



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“Determinación del contenido de compuestos volátiles en
etapas de desarrollo y durante la fertilización y micorrización
en Nurite [*Satureja macrostema* (Benth.) Briq]”**

TESIS

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

QFB. RAFAEL TORRES MARTÍNEZ

Directores de tesis:

DC. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA

DC. JORGE MOLINA TORRES

MORELIA, MICHOACÁN, FEBRERO 2013

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología Vegetal, del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y el laboratorio de Fitobioquímica, del CIVESTAV Unidad Guanajuato, bajo la Dirección de los D.Cs. Rafael Salgado Garciglia y Jorge Molina Torres, responsables de laboratorio, respectivamente.

DEDICATORIA

*Con todo mi amor y cariño,
para las personas más importantes en mi vida:*

*A mis Padres,
Ma. Cristina Martínez y Rafael Torres*

*A mis hermanas,
Ma. del Carmen y Alejandrina Torres Martínez*

*A mis sobrinos,
Camila y Nicolás García Torres*

AGRADECIMIENTOS

Al D.C. Rafael Salgado Garciglia, por su confianza, apoyo y respaldo, así como su valiosa asesoría durante esta investigación y para la conclusión de la presente tesis.

Al D.C. Jorge Molina Torres, por compartir sus conocimientos y acertados consejos para la realización de este trabajo.

A los sinodales D.Cs. Rodolfo López Gómez, Lourdes Ivette Macías Rodríguez y Mauro Manuel Martínez Pacheco, gracias por sus comentarios y sugerencias que ayudaron a mejorar este trabajo.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por abrirme sus puertas cuando otras se cerraron. A todos y cada uno de los profesores de la Escuela de Químico Fármaco Biología y el Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, que de alguna u otra forma contribuyeron en mi formación académica y profesional.

A la Biól. Alejandra Hernández García, por las enseñanzas y orientación brindadas durante el desarrollo de mi trabajo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

Al M.C. Enrique Ramírez Chávez (CINVESTAV Irapuato), Biól. Yolanda García Rodríguez (CIEco, UNAM) y Biól. Lorena Carreto Montoya (IIQB-UMSNH), por su tiempo y disposición, ya que sin su apoyo, experiencia y conocimientos, este trabajo no hubiese alcanzado sus objetivos.

Especial agradecimiento al Biól. Rodolfo Fulgencio Negrete por el invaluable apoyo que siempre brindo en el desarrollo de esta investigación.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Escuela de Químico Fármaco Biología, Facultad de Biología e Instituto de Investigaciones Químico Biológicas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

Finalmente agradezco a las instituciones que apoyaron financiando el proyecto.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	6
RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN	9
2. ANTECEDENTES	12
2.1. PLANTAS AROMÁTICAS Y MEDICINALES	12
2.1.1. Constituyentes químicos en plantas aromáticas medicinales	15
2.1.2. Factores que afectan la composición de los compuestos volátiles	18
2.1.2.1. Factores genéticos	18
2.1.2.2. Etapa fenológica y tipo de órgano	19
2.1.2.3. Factores abióticos	20
2.1.2.4. Efecto de la fertilización	21
2.1.2.5. Factores bióticos	22
2.1.2.5.1. Hongos micorrízicos	25
2.2. NURITE (<i>Satureja macrostema</i>)	29
2.2.1. Taxonomía y distribución de nurite	29
2.2.2. Características fitoquímicas de <i>S. macrostema</i>	31
2.2.3. Usos y propiedades de nurite	33
2.2.4. Problemática de nurite	34
3. JUSTIFICACIÓN	36
4. HIPOTESIS	37
5. OBJETIVOS	37
5.1. OBJETIVO GENERAL	37
5.1.1. Objetivos específicos	37
6. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL	38
7. MATERIALES Y MÉTODOS	39
7.1. MATERIAL BIOLÓGICO	39
7.2. MICROPROPAGACIÓN DE <i>S. macrostema</i>	39
7.2.1. Establecimiento <i>in vitro</i>	39
7.2.2. Multiplicación de brotes	40
7.2.3. Enraizado de brotes	40
7.2.4. Trasplante, aclimatación y cultivo en invernadero	41
7.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE VOLÁTILES EN <i>S. macrostema</i>	41
7.3.1. Análisis y cuantificación de compuestos volátiles	42
7.3.1.1. Método de extracción de compuestos volátiles	42
7.3.1.2. Método de cromatografía de gases-espectrometría de masas	43
7.3.1.3. Identificación de los compuestos volátiles	43
7.3.1.4. Cuantificación de los compuestos volátiles	43
7.4. COMPUESTOS VOLÁTILES EN PLANTAS DE NURITE <i>in vitro</i> , <i>in situ</i> Y CULTIVADAS EN INVERNADERO	44
7.4.1. Compuestos volátiles en plantas de nurite cultivadas <i>in vitro</i>	44
7.4.2. Compuestos volátiles en plantas de nurite <i>in situ</i> y cultivadas en invernadero	44

7.5.	TRATAMIENTOS DE FERTILIZACIÓN Y MICORRIZACIÓN EN PLANTAS DE NURITE CULTIVADAS EN INVERNADERO	45
7.5.1.	Aplicación de fertilizantes químicos	45
7.5.2.	Inoculación de micorriza arbuscular	46
7.5.3.	Parámetros determinados	48
7.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	48
8.	RESULTADOS	49
8.1.	MICROPROPAGACIÓN <i>S. macrostema</i>	49
8.1.1.	Germinación <i>in vitro</i> de semillas de nurite	49
8.1.2.	Multiplicación de brotes	51
8.1.3.	Enraizado y desarrollo de las plántulas	52
8.1.4.	Trasplante, aclimatación y cultivo en invernadero	52
8.2.	IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES EN PLANTAS DE NURITE	54
8.2.1.	Plantas <i>in vitro</i>	54
8.2.2.	Plantas <i>in situ</i>	56
8.2.3.	Plantas en invernadero	57
8.3.	EFFECTO SOBRE EL CONTENIDO DE COMPUESTOS VOLÁTILES SEGÚN LAS ETAPAS DE DESARROLLO Y CRECIMIENTO EN PLANTAS DE NURITE	57
8.3.1.	Efecto de la fenología sobre los compuestos volátiles en plantas <i>in situ</i> de nurite	57
8.3.2.	Efecto del crecimiento sobre los compuestos volátiles en plantas de nurite cultivadas en invernadero	59
8.4.	EFFECTO DE LA FERTILIZACIÓN Y LA MICORRIZACIÓN EN PLANTAS DE NURITE CULTIVADAS EN INVERNADERO SOBRE EL CONTENIDO DE COMPUESTOS VOLÁTILES	61
8.4.1.	Efecto de la fertilización química	61
8.4.1.1.	Altura	61
8.4.1.2.	Número de hojas	62
8.4.1.3.	Área foliar	62
8.4.1.4.	Efecto de la fertilización sobre la biomasa en peso fresco y seco	64
8.4.1.5.	Efecto de la fertilización sobre el contenido de compuestos volátiles	65
8.4.2.	Efecto de la micorrización	68
8.4.2.1.	Porcentaje de colonización	69
8.4.2.2.	Altura	69
8.4.2.3.	Longitud de raíz	69
8.4.2.4.	Biomasa (peso fresco y seco)	71
8.4.2.5.	Efecto de la micorriza sobre el contenido de compuestos volátiles	71
9.	DISCUSIÓN	75
9.1.	MICROPROPAGACIÓN DE NURITE	75
9.1.1.	Germinación	75
9.1.2.	Multiplicación y desarrollo de brotes	76
9.1.3.	Enraizado y desarrollo de plántulas	77
9.1.4.	Trasplante y aclimatación	77
9.2.	COMPUESTOS VOLÁTILES EN PLANTAS DE NURITE	78
9.2.1.	Plantas <i>in vitro</i>	78

9.2.2. Compuestos volátiles en las etapas de desarrollo y fenología de plantas de nurite <i>in situ</i> y cultivadas en invernadero	78
9.3. EFECTO DE LA FERTILIZACIÓN Y LA MICORRIZACIÓN EN PLANTAS DE NURITE CULTIVADAS EN INVERNADERO SOBRE EL CONTENIDO DE COMPUESTOS VOLÁTILES	81
9.3.1. Efecto de la fertilización Inorgánica (NPK) sobre el crecimiento	81
9.3.2. Efecto de la fertilización Inorgánica (NPK) sobre el contenido de compuestos volátiles	83
9.3.3. Efecto de la micorrización sobre el crecimiento	87
9.3.4. Efecto de la micorrización sobre el contenido de compuestos volátiles	89
10. CONCLUSIONES	93
11. PERSPECTIVAS	94
12. LITERATURA CITADA	95
13. ANEXOS	116
I. Espectro de masas del compuesto volátil pulegona, presente en los extractos hexánicos de plantas de nurite (<i>S. macrostema</i>) <i>in vitro</i> , cultivadas en invernadero e <i>in situ</i> (campo), identificado con la biblioteca NIST 08	116
II. Contenido de pulegona en plántulas micropropagadas de nurite (<i>S. macrostema</i>), a los 90 días de cultivo <i>in vitro</i> .	116
III. Espectro de masas del compuesto volátil limoneno, presente en los extractos hexánicos de plantas de nurite (<i>S. macrostema</i>) cultivadas en invernadero e <i>in situ</i> (campo), identificado con la biblioteca NIST 08	117
IV. Espectro de masas del compuesto volátil linalol, presente en los extractos hexánicos de plantas de nurite (<i>S. macrostema</i>) cultivadas en invernadero e <i>in situ</i> (campo), identificado con la biblioteca NIST 08	117
V. Espectro de masas del compuesto volátil mentona, presente en los extractos hexánicos de plantas de nurite (<i>S. macrostema</i>) cultivadas en invernadero e <i>in situ</i> (campo), identificado con la biblioteca NIST 08	118
VI. Espectro de masas del compuesto volátil verbenona, presente en los extractos hexánicos de plantas de nurite (<i>S. macrostema</i>) cultivadas en invernadero e <i>in situ</i> (campo), identificado con la biblioteca NIST 08	118

