GRIEPINK, F., DE KOGEL, W.-J., VERSTAPPEN, W.A., VERHOEVEN, H. A., JONGSMA, M. A., SCHWAB, W. y BOUWRNEESTER, H. J. 2003. Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic *Arabidopsis* plants. Plant Cell 15: 481-494
- ALANIZ-GUTIERREZ, L., CASTRO-FRANCO, R. y GÓMEZ-LORENCE, F. 2000. Contribución al estudio de la calidad de aceite esencial en orégano (*Lippia graveolens* H.B.K.). Revista Chapingo, Serie Zonas Áridas 1: 13-19.
- ALBA, R., CORDONNIER-PRATT, M. y PRATT, L.H. 2000. Fruit-localized phytochromes regulate lycopene accumulation independently of ethylene production in tomato. Plant Physiology 123: 363-370.
- ANDERSEN, A., LUCCHINI, F., MORICONI, J. y FERNÁNDEZ, E. A. 2006. Variabilidad en la morfo-anatomía foliar de *Lippia turbinata* (Verbenaceae) en la provincia de San Luis (Argentina). Phytion 75: 137-143.
- ARGYROPOULOU, C., AKOUMIANAKI-IOANNIDOU, A., CHRISTODOULAKIS, N. S. y FASSEAS, C. 2010. Leaf anatomy and histochemistry of *Lippia citriodora* (Verbenaceae). Australian Journal of Botany 58: 398-409.
- ARIAS TOLEDO, A. A., VALVERDE VALDÉS, M. T. y REYES SANTIAGO, J. 2000. Las plantas de la región de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. 1ª edición. D. R. Secretaría de Medio Ambiente, recursos naturales y pesca. Instituto Nacional de Ecología. México. 80 p.
- ARIMURA, G.I., MATSUI, K. y TAKABAYASHI, J. 2009. Chemical and molecular ecology of herbivore induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. Plant Cell Physiology 50(5): 911-923.
- ASCENSAO, L. y PAIS, M. S. 1998. The leaf capitate trichomes of *Leonotis leonurus*: histochemistry, ultrastructure and secretion. Annals of Botany 81: 263-271.
- ASCENSAO, L., FIGUEIREDO, A. C., BARROSO, J.G., PEDRO, L.G., SCHRIPSEMA, J., DEANS, S. G. Y SCHEFFER, J. J. C. 1998. *Plectranthus madagascariensis*: morphology of the glandular trichomes, essential oil composition, and its biological activity. International Journal of Plant Science 159(1): 31-38.
- ASCENSAO, L., MOTA, L. y CASTRO, M. de M. 1999. Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthis ornatus*: morphology, distribution and histochemistry. Annals of Botany 84: 437-447.
- AUBOURG, S., LECHARNY, A. y BOHLMANN, J. 2002. Genomic analysis of the terpenoid synthase (*AtTPS*) gene family of *Arabidopsis thaliana*. Molecular Genetics and Genomics 267: 730-745.
- AUTUNES, T. y SEVINATE-PINTO, I. 1991. Glandular trichomes of *Teucrium scorodonia* L. morphology and histochemistry. Flora 185: 65-70.
- AZIRAK, S. y RENCUZOGULLARI, E. 2008. The *in vivo* genotoxic effects of carvacrol and thymol in rat bone marrow cells. Environmental Toxicology 23(6): 728-735.
- BABU, S., AKHTAR, T. A., LAMPI, M. A., TRIPURANTHAKAM, S., DIXON, G. R. y GREENBERG, B. M. 2003. Similar stress responses are elicited by copper and ultraviolet radiation in the aquatic plant *Lemma gibba*: implication of reactive oxygen species as common signals. Plant and Cell Physiology 44:1320-1329.
- BALDWIN, I. 1991. Damage-induced alkaloids in wild tobacco. En: Tallamy, D. W. y Raupp, M. J. (eds). Phytochemical induction by herbivores. Wiley, New York, pp 47-69
- BALLARE, C., SCOPEL, A. y SANCHEZ, R. 1997. Foraging for light: photosensory ecology and agricultural implications. Plant, Cell and Environment 20: 820-825.
- BARILLOT, R., FRAK, E., COMBES, D., DURAND, J.-L. y ESCOBAR-GUTIÉRREZ, A. J. 2010. What determines the complex kinetics of stomatal conductance under blueless PAR in *Festuca arundinacea*? Subsequent effects on leaf transpiration. Journal of Experimental Botany doi:10.1093/jxb/erq115

- BARTRAM, S., JUX, A., GLEIXNER, G. y BOLAND, W. 2006. Dynamic pathway allocation in early terpenoid biosynthesis of stress-induced lima bean leaves. *Phytochemistry* 67:1661-1672.
- BEDNAR, R. A. y HADCOCK, J. R. 1988. Purification and characterization of chalcone isomerase from soybeans. *Journal of Biological Chemistry* 263(20): 9582-9588.
- BERITOGNOLO, I., MAGEL, E., ABDEL-LATIF, A., CHARPENTIER, J-P., JAY-ALLEMAND, C. y BRETON, C. 2002. Expression of genes encoding chalcone synthase, flavanone 3-hydroxylase and dihydroflavonol 4-reductase correlates with flavanol accumulation during heartwood formation in *Juglans nigra*. *Tree Physiology* 22: 291-300.
- BICK, J. y LANGE, B. M. 2003. Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 415: 146-154.
- BLANCKAERT, I. 2004. 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. 83 p.
- BLOCK, A., DANGL, J. L., HAHLBROCK, K. y SCHULZE-LEFERT, P. 1990. Functional borders, genetic fine structure, and distance requirements of cis elements mediating light responsiveness of the parsley chalcone synthase promoter. *PNAS* 87: 5387-5391.
- BOREVITZ, J.O., XIA, Y., BLOUNT, J., DIXON, R. A. y LAMB, C. 2000. Activation tagging identifies a conserved MYB regulator phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* 12: 2383-2393.
- BOSABALIDIS, A. M. y SKOULA, M. 1998. A comparative study of the glandular trichomes on the upper and lower leaf surfaces of *Origanum x intercedens* Rech. *Journal of Essential Oil Research* 10: 277-286.
- BOSABALIDIS, A., GABRIELI, C. y NIOPAS, I. 1998. Flavone aglycones in glandular hairs of *Origanum x intercedens*. *Phytochemistry* 49: 1549-1553.
- BOSABALIDIS, A.M. 2002. Structural features of *Origanum* species. En: Kintzios, S.E. (ed.) *Oregano: The genera Origanum and Lippia*. London: Taylor & Francis. 277 p.
- BOWLES, D. J. 1993. Local and systemic signals in the wound response. *Seminars in Cell Biology* 4: 103-111.
- BRAGA, P. C., CULICI, M., ALFIERI, M. y DAL SASSO, M. 2008. Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents* 31:472-477.
- BREMNER, P. D. y MEYER, J. J. 1998. Pinocembrin chalcone: an antibacterial compound from *Helichrysum trilineatum*. *Planta Medica* 64(8): 777.
- BRISKIN, D. P., LEROY A. y GAWIENOWSKI M.C. 2000. Influence of nitrogen on the production of hypericins by St. John's wort. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 413-420.
- BROUN, P. 2005. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: a complex network of conserved regulators involved in multiple aspects of differentiation in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 272-279.
- BUENO-DURÁN, A. Y., CERVANTES-MARTÍNEZ, J. y OBLEDO-VÁZQUEZ, E. N. 2013. Composition of essential oil from *Lippia graveolens*. Relationships between spectral light quality and thymol and carvacrol content. *Journal of Essential Oil Research*. DOI: 10.1080/10412905.2013.840808
- BYUN-McKAY, A., GODARD, K-A., TOUDEFALLAH, M., MARTIN, D. M., ALFARO, R., KING, J., BOHLMANN, J. y PLANT, A. 2003. Insect attack and wounding induce traumatic resin duct development gene expression of (-)pinene synthase in Sitka spruce. *Plant Physiology* 133: 368-378.
- CALIXTO, J. B. 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33:179-189.
- CALVO-IRABIEN, L. M., YAM-PUC, J. A., DZIB, G., ESCALANTE-EROSA, F. y PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. 2009. Effect of postharvest drying on the composition of mexican oregano (*Lippia graveolens*) essential oil. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* 15: 281-287.
- CAMACHO-CRISTOBAL, J. J., ANZELLOTTI, D. y GONZALEZ-FONTES, A. 2002. Changes in phenolic metabolism of tobacco plants during short-term boron deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 997-1002.

- 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., DURAN, A. y LIRA, R. 2006. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales de San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán- Cuicatlán, Puebla, México. *Acta Botanica* 75: 21-46.
- CAO, G., SOFIC, E. y PRIOR, R. L. 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free radical Biology and Medicine* 22(5): 749-760.
- CASADORO, G. y RASCIO, N. 1982. Glands of *Lippia triphylla* (L'Hr.) O. Kuntze. *Cytobios* 35: 85-94.
- CASTELLANOS, I. y ESPINOSA-GARCÍA, F.J. 1997. Plant secondary metabolite diversity as a resistance trait against insects: a test with *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and seed secondary metabolites. *Biochemical Systematics and Ecology* 25: 591-602.
- CASTILLO-HERRERA, G. A., J. A. GARCÍA-FAJARDO y M. ESTARRÓN-ESPINOSA. 2007. Extraction method that enriches phenolic content in oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.) essential oil. *Journal of Food Process Engineering* 30: 661-669.
- CAVALEIRO, C., SALGUEIRO, L. R., ANTUNES, T., SEVINATE-PINTO, I. y BARROSO, J. G. 2002. Composition of the essential oil and micromorphology of trichomes of *Teucrium salviastrum*, an endemic species from Portugal. *Flavour and Fragrance Journal* 17:287-291.
- CHAVES, M. M., 1991. Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany* 42:1-16.
- CHAVES, N., ESCUDERO, J. C. y GUTIERREZ-MERINO, C. 1997. Role of ecological variables in the seasonal variation of flavonoid content of *Cistus ladanifer* exudate. *Journal of Chemical Ecology* 23(3): 579-603.
- CHAVES, M. M., MAROCO, J. P. y PEREIRA, J. S. 2003. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30: 239-264.
- CHIN-CHEN CHANG, C., BALL, L., FRYER, M. J., BAKER, N. R., KARPINSKI, S. y MULLINEAUX, P. M. 2004. Induction of ASCORBATE PEROXIDASE 2 expression in wounded *Arabidopsis* leaves does not involve known wound-signalling pathways but is associated with changes in photosynthesis. *Plant Journal* 38(3): 499-511.
- CHIRIKOVA, N. K., OLENNIKOV, D. N. y TANKHAEVA, M. 2010. Quantitative determination of flavonoid content in the aerial part of Baical scullcap (*Scutellaria baicalensis* Georgi). *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 36(7): 915-922.
- CHRISTAKI, E., BONOS, E., GIANNENAS, I. y FLOROU-PANERI, P. 2012. Aromatic plants as a source of bioactive compounds. *Agriculture* 2: 228-243.
- CHRISTIE, J. M. y JENKINS, G. I. 1996. Distinct UV-B and UV-A/blue light signal transduction pathways induce chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell* 8: 1555-1567.
- CLAUDOT, A.C., ERNST, D., SANDERMANN, H. y DROUET, A. 1999. Cloning and characterization of two members of the chalcone synthase gene family from walnut. *Plant Physiology and Biochemistry* 37(10): 721-730.
- COLEMAN, J. S. y JONES, C. G. 1991. A phytochemical perspective of phytochemical induction by herbivores. En: Tallamy, D. W. y Raupp, M. J. (eds). *Phytochemical induction by herbivores*. Wiley, New York. Pp: 3-46.
- COMBRINCK, S. A., DU PLOOY, G. W., MCCRINDLE, R. I. y BOTHA, B. M. 2007. Morphology and histochemistry of the glandular trichomes of *Lippia scaberrima* (Verbenaceae). *Annals of Botany* 99: 1111-1119.
- COMPADRE, C.M., HUSSAIN, R. A., LEON, I. y ENRIQUEZ, R. G. 1987. *Planta Medica* 53: 495-496.
- COX, M. y KORTH, K. L. 2002. Characterization of wound-inducible genes encoding enzymes for terpenoid biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Inquiry* 3: 105-110.
- CROCOLL, C., ASBACH, J., NOVAK, J., GERSHENZON, J. y DEGENHARDT, J. 2010. Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. *Plant Molecular Biology* 73: 587-603.
- CUETO-WONG, M.C., RIVAS-MORALES, C., ALANIZ-GUTIERREZ, M.G., ORANDAY-CÁRDENAS, A., AMAYA-

- GUERRA, C.A., NÚÑEZ-GONZÁLEZ, A., SAMANIEGO-GAXIOLA, J.A. y CANO-RÍOS, P. 2010. Antifungal properties of essential oil of mexican oregano (*Lippia berlandieri*) against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Revista Mexicana de Micología* 31:29-35.
- DAHLIN, R. M., BRICK, M. A. y OGG, J. B. 1992. Characterization and density of trichomes on three common bean cultivars. *Economic Botany* 46(3): 299-304.
- DA GRAÇA, J.P., RODRIGUES, F. A., FARIAS, J. R. B., OLIVEIRA, M. C. N., HOFFMANN-CAMPO, C. B. y ZINGARETTI, S. M. 2010. Physiological parameters in sugarcane cultivars submitted to water deficit. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 22:189-197.
- DAMIEN, H. J., SURAI, P. y DEANS, S. G. 2000. *In vitro* antioxidant activity of a number of plant essential oils and phytoconstituents. *Journal of Essential Oil Research* 12: 241-248.
- DAVIES, M. J., ATKINSON, C. J., BURNS, C., WOOLLEY, J. G., HIPPS, N. A., ARROO, R. R. J., DUNGEY, N., ROBINSON, T., BROWN, P., FLOCKART, I., HILL, C., SMITH, L., BENTLEY, S. 2009. Enhancement of artemisinin concentration and yield in response to optimization of nitrogen and potassium supply to *Artemisia annua*. *Annals of Botany* 104: 315-323.
- DÁVILA, P., VILLASEÑOR, J. L., MEDINA, R., RAMÍREZ, A., SALINAS, A., S ÁNCHEZ-KÉN, J., TENORIO, P. 1993. Listados florísticos de México. X. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 195pp.
- DAVIS, E.M. y CROTEAU, R. 2000. Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. *Topics in Current Chemistry* 209. 53-95.
- DEBEAUJON, I., LEON-KLOOSTERZIEL, K. M. y KOORNNEEF, M. 2000. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 122: 403-414.
- DEBEAUJON, I., NESI, N., PEREZ, P., DEVIC, M., GRANDJEAN, O., CABOCHE, M. y LEPINIEC, L. 2003. Proanthocyanidin-accumulating cells in *Arabidopsis* testa: regulation of differentiation and role in seed development. *Plant Cell* 15: 2514-2531.
- DEGENHARDT, J., KÖLLNER, T. G. y GERSHENZON, J. 2010. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry* 70: 1621-1637.
- DELESSERT, C., WILSON, I. W., VAN DER STRAETEN, D., DENNIS, E. S. y DOLFERUS, R. 2004. Spatial and temporal analysis of the local response to wounding in *Arabidopsis* leaves. *Plant Molecular Biology* 55(2): 165-181.
- DI CARLO, G., MASCOLO, N., IZZO, A. A. y CAPASSO, F. 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Science* 65(4): 337-353.
- DICKE, M. y LORETO, F. 2012. Induced plant volatiles: from genes to climate change. *Trends in Plant Science* 15(3): 115-117.
- DOMÍNGUEZ, X. A., SÁNCHEZ, V., SUÁREZ, M., BALDAS, H. Y GONZÁLEZ, M. R. 1989. Chemical constituents of *Lippia graveolens*. *Planta Medica* 55:208-209.
- DUKE, S. O. y PAUL, R. N. 1993. Development and fine structure of the glandular trichomes of *Artemisia annua* L. *International Journal of Plant Sciences* 154: 107-118.
- EBISAWA, M., SHOJI, K., KATO, M., SHIMOMURA, K., GOTO, F., y YOSHIHARA, T. 2008. Supplementary ultraviolet radiation B together with blue light at night increased quercetin content and flavonol synthase gene expression in leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) *Environmental Control Biology* 46:1-11.
- EDREVA, A., VELIKOVA, V., TSONEV, T., DAGNON, S., GUREL, A., AKTAS, L. y GESHEVA, E. 2008. Stress-protective role of the secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. *General and Applied Plant Physiology* 34(1-2): 67-78.
- FAKTOR, O., KOOTER, J. M., LOAKE, G. J., DIXONE, R. A., LAMB, C. J. 1997. Differential utilization of regulatory cis-elements for stress-induced and tissuespecific activity of a French bean chalcone synthase promoter. *Plant Science* 124: 175-182.
- FLEXAS, J., BOTA, J., LORETO, F., CORNIC, G. y SHARKEY, T. D. 2004. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C₃ plants. *Plant Biology* 6:269-279.
- FLORES, G. 1991. Algunas consideraciones sobre la problemática e importancia del orégano en la zona norte de Jalisco. En: Estado actual del conocimiento sobre el orégano en México. Urzúa-UACH. Bermejillo, Durango. México. Pp: 203-207.

- FONSECA, J. M., RUSHING, J., RAJAPAKSE, N.C., THOMAS, R.L. y RILEY, M.B. 2006. Controlled environments: the case of Feverfew (*Tanacetum parthenium*). HortScience 41: 531- 535.
- FUGLEVAND, G., JACKSON, J. A. y JENKINS, G. I. 1996. UV-B, UV-A, and blue light signal transduction pathways interact synergistically to regulate chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis*. Plant Cell 8:2347-2357.
- GARCÍA-GARCÍA, R., LÓPEZ-MALO, A. y PALOU, E. 2011. Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*. Journal of Food Science 76: M95–100.
- GERSBACH, P. V. 2002. The essential oil secretory structures of *Prostanthera ovalifolia* (Lamiaceae). Annals of Botany 89: 255-260.
- GERMOSEN-ROBINEAU, L. Ed. 2003. Farmacopea vegetal caribeña. 2ª edición. Gramil. <http://www.funredes.org/tramil/>
- GERSHENZON, J., MAFFEI, M. y CROTEAU, R. 1989. Biochemical and histochemical localization of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of spearmint (*Mentha spicata*). Plant Physiology 89:1351-1357
- GONG, W., SHEN, Y-P., MA, L-G-, PAN, Y., DU, Y-L., WANG, D-H., YANG, J-Y., HU, L-D., LIU, X. F., DONG, C. X., MA, L., CHEN, Y. H., YANG, X. Y., GAO, Y., ZHU, D., TAN, X., MU, J. Y., ZHANG, D. B., LIU, Y. L., DINESH-KUMAR, S. P., LI, Y., WANG, X. P., GU, H. Y., QU, L. J., BAI, S. N., LU, Y. T., LI, J. Y., ZHAO, J. D., ZUO, J., HUANG, H., DENG, X. W. Y ZHU, Y. X. 2004. Genome-wide ORFeome cloning and analysis of *Arabidopsis* transcription factor genes. Plant Physiology 135: 773–782.
- GONZÁLEZ-GÜERECA, M.C., SOTO-HERNÁNDEZ, M., KITE, G. y MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M. 2007. Antioxidant activity of flavonoids from the stem of the Mexican oregano (*Lippia graveolens* HBK var. *berlandieri* Schauer). Revista de Fitotecnia Mexicana 30: 43-49.
- GOULD, K. S., McKELVIE, J. y MARKHAM, K. R. 2002. Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury. Plant, Cell and Environment 25(10): 1261-1269.
- GRAHAM, I. A., BESSER, K., BLUMER, S., BRANIGAN, C. A., CZECHOWSKI, T., ELIAS, L., GUTERMAN, I., HARVEY, D., ISAAC, P. G., KHAN, A. M., LARSON, T. R., LI, Y., PAWSON, T., PENFIELD, T., RAE, A. M., RATHBONE, D. A., REID, S., ROSS, J., SMALLWOOD, M. F., SEGURA, V., TOWNSEND, T., VYAS, D., WINZER, T. y BOWLES, D. 2010. The genetic map of *Artemisia annua* L. identifies loci affecting yield of the antimalarial drug artemisinin. Science 327:328–33.
- GROTEWOLD, E., CHAMBERLIN, M., SNOOK, M., SIAME, B., BUTLER, L., SWENSON, J., MADDOCK, S., ST CLAIR, G. y BOWEN, B. 1998. Engineering secondary metabolism in maize cells by ectopic expression of transcription factors. Plant Cell 10: 721-740.
- GUIDI, L., DEGL'INNOCENTI, E., REMORINI, D., MASSAI, R. y TATTINI, M. 2008. Interactions of water stress and solar irradiance on the physiology and biochemistry of *Ligustrum vulgare*. Tree Physiology 28: 873-883.
- GÜLLÜCE, M., SÖKMEN, M., DAFERERA, D., AGAR, G., ÖZKAN, H., KARTAL, N., POLISSIOU, M., SOKMEN, A. y SAHIN, F. 2003. *In vitro* antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and metanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51(14): 3958-3965.
- GURIB-FAKIM, A. 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular Aspects of Medicine 27: 1-93.
- GUYOT, G., SCOFFONI, C. y SACK, L. 2012. Combined impacts of irradiance and dehydration on leaf hydraulic conductance: insights into vulnerability and stomatal control. Plant, Cell and Environment 35:857–871
- HARTMANN, T. 1996. Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. General and Applied Entomology 80: 177–188.
- HARTMANN, U., SAGASSER, M., MEHRTENS, F., STRACKE, R. y WEISSHAAR, B. 2005. Differential combinatorial interactions of cis-acting elements recognized by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes. Plant Molecular Biology 57: 155–171.
- HEIM, K. E., TAGLIAFERRO, A. R. y BOBILYA, D. J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. Journal of Nutritional Biochemistry 13: 572-584.
- HERNÁNDEZ, 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, T., CANALES, M., GARCÍA, A. M., DURAN, A., MERAZ, S., DAVILA, P. y AVILA, J. G., 2008. Antifungal activity of the essential oils of two Verbenaceae: *Lantana achyranthifolia* and *Lippia graveolens* of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 7(4): 202-206.
- HERNÁNDEZ, T., CANALES, M., AVILA, J. G., GARCÍA, A. M., MERAZ, S., CABALLERO, J. y LIRA, R. 2009a. Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lippia graveolens* H.B.K. (Verbenaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 8(4): 295-300.
- HERNÁNDEZ, T., CANALES, M., DURAN, A., GARCÍA, A. M., AVILA, J. G., HERNANDEZ-PORTILLA, L., ALVARADO, M., ROMERO, M., TERAN, B., DAVILA, P. y LIRA, R. 2009b. Variation in the hexanic extract composition of *Lippia graveolens* in an arid zone from Mexico: environmental influence or true chemotypes? *The Open Plant Science Journal* 3: 29-34.
- 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.
- HLAVACKOVA, V., SPUNDOVA, M., NAUS, J., NAVRATIL, M., KOURIL, R. y KANA, R. 2002. Mechanical wounding caused by inoculation influences the photosynthetic response of *Nicotiana benthamiana* plants to plum pox potyvirus. *Photosynthetica* 40: 269-277.
- HOFMANN, R. W., SWINNY, E. E., BLOOR, S. J., MARKHAM, K. R., RYAN, K. G., CAMPBELL, B. D., JORDAN, B. R. y FOUNTAIN, D. W. 2000. Responses of nine *Trifolium repens* L. populations to ultraviolet-B radiation: differential flavonol glycoside accumulation and biomass production. *Annals of Botany* 86: 527-537.
- HOWE, G. A. 2004. Jasmonates as signals in the wound response. *Journal of Plant Growth and Regulation* 23: 223-237.
- HUANG, M. H., ABEL, C., SOHRABI, R., PETRI, J., HAUPT, I., COSIMANO, J., GERSHENZON, J. y THOLL, D. 2010. Variation of herbivore-induced volatile terpenes among *Arabidopsis* ecotypes depends on allelic differences and subcellular targeting of two terpene synthases, TPS02 and TPS03. *Plant Physiology* 153: 1293-1310.
- HUERTA, C. 1997. Orégano mexicano: oro vegetal. *Biodiversitas* 3: 8-13.
- HUMMELBRUNNER, A. L. e ISMAN, M.B. 2001. Acute, sublethal, antifeedant and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cut worm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49: 715–720.
- IJIMA, Y., DAVIDOVICH-RIKANATI, R., FRIDMAN, E., GANG, D. R., BAR, E., LEWINSOHN, E. y PICHERSKY, E. 2004. The biochemical and molecular basis for the divergent patterns in the biosynthesis of terpenes and phenylpropanes in the peltate glands of three cultivars of Basil. *Plant Physiology* 136: 3724-3736.
- ITHAL, N. y REDDY, A.R. 2004. Rice flavonoid pathway genes, *OsDfr* and *OsAns*, are induced by dehydration, high salt and ABA, and contain stress responsive promoter elements that interact with the transcription activator, OsC1-MYB. *Plant Science* 166: 1505-1513.
- JANSEN, B. M. J. y DE GROOT, A. 2004. Ocurrence, biological activity and synthesis of drimane sesquiterpenoids. *Natural Products Reports* 21: 449-477.
- JENKINS, G. I. 1998. UV and blue light signal transduction in the regulation of flavonoid biosynthesis. En: Schiavo, F., Last, L., Morelli, G. y Raikhel, N. V. eds. Cellular integration of signalling pathways in plant development. NATO ASI Series. Vol H 104. Springer-Verlag. Alemania. Pp: 71.
- 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.
- JOHNSON, J., MAHER, P. y HANNEKEN, A. 2009. The flavonoid, Eridictyol, induces long-term protection in ARPE-19 cells through its effects on Nrf2 activation and phase 2 gene expression. *Investigative Ophthalmology and Viual. Science* 50(5): 2398- 2406.
- JULIANI, H.R., KAROCH, A.R., JULIANI, H.R., TRIPPI, V.S. y ZYGADLO, J.A. 2002. Intraspecific variation in the leaf oils of *Lippia junelliana* (mold.) tronc. *Biochemical Systematics and Ecology* 30:163-170.