ÍNDICE DE FIGURAS		Página
Figura 1.	Planta (A) y flores (B) de nurite (<i>Satureja macrostema</i> “Benth.” Briq.).	30
Figura 2.	Distribución de nurite (<i>Satureja macrostema</i>) en el Estado de Michoacán.	31
Figura 3.	Semillas de nurite (A), su cultivo (B) y germinación <i>in vitro</i> (C), así como el desarrollo de plántulas a los 60 días del cultivo (D).	49
Figura 4.	Proceso de micropropagación de nurite, desde la siembra <i>in vitro</i> del explante (A), desarrollo de brotes (B), enraizado de éstos (C) y el desarrollo de plántulas (D).	51
Figura 5.	Fases del trasplante y aclimatación de plántulas micropropagadas de nurite (<i>S. macrostema</i>): A) Previo al trasplante durante enjuague y secado de las plántulas; B) 15 días de cultivo en cámara húmeda cerrada; C) 15 días en cámara abierta; D) a los 30 días del cultivo en maceta.	53
Figura 6.	Cromatogramas representativos de extractos hexánicos de plantas de nurite (<i>S. macrostema</i>): A) Planta <i>in vitro</i> ; B) Planta <i>in situ</i> ; C) Planta en invernadero, donde limoneno (a), linalol (b), mentona (c), pulegona (d), verbenona (e) y tetradecano (f) son los volátiles de interés.	55
Figura 7.	Desarrollo en campo de plantas de nurite (<i>S. macrostema</i>) durante 12 meses: A) Planta durante desarrollo vegetativo; B) Planta durante la etapa de floración; C) Planta en etapa de fructificación; D) Planta durante siguiente desarrollo vegetativo.	58
Figura 8.	Plantas de nurite (<i>Satureja macrostema</i>) durante su desarrollo en invernadero: A) Planta de 30 días de cultivo (etapa 1); B) Planta de 4 meses de cultivo (etapa 2); C) Planta de 8 meses de cultivo (etapa 3); D) Planta 12 meses de cultivo (etapa 4).	60
Figura 9.	Parámetros de crecimiento en plantas de nurite (<i>S. macrostema</i>) cultivadas en invernadero durante 90 días: A) altura, B) número de hojas y C) área foliar; tratadas con cuatro niveles de fertilización: T1 (no tratadas), T2 (10-10-10), T3 (17-17-17) y T4 (20-20-20). Letras diferentes indican diferencia significativa en cada bloque de tiempo $\pm$ desviación estándar (n=6, Tukey $p \leq 0.05$).	63
Figura 10.	Biomasa: peso fresco y seco, en plantas de nurite (<i>S. macrostema</i>) a 90 días de cultivo en invernadero; tratadas con cuatro niveles de fertilización: T1 (no tratadas), T2 (10-10-10), T3 (17-17-17) y T4 (20-20-20). Letras diferentes indican diferencia significativa en cada bloque de peso $\pm$ desviación estándar (n=6, Tukey $p \leq 0.05$).	64
Figura 11.	Contenido de volátiles: A) limoneno; B) linalol; C) mentona; D) pulegona; E) verbenona, determinado en plantas de nurite (<i>S. macrostema</i>) cultivadas en invernadero durante 90 días, tratadas con	

	cuatro niveles de fertilización (N-P-K). Letras diferentes indican diferencia significativa en cada tiempo de muestreo para cada compuesto $\pm$ desviación estándar. *Diferencia significativa entre tratamientos (n=9, Tukey $p \leq 0.05$).	67
Figura 12.	Parámetros de crecimiento en plantas de <i>S. macrostema</i> , cultivadas en invernadero: A) altura y B) longitud de raíz; tratadas con <i>G. intraradices</i> : no micorrizadas (- micorriza) y micorrizadas (+ micorriza), durante 90 días. Letras diferentes indican diferencia significativa en cada bloque de tiempo $\pm$ desviación estándar (n=6, Tukey $p \leq 0.05$).	70
Figura 13.	Biomasa: peso fresco y seco, en plantas de nurite (<i>S. macrostema</i>) a 90 días de cultivo en invernadero; tratadas con <i>Glomus intraradices</i> : no micorrizadas (- micorriza) y micorrizadas (+ micorriza). Letras diferentes indican diferencia significativa en cada bloque de peso $\pm$ desviación estándar (n=6, Tukey $p \leq 0.05$).	71
Figura 14.	Contenido de volátiles: A) limoneno; B) linalol; C) mentona; D) pulegona; E) verbenona, determinado en plantas de nurite (<i>S. macrostema</i>) cultivadas en invernadero durante 90 días, tratadas con <i>G. intraradices</i> : no micorrizadas (- micorriza) y micorrizadas (+ micorriza). Letras diferentes indican diferencia significativa en cada tiempo de muestreo para cada compuesto $\pm$ desviación estándar. * Diferencia significativa entre tratamientos (n=9, Tukey $p \leq 0.05$).	73

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1.	Principales plantas aromáticas y medicinales con alta demanda en el mercado mundial por su uso en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica, debido a la producción de compuestos volátiles.	17
Tabla 2.	Efecto de la fertilización sobre el contenido de metabolitos secundarios en algunas plantas aromáticas medicinales.	23
Tabla 3.	Efecto de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares sobre el contenido de metabolitos secundarios en algunas plantas medicinales.	28
Tabla 4.	Clasificación botánica de nurite.	29
Tabla 5.	Tratamientos de fertilización aplicados en plantas de nurite (<i>S. macrostema</i>) cultivadas en invernadero.	46
Tabla 6.	Porcentaje de germinación (%) de semillas de nurite en medio nutritivo MS con 0.05 mg/L BA, a diferentes tiempos de cultivo.	50
Tabla 7.	Composición, tiempo de retención y contenido de los compuestos volátiles del extracto hexánico de parte aérea de plantas <i>in vitro</i> , <i>in situ</i> y cultivadas en invernadero de <i>S. macrostema</i> . Letras diferentes indican diferencia significativa entre tipos de plantas para cada compuesto por separado $\pm$ desviación estándar (n=9, Tukey $p \leq 0.05$).	56
Tabla 8.	Composición y contenido de los compuestos volátiles de los extractos hexánicos de parte aérea de plantas <i>in situ</i> de <i>S. macrostema</i> , durante sus etapas fenológicas. Letras diferentes indican diferencia significativa entre etapas fenológicas para cada compuesto por separado $\pm$ desviación estándar (n=9, Tukey $p \leq 0.05$).	59
Tabla 9.	Composición y contenido de los compuestos volátiles de los extractos hexánicos de parte aérea de plantas de <i>S. macrostema</i> , durante su desarrollo por 12 meses en invernadero. Letras diferentes indican diferencia significativa entre etapas de desarrollo para cada compuesto por separado $\pm$ desviación estándar (n=9, Tukey $p \leq 0.05$).	60

RESUMEN

Satureja macrostema (Benth.) Briq. conocida como nurite es una planta medicinal empleada en la medicina tradicional de la región Purépecha en Michoacán, México. Algunos estudios indican que contiene compuestos volátiles, principalmente terpenos con actividad biológica. Para esta especie no existen programas para su domesticación, que impliquen sistemas de propagación, prácticas para su cultivo en invernadero y la variación de su contenido en compuestos volátiles. Por lo que el objetivo de esta investigación fue determinar el contenido de compuestos volátiles en diferentes etapas de desarrollo en plantas de campo y cultivadas en invernadero, bajo tratamientos de fertilización y micorrización. Para realizar el muestreo en campo (*in situ*), se eligieron plantas de nurite ubicadas en un sitio del bosque de pino-encino (Charapan, Michoacán). Para el cultivo en invernadero, se utilizaron plantas micropropagadas de nurite, las cuales se obtuvieron a partir de la germinación *in vitro* de semillas en MS suplementado con 0.05 mg/L de benciladenina (BA), obteniendo 45% de germinación. Las plántulas fueron fuente de explantes (yemas apicales y axilares) para conseguir la regeneración de brotes en MS con 2.5 mg/L de BA, obteniéndose una brotación del 95% con 23 brotes/explante. El enraizado de éstos se logró con 0.1 mg/L de ácido indol-3-butírico (AIB), promediando 12.1 raíces/brote. Las plántulas fueron trasplantadas, aclimatadas y cultivadas en invernadero, presentando un 95% de viabilidad. Para el análisis de variación del contenido de volátiles, éstas fueron cultivadas por 12 meses y también tratadas con fertilizante comercial (Triple N-P-K) y micorrizadas con *Glomus intraradices* por 90 días.

La identificación y cuantificación de los compuestos volátiles (terpenos) se realizó en extractos hexánicos de la parte aérea (tallo y hojas apicales) por CG-EM, tanto de plantas *in vitro*, *in situ* y cultivadas en invernadero. El compuesto volátil pulegona fue el terpeno mayoritario en todos los extractos, en plantas *in vitro* solamente se determinó la presencia de éste, a los 90 días de cultivo. Los terpenos limoneno, linalol, mentona y verbenona, fueron los otros compuestos volátiles determinados durante las etapas y desarrollo de las plantas (12 meses) tanto *in situ* como en invernadero. Las plantas silvestres mostraron un mayor contenido de volátiles de cada uno de ellos en la etapa de crecimiento vegetativo (agosto), disminuyendo durante la floración y fructificación (diciembre-abril), el contenido siempre fue mayor que en plantas de invernadero. En invernadero, el contenido de volátiles fue diferente durante las etapas de crecimiento, ya que la cantidad de pulegona y linalol fue mayor en el mes de diciembre (4 meses de cultivo), mientras que la de limoneno, mentona y verbenona, aumentó hasta los 12 meses del cultivo.

En un periodo de 90 días de cultivo de plantas de nurite en invernadero, se analizó el efecto de la fertilización con la aplicación de cuatro tratamientos del N-P-K (T1=0, T2=10-10-10, T3=17-17-17 y T4=20-20-20) y *G. intraradices*, determinando diversos parámetros de crecimiento y la cuantificación de volátiles. A los 90 días del cultivo, las plantas de nurite del tratamiento T4, presentaron la mayor altura, biomasa, área foliar y el mayor número de hojas, así como el más alto contenido de los compuestos volátiles, con una concentración mayor de pulegona (44.38 µg/g). El compuesto verbenona disminuyó con la aplicación del fertilizante. En el caso de las plantas micorrizadas, tanto los parámetros de crecimiento como el contenido de volátiles fueron similares a los encontrados en plantas fertilizadas con N-P-K. Los resultados de la presente investigación demuestran que existe una variación en el contenido de volátiles en nurite, dependiente de las etapas de desarrollo, en plantas silvestres se incrementa durante el desarrollo vegetativo y en plantas de invernadero con la edad de la planta. La fertilización química y la micorrización en plantas micropropagadas de nurite, cultivadas en invernadero, promovieron un efecto positivo en el crecimiento y en el contenido de compuestos volátiles.

ABSTRACT

Satureja macrostema (Benth.) Briq. known as nurite is a medicinal plant used in the traditional medicine of the Purhépecha region in Michoacán, Mexico. Some studies indicate that this plant contains volatile compounds, mainly terpenes with biological activity. For this species, there are no programs for domestication and propagation practices for its cultivation in the greenhouse and there are not studies of content of volatile compounds variation. The objective of this research was to determine the content of volatile compounds in various stages of development in plants of field and cultivated in the greenhouse, under fertilization and mycorrhization treatments. To perform sampling in the field (*in situ*) were chosen nurite plants located on a site pine-oak forest (Charapan, Michoacán). For the greenhouse cultivation, nurite micropropagated plants were obtained from the *in vitro* germination of seeds on MS medium supplemented with 0.05 mg/L benzyladenine (BA), obtaining 45% germination. The seedlings were source of explants (apical and axillary buds) to achieve the regeneration of shoots in MS with 2.5 mg/L BA, obtaining a shooting of 95% with 23 shoots/explant. The rooted of these was achieved with 0.1 mg/L indole-3-butyric acid (IBA), averaging 12.1 roots/shoot. Seedlings were transplanted, acclimatized and cultivated in the greenhouse, presenting 95% viability. The analysis of volatile compounds content was realized with cultivated 12 months pants and treated with commercial fertilizers (Triple N-P-K) and michorized with *Glomus intraradices*.