- KAMPRANIS, S.C., IOANNIDIS, D., PURVIS, A., MAHREZ, W., NINGA, E., KATERELOS, N., ARISSOUR, S., DUNWELL, J. M., DEGENHARDT, J., MAKKRIS, A. M., GOODENOUGH, P. W. y JOHNSON, C. B. 2007. Rational conversion of substrate and product specificity in a *Salvia* monoterpene synthase: structural insights into the evolution of terpene synthase function. *Plant Cell* 19: 1994-2005.
- KASAN, K. 2006. Negative regulation of defence and stress genes by EAR-motif-containing repressors. *Trends in Plant Science*. 11: 109-112.
- KENNEDY, G. G. 2003. Tomato, pests, parasitoids, and predators: tritrophic interactions involving the genus *Lycopersicon*. *Annual Review of Entomology* 48: 51-72
- KESSLER, A. y BALDWIN, I. T. 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* 291: 2141-2144.
- KHAN, M., CAVERS, P. B., KANE, M. y THOMPSON, K. 1996. Role of the pigmented coat of proso millet (*Panicum miliaceum* L.) in imbibition, germination and seed persistence. *Seed Science Research* 7:21-25.
- KINTZIOS, S. E. 2002. Profile of the multi faceted prince of the herbs. In: *Oregano. The Genera Origanum and Lippia*. Edits., S.E. Kintzios (Medicinal and Aromatic Plants –Industrial Profiles, vol. 25). Taylor & Francis. Reino Unido. 3-8 Pp.
- KJÆR, A., GREVSEN, K. y JENSEN, M. 2012. Effect of external stress on density and size of glandular trichomes in full-grown *Artemisia annua*, the source of anti-malarial artemisin, *AoB Plants* pls018; doi:10.1093/aobpla/pls018
- KNOGGE, W., SCHMELZER, E., WEISSENBOCK, G. 1986. The role of chalcone synthase in the regulation of flavonoid biosynthesis in developing oat primary leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 250: 364-372.
- KOFIDIS, G., BOSABALIDIS, A.M. y MOUSTAKIS, M. 2003. Contemporary seasonal and altitudinal variations of leaf structural features in Oregano (*Origanum vulgare* L.). *Annals of Botany* 92:635-645.
- KOFIDIS, G. y BOSABALIDIS, A.M. 2008. Effects of altitude and season on glandular hairs and leaf structural traits of *Nepeta nuda* L. *Botanical Studies* 49: 363-372.
- KOLB, C. A., KÄSER, M. A., KOPECKÝ, J., ZOTZ, G., RIEDERER, M. y PFÜNDEL, E. E. 2001. Effects of natural intensities of visible and ultraviolet radiation on epidermal ultraviolet screening and photosynthesis in grape leaves. *Plant Physiology* 127: 863-875.
- KOLLNER, T. G., LENK, C., SCHNEE, C., KOPKE, S., LINDEMANN, P., GERSHENZON, J. y DEGENHARDT, J. 2013. Localization of sesquiterpene formation and emission in maize leaves after herbivore damage. *BMC Plant Biology* 13: 15 doi:10.1186/1471-2229-13-15.
- KOSSEL, A. 1891. Über die chemische Zusammensetzung der Zelle. *Du Bois-Reymond's Archives*: 181-186.
- LAWSON, T. 2009. Guard cell photosynthesis and stomatal function. *New Phytologist* 181: 13-34.
- LEGESSE, N. y POWELL, A. A. 1992. Comparisons of water uptake and imbibition damage in eleven cowpea cultivars. *Seed Science and Technology* 20: 173-180.
- LERNER, H. R. 1999. Introduction to the response of plants to environmental stresses. In: *plant responses to environmental stresses*. Ed. H. R. Lerner. Marcel Dekker, Nueva York, USA. 1-26 Pp.
- LEUNG, A.Y. y FOSTER, S. 1995. *Encyclopedia of common natural ingredients*. John Wiley & Sons, USA. 649 p.
- LICHTENTHALER, H. K. y BURKART, S. 1999. Photosynthesis and high light stress. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 25: 3-16.
- LIN, L. Z., MUKHOPADHYAY, 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 Analysis* 20(5): 361-369.
- LIN, C., BINZHANG, S., XU, Z., KOLLNER, T. G., DEGENHARDT, J. y DOONER, H. K. 2008. Characterization of the monoterpene synthase gene *tps26*, the ortholog of a gene induced by insect herbivory in maize. *Plant Physiology* 146: 940-951.
- LIOLIOS, C. C., GORTZI, O., LALAS, S., TSAKNIS, J., y CHINOI, I. 2009. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and *in vitro* antimicrobial activity. *Food Chemistry* 112(1): 77-83.
- LITVAK, M.E. y MONSON, R. K. 1998. Induced and constitutive monoterpene defenses in conifer needles in relation to herbivory patterns. *Oecologia* 114:531-40.

- LOGEMANN, E., TAVERNARO, A., SCHULTZ, W., SOMSSICH, I. E. y HAHLBROCK, K. 2000. UV light selectively coinduces supply pathways from primary metabolism and flavonoid secondary product formation in parsley. *PNAS* 97(4):1903-1907
- LOMMEN, W. J. M., SCHENK, E., BOUWMEESTER, H. J. y VERSTAPPEN, F. W. A. 2006. Trichome dynamics and artemisinin accumulation during development and senescence of *Artemisia annua* leaves. *Planta Medica* 72:336–345.
- LOPES, R. M., OLIVEIRA, T. T., NAGEM, T. J. y PINTO, A. S. 2000. Flavonoides. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 17: 18–22.
- LORETO, F., CICCIOLO, P., CECINATO, P., BRANCALEONI, E., FRATTONI, M., FABOZZI, C. y TRICOLI, D. 1996. Evidence of the photosynthetic origin of monoterpenes emitted by *Quercus ilex* L. leaves by ¹³C labeling. *Plant Physiology* 110: 1317-1322.
- LORETO, F., NASCETTI, P., GRAVERINI, A. y MANNOZZI, M. 2000. Emission and content of monoterpenes in intact and wounded needles of the Mediterranean Pine, *Pinus pinea*. *Functional Ecology* 14(5): 589-595.
- LORETO, F., TSONEV, T. y CENTRITTO, M. 2009. The impact of blue light on leaf mesophyll conductance. *Journal of Experimental Botany* 60(8): 2283-2290.
- MACKERNESS, S., JOHN, C. F., JORDAN, B. R. y THOMAS, B. 2001. Early signalling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. *FEBS Letters* 489: 237-242.
- MADHAVA RAO, K. V. 2006. Introduction. En: *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*. Springer. Holanda. 1-14 Pp.
- MAFFEI, M., CHIALVA, F. y SACCO, T. 1989. Glandular trichomes and essential oils in developing peppermint leaves. *New phytologist* 111: 707-716.
- MAFFEI, M. y CODIGNOLA, A. 1990. Photosynthesis, photorespiration and herbicide effect of terpene production in peppermint (*Mentha piperita* L.). *Journal of Essential Oil Research* 2: 275-286.
- MAIA, J. G. S., TAVEIRA, F. S. N., ANDRADE, E. H. A., DA SILVA, M. H. L. y ZOGHBI, M. G. B. 2003. Essential oils of *Lippia grandis* Schau. *Flavour and Fragrance Journal* 18: 417–420.
- MARTÍNEZ-ROCHA, A., PUGA, R., HERNÁNDEZ-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.
- MATA-GONZÁLEZ, R. y MELÉNDEZ-GONZÁLEZ, R. 2005. Growth characteristics of mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) under salt stress. *Southwest Naturalist* 50: 1-6.
- MEDINA, J. 2000. Determinación del vigor y el estado reproductivo de *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) a lo largo de una cronosecuencia edáfica en un abanico aluvial en Coxcatlán, Valle de Tehuacán. Tesis Profesional. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. México. Pp: 8-9.
- MENDEZ-LARIOS, I., ORTIZ, E. y VILLASEÑOR, J. L. 2004. Las Magnoliophyta endémicas de la porción xerofítica de la provincia florística del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, México. *Anales del Instituto de Biología, UNAM, Serie Botánica* 75(1): 87-104.
- MICHELOZZI, M. 1999. Defensive roles of terpenoid mixtures in conifers. *Acta Botanica Gallica* 146, 73–84.
- MIDDLETON, E. M y TERAMURA, A. H. 1993. The Role of Flavonol Glycosides and Carotenoids in Protecting Soybean from Ultraviolet-B Damage. *Plant Physiology* 103(3):741–752.
- MILLER, B., MADILAO, L. L., RALPH, S. y BOHLMAN, J. 2005. Insect-induced conifer defense: white pine weevil and methyl jasmonate induce traumatic resinosis, *de novo* formed volatile emissions, and accumulation of terpenoid synthase and putative octadecanoid pathway transcript in Sitka spruce. *Plant Physiology* 137: 369-382.
- MITHOFER, A. y BOLAND, W. 2012. Herbivores: chemical aspects. *Annual Review of Plant Biology* 63: 431-450.
- MOHAMED-YASSEEN, Y., BARRINGER, S. A., SPLITTSTOESSEER, W. E. y COSTANZA, S. 1994. The role of seed coats in seed viability. *Botanical Review* 60: 426-439
- MORENO, A. 2009. Perfiles de acumulación de metabolitos secundarios en 3 especies medicinales de San Rafael, Coxcatlán, Puebla, bajo diferentes prácticas de cultivo. Tesis de Maestría. UNAM, México. 98 Pp.

- MONTENEGRO, G., SEGURA, B., SAENGER, R. y MUJICA, A. M. 1981. Xeromorfismo en especies arbustivas del matorral chileno. *Anales del Museo de Historia Natural* 14: 71-83.
- MORISHITA, T., KOJIMA, Y., MARUTA, T., NISHIZAWA-YOKOI, A., YABUTA, Y. Y SHIGEOKA, S. 2009. *Arabidopsis* NAC transcription factor, ANAC078, regulates flavonoid biosynthesis under high light. *Plant Cell Physiology* 50(12): 2210-2222.
- MOTEKI, H., HIBASAMI, H., YAMADA, Y., KATSUZAKI, H., IMAI, K. y T. KOMIYA. 2002. Specific induction of apoptosis by 1,8-cineole in two human leukemia cell lines, but not in human stomach cancer cell line. *Oncology Reports* 9: 757-760.
- NUÑEZ, M. J. 2004. Metabolitos secundarios bioactivos aislados de *Maytenus chiapensis* y *Crossopetalatum uragoga* (Celastraceae). Tesis doctoral. UNAM, México. 55 Pp.
- OCHUODHO, J. O. y MODI, A. T. 2010. Association of seed coat colour with germination of three wild mustard species with agronomic potential. 2nd Ruforum Biennial meeting. Entebbe, Uganda. news.mak.ac.ug/documents/.../Ochuodho.pdf
- 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.
- OPITZ, S., KUNERT, G. y GERSHENZON, J. 2008. Increased terpenoid accumulation in cotton (*Gossypium hirsutum*) foliage is a general wound response. *Journal of Chemical Ecology* 34: 508-522.
- OSORNO-SÁNCHEZ, T., TORRES RUIZ, A. y LINDIG-CISNEROS, R. 2012. Effects of harvesting on population structure of *Lippia graveolens* (Verbenaceae, Lamiales) in the Semidesert of Queretaro, Mexico. *African Journal of Agricultural Research* 7: 100-108.
- OSUAGWU, G. G. E., EDEOGA, H. O. y OSUAGWU, A. M. 2010. Flavonoid, saponin, and tannin potential of the leaves of *Ocimum gratissimum* (L) and *Gongronema latifolium* (Benth) as influenced by water stress (drought). *Journal of Sustainable Agriculture and Environment* 12: 157-167.
- OSUNA, L., TAPIA, M. E. y AGUILAR, A. 2005. Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. Publicaciones y ediciones de la Universidad de Barcelona, España. 66-67 Pp.
- PAREDES FLORES, M. 2001. Estudios etnobotánicos en Zapotitlán de las Salinas Puebla. Tesis, Licenciatura. Biología. UNAM. Fes-Iztacala. México.
- PAREDES-FLORES, M., LIRA SAADE, R. y DÁVILA ARANDA, P. D. 2007. Estudio etnobotánico de Zapotitlán Salinas, Puebla. *Acta Botánica Mexicana* 79: 13-61.
- PARK, J.S., CHOUNG, M. S., KIM, J. B., HAHN, B. S., KIM, J. B., BAE, S. C., ROH, K. H. y KIM, Y. H. 2007. Genes up-regulated during red coloration in UV-B irradiated lettuce leaves. *Plant Cell Reports* 26: 507-516.
- PELLETIER, M.K. y SHIRLEY, B.W. 1996. Analysis of flavanone 3-hydroxylase in *Arabidopsis* seedlings. Coordinate regulation with chalcone synthase and chalcone isomerase. *Plant Physiology* 111: 339-345.
- PETROPOULOS, S. A., DAFERERA, D., POLISSIOU, M. G. y PASSAM, H. C. 2008. The effect of water deficit stress on the growth, yield and composition of essential oils of parsley. *Scientia Horticulturae* 115: 393-397.
- PHILLIPS, M.A., WILDUNG, M. R., WILLIAMS, D. C., HYATT, D. C. y CROTEAU, R. 2003. cDNA isolation, functional expression and characterization of (+)- alpha-pinene synthase and (-) alpha-pinene synthase from loblolly pine (*Pinus taeda*): stereocontrol in pinene biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 411: 267-276.
- PICHERSKY, E. y GERSHENZON, J. 2002. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology* 5(3): 237-243.
- PIETTA, P. G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 63: 1035-1042.
- PINO, J., ROSADO, A. y BORGES, P. 1989. Analysis of the essential oil mexican oregano (*Lippia graveolens* HBK). *Food/Nahrung* 33(3):289-295.
- POULOSE, A. J. y CROTEAU, R. 1978. Biosynthesis of aromatic monoterpenes: conversion of gamma-terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 187(2): 307-314.

- POWELL, A. A., OLIVEIRA, M. de A. y MATTHEWS, S. 1986. Seed vigour in cultivars of dwarf French beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in relation to the colour of the testa. *Journal of Agricultural Science* 106:419-425.
- RASTRELLI, L., CACERES, A., MORALES, E. De SIMONE, F. y AQUINO, R. 1998. Iridoids from *Lippia graveolens*. *Phytochemistry* 49(6): 1829-32.
- RASULOV, B., HUVE, K., BICHELE, I., LAISK, A. y NIINEMET, S. U. 2010. Temperature response of isoprene emission *in vivo* reflects a combined effect of substrate limitations and isoprene synthase activity: a kinetic analysis. *Plant Physiology* 154: 1558–1570,
- REUBER, S., BORNMAN, J. y EISSENBOCK, G. W. 1996. A flavonoid mutant barley (*Hordeum vulgare* L.) exhibits increased sensitivity to UV-B radiation in primary leaf. *Plant, Cell and Environment* 19: 593-601
- RHYU, H.Y. 1979. Gas chromatographic characterization of oregano and other selected spices of the Labiate family. *Journal of Food Science* 44: 1373-1378.
- RICHARD, S., LAPOINTE, G., RUTLEDGE, R.G. y SEGUIN, A. 2000. Induction of chalcone synthase expression in white spruce by wounding and jasmonate. *Plant Cell Physiology* 41(8):982-987.
- RIVASSEAU, C., SEEMANN, M., BOISSON, A. M., STREB, P., GOUT, E., DOUCE, R., ROHMER, M., y BLIGNY, R. 2009. Accumulation of 2-C-methyl-d-erythritol 2,4-cyclodiphosphate in illuminated plant leaves at supraoptimal temperatures reveals a bottleneck of the prokaryotic methylerythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Plant, Cell and Environment* 32: 82–92.
- RIUS, S., GROTEWOLD, E. y CASATI, P. 2012. Analysis of the P1 promoter in response to UV-B radiation in allelic variants of high-altitude maize. *BMC Plant Biology* 12:92. doi:10.1186/1471-2229-12-92
- RIVERO-CRUZ, I., DUARTE, G., NAVARRETE, A., BYE, R., LINARES, E. y MATA, R. 2011. Chemical composition and antimicrobial and spasmolytic properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* essential oils. *Journal of Food Science* 76(2): C309-C317.
- ROSAS, L. R. 2003. Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán. Tesis profesional, Facultad de Estudios Superiores, UNAM. México. 94 pp.
- RUIZ, C., TUNAROSA, F. MARTÍNEZ, J. y STASHENKO, E. 2007. Estudio comparativo por GC-MS de metabolitos secundarios volátiles de dos quimiotipos de *Lippia origanoides* H.B.K., obtenidos por dos diferentes técnicas de extracción. *Scientia et Technica* 13(33): 325-328.
- RUIZ NIETO, E., MONTERO TAVERA, V., ACOSTA GALLEGOS, J. A., PIEDRA IBARRA, E., AGUIRRE MANCILLA, C. L., RAMIREZ PIMENTEL, J. G. y RAYA PEREZ, J. C. 2013. Caracterización fisiológica y genética del uso eficiente del agua en dos variedades de frijol contrastantes. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria de México* 1(1): 43-51.
- RZENDOWSKI, J. 1986. Vegetación de México. Limusa. México. 432 pp.
- SAID-AL AHL, H A. H. y HUSSEIN, M. S. 2010. Effect of water stress and potassium humate on the productivity of oregano plant using saline and fresh water irrigation. *Ozean Journal of Applied Sciences* 3(1): 125-141.
- SEKHER PANNALA, A., CHAN, T. S., O 'BRIEN, P. J. y RICE-EVANS, C. A. 2001. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochemical and Biophysics Research Communications* 282:1161–1168.
- SEMARNAT, 2001. Evaluación del riesgo de extinción de *Lippia graveolens* de acuerdo al numeral 5.7 de la NOM-059-Semarnat-2001.
- SHANKER, S., AJAYAKUMAR, P. V., SANGWAN, S., KUMAR, S., SANGWAN, R. S. 1999. Essential oil gland number and ultrastructure during *Mentha arvensis* leaf ontogeny. *Biologia Plantarum* 42: 379–387.
- SCHMELZER, E., JAHNEN, W. y HAHLBROCK, K. 1988. *In situ* localization of light-induced chalcone synthase mRNA, chalcone synthase, and flavonoid end products in epidermal cells of parsley leaves. *PNAS* 85:2989-2993.
- SCHMITT, J., NILES, J. y WULFF, R. 1992. Norms of reaction of seed traits to maternal environments in expression of maternal genotype and environmental effects can depend on the conditions experienced by offspring; consequently, the evolutionary impact of maternal effects may differ among progeny environments. *The American Naturalist* 139(3): 451-466.
- SCHNITZLER, J.P., LOUIS, S., BEHNKE, K., y LOIVAMAKI, M. 2010. Poplar volatiles biosynthesis, regulation and (eco)physiology of isoprene and stress-induced isoprenoids. *Plant Biology* 12: 302–316.

- SCHURMANN, W., ZIEGLER, H., KOTZIAS, D., SCHONWITZ, R. y STEINBRECHER, R. 1993. Emission of biosynthesized monoterpenes from needles of Norway spruce. *Naturwissenschaften* 80: 276-278
- SCHWACHTJE, J. y BALDWIN, I. T. 2008. Why does herbivore attack reconfigure primary metabolism? *Plant Physiology* 146:845–851.
- SCHWINN, K., VENAIL, J., SHANG, Y., MCKAY, S., ALM, V., BUTELLI, E., OYAMA, R., BAILEY, P., DAVIES, K. y MARTIN, C. 2006. A small family of MYB-regulatory genes controls floral pigmentation intensity and patterning in the genus *Antirrhinum*. *Plant Cell* 18: 831-851.
- SHIMAZAKI, K. I., DOI, M., ASSMANN, S. M. y KINOSHITA, T. 2007. Light regulation of stomatal movement. *Annual Review of Plant Biology* 58:219-247.
- 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.
- SNYDER, J.C. y HYATT, J. P. 1984. Influence of daylength on trichome densities and leaf volatiles of *Lycopersicon* species. *Plant Science Letters* 37:177-181.
- SOETAERT, S. S. A., VAN NESTE, C. M. F., VANDEWOESTYNE, M. L., HEAD, S. R., FOOSSENS, A., VAN NIEUWERBURGH, F. C. W. y DEFORCE, D. L. D. 2013. Differential transcriptome analysis of glandular and filamentous trichomes in *Artemisia annua*. *BMC Plant Biology* 13: 220-234.
- SORIANO-MELGAR, L. A. A., ALCARAZ-MELÉNDEZ, L., MÉNDEZ-RODRÍGUEZ, L. C., PUENTE, M. E., RIVERA-CABRERA, F. Y ZENTENO-SAVÍN, T. 2012. Antioxidant and trace element content of damiana (*Turnera diffusa* Willd) under wild and cultivated conditions in semi-arid zones. *Industrial Crops and Products* 37: 321-327.
- SOYSAL, Y. y OZTEKIN, S. 2001. Soption isosteric heat for some medicinal and aromatic plants. *Journal of Agricultural Engineering research* 78: 159-166.
- STASHENKO, E. E., JARAMILLO, B. E. y MARTÍNEZ, J. R. 2003. Comparison of different extraction method for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. *Journal of Chromatography A* 1025(1): 93-103.
- STAUDT, M. y LHOUTELLIER, L. 2011. Monoterpene and sesquiterpene emissions from *Quercus coccifera* exhibit interacting responses to light and temperature. *Biogeosciences* 8: 2757-2771.
- STEELE, C.L., KATOH, S., BOHLMANN, J. y CROTEAU, R. 1998. Regulation of oleoresinosis in grand fir (*Abies grandis*): differential transcriptional control of monoterpene, sesquiterpene, and diterpene synthase genes in response to wounding. *Plant Physiology* 116, 1497-1504.
- TALBOTT, L. D., SHMAYEVICH, I. J., CHUNG, Y., HAMMAD, J. W. y ZEIGER, E. 2003. Blue light and phytochrome-mediated stomatal opening in the *npq1* and *phot1 phot2* mutantst of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133(4): 1522-1529.
- TATTINI, M., GRAVANO, E., PINELLI, P., MULINACCI, N. y ROMANI, A. 2000. Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phyllyrea latifolia* exposed to excess solar radiation *New Phytologist* 148: 69-77.
- TATTINI, M., GALARDI, C., PINELLI, P., MASSAI, R., REMORINI, D. y AGATI, G. 2004. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. *New Phytologist* 163: 547-561.
- THOLL, D., CHEN, F., GERSHENZON, J. y PICHERSKY, E. 2004. *Arabidopsis thaliana*, a model system for investigating volatile terpene biosynthesis, regulation and function. En: ROMEO, J. T. Secondary metabolism in model systems. Recent advances in phytochemistry. Vol. 38. Capítulo 1: 1-18 Pp.
- THOLL, D. 2006. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*. 9:297-304.
- TINGEY, D. T., EVANS, R. C., BATES, E. H. y GUMPERTZ, M. L. 1987. Isoprene emissions and photosynthesis in three ferns . The influence of light and temperature. *Physiologia Plantarum* 69: 609–616.
- TOMAS-BARBERÁN, F. y ROBINS, R. J. 1997. Introduction: Phytochemistry of fruit and vegetables. Oxford University Press. New York, USA. 1-9 Pp.

- TRAPP, S.C. y CROTEAU, R.B. 2001. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics* 158: 811–832.
- URIBE-HERNÁNDEZ, C.J., HURTADO-RAMOS, J.B., OLMEDO-ARCEGA, E.R. y MARTINEZ-SOSA, M.A. 1992. The essential oil of *Lippia graveolens* H.B.K. from Jalisco, Mexico. *Journal of Essential Oil Research* 4: 647-649.
- 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.
- VALIENTE-BANUET, A., CASAS, A., ALCÁNTARA, A., DÁVILA, P., FLORES-HERNÁNDEZ, N., ARISMENDI, M. C., ORTEGA-RAMÍREZ, J. y SORIANO, J. A. 2000. La vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 67:25-75.
- VAN DAM, N.M. y VRIELING, K. 1994. Genetic variation in constitutive and inducible pirrolizidine alkaloid levels in *Cynoglossum officinale* L. *Oecologia* 99:374-378.
- VAN HINSBERG, A. 1998. Maternal and ambient environmental effects of light on germination in *Plantago lanceolata*: correlated responses to selection on leaf length. *Functional Ecology* 12: 825-833.
- 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., GAYDOU, E.M. y PARKANYI, C. 2001. Analysis of the essential oil of *Lippia graveolens* H.B.K. from El Salvador. *Flavour and Fragrance Journal* 16: 219-226.
- VLADIMIROV, Y. A., PROSKURNINA, E. V., DEMIN, E. M., MATVEEVA, N. S., LUBITSKIY, O. B., NOVIKOV, A.A., IZMALOV, D. Y., OSIPOV, A. N., TIKHONOV, V. P. y KAGAN, V. E. 2009. Dihydroquercetin (taxifolin) and other flavonoids as inhibitors of free radical formation at key stages of apoptosis. *Biochemistry (Moscow)* 74(3): 301-307.
- VOGEL, H., JELDRES, P., RAZMILIC, I. y DOLL, U. 2011. Morphological characters, yields and active principles in wild and cultivated accessions of the Chilean medicinal plant *Buddleja globosa* Hope. *Industrial Crops and Products* 34 (2): 1322–1326.
- WAGNER, G.J. 1991. Secreting glandular trichomes: more than just hairs. *Plant Physiology* 96: 675-679.
- WERKER, E., RAVID, U. y PUTIEVSKY, E. 1985. Structure of glandular hairs and identification of the main components of their secreted material in some species of the Labiatae. *Israel Journal of Botany* 34: 31–45.
- WERKER, E. 1993. Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plants of Lamiaceae- a review. *Flavour and Fragrance Journal* 8: 249-255.
- WILLIAMS, D. C., MCGARVEY, D. J., KATAHIRA, E. J. y CROTEAU, R. 1998. Truncation of limonene synthase preprotein provides a fully active 'pseudomature' form of this monoterpene cyclase and reveals the function of the amino-terminal arginine pair. *Biochemistry* 37: 12213-12220.
- WINKEL-SHIRLEY, B. 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* 126(2): 485-493.
- 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.
- XIONG, Y., LIU, T., TIAN, C., SUN, S., LI, J. y CHEN, M. 2005. Transcription factors in rice: a genome-wide comparative analysis between monocots and eudicots. *Plant Molecular Biology* 59: 191-203.
- YANG, Z., TIAN, L. LATOSZEK-GREEN, M., BROWN, D. y WU, K. 2005. *Arabidopsis* ERF4 is a transcriptional repressor capable of modulating ethylene and abscisic acid responses. *Plant Molecular Biology* 58(4): 585-596.
- YUTING, C., RONGLIANG, Z., ZHONGJIAN, J. y YONG, J. 1990. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 9: 19-21.
- ZAMFIRACHE, M.M., BURZO, I., GOSTIN, I., OLTEANU, Z., STEFAN, M., BADEA, M.L., PADURARIU, C., GALES, R.C., ADUMITRESEI, L., LAMBAN, C., TRUTA, E. y STANESCU, I. 2009. Glandular trichomes and essential oil constituents of *Perovskia atriplicifolia* Benth. *Analele Stiintifice ale Universitatii Alexandru Ioan Cuza*. 10: 73-80.