The identification and quantification of the compounds volatile (terpenes) was carried out in hexane extracts from the aerial part (apical stem and leaves) by GC-MS, such of *in vitro* plants, *in situ* plants as cultivated in the greenhouse, at different time of collection. The volatile compound pulegone was the major terpene in all extracts, in *in vitro* plants only was determined the presence of this compound, at 90 days of cultivation. The terpene compounds limonene, linalool, menthone and verbenone, were the other volatile compounds determined during the stages and development of plants (12 months) both *in situ* and in greenhouse. Wild plants showed a higher content of volatiles from each of them in the vegetative growth stage (August), decreasing during the flowering and fruiting (December-April), the content was always higher than in greenhouse plants. In the greenhouse, the content of volatile was different during the stages of growth, since the amount of pulegone and linalool was higher in the month of December (4 months of culture), while the limonene, menthone and verbenone, increased to 12 months of cultivation.

In a period of 90 days of cultivation of nurite plants in greenhouse conditions, the effect of fertilization with the application of four treatments of N-P-K (T1=0, T2=10-10-10, T3=17-17-17 y T4=20-20-20) and *Glomus intraradices* were studied, determining various parameters of growth and quantification of volatile. At 90 days of cultivation, the nurite plants of T4 treatment showed the greatest height, biomass, leaf area and the greater number of leaves as well the highest content of volatile compounds, with one higher concentration of pulegone (44.38 µg/g). The verbenone content decreased with the application of fertilizer. In the case of the mycorrhizal plants, both growth parameters and the content of volatiles were similar to those found in plants fertilized with N-P-K. The results of this research show that there is a variation in the content of volatiles in nurite plants, dependent on the stages of development. The volatile compounds content in wild plants increases during vegetative development and as well in greenhouse plants with the age of the plant. The chemical fertilization and mycorrhization in nurite micropropagated plants grown in greenhouse, promoted a positive effect on growth and on the content of volatile compounds.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas aromáticas y medicinales forman un grupo grande y diverso de especies botánicas, cada una de ellas con unas características biológicas propias y una adaptación diferenciada a las condiciones ecológicas, de clima y suelo. En los últimos años, la demanda de estas especies y los productos derivados de ellas, tanto en el mercado nacional como internacional, ha experimentando un aumento constante (Cañigüeral y Vila, 2003; Lange, 2006). Se calcula que 2/3 de la población mundial (4,700 millones de personas), recurren a las hierbas aromáticas y medicinales para su alimentación y uso medicinal (Ventura, 2010).

En México, se han identificado más de 5,000 especies que tienen aplicaciones curativas. Debido a su actividad terapéutica han sido utilizadas en la medicina tradicional (Aguilar-Contreras *et al.*, 1994), y actualmente los principios activos son utilizados como fuente de medicamentos, colorantes, conservadores, cosméticos y nutraceuticos, entre otros (Bourgauud *et al.*, 2001).

Algunas de las propiedades aromáticas y medicinales asociadas con las plantas resultan de constituyentes o fracciones volátiles que químicamente se denominan esencias o aceites esenciales, cuyos principales constituyentes son los compuestos volátiles de tipo terpénico, los cuales se encuentran en distintas partes del tejido vegetal como pueden ser hojas, tallos, bulbos, rizomas, raíces, flores, semillas y frutos (Forlín, 2012). Estos compuestos volátiles derivan del metabolismo secundario de las plantas por lo que su producción y composición no depende exclusivamente de los mecanismos biosintéticos, la variabilidad puede ser atribuida a factores genéticos, abióticos como luz, temperatura, disponibilidad de agua, etc., y bióticos ocasionados por la interacción con animales, plantas y microorganismos (Dudareva y Negre, 2005).

De igual forma, las etapas de desarrollo y el tipo de órgano vegetativo pueden ser determinantes en la composición y acumulación de compuestos volátiles

(Figueiredo *et al.*, 2008). Generalmente es en los estadios tempranos de las etapas de floración y fructificación, cuando hay mayor producción de volátiles (Dudareva *et al.*, 2004; Dudareva y Negre, 2005), la cual a su vez depende del tipo de estructuras de secreción que sintetizan, almacenan y liberan los volátiles.

Tradicionalmente, las plantas aromáticas y medicinales se obtenían de recolección de flora silvestre (Craker, 1999), la cual sigue practicándose para determinadas especies (Cases, 2007). Con el tiempo, la recolección ha originado una sobreexplotación de las poblaciones silvestres, lo que demanda implementar otras formas de producción como su cultivo en campo o en invernadero (Zengin *et al.*, 2008). La domesticación y cultivo de plantas medicinales silvestres, implica un mejoramiento en la calidad de la materia prima, que permita estandarizar el contenido de principios activos y poblaciones homogéneas de plantas necesarias para su producción y procesamiento (Davies, 2004). En Latinoamérica hay pocos trabajos para la domesticación y cultivo de plantas medicinales, se cultivan especies como *Anethum graveolens* L. (Eneldo) (Fanlo *et al.*, 2009), *Cimnopogon citratus* (Limonaria) (Antolinez-González *et al.*, 2008), *Foeniculum vulgare* Mill. (Hinojo) (Vogel y Berti, 2003), *Rosmarinus officinalis* (Romero) (Ventura, 2010), *Salvia officinalis* (Salvia) (Vogel y Berti, 2003), *Satureja hortensis* (Ajedrea) (Forlín, 2012), *Tagetes lucida* (Santa María) (Acosta *et al.*, 2010), entre otras.

En México, la mayoría de las plantas medicinales que se cultivan son plantas introducidas como manzanilla (*Matricaria chamomilla*), lavanda (*Lavandula officinalis*), albahaca (*Ocimum basilicum*), menta (*Mentha x piperita* L.), tomillo (*Thymus vulgaris*), orégano (*Origanum vulgare*), etc. Sin embargo, en plantas medicinales nativas no existen suficientes investigaciones sobre los factores agronómicos que afectan las características cualitativas y cuantitativas, pero se destaca que la fertilización mineral, sobre todo con nitrógeno (Zheljazkov *et al.*, 2009), fósforo (Zhu *et al.*, 2008) y potasio (Pavlovic *et al.*, 2006), incrementa la producción de biomasa, lo que se relaciona con el aumento del contenido y composición de metabolitos secundarios de interés económico, como los aceites

volátiles. Por otro lado, se ha reportado que la micorrización contribuye en el crecimiento de la planta hospedante y en la síntesis, acumulación y calidad de algunos compuestos volátiles (Toussaint *et al.*, 2007; Guerra, 2008).

Debido a la alta demanda de las plantas medicinales silvestres nativas, es necesario realizar investigaciones para esclarecer que factores son determinantes en la variación de compuestos volátiles, para incrementar los rendimientos en el contenido de dichos compuestos bajo cultivo en campo e invernadero (Estrada, 2002).

Tal es el caso del nurite, cuyo nombre latino es *Satureja macrostema* (Benth.) Briq., pertenece a la familia de las labiadas (Lamiaceae), es una especie de gran importancia en la medicina tradicional de los pueblos Purépecha, quienes la consideran un símbolo de fertilidad y es muy usada como medicinal en varios padecimientos (Rzedowski y Rzedowski, 1985; Martínez, 1986; Bello, 1993). Los estudios indican que el nurite contiene una mezcla de compuestos químicos llamados flavonoides que han sido extensamente estudiados en los últimos años por su efecto antioxidante (Catapano, 1997; Rodríguez, 1998; Pérez-Gutiérrez y Gallardo-Navarro, 2010). Entre los flavonoides extraídos de las hojas del nurite está la naringenina (Rodríguez, 1998). También se reportan compuestos volátiles (terpenos) como el limoneno, pulegona, carvacrol y timol, considerados como antimicrobianos (Bello, 2006).

El nurite es ampliamente demandado no solo a nivel regional sino nacional (Bello, 2006) y no existen programas para su domesticación, que impliquen sistemas de propagación, prácticas para su cultivo en invernadero y la variación de su contenido en compuestos volátiles. Por lo que el objetivo de esta investigación fue determinar el contenido de compuestos volátiles en diferentes etapas de desarrollo en plantas de nurite (*Satureja macrostema*) en campo y cultivadas en invernadero, así como durante la fertilización y micorrización en invernadero.

2. ANTECEDENTES

2.1. PLANTAS AROMÁTICAS Y MEDICINALES

Las plantas aromáticas y medicinales conforman una lista amplia y diversa de especies, que obedecen a variadas condiciones ambientales, muchas de las cuales no tienen un único uso (Vogel y Berti, 2003). Así pues, hay diferentes ámbitos de utilización: en medicina, alimentación, perfumería, cosmética, decoración, ambientación, protección de vegetales, agricultura y apicultura. Algunos de estos usos, no obstante, sólo son de tipo doméstico (Moré y Colom, 2002).

El uso y consumo de las plantas aromáticas y medicinales es tan antiguo como la humanidad. Antes de conocer el fuego y domesticar a los animales, la subsistencia del hombre dependía en gran parte de las hierbas, los frutos, la miel y los jugos que extraía de las plantas. En el periodo neolítico, se vuelve sedentario y aparece la agricultura, se cultivan granos y plantas como el hinojo y el cilantro, las que se utilizaban como condimentos. También se inicia la fermentación de ciertos cereales con la ayuda de semillas aromáticas como el comino y el anís, para realzar el sabor con hierbas aromáticas (Fretes, 2010).

Los griegos usaban plantas aromáticas en su medicina y las incorporaron a su mitología tejiendo leyendas, como la de Dafne convertida en laurel y la de la hechicera Medea y sus encantamientos a base de plantas aromáticas. Homero menciona en su Odisea jardines compuestos de plantas aromáticas y especias (Fretes, 2010).

En la Edad Media, los árabes perfeccionaron la destilación de las plantas aromáticas, favoreciendo así el desarrollo de la naciente y rudimentaria farmacia. En el siglo XIII los alquimistas vendían aceites esenciales, siendo la esencia de romero una de las primeras aisladas. El siglo XVII marcó el apogeo de las plantas

medicinales y aromáticas, que hasta entonces se emplearon de manera limitada como medicina; su número había aumentado. A finales del siglo XVIII, su valor principal era el curativo (Muñoz, 2002).

Con los avances en química analítica, en el siglo XIX se practicaron los primeros análisis químicos de las esencias y de otros principios activos de los vegetales, naciendo así la farmacología. A comienzo de ese mismo siglo, en 1811, se produjo un hecho importante, el aislamiento de la morfina, alcaloide del opio, al que posteriormente siguieron el aislamiento de otros principios activos (Villarino, 1999; Muñoz, 2002). Todo ello promovió el desarrollo de la investigación a escala mundial, para conocer la composición química de los vegetales.

Si bien todas las culturas y civilizaciones aprovecharon sus características y principios activos, a finales del siglo XIX y principios del XX el interés hacia ellas decayó debido a la introducción de los fármacos sintéticos y las nuevas técnicas de conservación de los alimentos (Ventura, 2010). Más recientemente, al constatar los efectos secundarios de los fármacos sintéticos, se recuperó el interés por la terapéutica vegetal con investigaciones continuadas y cada vez más profundas.

Actualmente existe una fuerte tendencia a nivel mundial hacia la búsqueda de una mejor calidad de vida, por lo que el consumo de productos dietéticos, nutracéuticos y farmacéuticos, obtenidos a partir de fuentes naturales, se ha incrementado, principalmente en mercados externos como los de Europa, Estados Unidos y Japón, entre otros (García-Nieto, 2000).

En las dos últimas décadas, el cultivo de las plantas aromáticas medicinales ha adquirido relevancia social, económica y ambiental a partir de su capacidad de generar puestos de trabajo, de otorgarle un valor añadido y de conservar el medio ambiente, además de los grandes beneficios que para la salud humana conlleva su consumo. El mercado mundial de plantas aromáticas y medicinales en todos

los segmentos (excluidos los de soya y algas), en la actualidad aporta cerca de 83,000 millones de dólares (Gruenwald, 2010).

Se estima que en el mundo existen unas 250,000 especies vegetales de las cuales solo se conocen científicamente el 10% de ellas, considerándose como medicinales alrededor de 12,000 especies en total (Alonso, 2004). Se estima que alrededor del 80% de la población mundial recurre a la medicina tradicional herbolaria para la atención primaria de la salud (Fretes, 2010). La producción de este tipo de plantas medicinales proviene en gran medida de la recolección de plantas silvestres, aunque la mayor parte del volumen comercializado proviene de unas pocas especies cultivadas que son más cotizadas por su composición de sus aceites esenciales (Moré *et al.*, 2010).

En el mundo se destinan cerca de 5.5 millones de hectáreas al cultivo de especias, hierbas aromáticas y medicinales. Con un nivel de producción mundial estimado de 4.5 millones de toneladas, la mayor parte de las especias y hierbas aromáticas y medicinales se producen en los países de menor desarrollo relativo, siendo India el principal productor a nivel mundial. Menta, orégano y perejil deshidratados son las hierbas más importantes en cuanto al volumen de producción y exportación en el mercado internacional (Moré *et al.*, 2010).

En México existe la comercialización de plantas aromáticas y medicinales endémicas que por tradición funciona en mercados locales y que pueden ser de gran importancia económica en el ámbito internacional por la variabilidad de sus principios activos. Su importancia es tal, que estudios realizados por Betancourt y Gutiérrez (1999), reportan que de manera cotidiana se comercializan frescas y deshidratadas cerca de 250 especies provenientes principalmente de las zonas centro y sur del país, lo cual indica el arraigo cultural que se tiene. En términos de superficie dedicada a la producción de plantas medicinales no hay datos actualizados y de acuerdo a la información disponible, en el año 2005 se tuvieron 30,016 hectáreas dedicadas al cultivo orgánico de plantas. Los estados de

Morelos, Baja California Sur, Estado de México, Oaxaca, Puebla y Tlaxcala son los principales productores de plantas aromáticas de exportación, algunas de ellas bajo certificación orgánica (Pérez, 2009). Entre las plantas que se distribuyen en el estado de Michoacán y que se han utilizado de manera sobresaliente en la medicina popular destaca *Satureja macrostema* (Benth) Briq. conocida comúnmente como nurite, especie nativa que ha sido estudiada desde el punto de vista etnobotánico, farmacológico, quimiotaxonómico, fitoquímico y de propagación (Aguilar-Ramírez, 2002).

Estas plantas medicinales nativas que se venden en los mercados nacionales y en el extranjero, son obtenidas por recolecta, pero debido a una creciente demanda de plantas medicinales silvestre, este proceso está en aumento y ha propiciado que las poblaciones de muchas especies se vean amenazadas y en el peor de los casos la casi extinción regional de algunas especies (Fierro *et al.*, 2005).

La domesticación y el cultivo de especias, hierbas aromáticas y medicinales nativas, para fines comerciales asegura una producción de material vegetal homogéneo, colaborando a un manejo eficiente del cultivo que permita un nivel de producción apto para cubrir la demanda existente con material cultivado, promoviendo el consumo de plantas nativas, evitando el deterioro de los recursos, la posible erosión de los suelos y el riesgo de extinción de las especies que la recolección en estado silvestre puede ocasionar (Davies, 2004).

2.1.1. Constituyentes químicos en plantas aromáticas medicinales

Las plantas son fuente de una amplia variedad de compuestos químicos, conocidos como metabolitos secundarios, que son utilizados como fármacos, colorantes, saborizantes y fragancias, entre otros. Al menos un 25% de los productos farmacéuticos modernos se derivan de las plantas y los ingredientes de muchos otros son reemplazos sintéticos creados a partir de compuestos obtenidos de las plantas (De la Torre-Carreras y López-González, 2010).

Los metabolitos secundarios se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (Ávalos y Pérez-Urría, 2009). Dentro de sus funciones principales se tiene que determinan el color de la planta, protegen a la planta contra herbívoros y microorganismos, atraen a polinizadores, animales dispersores de semillas, y actúan como indicadores cuando la planta se encuentra bajo tensión; sin embargo, muchas de sus funciones siguen siendo desconocidas (Hounscome *et al.*, 2008). Los alcaloides, antraquinonas, glicósidos, cumarinas, flavonoides, esteroides, fenilpropanoides y aceites esenciales son los metabolitos secundarios asociados con las plantas aromáticas y medicinales (Dewick, 2002).

Los aceites esenciales o esencias, son mezclas complejas de compuestos orgánicos líquidos y aromáticos, conformados por compuestos volátiles que por lo general son sustancias altamente lipofílicas de bajo peso molecular, cuya volatilidad se debe a que se evaporan al ser expuestos al aire o a temperatura ambiente, por lo que sus presiones de vapor son altas (Vaughn, 2001; Pichersky, 2004; Dudareva y Negre, 2005).

Los terpenos son los compuestos volátiles más relevantes ya que constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios con más de 40,000 moléculas diferentes (Ávalos y Pérez-Urría, 2009); seguidos de los derivados de ácidos grasos (hidrocarburos saturados e insaturados), bencenoides y fenilpropanoides, aunque también se han reportado sustancias azufradas y nitrogenadas (Dudareva *et al.*, 2004). Los terpenos suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (5 carbonos) e incluyen a otros grupos funcionales como alcoholes, aldehídos, ésteres y cetonas (Ávalos y Pérez-Urría, 2009).

La mayoría de estos compuestos se acumulan en estructuras vegetales específicas tales como ductos, cavidades secretoras y tricomas glandulares, los

cuales pueden estar distribuidas en las hojas (eucalipto, albahaca), flores (lavanda, menta), rizoma (jengibre), frutos (anís, hinojo), madera (alcanfor), raíz (vetiver), corteza (canela), semilla (nuez moscada), etc. (Sangwan *et al.*, 2001; Davies, 2004). Plantas como albahaca, manzanilla, mejorana, tomillo y vetiver, son unas de las principales especies con alta demanda en diferentes industrias debido al contenido de sus componentes volátiles (Tabla 1).

Comúnmente, estos compuestos se extraen de plantas silvestres o cultivadas, lo que tiene una serie de desventajas, por ejemplo su acumulación en las plantas es bajo y lento, ya que está regulada espacial y temporalmente. Es decir, ocurre en células, órganos y tejidos específicos, en fases determinadas del ciclo de vida de la planta, bajo condiciones estacionales o de estrés, etc. (Trejo y Rodríguez, 2007).

Tabla 1. Principales plantas aromáticas y medicinales con alta demanda en el mercado mundial por su uso en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica, debido a la producción de compuestos volátiles (Moré *et al.*, 2010).

Nombre común	Nombre científico	Principales compuestos volátiles
Albahaca	<i>Ocimum basilicum</i>	Estragol, Linalol
Geranio	<i>Pelargonium graveolens</i>	Geraniol, L-Citronelol
Lavanda	<i>Lavandula officinalis</i>	Geraniol, Linalol
Manzanilla	<i>Matricaria chamomilla</i>	Azuleno, Chamazuleno, α -(-)Bisabolol
Mejorana	<i>Origanum majorana</i>	Terpen-4-ol, Pineno
Menta	<i>Mentha x piperita</i>	Mentona, Mentol, Isomentona, Carvona
Salvia	<i>Salvia officinalis</i>	Canfor, Tujona
Tarragón	<i>Artemisia dracuncullos</i>	Metil-estragol
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	Timol, Carvacrol
Vetiver	<i>Vetiveria zizanioides</i>	Vetiverol
Zacate Limón	<i>Cymbopogon flexuosus</i>	Citral, Geraniol, Citronelol, Limoneno

2.1.2. Factores que afectan la composición de los compuestos volátiles

Las tasas de producción y composición de los compuestos volátiles en las plantas no dependen exclusivamente de mecanismos bioquímicos que regulan los niveles de alguna enzima responsable del paso final en la biosíntesis y la disponibilidad del sustrato en la célula. La variabilidad también está influenciada en mayor o menor grado por factores genéticos y ambientales (luz, temperatura, disponibilidad de agua), al igual que por prácticas de cultivo como la fertilización, frecuencia de corte (podas) y la interacción de la planta con microorganismos benéficos (hongos micorrízicos) (Marín-Loaiza y Céspedes, 2007).

2.1.2.1. Factores genéticos

La variación genética de las especies regula la composición de los aceites esenciales (Sangwan *et al.*, 2001; Tétényi, 2002) y otros metabolitos de importancia fitoquímica, ya que hace que la síntesis sea altamente específica y regida por el desarrollo de la planta. Generalmente es en los estadios tempranos cuando hay mayor producción: en las flores a punto de ser polinizadas, en las hojas jóvenes y en los frutos inmaduros (Dudareva *et al.*, 2004; Dudareva y Negre, 2005). Por otra parte, Keskitalo *et al.* (2001), señalan que la variación genética es un factor ligado estrechamente al origen geográfico. En un estudio realizado en *Tanacetum vulgare* L., se observó una gran variabilidad en la composición de los compuestos volátiles y no volátiles, indicando que la composición de terpenos resulta de la activación de enzimas específicas relacionadas con los patrones de variación.

Este comportamiento ha sido observado en un estudio realizado por Lewinsohn (2000) en albahaca (*Ocimum basilicum*), encontrando la existencia de quimiotipos de dicha especie, siendo los volátiles estragol y metil-eugenol los que presentaron variación en el contenido, esto debido a la actividad de la enzima chavicol O-metil transferasa. Por lo tanto, es recomendable que la asociación entre los principales

componentes químicos y morfológicos deben ser considerados en la selección de poblaciones que pueden ser usadas para mejoramiento y estudios bioquímicos, donde son de gran utilidad los marcadores genéticos, moleculares y bioquímicos para identificar y clasificar variedades o cultivares (Solouki *et al.*, 2008). Por otra parte, Salamon (2007) indica que la variación en la composición es alta también entre especies silvestres y cultivadas.

2.1.2.2. Etapa fenológica y tipo de órgano

El estado de desarrollo y tipo de órgano vegetativo como son las flores, tallos, corteza, frutos, semillas o raíces puede ser determinante en la composición y acumulación de los compuestos volátiles (Steeghs *et al.*, 2004; Kaloustain *et al.*, 2005; Figueiredo *et al.*, 2008). Lo cual a su vez depende del tipo de estructuras de secreción que sintetizan, almacenan y liberan al ambiente los componentes volátiles. Estas estructuras se encuentran distribuidas en toda la planta y son muy variadas (Sangwan *et al.*, 2001), se dividen en estructuras externas, como tricomas y osmóforos que se localizan en plantas de las familias *Asteraceae*, *Cannabaceae*, *Geraniaceae*, *Lamiaceae*, *Rutaceae*, *Solanaceae*, *Verbenaceae* y *Orchidaceae*; y estructuras internas como idioblastos, cavidades, ductos y canales, las cuales pueden ser encontradas en plantas de las familias *Araceae*, *Lauraceae*, *Magnoliaceae*, *Leguminoseae*, *Piperaceae*, entre otras (Figueiredo *et al.*, 2008). De ahí que un estudio realizado en *Artemisia annua* se observaron cambios en la composición de aceite esencial cuando se analizó el producto proveniente de hojas, pétalos y tallos, obteniendo 86, 77 y 63 componentes, respectivamente (Goel *et al.*, 2007). Esta tendencia de variación ha sido observada en otras especies aromáticas como *Ocimum basilicum* y *Origanum vulgare* (Lewinsohn *et al.*, 2000; García y Sanz, 2001; Chalchat y Özcan, 2008).