ZANGERL, A. R. y BERENBAUM, M. R. 1990. Furanocoumarin induction in wild parsnip: genetics and populational variation. *Ecology* 71:1933-1940

ZEIN, S., AWADA, S., AL-HAJJE, A., RACHIDI, S., SALAMEH, P. y KANAAN, H. 2012. Variation of thymol, carvacrol and thymoquinone production from wild and cultivated *Origanum syriacum* of south Lebanon. *Journal of Medicinal Plants Research* 6(9): 1692-1696.

ZHANG, W. J. y BJORN, L. O. 2009. The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. *Fitoterapia* 80: 207-218.

ZHU, Q., DROGE-LASER, W., DIXON, R. A. y LAMB, C. 1996. Transcriptional activation of plant defense genes. *Current Opinion in Genetics and Development* 6: 624-630.

10. APENDICES

1. Composición de la solución Hoagland completa (20 L)

Macronutrientes		Micronutrientes	
KH ₂ PO ₄	2.72g	H ₃ BO ₃	1.43g
KNO ₃	10.11g	ZnSO ₄	0.11g
Ca(NO ₃) ₂	16.41g	CuSO ₄	0.04g
MgSO ₄	4.8156g	H ₂ MoO ₄	0.01g

2. Secuencias utilizadas para el diseño de oligonucleótidos

chs:

No. acceso GenBank	Organismo	No. pb
AB046666	<i>Scutellaria baicalensis</i>	1303
AB008748	<i>Scutellaria baicalensis</i>	1363
EF512579	<i>Scutellaria baicalensis</i>	1172
AF035622	<i>Scutellaria baicalensis</i>	1402
EU386767	<i>Scutellaria viscidula</i>	1649
AB002815	<i>Perilla frutescens</i>	1449
AB002582	<i>Perilla frutescens</i>	1577
EF522149	<i>Solenostemon scutellarioides</i>	1487
AY044331	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1232
XM002871545	<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	1490
EU305683	<i>Mimulus aurantiacus</i>	1110
AF461105.1	<i>Hypericum perforatum</i>	1510
AB012923	<i>Torenia hybrida</i>	1465

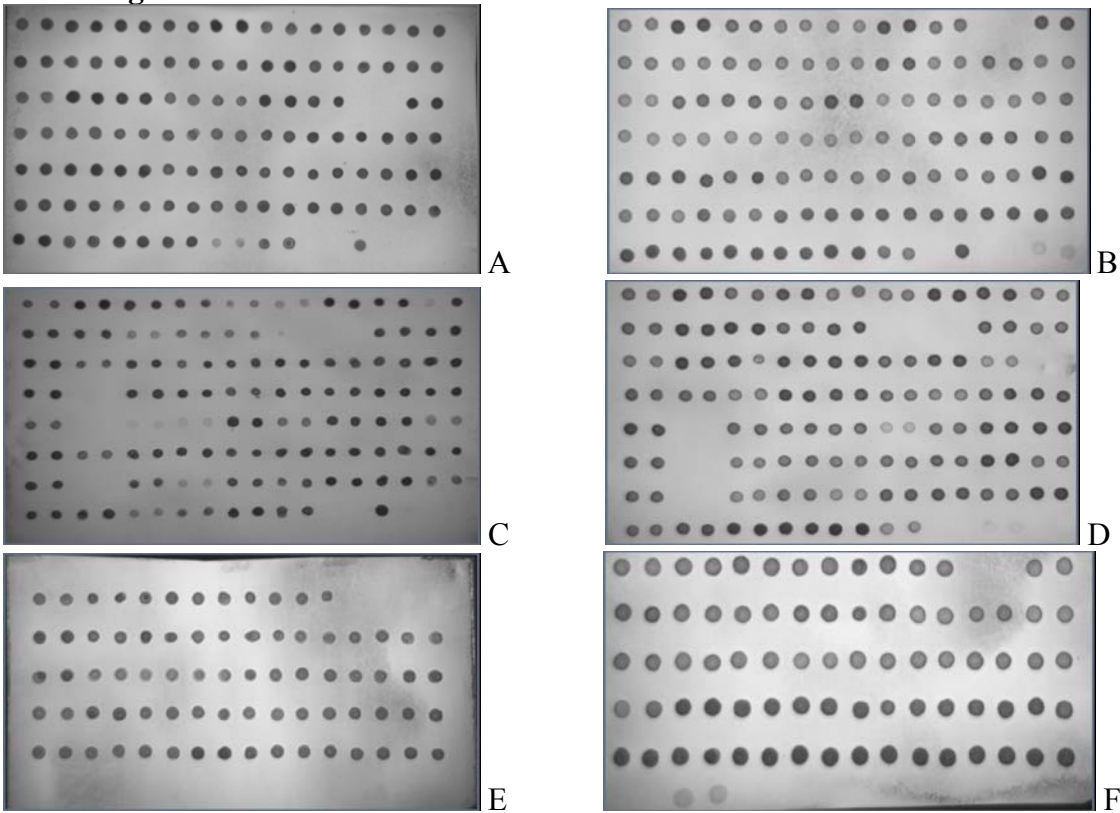
tps:

No. acceso GenBank	Organismo	No. pb
AB110638	<i>Citrus unshiu</i>	1809
AB110639	<i>Citrus unshiu</i>	1803
AB110640	<i>Citrus unshiu</i>	1803
AF514286	<i>Citrus limon</i>	1991
JQ957866	<i>Thymus vulgaris</i>	1809
JQ957864	<i>Thymus vulgaris</i>	1788
JQ957865	<i>Thymus vulgaris</i>	1788
JN542829	<i>Origanum syriacum</i>	2249
GU385978	<i>Origanum vulgare</i> cultivar d0601	1785

3. Dimensiones de las semillas de *L. graveolens* por origen (silvestres e invernadero) y color de la testa (claras y oscuras). n=10. Medición de longitud, ancho y profundo en el programa Axiovision v. 4.0

Grupo	Dimensión (mm)	Diámetro (mm)	Volumen (mm ³)	Área (mm ²)	Esféricidad (%)	Masa de 10 semillas (mg)
Silvestres: Oct oscuras	3.374±0.27 ^a	0.43±0.13 ^a	0.055±0.018 ^a	3.45±0.68 ^b	0.27±0.07	3.96±0.416
Silvestres: Oct claras	3.581±0.32 ^a	0.53±0.16 ^a	0.044±0.009 ^a	4.11±0.86 ^a	0.33±0.09*	3.83±0.75
Silvestres: Sept oscuras	3.408±0.42 ^a	0.44±0.15 ^a	0.054±0.016 ^a	3.6±0.85 ^a	0.27±0.05	2.43±0.142
Silvestres: Sep claras	3.105±0.2 ^b	0.35±0.07 ^b	0.067±0.02 ^b	3.1±0.56 ^b	0.25±0.05	2.03±0.49
Invernadero oscuras	3.212±0.24 ^b	0.37±0.08 ^b	0.047±0.01 ^b	3.19±0.38 ^b	0.25±0.04	5.8±0.66
Invernadero claras	3.555±0.23 ^a	0.44±0.06 ^a	0.056±0.079 ^a	3.65±0.53 ^a	0.24±0.02	4.76±0.65

4. Fotografías de membranas de hibridación dot blot



Membranas de hibridación usando *tps* como sonda en cDNA de las muestras y controles de los experimentos de luz azul (A), flujo fotónico alto y estrés hídrico (C), y daño mecánico (E). Membranas de hibridación usando *chs* como sonda en cDNA de las muestras y controles de los experimentos de luz azul (B), flujo fotónico alto y estrés hídrico (D), y daño mecánico (F).

5. Publicación

El presente artículo forma parte de los resultados obtenidos en el presente estudio. Trata sobre el efecto del estrés hídrico continuo y la intensidad lumínica en la acumulación de 3 flavonoides de importancia medicinal en *L. graveolens*.



The effect of light and soil moisture on the accumulation of three flavonoids in the leaves of Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth)

Amanda Moreno-Rodríguez¹, Josefina Vázquez-Medrano¹, Luis B. Hernández-Portilla¹, Ignacio Peñalosa-Castro¹, Margarita Canales-Martínez², Alma Orozco-Segovia³, Manuel Jiménez-Estrada⁴, Louise Colville⁵, Hugh W. Pritchard⁵ and Cesar M. Flores-Ortiz^{1*}

¹Laboratorio de Fisiología Vegetal, UBIPRO, FES Iztacala, UNAM, Tlalnepantla 54090, Mexico. ²Laboratorio de Farmacognoscia, UBIPRO, FES Iztacala, UNAM, Tlalnepantla 54090, Mexico. ³Laboratorio de Ecología fisiológica, Instituto de Ecología, UNAM, Coyoacán 04510, Mexico. ⁴Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, UNAM, Coyoacán 04510, Mexico. ⁵Seed Conservation Department, Royal Botanic Gardens, Kew, Wakehurst Place, Ardingly, RH17 6TN, United Kingdom. e-mail: moreno.amandita@gmail.com, josevam@unam.mx, lbarboh@yahoo.com.mx, ipcastro@unam.mx, magacm@yahoo.com.mx, alma@ecologia.unam.mx, manuelj@unam.mx, l.colville@kew.org, h.pritchard@kew.org, cmflores@unam.mx

Received 16 February 2014, accepted 30 March 2014.

Abstract

Mexican oregano (*Lippia graveolens*) is used as an aromatic spice and also in traditional medicine, primarily for the treatment of gastrointestinal and respiratory ailments. High demand for *L. graveolens* has led to exploitation of wild populations. Cultivation of *L. graveolens* would reduce the pressure on wild populations, but the effect of *ex situ* propagation on its medicinal properties requires evaluation of the stability of the chemotype. Here, we report the differential accumulation of three flavonoids with biological significance (naringin, naringenin, and pentahydroxyflavanone-hexoside) in leaves of *L. graveolens* plants propagated for 11-months under greenhouse conditions. The effect of light intensity and soil moisture on flavonoid content was studied, and flavonoid concentrations in greenhouse-propagated plants were compared with concentrations in wild individuals in wet and dry seasons from a semi-arid region of Mexico. Pentahydroxyflavanone-hexoside was most abundant of the three compounds, and was unaffected by light intensity or soil moisture. In contrast, the concentration of naringenin was four times greater under high than under low light intensity ($p < 0.05$). Over growing time in greenhouse, there was a positive relationship between the concentration of naringenin, which is a biosynthetic precursor, and its downstream products, naringin and pentahydroxyflavanone-hexoside, under high light intensity ($r = 0.72$ and 0.89 , respectively; $p < 0.05$). Flavonoid content was highly variable in wild samples, although naringenin concentration was higher than in greenhouse-grown plants (100 vs 45.8 mg kg⁻¹ fresh tissue, respectively; $p < 0.05$), while pentahydroxyflavanone-hexoside and naringin were twice as concentrated in the greenhouse-grown plants as in the wild samples. Accumulation of naringenin during *ex situ* propagation can be stimulated by a combination of high light intensity (around 640 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and soil moisture at 80% of field capacity. Under these conditions, naringenin levels are still lower than in wild individuals, but the concentrations are less variable, potentially making pharmacological production more predictable and sustainable.

Key words: *Lippia*, flavonoids, soil moisture, high light, naringenin.

Introduction

The rising demand for useful plants has led to over-exploitation of wild populations and significant reduction of some endemic and native species. Cultivation of useful plants can provide a predictable and sustainable supply to satisfy demand, whilst protecting wild resources¹. However, there is a concern about the quality and safety of the cultivated product, in terms of medicinal properties and taste. Many environmental factors can affect the phytochemical composition of a plant, such as temperature, quality and quantity of light, nutrition, seed quality and provenance, water availability and presence of pathogens, etc². Phytochemical characterization and evaluation of basic physiological parameters are essential to maximize and manage the pharmacological effectiveness of cultivated plants.

Mexican oregano, *Lippia graveolens* Kunth (syn. *Lippia berlandieri* Schauer.), an erect, aromatic, perennial shrub in the Verbenaceae family, is widely used for food and folk medicinal purposes in the treatment of diarrhoea, stomach ache, colic and

as an abortive, anti-pyretic, anti-spasmodic, and anti-inflammatory remedy in Mexico. In Coxcatlán, Puebla, it is frequently used in the treatment of gastrointestinal illnesses and it is recognized as one of the most important useful species in the region³. It is harvested seasonally for national or local consumption. Mexico is the main global exporter of Mexican oregano (including *L. graveolens*) principally to the US, where it supplies half of the market⁴.

L. graveolens is deciduous, losing its leaves during the long dry season from December to August. Local people and farmers harvest leaves from wild plants during their flowering period, which is during the wet season between August and October. The potential ecological effects of the demand for this resource on the population in terms of pollination, seed set, germination, seed dispersal and, in general, the plants' survival and recruitment, and indirect effects on the species' overall ecosystem function have yet to be studied. Some authors⁵ have observed serious

consequences of harvesting *L. graveolens* on their population structure in the Querétaro, Mexico, with a decrease in density, production of inflorescences and mean plant height. Furthermore, the low relative growth rate of *L. graveolens* suggests a slow recovery process following harvest ⁶.

The species is characterized phytochemically by its essential oil content ^{7,8}, which has been shown to have Gram-positive and Gram-negative antibacterial activity ⁹, and by flavonoids ¹⁰ such as naringenin, a central precursor in the biosynthetic pathway of flavonoids as shown in Fig. 1, and its glucoside, naringin. Both naringenin and naringin are reported to have *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity ¹¹⁻¹³. Other medicinally important flavonoids in *L. graveolens* are pentahydroxyflavanones-glucosides, some of which have anti-inflammatory and cytotoxic activity in a mouse model ¹⁴.