Por otro lado, se ha comprobado que los periodos de floración dependen de la estación en algunas especies aromáticas y esto afecta de manera significativa la composición de los volátiles, siendo la fecha de colecta determinante para obtener

mayores rendimientos y alta calidad (Kaloustain *et al.*, 2005). En un estudio de Ruíz-Nova (2008), se determinó la variación de los volátiles en tres estados fenológicos (primera floración, post-floración y segunda floración) de *Lippia origanoides*, encontrando que los volátiles α -felandreno, *p*-cimeno, *trans*- β -cariofileno y α -humuleno presentaban una mayor concentración durante la floración, siendo en la segunda floración donde el contenido de dichos volátiles fue mayor que en la primera floración. Estas variaciones estacionales, afectan el fotoperiodo y en consecuencia la biosíntesis de terpenos, haciendo de la fecha de siembra, plantación y colecta un factor importante (Ramesh y Singh, 2008), ya que pueden causar variaciones en la duración de la fase de desarrollo, en la producción de biomasa, en el rendimiento y en la composición de los volátiles (Jordán *et al.*, 2006).

2.1.2.3. Factores abióticos

Las variables climáticas como temperatura, luminosidad, disponibilidad de agua en los diferentes estados de desarrollo vegetal, tienen un efecto significativo en la producción de biomasa y en consecuencia en la cantidad de compuestos volátiles (Ramesh y Singh, 2008). En lo que se refiere al régimen térmico, a temperaturas mayores a 45°C, la planta sufre desequilibrios en el metabolismo primario ocasionando pérdida de foto-asimilados, inhibición del crecimiento y pérdida de reservas (Azcón y Talón, 2000) que en consecuencia disminuyen a los precursores del metabolismo secundario y por lo tanto la producción de compuestos volátiles. También se ha observado que durante los meses de bajas temperaturas hay una disminución en la producción de compuestos volátiles (Figueiredo *et al.*, 2008). Por tanto, existe una relación estrecha entre la fotosíntesis (Sangwan *et al.*, 2001) y la foto-respiración (Misra *et al.*, 2006), en la síntesis de compuestos volátiles, por lo que se espera que variaciones en la duración del día y la intensidad luminosa afecten su producción.

En términos generales, las plantas que crecen bajo buena iluminación muestran un aumento en el rendimiento de volátiles que aquellas cultivadas bajo sombra. Esta función ha sido demostrada por Wang y Lincoln (2004), quienes al evaluar el efecto directo de la intensidad luminosa artificial en la producción de monoterpenos en pino (*Pinus radiata*), obtuvieron mayor crecimiento y densidad de tricomas glandulares que en plantas tratadas con baja intensidad luminosa, las cuales presentaron una reducción en la fotosíntesis y la reserva de carbono, así como la formación de tricomas glandulares.

En regiones con condiciones de sequía, la frecuencia de lluvia y el riego se constituyen como factores limitantes del rendimiento y composición de volátiles (Khazaie *et al.*, 2008), debido a que se inducen cambios fisiológicos y metabólicos en las plantas cultivadas (Sangwan *et al.*, 2001). Para determinar la influencia de los factores abióticos en la producción de volátiles, Gouinguéné y Turlings (2002) realizaron experimentos con maíz (*Zea mays*), donde descubrieron que la humedad del suelo, la temperatura y la luz causaban cambios significativos en las proporciones de los compuestos presentes. No obstante para plantas como *Lippia graveolens*, la cantidad de humedad que recibe durante su ciclo de cultivo no afecta la composición de volátiles (Turgut y Silva, 2005).

2.1.2.4. Efecto de la fertilización

La fertilización mineral como factor agronómico juega un papel importante ya que mejora la nutrición de los cultivos afectando principalmente la producción de biomasa y solamente en forma indirecta los metabolitos secundarios. Por eso es necesario aplicar los nutrientes que presentan deficiencias en el suelo para asegurar un buen crecimiento vegetal. El efecto que produce la fertilización depende de la especie de que se trate, del principio activo que interesa obtener de esa especie y del nutriente aplicado. Por ejemplo, una abundancia de nitrógeno producirá un gran desarrollo vegetativo y por tanto una mayor demanda de agua. El momento de realizar las aportaciones de nutrientes puede ser en invierno y/o

después de los cortes o podas (Moré *et al.*, 2010). Los distintos nutrientes pueden generar respuestas positivas o negativas en la producción de los principios activos presentes en las diferentes especies medicinales o aromáticas (Vogel y Berti, 2003).

Al respecto, Amzallag *et al.* (2005), en un experimento desarrollado en Israel observaron que las variaciones en la composición del aceite esencial de *Origanum dayi*, son un efecto por el contenido de micronutrientes, el contenido de sodio y la textura del suelo. Estas variaciones han sido reportadas en otras especies, como es el caso de la planta aromática limonaria (*Cymbopogon citratus*), en la que se evaluaron las variables agronómicas, fertilización y frecuencia de corte sobre el contenido de volátiles, encontrando que con la dosis más elevada de N (180 kg/ha) a los 60 días de aplicación, se obtuvieron los mayores rendimientos del aceite esencial (Antolinez-González *et al.*, 2008). Gouinguéné y Turlings (2002) determinaron que la tasa de fertilización completa causaba cambios en las proporciones de los volátiles, aumentando el contenido de algunos monoterpenos como geranil acetato, β -cariofileno, β -bisaboleno y nerolidol. Existen numerosos estudios sobre estos efectos, en la tabla 2 se describen los resultados de algunos de ellos.

2.1.2.5. Factores bióticos

Las plantas responden ante los ataques de ciertos microorganismos y herbívoros mediante la emisión de ciertos compuestos orgánicos volátiles que avisan de su presencia y sirven como un mecanismo de defensa indirecto (Heil y Ton, 2008). Además, esta liberación de compuestos volátiles por las hojas, flores y frutos a la atmósfera o por las raíces al suelo, puede defender a la planta frente a nuevos herbívoros o patógenos, además de proporcionar ventajas en la reproducción debido a la atracción de polinizadores (Chen *et al.*, 2004).

Tabla 2. Efecto de la fertilización sobre el contenido de metabolitos secundarios en algunas plantas aromáticas medicinales.

ESPECIE	PRINCIPIO		RESPUESTA	REFERENCIA
	ACTIVO AFECTADO	NUTRIENTE		
<i>Atropa belladonna</i>	Alcaloides	Nitrógeno	Positiva	Flück, 1954
	Alcaloides	Potasio	Negativa	
<i>Datura spp.</i>	Alcaloides	Nitrógeno	Positiva	
<i>Coriandrum sativum</i>	Aceite esencial	Nitrógeno	Positiva	
	Aceite esencial	Potasio	Negativa	
<i>Pimpinella anisum</i>	Aceite esencial	Nitrógeno	Positiva	
	Aceite esencial	Potasio	Negativa	
<i>Salvia officinalis</i>	Aceite esencial	Nitrógeno	No afecta	Röhricht <i>et al.</i> , 1995
<i>Mentha x piperita</i>	Mentol	Nitrógeno y Fósforo	Positiva	Jeliazkova <i>et al.</i> , 1998
<i>Foeniculum vulgare</i>	Aceite esencial	Nitrógeno	Positiva	Omidbaigi y Hornok, 1992
<i>Matricaria chamomilla</i>	Bisabolol	Nitrógeno	Positiva	Franz, 1984
	Óxido de Bisalobol	Nitrógeno	Negativa	
	Bisabolol	Potasio	Negativa	
	Óxido de Bisalobol	Potasio	Positiva	
<i>Thymus vulgaris</i>	Timol	Nitrógeno	No afecta	Omidbaigi, 2002
<i>Echinacea angustifolia</i>	Equinacósido	Nitrógeno	Negativa	Berti <i>et al.</i> , 2002
	Equinacósido	Potasio	Positiva	

La multifuncionalidad de los microorganismos en los sistemas agrícolas, se expresa de acuerdo a una serie de factores bióticos, como la competencia con otros microorganismos, la composición biológica del suelo, el reconocimiento planta microorganismo y viceversa. Igualmente, factores abióticos, como la climatología, las características físicas y químicas del suelo, influyen directamente en el tipo de interacción de estos organismos y la expresión de los efectos benéficos o detrimentales, determinantes en el desarrollo de las especies vegetales (Marschner y Timonen, 2005; Harman, 2006; Hoitink *et al.*, 2006; Siddiqui y Akhtar, 2008; Radjacommare *et al.*, 2010).

La interacción de microorganismos rizosféricos, como los hongos formadores de micorrizas arbusculares, hongos del género *Trichoderma* y bacterias del género *Pseudomonas*, usualmente catalogados como agentes de control biológico y microorganismos promotores del crecimiento vegetal, dependen de este tipo de factores para expresar sus potenciales efectos benéficos (Cano, 2011).

Se ha demostrado que el uso de inoculantes con microorganismos, como los antes mencionados, también llamados biofertilizantes, pueden ayudar a la productividad vegetal, mediante el aumento de la actividad biológica en la rizósfera, a través de la producción de fitohormonas e indirectamente con la fijación de nutrientes como nitrógeno o fósforo, o bien por el bio-control de agentes fitopatógenos del suelo (Glick, 2003; Tilak y Reddy, 2006).

En los últimos años se ha demostrado que el uso de biofertilizantes presenta un efecto sobre el incremento de compuestos volátiles o aceites esenciales en algunas plantas aromáticas medicinales. La aplicación de composta en *Thymus vulgaris* llevó a un incremento de tres veces en el contenido de timol (Ateia *et al.*, 2009); así mismo, cuando se aplicó vermicomposta a una variedad alemana de manzanilla, además de lograr un incremento en la altura y diámetro de las plantas y sobre el número de flores, se obtuvo un aumento en el contenido del aceite esencial (Azizi *et al.*, 2008).

Con la inoculación de las raíces de *Ocimum basilicum* con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, como *Pseudomonas putida* cepa 41, *Azotobacter chroococcum* cepa 5 y *Azospirillum lipoferum* cepa OF, se mejoró el crecimiento vegetal y se incrementó la acumulación del aceite esencial (Ordookhani *et al.*, 2011).

Esta respuesta también ha sido observada en algunas plantas inoculadas con hongos micorrízicos arbusculares, que contribuyen al crecimiento de la planta huésped y a la síntesis de algunos metabolitos secundarios (Akiyama y Hayashi, 2002; Larose *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2003; Vittal-Navi *et al.*, 2006).

2.1.2.5.1. Hongos micorrízicos

Diversos estudios han demostrado los efectos benéficos de la asociación simbiótica entre los hongos micorrízicos arbusculares (micorriza) y las plantas (Gosling *et al.*, 2006; Franken *et al.*, 2007; Akhtar y Siddiqui, 2008; Kapoor *et al.*, 2008).

La principal función de la micorriza es favorecer la eficiencia de absorción de agua y nutrimentos por la planta a partir de la solución del suelo, mientras que la planta proporciona al hongo compuestos de carbono (Cano, 2011). La explicación de esta eficiencia de la utilización de nutrientes es que las hifas fúngicas que se extienden desde la raíz, son capaces de solubilizar, absorber y transportar fosfato (u otro nutrimento) desde el suelo a la raíz hospedante. La superficie de absorción ofrecida por la ramificación del micelio externo alrededor de las raíces micorrizadas permite a la planta aprovechar el nutrimento en el suelo más allá de la zona de agotamiento en la superficie radical (Cooper, 1984; Douds y Schenck, 1990; Ruíz-Lozano *et al.*, 1995; Jakobsen, 1998; Bago *et al.*, 2000).

Se reconoce actualmente que la respuesta en crecimiento de la planta micorrizada es a menudo resultado del aumento en la vida útil de las raíces absorbentes y del

incremento en nutrición, mayormente por fósforo (P) y otros nutrimentos como nitrógeno (N), potasio (K), cobre (Cu), zinc (Zn), magnesio (Mg), manganeso (Mn) y calcio (Ca) (González-Chávez *et al.*, 1998; Velasco *et al.*, 2001; Cruz *et al.*, 2004; Cordeiro *et al.*, 2005; Govindarajulu *et al.*, 2005; Robertson *et al.*, 2007).

Muchos aspectos de la interacción micorriza arbuscular-planta han sido estudiadas, como el efecto sobre el crecimiento de la planta, los intercambios nutricionales, control biológico hacia patógenos de las plantas, la tolerancia al estrés hídrico y las condiciones ambientales adversas, pero poco se sabe sobre el potencial de los hongos micorrízicos y como afectan las vías del metabolismo secundario de las plantas (Copetta *et al.*, 2006).

Varios grupos de trabajo han investigado los patrones de compuestos secundarios de raíces micorrizadas, algunos de éstos son: terpenoides (Akiyama y Hayashi, 2002), carotenoides (Maier *et al.*, 1995; Walter *et al.*, 2000; Fester *et al.*, 2002), flavonoides (Morandi 1996; Larose *et al.*, 2002), los glucosinolatos (Vierheilig *et al.*, 2000), fenoles (Zhu y Yao 2004) y fenilpropanoides (Weiss *et al.*, 1997).

Además, la evidencia indirecta sugiere que los hongos formadores de micorriza arbuscular también pueden aumentar el contenido de aceite esencial (compuestos volátiles) producidos en las hojas de las plantas micorrizadas (Guerrieri *et al.*, 2004). En ocasiones, se explica que la modificación observada en la síntesis de aceite esencial se considera una respuesta de defensa a la colonización fúngica, ya que dicha respuesta ha sido observada en interacciones micorriza-planta (Napierale-Filipiak *et al.*, 2002; Mucciarelli *et al.*, 2003; Werner *et al.*, 2004).

Autores como Gang *et al.* (2001) y Copetta *et al.* (2006), afirman que la colonización micorrízica produce un mayor rendimiento de aceite esencial y esto se asoció al mayor número de tricomas glandulares (sitio principal de síntesis de aceite esencial) presentes en las zonas de la hoja basal y central que fue encontrado en las plantas micorrizadas en comparación con las no micorrizadas.

Este mayor número de glándulas pueden estar relacionado con alteraciones en el perfil hormonal de las plantas debido a los mayores niveles de auxinas, citocininas, y giberelinas que se han registrado en plantas micorrizadas (Torelli *et al.*, 2000). Pero los mecanismos para dichas modificaciones no han sido dilucidados. En general, los autores remarcan la importancia del aumento en la nutrición mineral para mejorar el rendimiento de aceite esencial.

Actualmente existen pocos trabajos relacionados con el estudio de la interacción micorriza arbuscular y plantas medicinales, enfocado al incremento de sus metabolitos secundarios. La mayoría de éstos se enfocan principalmente a analizar el incremento en el crecimiento en estas especies vegetales. Como ejemplo, se tiene a *Dodonaea viscosa* (familia Sapindaceae) la cual es una planta característica de las zonas áridas de México, conocida también como Chapulixtle, Ocotillo o Jarilla. *Dodonaea viscosa*, se emplea en medicina tradicional contra problemas gastrointestinales, enfermedades de la piel, gota y reumatismo y en enfermedades venéreas, fiebre y cólicos. Los hongos micorrízicos arbusculares como *Glomus sp. Zac-6* y *Glomus sp. Zac-2*, probadas en esta planta produjeron mayores rendimientos de biomasa aérea, en comparación con plantas no tratadas (Gardezi *et al.*, 2000).

En las plantas aromáticas medicinales como *Ocimum basilicum*, *Mentha arvensis*, *Santolina chamaecyparissus*, *Salvia officinalis*, *Lavandula angustifolia*, *Geranium dissectum*, *Origanum dictamnus* y *Artemisia annua*, se ha demostrado que la colonización micorrízica aumenta el contenido y la composición de los aceites esenciales (Freiteas *et al.*, 2004; Rapparini *et al.*, 2008; Karagiannidis *et al.*, 2012), entre otras plantas más (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares sobre el contenido de metabolitos secundarios en algunas plantas medicinales.

ESPECIE	PRINCIPIO ACTIVO	HONGO MICORRÍZICO	RESPUESTA	REFERENCIA
Artemisia annua	Artemisina	<i>Glomus macrocarpum</i>	Positiva	Kapoor et al., 2007
	Artemisina	<i>Glomus fasciculatum</i>	Positiva	
Artemisia umbelliformis	β -Ocimeno	<i>Glomus tenue</i>	Positiva	Binet et al., 2011
	2-Decenal	y	Negativa	
	2-4-Decadienal	<i>G. intraradices</i>		
Catharanthus roseus	Vinblastina	<i>Glomus</i> sp.	Positiva	De la Rosa-Mera, 2009
	Vincristina	<i>Glomus</i> sp.	Positiva	
Mentha arvensis	Aceite esencial	<i>Glomus fasciculatum</i>	Positiva	Freiteas et al., 2004
Ocimum basilicum	Aceite esencial	<i>Gigaspora rosea</i>	Positiva	Copetta et al., 2006
	Ácido cafeíco	<i>Glomus caledonium</i>	Positiva	Toussaint et al., 2007
	Ácido rosmarínico	<i>Glomus mosseae</i>	Positiva	
Origanum vulgare var. Cona	Aceite esencial	<i>Glomus mosseae</i>	Positiva	Khaosaad et al., 2006
Origanum vulgare ssp. Hirtum	Aceite esencial	<i>Glomus viscosum</i>	Positiva	Morone-Fortunato y Avato, 2008

2.2. NURITE (*Satureja macrostema*)

2.2.1. Taxonomía y distribución de nurite

El nurite [*Satureja macrostema* (Benth.) Briq.] es una planta dicotiledónea de la familia Lamiaceae con olor a menta al estrujar sus hojas (Tabla 4). Es una planta arbustiva de 1 a 3 m de alto; tallos erectos, ramas arqueadas, pubescentes; hojas con peciolo de 2 a 5 mm de largo, limbo ovado u oblongo a lanceolado, de 1 a 4 cm de largo por 0.6 a 1.5 cm de ancho, ápice agudo, aserradas, base redondeada; flores solitarias o en grupos de 2 a 3 en las axilas de las hojas, pedicelos de 2 a 6 mm de largo, pubescentes; cáliz 5-dentado, bilabiado, de 7 a 10 mm de largo con la garganta pilosa; corola roja o anaranjada (cambiando a blanquecina o rosada en el secado), de 2 a 3.5 cm de largo; estambres exsertos, tecas de las anteras divergentes; estilo saliente de la corola; mericarpios ovoides, lisos o reticulados (Figura 1) (Rzedowski y Rzedowski, 1985).

S. macrostema es una especie compleja y los siguientes taxones han sido incluidos como sus sinonimias: *Melissa macrostema*, Mociño & Sessé; *Clinopodium macrostemum* (Benth.) Kuntze (Standley, 1924); y *Calamintha macrostema* (Benth.) Kuntze (Rzedowski y Rzedowski, 1985).

Tabla 4. Clasificación botánica de nurite (Watson y Dallwitz, 1992)

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Labiales
Familia	Lamiaceae
Género	<i>Satureja</i>
Especie	<i>S. macrostema</i> (Benth.) Briq. (1897)



Figura 1. Planta (A) y flores (B) de nurite (*Satureja macrostema* 'Benth.' Briq.).

Para 1924, Standley reportó al Género *Clinopodium* con tres especies; *C. oaxacanum*; *C. macrostemum* y *C. laevigatum* como especie nueva para el Estado de Michoacán. El Género *Clinopodium* es renombrado y cambia a *Satureja*, mientras que la especie *C. laevigatum* es considerada ya no como especie sino como una variedad; *Satureja macrostema* var. *laevigata* (Standl.) McVaugh & Schmid (Rodríguez y Espinosa, 1996), y *Satureja macrostema* var. *macrostema* (McVaugh y Schmid, 1967).

Comúnmente se le conoce como “té nurite”, “té de monte”, “tabaquillo”, hierba del borracho, tuche, garañona, atóchietl, poleo, cuencuenzpatli (Náhuatl), guie-zaa (Oaxaca, Zapoteco), Nurhitini te (purépecha), tragoriganoquauhna huacense, toronjil, tunché o tarepe. Principalmente habita en bosques de pino, de encino y de oyamel, a veces en matorrales cercanos a los bosques. En el Valle de México se reporta su presencia en Cuajimalpa, Tlalpan, Milpa Alta, Tlalmanalco y Amecameca (en altitudes de 2450-3500 m); fuera del Valle de México, se le localiza de Jalisco a Veracruz y Oaxaca (Standley, 1924) a lo largo de la Cordillera Neovolcánica, en bosques de pino, encino y oyamel en altitudes de 2400-3200 m.

En la Figura 2 se presenta su distribución en Michoacán, en los Municipios de Aguililla, Angangueo, Ciudad Hidalgo, Coalcomán, Charo, Chilchota, Nahuatzen, Nuevo San Juan Parangaricutiro, Ocampo, Paracho, Pátzcuaro, Salvador Escalante, Senguio, Tancítaro, Uruapan, Zinapécuaro, Zitácuaro (Bello, 1993; Rzedowski y Rzedowski, 1985).

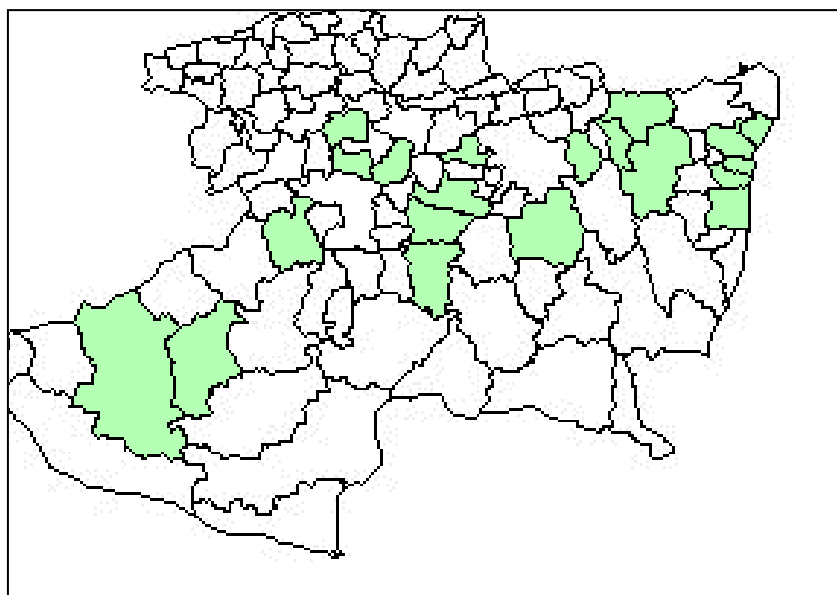


Figura 2. Distribución de nurite (*Satureja macrostema*) [●] en el Estado de Michoacán (SEMARNAP, 2000a).