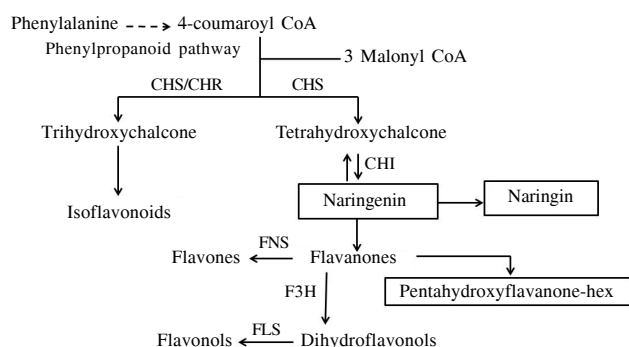


Figure 1. Schema of the core flavonoid biosynthetic pathway. The three compounds determined in this study are indicated in boxes.

CHS: Chalcone synthase, CHR: Chalcone reductase, CHI: Chalcone isomerase, F3H: Flavanone 3 β -hydroxylase, FNS: Flavone synthase, FLS: Flavonol synthase. Modified from Winkel-Shirley ¹⁵.

Recently, there has been increased interest in morphological, biochemical and molecular processes in plants under biotic or abiotic stress conditions. The application of biotic and abiotic stresses to produce higher yields of medicinal, nutritive or industrial secondary metabolites is being studied ^{16,17}.

The effects of environmental conditions on the composition of certain monoterpenes, which are components of essential oils, have been studied in *L. graveolens* ¹⁸, but the effects on flavonoids have not. Flavonoids play important roles as antioxidants and as natural UV filters and may provide protection against photo-oxidative damage ^{19,20}. Therefore, we hypothesized that high light exposure will induce flavonoid accumulation, and flavonoid concentrations in plants propagated under greenhouse conditions will be much less variable than in wild plants. The objective of this study was to evaluate the effect of light intensity and soil moisture on the accumulation of three pharmacologically active flavonoids in the leaves of *L. graveolens* under controlled greenhouse conditions.

Materials and Methods

Plant material and growth conditions: Seeds of *L. graveolens* were harvested from greenhouse-established individuals grown from seeds collected in Zapotitlán, Salinas, Puebla, Mexico in 2005 (N18°19', W97°27'). Seeds were cleaned with 1% NaClO for 5 min, washed three times in distilled water and allowed to imbibe for 24 h. They were subsequently sown on 1% bacteriological agar in Petri dishes and placed in a growth chamber under low fluorescent light (81 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) with a 12/12 h photoperiod, at

28°C with maximum relative humidity of 82%. Seed germination, defined as radicle emergence, was recorded daily to obtain the final percentage of germination, mean germination time and synchrony. Calculations are explained in the 'statistical analysis' section.

When the seedlings had produced 2 nodes and the youngest true leaves were fully developed (three months old), they were transferred to 29.7 cm pots (11.7 inch diameter) with a mixture of soil:agrolite (1:2 by volume), watered to field capacity with complete Hoagland solution and placed in the greenhouse. A total of 160 plants were divided into two groups, which were subjected to two different light intensities: L1, under a shade mesh of 30% transmission, and L2 without the shade mesh. These groups were divided into subgroups (40 plants in each) subjected to two different soil moisture conditions: 80% (M1) and 40% (M2) of field capacity. The hydric potential in leaves was measured using a HR-33T Dew Point microvoltmeter (Wescor, UT, USA) and shown to be -0.38 and -0.78 MPa under M1 and M2 conditions, respectively. Plants were watered once daily with distilled water up to the substrate moisture percentage of the respective treatment. The experiment was carried out at Facultad de Estudios Superiores UNAM Iztacala, located at Tlalnepantla, Mexico (19°31'17.7" N, 99°11'19.5" W). Temperature and photon flux were measured every 15 min using a data logger HOB0® UA 002-64 Pendant (Bourne, MA, USA), Version 1.0.6.

Assimilation rate of CO₂ and stomatal conductance measurements:

The CO₂ assimilation rate and stomatal conductance were measured using a LI-COR 6400 (Lincoln, Nebraska, USA) analyser, operating at a leaf temperature of 25°C and 1500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ of photosynthetic photon flux. Readings were taken on a monthly basis on the second node leaf of three plants per treatment.

Samples and measurements in wild individuals:

For comparison of flavonoid concentrations in greenhouse-grown plants and wild individuals, oregano leaves were harvested from five mature wild plants in San Rafael, Puebla, Mexico (18°11' N, 97°07' W at 883-951 m a.s.l.) in May (dry season) and September (wet season). Leaves were stored in paper bags until extracts were made to analyse flavonoid content. A voucher specimen was deposited at the Herbarium Izta No. 42699.

For each individual sampled, the CO₂ assimilation rate, stomatal conductance and environmental parameters including temperature, and relative humidity were recorded, using a LI-COR 6400 (Lincoln, Nebraska, USA) analyser.

Identification and quantification of flavonoids:

Leaves were weighed (70-500 mg) and ground to a fine powder with mortar and pestle. The powder was mixed with HPLC grade methanol (Honeywell, Morristown, NY, USA) and centrifuged at 14,000 rpm for 3 min in a centrifuge (Brinkmann Instruments, Inc. Cantiague Road, Westbury, New York, USA). Twenty μl of the supernatant was analysed using an 1100 HPLC (Hewlett-Packard, Wilmington, DE, USA) with an Allsphere column (5 μm , 250 \times 4.6 mm, Alltech, Nicholasville, KY, USA) and a mobile phase of water:acetic acid:methanol (60:5:35) at a flow rate of 1 ml min⁻¹ between 0-5 min, and 1.5 ml min⁻¹ between 5.1 and 20 min. The column eluate was monitored at 260 nm using a diode array detector (DAD).

Naringenin and naringin were identified based on comparison with standards (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), which were diluted in methanol to a final concentration of 29 and 13.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively. Pentahydroxyflavanone-hexoside was putatively identified based on the literature¹⁰ and comparison of reported spectral UV λ_{max} ¹⁴, and confirmed using LC-MS. Samples were analysed using an Accela HPLC (Pump, autosampler, detector, Thermo Scientific Austin, TX, USA) with a 150 mm \times 2.1 mm \times 2.6 μm Phenomenex Kinetex C18 column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) and a water/methanol/ acetonitrile +1% formic acid mobile phase with a gradient of 90:0:10 (t = 0 min), 0:90:10 (t = 20 min), 0:90:10 (t = 25 min), 90:0:10 (t = 27 min), 90:0:10 (t = 37 min) and a flow rate of 400 $\mu\text{l min}^{-1}$. The column eluate was monitored by a PDA detector with a wavelength scan range of 200 to 600 nm and a scan rate of 1 scan s^{-1} . Mass spectra were acquired using LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific, Austin, TX, USA). The detection was accomplished using electrospray ionization (ESI) in the positive and negative mode, sheath and auxiliary gas flow at 60 and 20 arbitrary units, capillary temperature of 300°C, source voltage of \pm 3.50 kV and source current of 100 μA . To avoid errors arising from degradation, all of the analyses were made within 24 h of extraction. Three plants per treatment were sampled on a monthly basis.

Statistical analysis: Flavonoid content (transformed values) with reference to treatment and time was analysed by 3-way ANOVA, using a 0.05 significance level. A *post hoc* least significant difference (LSD, $\alpha \geq 0.05$) test was applied to all significant differences found. Means of phytochemical and physiological parameters of greenhouse and wild plants were compared by Student's *t*-test at 0.05 significance, using STATISTICA/Win StatSoft® 1998, version 6.0 (Tulsa, Oklahoma, USA). Correlations were measured using the Pearson correlation coefficient with a 0.05 significance level. Cumulative germination percentages per replicate were arcsine-transformed and adjusted to an exponential-sigmoid model ($Y = a/[1+b \exp(-cx)]$) to obtain maximum germination rates (MGR)²¹. The first derivative along the exponential sigmoid curve was fitted to a Gaussian model ($Y = a+b \exp(-0.5[(x-c)/d]^2)$) to estimate the mean germination time (MGT) and synchrony (S) using the program TCWIN 3 Table Curve 2D, version 3.0 (AISN Software, Chicago, IL, USA).

Results and Discussion

Germination and propagation: The mean percentage germination of *L. graveolens* seeds was $70 \pm 8\%$. The highest germination rate (HGR) was 40.9% seeds day^{-1} ; the mean time of germination (MTG) was 3.1 days and the synchrony (S) was 0.107. These results show that *L. graveolens* seeds germinate quickly and attain a high germination value without requiring any scarification process.

In the greenhouse, photonic flux daily averages varied seasonally under the two light conditions, with a maximum value in April (482 and 760.91 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ of photosynthetically active radiation, PAR, for L1 and L2, respectively) and a minimum in October (96.12 and 208.93 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR, for L1 and L2, respectively). The highest values of temperature and photonic flux were observed under L2 conditions (Fig. 2). The highest photonic flux values were around 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, which is a relatively high value in comparison with the growth conditions (300 to 600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) used for studies of light stress in *Brassica rapa*²² or *Arabidopsis*²³. However, it is worth emphasising that during the dry season in Mexico photonic flux can reach values of 1500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Despite having C3 metabolism, *L. graveolens* is well adapted to arid and semi-arid regions, and plants shed their leaves during the dry season as a mechanism for avoiding water loss.

Assimilation rate of CO₂ and stomatal conductance: The assimilation rate of CO₂ tended to decrease during the first few months of the experiment (April–June), particularly under L2 conditions, and at the end of the experiment in October (Fig. 3). Between June and August the CO₂ assimilation rate increased and reached the highest mean value in August under L2 conditions. This coincided with increases in temperature and photonic flux between July and August (Fig. 2). The effect of soil moisture on CO₂ assimilation rate was less clear. Generally, the CO₂ assimilation rate was higher in plants grown in M1 conditions (Fig. 3). Under high light exposure (L2) in August and September, the CO₂ assimilation rate was significantly lower in plants grown in M2 conditions compared to M1. This could be due to the increase in maximum temperature and photonic flux in August and September, which could further restrict the availability of water under M2 conditions due to greater evaporation. Values of leaf water potential under M2 conditions were even more negative than values in *Lippia sidoides* after 8 days without irrigation (-0.66 MPa)²⁴. However, differences in the assimilation

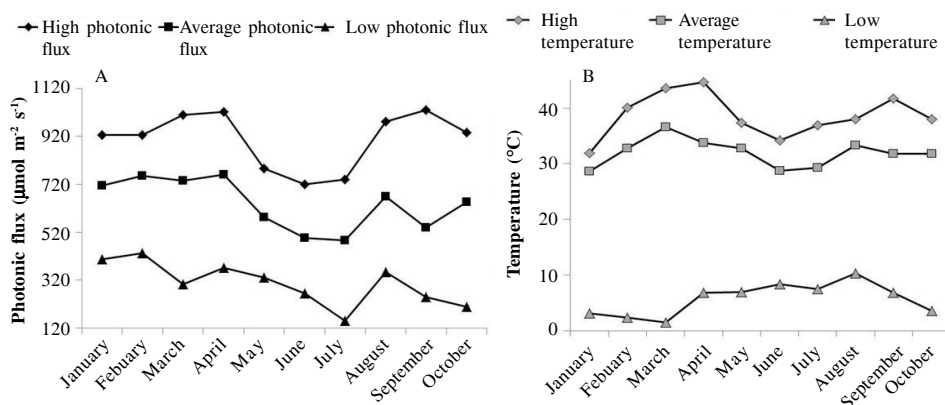


Figure 2. Oscillation of photonic flux (A) and temperature (B) in the greenhouse without shade mesh (L2) during the 10 months of the experiment.

High and low values were defined as maximum and minimum averages from data registered per day.

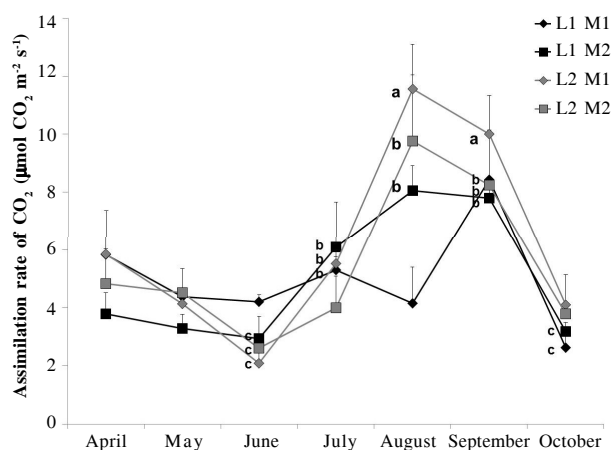


Figure 3. Assimilation rate of CO₂ in *L. graveolens* in greenhouse with (L1) or without shade mesh (L2), and soil moisture of 80% (M1) or 40% (M2) of field capacity.

Values are means ± S.E.M. of three replicates. Letters indicate significant differences ($p \leq 0.005$) within treatments.

rate of CO₂ were not dramatically affected. These results indicate that Mexican oregano plants are more sensitive to light incidence than water suppression.

Stomatal conductance was higher in plants in L1 (with the mesh) and M1 (80% of field capacity) conditions, but the differences were not significant (data not shown). It is relevant to point out that the lowest stomatal conductance occurred in August, a month when there was an increase in the greenhouse temperature. Plants are likely to close their stomata as a mechanism to prevent evapotranspiration that would result in embolisms and cavitation, one of the most common mechanisms of reduction of plant hydraulic conductance, especially under water deficit²⁵.