2.2.2. Características fitoquímicas de *S. macrostema*

Las hojas del nurite en estado fresco contienen de 1 a 3% de esencia (Rodríguez, 1998), cuyo principal componente del aceite esencial es la 1-mentona y se encuentra en proporción de 3 a 6%. La actividad antibacteriana y bacteriostática de muchas plantas de la familia Lamiaceae puede, en muchos casos, ser atribuida a los compuestos fenólicos o a los componentes de los aceites volátiles (Simon *et al.*, 1984). De los compuestos fenólicos, los derivados del ácido cinámico, están ampliamente distribuidos en Lamiaceae y son especialmente activos. De acuerdo

con Terni (Cit. por Rodríguez, 1998), el ácido cafeíco es por sí mismo, particularmente activo contra *Corynebacterium diphtheriae* y *Staphylococcus-Proteus*. La actividad equivalente de casi diez unidades de penicilina (1.44 miligramos de ácido cafeíco) es el límite inferior para sustancias que son clasificadas como antibióticos.

En 2004, Serrato *et al.* reportaron el aislamiento e identificación del compuesto volátil piperitenona, a partir de un extracto etanólico de la parte aérea (hojas y tallos) de *S. macrostema*. Este compuesto presentó un efecto de inhibición de las bacterias *Salmonella* sp. (30%) y *Staphylococcus aureus* (32%) tanto de plantas en estado de prefloración como en plena floración. Asimismo, en el ensayo autobiográfico se observó un efecto de retardo de seis días en la germinación de la semilla de trébol (*Trifolium pratense* cv. Kendland), caracterizándolo como poseedor de cualidades aleloquímicas.

Actualmente, los compuestos químicos identificados para esta especie son: monoterpenos (linalol, limoneno, canfor, timol, pulegona, *p*-cimeno, α -terpineol, canfeno, limoneno y 4-terpinenol) y tres triterpenos (ácido oleanólico, ácido ursólico y ácido 3- hidroxí-ursenoico) (Bello *et al.*, 2006). En trabajos con nurite, se ha mostrado que el extracto etanólico de esta especie tuvo 80% de inhibición contra bacterias (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*). Los terpenos como limoneno y pulegona, compuestos volátiles mayoritarios del extracto, podrían ser los metabolitos responsables del efecto antibacteriano. Los compuestos fitol, escualeno, estigmasterol y ácido ursólico son principalmente responsables del efecto antiinflamatorio y relajante (Bello *et al.*, 2006). Por su parte Damián-Badillo *et al.* (2008), evaluaron el efecto antifúngico y antioomiceto de esta especie, sobre los hongos *Candida albicans*, *Collectotrichum lindemuthianum*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Sporothrix schenckii* encontrando una inhibición sobre su crecimiento de 45, 41, 60 y 37%, respectivamente.

Recientemente, Pérez-Gutiérrez y Gallardo-Navarro (2010) determinaron la capacidad antioxidante del extracto metanólico de *S. macrostema* el cual exhibió potente captación de radicales libres, especialmente frente DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracilo), recolección de residuos de radicales hidroxilo y la actividad quelante de hierro, así como un efecto moderado sobre los aniones superóxido y óxido nítrico, estos efectos fueron atribuidos al contenido de fenoles presentes en el extracto.

2.2.3. Usos y propiedades de nurite

El nurite es utilizado como un eficiente aperitivo si se toma en ayunas o antes de los alimentos. Se utiliza para combatir las infecciones intestinales como estomático, excitante de los movimientos gástricos o gastrointestinales y favorece la digestión cuando ésta es lenta y dolorosa. Es utilizado como un carminativo poderoso y se utiliza también para evitar o eliminar los cólicos. Es un agente digestivo eficaz si se toma después de los alimentos, también se toma el nurite para eliminar las molestias producidas por la ingestión de bebidas alcohólicas: agruras y náuseas, de este uso le viene el nombre de “hierba del borracho”. Otro uso que se le da al nurite es el de aliviar un tipo de diarrea denominada "Diarrea de Tierra Caliente"; como remedio y buen tónico después de sufrir paludismo u otras fiebres. Tradicionalmente se toma un atole de nurite para aumentar la fertilidad y lograr la concepción en algunas mujeres que padecen cierto tipo de esterilidad (Martínez, 1986), de este uso se le conoce con el nombre de “garañona”. En general, varias especies del género *Satureja* han sido tradicionalmente usadas como estimulantes, estomáticas, carminativas, expectorantes, antidiarreicas y afrodisiacas (Standley, 1924; Rzedowski y Rzedowski, 1985; Bello, 1993; Rodríguez, 1998).

2.2.4. Problemática de nurite

La recolección de la flora silvestre tiene muchos inconvenientes, derivados del confusiónismo y mezcla de especies, por falta de conocimiento de las mismas, desconocimiento del rendimiento y el contenido de los principios activos de la flora que se recolecta, en muchas ocasiones no se consigue la cantidad demandada por la industria y por último, la carestía y escasez de mano de obra rural. Estos inconvenientes se evitan con el cultivo agrícola, a partir de planta seleccionada con criterios de buena adaptabilidad al cultivo y rendimiento y cantidad de sus principios activos (Kordali *et al.*, 2005; Bello, 2006).

Así mismo, algunas especies silvestres tienen la problemática de presentar la producción de biomasa según la estacionalidad, ya que algunas son anuales, o si son perennes, muchas son caducifolias, de tal manera que no hay producción de la parte aérea (flores, tallos y hojas) durante todo el año (Aguilar-Ramírez, 2002). La reproducción es otro factor que regula la producción en este tipo de plantas, ya que hay especies que producen semillas no viables o con muy bajos porcentajes de germinación, o simplemente no las producen. Esta problemática en particular, la presenta *S. macrostema*, ya que no todo el año hay producción de hojas o flores, y de manera natural, su germinación es casi nula (Aguilar-Ramírez, 2002). Se deduce que en condiciones silvestres la germinación es muy baja, debido a que no existen, ni han existido grandes poblaciones de nurite (SEMARNAP, 2000b; Aguilar-Ramírez, 2002).

Si a ello se agrega el hecho de que su hábitat ha sido y está siendo destruido por las explotaciones forestales, el pastoreo y los incendios forestales y de que además cuenta con una distribución muy restringida y escasa, así como la imposibilidad de su cultivo, y que actualmente las actividades para su recolección, acopio y venta se realizan sin planeamiento o control apropiado constituyendo una actividad depredadora, se puede provocar que un aumento de la demanda, esta

especie se lleve hacia un estatus de peligro de extinción debido a una sobre explotación (Aguilar-Ramírez, 2002).

Esta planta es ampliamente consumida por sus propiedades aromáticas y medicinales debidas en parte a su contenido de compuestos volátiles; por lo que, es altamente demandada, tanto para consumo propio, como para su venta, no solo a nivel regional sino también nacional (Bello, 2006). Actualmente no existen programas para su domesticación, que impliquen sistemas de propagación, prácticas para su cultivo en invernadero y si presenta o no variación de su contenido en compuestos volátiles durante sus etapas de desarrollo. Recientemente Villa-Patricio, estableció un sistema exitoso de micropropagación utilizando yemas apicales y axilares de plántulas germinadas *in vitro* a partir de semillas de *S. macrostema*. Por lo que se propuso utilizar este método de micropropagación *in vitro* para desarrollar el presente trabajo debido a la escases de material vegetal, especialmente semillas y porque esta tecnología ofrece la ventaja de permitir seleccionar grupos de individuos con características deseadas y homogéneas al considerarse estas plantas clones mostrando menos variación en su contenido de metabolitos secundarios que sus contrapartes silvestres (Goleniowski y Silva, 1993).

3. JUSTIFICACIÓN

Debido al uso tradicional y a las propiedades medicinales del nurite (*Satureja macrostema*) atribuidas a los compuestos volátiles que posee, así como a su problemática de reproducción de manera silvestre, es importante realizar investigaciones para contar con métodos de reproducción y cultivo que aseguren su abastecimiento, sin afectar sus poblaciones silvestres.

Dado que, nurite presenta potencial para la obtención de compuestos volátiles, es necesario conocer el contenido y variación de sus componentes volátiles durante su desarrollo y crecimiento tanto en condiciones de cultivo *in situ* como en invernadero, así como el determinar cómo afectan algunos factores como la fertilización química y biológica (simbiosis micorrízica), sobre la calidad de la planta y el contenido de sus principales componentes volátiles.

4. HIPÓTESIS

El contenido de compuestos volátiles es dependiente de las etapas de desarrollo y crecimiento en nurite (*Satureja macrostema*) y se incrementa con la fertilización y la micorrización.

5. OBJETIVOS

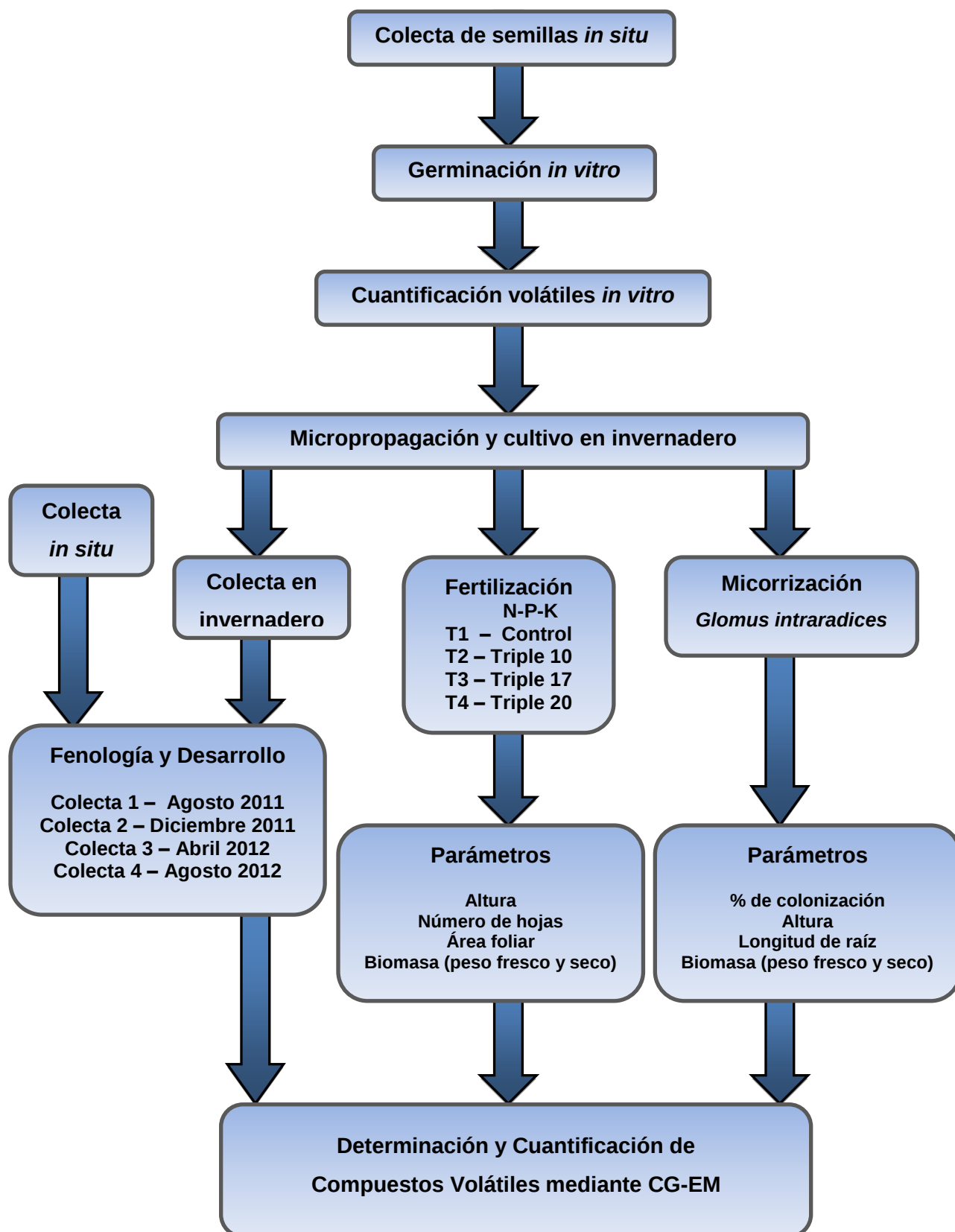
5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el contenido de compuestos volátiles en diferentes etapas de desarrollo *in situ* y crecimiento en invernadero, así como el efecto de la fertilización y micorrización en nurite (*Satureja macrostema*).