Measurements in wild and greenhouse-grown plants during September (wet season) showed that the assimilation rate of CO₂ in the L2/M1 treatment was significantly greater than that of wild individuals ($t \geq 0.005$). Stomatal conductance was positively correlated with relative humidity ($r = 0.694$, $p < 0.0001$), and it was higher in wild individuals than the greenhouse plants ($t \geq 0.005$), as shown in Fig. 4.

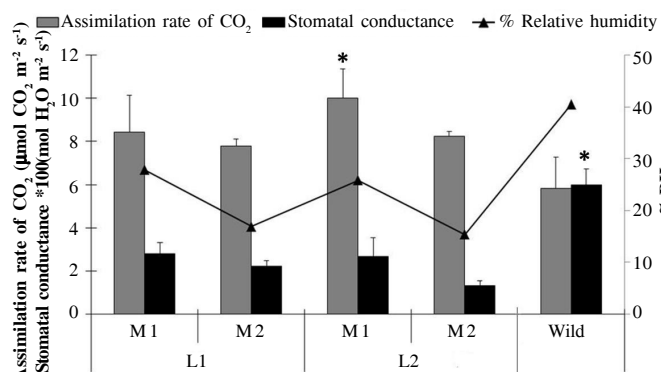


Figure 4. Comparison of physiological parameters between wild and greenhouse-grown individuals of *L. graveolens* in the wet season, and their relationship with relative humidity (RH).

Values are means ± S.E.M. of three replicates. Means with asterisks are significantly different ($t \leq 0.005$).

Identification and quantification of flavonoids: Three flavonoids were identified in *L. graveolens* leaves: naringenin, naringin and pentahydroxyflavanone-hexoside (Table 1).

Neither, naringenin or naringin, were found in one month old seedlings before applying treatments, but pentahydroxyflavanone-hexoside had a mean concentration of 22.7 ± 8.6 mg kg⁻¹ fresh tissue in seedlings. This compound was the most abundant compound in all samples.

In greenhouse-grown plants the lowest concentrations of naringenin occurred in April under M1 conditions, and in May and August in plants grown under M2 conditions. Naringenin levels in M1 plants peaked in October, with higher concentrations under L2/M1 conditions. Under M2 conditions the naringenin levels were the highest in September and November for L2 and L1 plants, respectively, with significantly ($p < 0.05$) higher concentrations in L2 compared to L1 plants (Fig. 5).

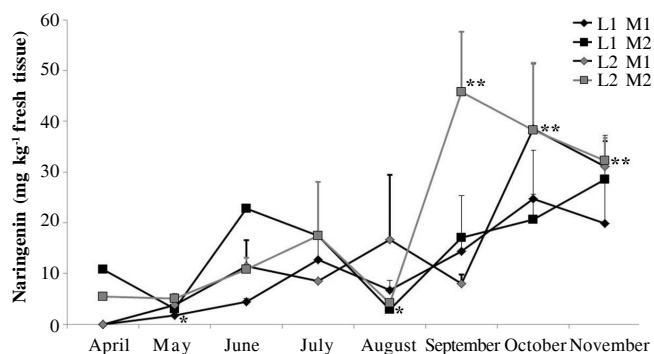


Figure 5. Accumulation of naringenin in *L. graveolens* in greenhouse with (L1) or without shade mesh (L2) and soil moisture of 80% (M1) or 40% (M2) field capacity in 6 months.

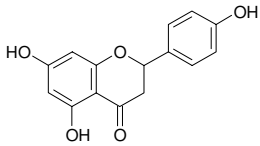
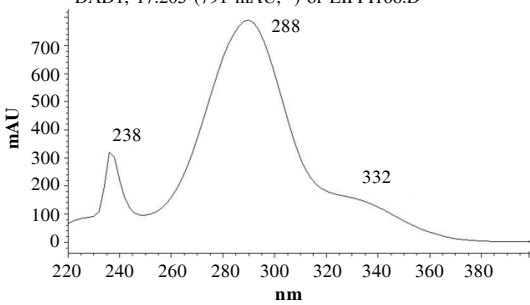
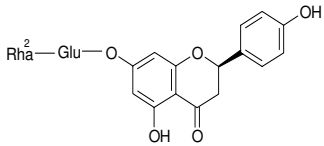
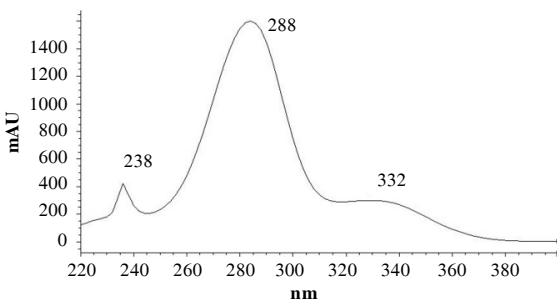
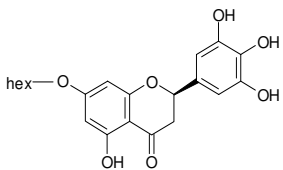
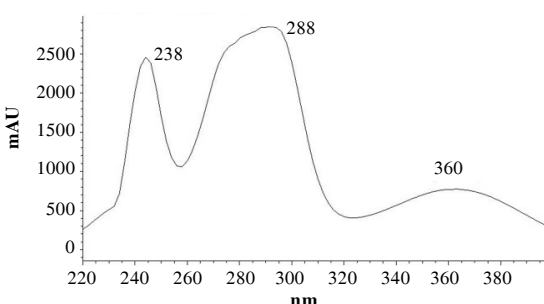
Values are means ± S.E.M. of three replicates. Significant differences between treatments over time are denoted by asterisks ($p \leq 0.005$).

It is interesting to note that there is a time lag between the peaks in CO₂ assimilation rate and naringenin accumulation. This relationship between photosynthesis rate or pigments, and flavonoid content, has been reported in other species including grapevine, sunflower, buckwheat, and *Labisia pumilia* during drought²⁶⁻²⁸. One possible mechanism involves the accumulation of active oxygen species under stress conditions, which act as a molecular signal to trigger the expression of genes and enzymes involved in secondary metabolite biosynthesis pathways.

The association between light and flavonoid synthesis has been widely documented in plants, including medicinal plants^{29,30} with light incidence and UV radiation reported to induce biosynthetic pathway genes such as chalcone synthase (*chs*) and chalcone isomerase (*chi*)³¹⁻³³. It has been suggested that metabolic responses under conditions of water stress and high irradiation occur indirectly as a consequence of oxidative stress, which could be directly related to the accumulation of flavonoids as antioxidant³⁴.

The most concentrated flavonoid in *L. graveolens* was pentahydroxyflavanone-hexoside. The highest concentration was in the L1/M2-treated plants in October, with a mean of 918.3 mg kg⁻¹ fresh tissue (Fig. 6), but there was no relationship between pentahydroxyflavanone-hexoside concentration and light or soil moisture. Naringin was found at minimal concentrations in all samples, from 0 to 2.36 mg kg⁻¹ fresh tissue, and there was no apparent relationship with light intensity or soil moisture.

Table 1. Peak assignments of three biologically active compounds in methanolic extracts of leaves of *L. graveolens*. The retention time (t_R), absorption spectrum, and λ_{max} of each compound is shown. The chromatographic conditions are described in the Materials and Methods section.

Compound	Chemical structure	t _R (min)	Absorption spectrum at 260 nm
Naringenin		17.2	DAD1, 17.205 (791 mAU, -) of LIPPI166.D 
Naringin		7.3	DAD1, 7.266 (1600 mAU, -) of LIPPI167.D 
Pentahydroxy flavanone-hexoside		4.1	DAD1, 4.099 (2847 mAU, -) of LIPPI174.D 

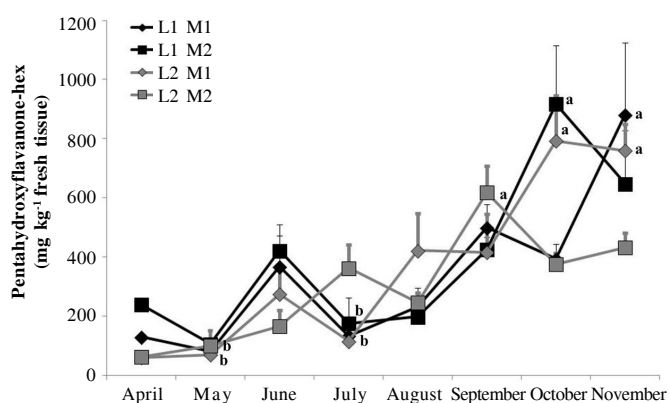


Figure 6. Accumulation of pentahydroxyflavanone-hexoside in *L. graveolens* in greenhouse with (L1) or without shade mesh (L2) and soil moisture of 80% (M1) or 40% (M2) field capacity in 6 months. Values are means ± S.E.M. of three replicates. Means with letters indicate significant differences ($p \leq 0.005$) within treatments over time.

The concentration values obtained in this study were lower than those reported for the species by Lin *et al.*¹⁰. Nevertheless, the proportions reported by these authors for naringenin and pentahydroxyflavanone-hexoside are similar to those obtained in the present study. Same authors confirmed the high concentration of pentahydroxyflavanone-hexoside, a compound that they determined as the principal flavonoid in this species. Interestingly, naringin (glucoside), with maximum concentrations of 2 mg kg⁻¹, was up to 60 times less abundant than naringenin (aglycone). Theoretically, the glycosylation of bioactive substances generates compounds of greater polarity, which have higher bioavailability and are easier to transport³⁵. Glycosylation may also stabilise secondary metabolites³⁶. Nevertheless, acylation in flavonoids allows absorption of UV-B radiation while salicylate compounds are less effective for this function³⁷, which would be a clear advantage for the aglycones under conditions of high light.

Naringenin is the central precursor of many flavonoids (Fig. 1). We found a positive relationship between naringenin content and pentahydroxyflavanone-hexoside in all treatments ($r = 0.89$, $p \leq 0.001$). A positive relationship between naringin and pentahydroxyflavanone-hexoside ($p \leq 0.05$) contents was

observed under high light conditions (L2), whilst there was a positive correlation between naringenin and naringin ($r = 0.72$, $p \leq 0.001$) under the L2/M1 treatment. The relationship between the accumulation of the naringenin and the two downstream products in the biosynthetic pathway show that under low light intensities, the naringenin (aglycone) is generated at the expense of the naringin (glycoside), while higher intensities induce metabolism of naringenin to form naringin. This has been demonstrated in other medicinal and food plant species, and even observed post-harvest³⁸. Based on these results, it can be suggested that despite its high concentrations, pentahydroxyflavanone-hexoside does not play a major role in the defense against high light intensity. However, it is likely to be important for *L. graveolens*' defense against other factors. On the other hand, naringenin seems to be crucial in defense against high light conditions and water deficit, its high levels in wild plants (Fig. 7) suggest a constitutive response to the extreme natural conditions where this species lives, e.g. an adaptation to semi-arid and arid regions, with naturally variable conditions of light incidence and water limitation.

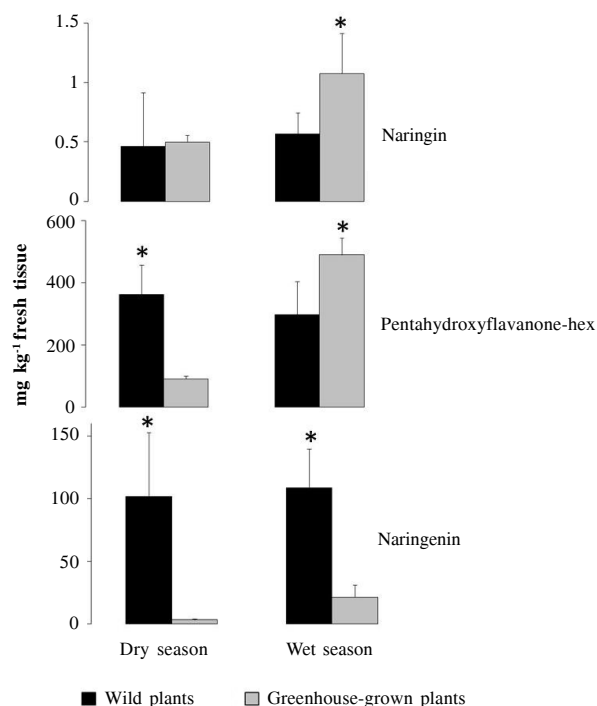


Figure 7. Accumulation of three flavonoids in *L. graveolens* propagated in the greenhouse (gray columns) in comparison with wild plants (black columns) in the dry season (May) and wet season (September).

Values are means \pm S.E.M. of three replicates. Asterisks indicate significant statistical differences ($t \leq 0.005$) between wild and greenhouse-grown plants.

Comparison with wild plants: There was high variability in the concentrations of all three flavonoids in wild plants, even between neighbor individuals, with values ranging from 43 to 232 mg kg⁻¹ fresh tissue for naringenin, 0.3 to 2.7 mg kg⁻¹ fresh tissue for naringin and 93.4 to 673.3 mg kg⁻¹ fresh tissue for pentahydroxyflavanone-hexoside. The concentrations of naringin and pentahydroxyflavanone-hexoside were statistically higher in greenhouse-grown plants ($t \geq 0.05$) than in wild individuals, but naringenin was lower (Fig. 7). The high variability in the concentration of secondary compounds in individuals of this species results from differences in cultivars or populations,

collection time and place, storage conditions, and sample processing^{9, 10, 38}. Even under greenhouse conditions, there is high variability in the concentration of essential oil¹⁸, probably due to genetic variation of the germplasm and seeds. Within clones and varieties the variability in composition of secondary metabolites is due to environmental factors^{39, 40}. Microclimatic factors⁴¹ and fluctuations in enzyme action over time⁴² will also influence the differential accumulation of flavonoids, especially in natural conditions. Thus, propagation under controlled conditions represents an additional advantage besides increasing the concentration of a particular metabolite: it generates greater homogeneity in the phytochemical composition without decreasing the assimilation rate of CO₂. Greenhouse propagation enables the natural process of senescence and leaf abscission to be circumvented, so that the aerial resource, which is useful for food and medicinal purposes, can be available all the year round. Selection of chemotypes characterized by their biological usefulness may enable even greater homogeneity and productivity of one or a group of compounds to be obtained.

Relatively high concentrations of flavonoids in wild individuals may result from high constant incidence of light. Fini *et al.*²⁰ reported that light stress irrespective of the relative proportions of the solar wavelengths, upregulates flavonoid biosynthesis. In the case of naringenin, which is present in higher concentrations in wild plants, it could be a constitutive response to extreme natural conditions. In fact, it has been demonstrated that this flavanone has stronger antioxidant capacity than its glucoside, naringin⁴³, and may offer a higher level of photoprotection as a result.

Conclusions

We present evidence that shows the effect of light intensity and soil moisture on the accumulation of three flavonoids with medicinal importance in *Lippia graveolens* plants grown under controlled greenhouse conditions. We show that greenhouse propagation of *L. graveolens* using high light levels, up to a maximum of 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, tends to increase the accumulation in the leaves of naringenin and naringin, both of which have important pharmacological applications. The high light levels did not lead to a reduction in the CO₂ assimilation rate, which indicates that the plants were not stressed. The accumulation of naringenin was lower than in wild plants, but there was much less variability in concentration.

The accumulation of pentahydroxyflavanone-hexoside did not appear to be affected by light or soil moisture during plant growth, and its high concentrations suggest an important role in *L. graveolens*' survival.

Finally, we emphasize the value of integrating phytochemical, physiological, and ecological studies that allow the empirical development of optimal propagation and growth of wild plants under controlled conditions to obtain viable and productive plants with active medicinal properties.

Acknowledgements

The project was funded by MGU, a philanthropist based in Spain, as part of Project MGU-the Useful Plants Project managed by the Royal Botanic Gardens, Kew. AM was a fellow of the Postgraduate Program in Biological Sciences, UNAM, and was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

CONACyT, study scholarship 210554. The Royal Botanic Gardens, Kew receives grant-in-aid from Defra.

We thank Dr. Geoffrey Kite for his contribution in analysing flavonoids by LC-MS, and to Alberto Ms.C. Arriaga Frias and Dr. Gerardo Ortiz Montiel for their valuable comments on the manuscript.

References

- ¹Fennell, C. W., Light, M. E., Sparg, S. G., Stafford, G. I. and Van Staden, J. 2004. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Agricultural and storage practices. *J. Ethnopharmacol.* **95**:113-121.
- ²Calixto, J. B. 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz. J. Med. Biol. Res.* **33**:179-189.
- ³Hernández, T., Canales, M., Caballero Durán, A. and 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**:17-27.
- ⁴Olivier, G. W. 1996. The world market of oregano. Proceedings of the IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute). International Workshop on Oregano. 8-12 May. CIHEAM, Valenzano, Bari, Italy, 142 p.
- ⁵Osorno-Sánchez, T., Torres Ruiz, A. and Lindig-Cisneros, R. 2012. Effects of harvesting intensity on population structure of *Lippia graveolens* (Verbenaceae, Lamiales) in the semidesert of Queretaro, Mexico. *Afr. J. Agric. Res.* **7**:100-108.
- ⁶Mata-González, R. and Meléndez-González, R. 2005. Growth characteristics of mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) under salt stress. *Southwest. Nat.* **50**:1-6.
- ⁷Pascual, M. E., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez Mata, D. and Villar, A. 2001. *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology, a review. *J. Ethnopharmacol.* **76**:201-214.
- ⁸Domínguez, X. A., Sánchez, V., Suárez, M., Baldas, J. H. and González, M. R. 1989. Chemical constituents of *Lippia graveolens*. *Planta Med.* **55**:208-209.
- ⁹Hernández, T., Canales, M., Ávila, J. G., García, A. M., Meraz, S., Caballero, J. and Lira, R. 2009. Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lippia graveolens* H.B.K. (Verbenaceae). *Bol. Latinoam. Caribe Plant Med. Aromat.* **8**:295-300.
- ¹⁰Lin, L., Mukhopadhyay, S., Robbins, R. and Harnly, J. M. 2007. Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. *J. Food Comp. Anal.* **20**:361-369.
- ¹¹Heo, H. J., Kimdo Shin, S. C., Kim, M. J., Kim, B. G. and Shin, D. H. 2008. Effect of antioxidant flavanone, naringenin, from *Citrus junos* on neuroprotection. *J. Agric. Food Chem.* **52**:1520-1525.
- ¹²Jeon, S. M., Kim, H. Y., Kim, H. J., Do, G. M., Jeong, T. S., Park, Y. B. and Choi, M. S. 2007. Hypocholesterolemic and antioxidative effects of naringenin and its two metabolites in high-cholesterol fed rats. *Transl. Res.* **149**:15-21.
- ¹³Mulvihill, E. E., Allister, E. M., Sutherland, B. G., Telford, D. E., Sawyez, C. G., Edwards, J. Y., Markle, J. M., Hegele, R. A. and Huff, M. W. 2009. Naringenin prevents dyslipidemia, apoB overproduction and hyperinsulinemia in LDL-receptor null mice with diet-induced insulin resistance. *Diabetes* **58**:2198-2210.
- ¹⁴González-Güereca, M. C., Soto-Hernández, M. and Martínez-Vázquez, M. 2010. Isolation of (-)(2S)-5,6,7,3',5'-pentahydroxyflavanone-7-O-β-D-glucopyranoside, from *Lippia graveolens* H.B.K. var. *berlandieri* Schauer, a new anti-inflammatory and cytotoxic flavanone. *Nat. Prod. Res.* **24**:1528-1536.
- ¹⁵Winkel-Shirley, B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**:218-223.
- ¹⁶Edreva, A., Velikova, V., Tsonev, T., Dagnon, S., Gürel, A., Aktas, L. and Gesheva, F. 2008. Stress-protective role of secondary metabolites: Diversity of functions and mechanisms. *Gen. Appl. Plant Physiol.* **34**:67-78.
- ¹⁷Zhang, W. J. and Björn, L. O. 2009. The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. *Fitoterapia* **80**:207-218.
- ¹⁸Dunford, N. and Silva, R. 2005. Bioactive components of Mexican oregano oil as affected by moisture and plant maturity. *J. Essent. Oil Res.* **17**:668-671.
- ¹⁹González-Güereca, M. C., Soto-Hernández, M., Kite, G. and Martínez-Vázquez, M. 2007. Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de Orégano Mexicano (*Lippia graveolens* HBK var. *berlandieri* Schauer). *Rev. Fitotec. Mex.* **30**:43-49.
- ²⁰Fini, A., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F. and Tattini, M. 2010. Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plants. *Plant Signal Behav.* **6**:709-711.
- ²¹Olvera-Carrillo, Y., Márquez-Guzmán, J., Barradas, V. D., Sánchez-Coronado, M. E. and Orozco-Segovia, A. 2001. Germination of the hard seed coated *Opuntia tomentosa* S. D., a cacti from México valley. *J. Arid Environ.* **55**:29-42.
- ²²Jiao, S., Emmanuel, H. and Guikema, A. 2004. High light stress inducing photoinhibition and protein degradation of photosystem I in *Brassica rapa*. *Plant Sci.* **167**:733-741.
- ²³Schmitz, J., Schottler, M. A., Krueger, S., Geimer, S., Schneider, A., Kleine, T., Leister, D., Bell, K., Flugge, U. and Hausler, R. E. 2012. Defects in leaf carbohydrate metabolism compromise acclimation to high light and lead to a high chlorophyll fluorescence phenotype in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* **12**:8. doi 10.1186/1471-2229-12-8.
- ²⁴Caldeira Almeida Alvarenga, I., Vasconcelos Valadares, R., Ronie Martins, E., Gonçalves Oliveira, F., Silva de Figueiredo, L. and Koji Kobayashi, M. 2011. Water stress before harvest of pepper rosmarin. *Pesq. Agrop. Bras.* **46**:706-711.
- ²⁵Mencuccini, M. and Comstock, J. 1997. Vulnerability to cavitation in populations of two desert species, *Hymenoclea salsola* and *Ambrosia dumosa*, from different climatic regions. *J. Exp. Bot.* **48**:1323-1334.
- ²⁶Jitareanu, C. D., Toma, L. D., Slabu, C. and Marta, A. E. 2011. Effect of weather conditions on photosynthetic and flavonoid pigment contents in leaves of grapevine cultivars during growing season. *Journal of Food, Agriculture & Environment* **9**(3&4):793-798.
- ²⁷Ebrahimian, E. and Bybordi, A. 2012. Influence of ascorbic acid foliar application on chlorophyll, flavonoids, anthocyanin and soluble contents of sunflower under conditions of water deficit stress. *Journal of Food, Agriculture & Environment* **10**(1):1026-1030.
- ²⁸Ghorbani Ghouszhi, H., Sahraroo, A., Reza Yavari, A. and Reza Amerian, M. 2009. Effect of mist, irrigation and plant density levels on rutin content of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.). *Journal of Food, Agriculture & Environment* **7**(1):179-181.
- ²⁹Briskin, D. P. and Gawienowski, M. C. 2001. Differential effects of light and nitrogen on production of hypericins and leaf glands in *Hypericum perforatum*. *Plant Physiol. Biochem.* **39**:1075-1081.
- ³⁰Yaginuma, S., Shiraishi, T., Ohya, H. and Igarashi, K. 2002. Polyphenol increases in safflower and cucumber seedlings exposed to strong visible light with limited water. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**:65-72.
- ³¹Schmelzer, E., Jahnen, W. and Hahlbrock, K. 1988. *In situ* localization of light-induced chalcone synthase mRNA, chalcone synthase, and flavonoid end products in epidermal cells of parsley leaves. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **85**:2989-2993.
- ³²Christensen, A. B., Gregersen, P. L., Schroder, J. and Collinge, D. B. 1998. A chalcone synthase with an unusual substrate preference is expressed in barley leaves in response to UV light and pathogen attack. *Plant Mol. Biol.* **37**:849-857.
- ³³Giuntini, D., Lazzeri, V., Calvenzani, V., Dall'asta, C., Galaverna, G., Tonelli, C., Petroni, K. and Ranieri, A. 2008. Flavonoid profiling and biosynthetic gene expression in flesh and peel of two tomato genotypes grown under UV-B depleted conditions during ripening. *J. Agric. Food Chem.* **56**:5905-5915.
- ³⁴Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z. E., Rahmat, A., Ahmat, A., Wahab, P. E. M. and Halim, M. R. A. 2010. Effect of different light intensities on total phenolics and flavonoids synthesis and anti-oxidant activities in young

- ginger varieties (*Zingiber officinale* Roscoe). *Int. J. Mol. Sci.* **11**:3885-3897.
- ³⁵Tumanova, E., Patov, S., Vasily Punegoc, V., Kutchin, A. V., Frolova, L. L. and Kodess, M. I. 2002. Kennigs-Knorr's glycosylation of monoterpenoids from vegetative essential oils. Chemistry and computational simulation. *Butlerov Communications* **2**:89-90.
- ³⁶Harborne, J. B. 1980. Plant phenolics. In Bell, E. A. and Charlwood, B. V. (eds). *Encyclopedia of Plant Physiology. Secondary Plant Products*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 329 p.
- ³⁷Fischbach, R. J., Kossmann, B., Panten, H., Steinbrecher, R., Heller, W., Seidlitz, H. K., Sandermann, H., Hertkorn, N. and Schnitzler, J. P. 1999. Seasonal accumulation of ultraviolet-B screening pigments in needles of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst). *Plant Cell Environ.* **22**:27-37.
- ³⁸Calvo-Irabien, L. M., Yam-Puc, J. A., Dzib, G., Escalante-Erosa, F. and Peña-Rodríguez, L. M. 2009. Effect of postharvest drying on the composition of mexican oregano (*Lippia graveolens*) essential oil. *J. Herbs, Spices Med. Plants* **15**:281-287.
- ³⁹Wamatu, J. N., Thomas, E. and Piepho, H. P. 2003. Responses of different Arabica coffee (*Coffea arabica* L.) clones to varied environmental conditions. *Euphytica* **129**:175-182.
- ⁴⁰Crocoll, C., Asbach, J., Novak, J., Gershenzon, J. and Degenhardt, J. 2010. Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. *Plant Mol. Biol.* **73**:587-603.
- ⁴¹Hashiba, K., Iwashina, T. and Matsumoto, S. 2006. Variation in the quality and quantity of flavonoids in the leaves of coastal and inland *Campanula punctata*. *Biochem. Syst. Ecol.* **34**:854-861.
- ⁴²Cheng, S., Xu, F., Li, L., Cheng, H. and Zhang, W. 2012. Seasonal pattern of flavonoid content and related enzyme activities in leaves of *Ginkgo biloba* L. *Not. Bot. Horti. Agrobi.* **40**:98-106.
- ⁴³Cavia-Saiz, M., Busto, M. D., Pilar-Izquierdo, M. C., Ortega, N., Pérez-Mateos, M. and Muñoz, P. 2010. Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: A comparative study. *J. Sci. Food Agric.* **90**:1238-1244.