5.1.1. Objetivos específicos

1. Optimizar la propagación *in vitro* de *Satureja macrostema* para su cultivo en invernadero.
2. Identificar los compuestos volátiles en plantas de *Satureja macrostema in situ* y cultivadas en invernadero, y determinar su variación durante las etapas de desarrollo y crecimiento.
3. Evaluar el efecto de la fertilización y micorrización sobre el contenido de compuestos volátiles en plantas de *Satureja macrostema* cultivadas en invernadero.

6. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Las semillas de nurite (*Satureja macrostema*) utilizadas para la realización de este estudio fueron colectadas en un sitio del bosque de pino-encino ubicado en el Municipio de Charapan, Michoacán (19°40'22.64" N, 102°16'59.87" O, 2530 msnm) en la época de fructificación del año 2010. Las plantas fuente de semillas, fueron rotuladas para realizar los muestreos para el análisis de compuestos volátiles, éstas fueron confirmadas taxonómicamente por el D.C. Miguel Ángel Bello González, investigador de la Facultad de Agrobiología, UMSNH.

7.2. MICROPROPAGACIÓN DE *S. macrostema*

7.2.1. Establecimiento *in vitro*

El cultivo *in vitro* se estableció con la siembra de semilla en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), mismo en el cual se realizó el sistema de micropropagación con la siembra de yemas axilares de las plántulas obtenidas, en condiciones reportadas previamente por el grupo de investigación (Villa-Patricio, 2011). Las sales del medio MS fueron de la marca Fermont®, vitaminas y reguladores de crecimiento vegetal de la compañía Sigma®, la sacarosa y el agar de marca registrada Bioxón. Todos los experimentos de cultivo *in vitro* se llevaron a cabo en cuarto de cultivo, con una temperatura de 25°C, 16 h de fotoperíodo (luz) con 2000 lux de intensidad.

Para el establecimiento *in vitro*, las semillas fueron desinfectadas de acuerdo a la siguiente rutina de asepsia:

- a) 100 semillas fueron suspendidas en una solución de detergente (Hyclin 15%, 15 min), y posteriormente fueron enjuagadas con agua corriente.

- b) Después, éstas fueron colocadas en una solución de etanol 70% durante 2 minutos, y sin enjuagar fueron pasadas a la solución de H₂O₂ al 3% por 1 min.
- c) Por último, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 1.2% de cloro activo, con el fungicida comercial Tecto 60 (tiabendazol), por 20 min.
- d) En área estéril (campana de flujo laminar), fueron enjuagadas con agua destilada estéril por 3 veces y se colocaron en caja de Petri.

Se cultivaron 5 semillas por frasco que contenían 20 mL de medio MS ajustado a un pH de 5.7 y solidificado con 8 g/L de agar bacteriológico, con 0.05 mg/L de benciladenina (BA). La incubación se realizó en cuarto de cultivo, determinando el porcentaje de germinación a los 15, 30, 60 y 90 días después del cultivo.

7.2.2. Multiplicación de brotes

Las plántulas de 30 días de cultivo, obtenidas por la siembra de semillas, fueron utilizadas como fuente de los explantes, seleccionando a las yemas axilares en base a lo reportado por Villa-Patricio (2011), que fueron cultivadas en medio MS con 30 g/L de sacarosa (pH 5.7) con 2.5 mg/L de benciladenina (BA) y solidificado con 8 g/L de agar bacteriológico, para la inducción de brotes. Se realizaron observaciones cada 15 días, determinando número y tamaño de brotes así como el porcentaje de respuesta a la brotación de éstos.

7.2.3. Enraizado de brotes

Los brotes regenerados de los explantes, fueron cultivados en el medio MS con 30 g/L de sacarosa, 8 g/L de agar bacteriológico (pH 5.7) sin reguladores de crecimiento (medio reportado por Villa-Patricio, 2011) y en MS ½ con 20 g/L de sacarosa, 8 g/L de agar bacteriológico (pH 5.7) con 0.1 mg/L de ácido indol butírico (AIB) para la formación de raíces. Cada 15 días se determinó el porcentaje

de producción de raíces por brote, número y tamaño de raíces y altura de las plántulas.

7.2.4. Trasplante, aclimatación y cultivo en invernadero

El trasplante y aclimatación se realizó, cultivando las plántulas en charolas de plástico con tapa que contenían una mezcla de sustrato (1:1) conformada por peat-moss comercial (turba) y agrolita bajo condiciones de alta humedad relativa (HR) (70%), las charolas se mantuvieron cerradas por 15 días con apertura paulatina durante 15 días y manteniéndolas abiertas 10 días más.

Posteriormente a los 30 días del trasplante y aclimatación, las plantas se cultivaron de manera individual en macetas de capacidad de 1 Kg, conteniendo el mismo sustrato. Se determinó la sobrevivencia de las plántulas y se midió la altura de éstas al inicio del trasplante y a los 30 días del cultivo.

Las condiciones de cultivo en invernadero fueron igual para todas las plantas de los diferentes experimentos, utilizando un invernadero de 4 X 9 m, sin control de temperatura e intensidad lumínica. El riego tanto inicial como durante el cultivo se hizo de forma continua y manual cada 3 días con agua corriente para permitir alta humedad en el sustrato ($\geq 70\%$ HR).

7.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE VOLÁTILES EN *S. macrostema*

La identificación y el contenido de los compuestos volátiles mayoritarios fue determinado en plantas creciendo en el sitio de colecta (Plantas *in situ* ó de campo), en plántulas germinadas y mantenidas en medio MS (Plantas *in vitro*) así como en plantas micropropagadas cultivadas en invernadero (Plantas cultivadas en invernadero).

7.3.1. Análisis y cuantificación de compuestos volátiles

El análisis de volátiles y su contenido se realizaron mediante la técnica de cromatografía de gases, acoplada a espectrometría de masas con ionización por impacto electrónico (CG-EMIE), método ya establecido para esta especie (Bello *et al.*, 2006). Las colectas (toma de muestras) se realizaron por triplicado (al azar), obteniendo 1 g de peso fresco parte aérea (hojas y tallo) por planta de cada una de los diferentes tipos de plantas.

7.3.1.1. Método de extracción de compuestos volátiles

Para realizar la extracción de los compuestos volátiles en plantas de nurite, se utilizó el sistema de maceración en solvente, bajo el siguiente protocolo:

- a) Las hojas y tallos se colocaron en un tubo de cristal con tapa con una capacidad de 20 mL; donde por cada gramo de material vegetal fresco, se adicionaron 10 mL de hexano.
- b) Se adicionó 500 μL de tetradecano ($\text{C}_{14}\text{H}_{30}$) a una concentración de 0.05 mg/mL por cada 10 mililitros de extracto (estándar interno).
- c) El tubo sellado, se llevó a agitación en Vortex (MS1 Minishaker, AKA®) durante 1 minuto.
- d) Las muestras se sometieron a maceración durante 5 días a 4°C.
- e) El extracto se filtró a través de papel filtro Whatman No.1.
- f) El extracto se llevó a sequedad en frío (sobre hielo), con remoción del hexano utilizando gas nitrógeno.
- g) El extracto obtenido se resuspendió en 1 mL de hexano y se mantuvo en refrigeración a 4°C hasta su análisis.

7.3.1.2. Método de cromatografía de gases – espectrometría de masas

El análisis de los extractos se realizó inyectando 1 μ L de muestra en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies (7890A) equipado con un detector de masas (Agilent 5975C) (Lab. de Fitobioquímica, CINVESTAV Campus Guanajuato). El cromatógrafo se operó usando helio como gas acarreador con un flujo de 1 mL/min, con inyección dividida (split 50:1) a una temperatura de 250°C, en una columna capilar no polar HP 5MS (30m x 0.25mm I.D. x 0.25 μ m Film), usando el siguiente programa de temperatura en el horno: una temperatura inicial de 50°C, seguida de una rampa de 5°C/min para llegar a una temperatura de 280°C por un tiempo 1 min, otra rampa de 25°C/min para llegar a una temperatura final de 380°C, durante 3 min. El tiempo de corrida fue de 50 minutos.

El espectrómetro de masas se operó a una velocidad de flujo de 1 mL/min, con un voltaje de ionización a 70 eV, a una temperatura de la interfase de 250°C, en modo SCAN y en un rango de masas de 50-500 m/z.

7.3.1.3. Identificación de los compuestos volátiles

Se revisó la pureza de cada uno los picos de los cromatogramas; así como su tiempo de retención y se realizó comparación de los espectros de masas de los compuestos con los de la biblioteca National Institute of Standards and Technology (NIST08). Solo se aceptó los picos con pureza de pico de uno y la identificación de espectros con concordancia por arriba del 90%.

7.3.1.4. Cuantificación de los compuestos volátiles

Para calcular la concentración de cada compuesto se realizó mediante el método de estándar interno, usando tetradecano (Sigma Aldrich®) a la concentración de 0.05 mg/mL. Dicha cuantificación se hizo de manera directa, relacionando el área del pico del estándar interno de concentración conocida con cada uno de los picos

de interés. Las concentraciones se reportaron en microgramos por gramo de peso fresco de la muestra ($\mu\text{g/g}$ peso fresco).

7.4. COMPUESTOS VOLÁTILES EN PLANTAS DE NURITE *in vitro*, *in situ* Y CULTIVADAS EN INVERNADERO

La obtención de material para la extracción, identificación y cuantificación de los compuestos volátiles, se realizó colectando la parte aérea (hojas y tallo). El método fue estandarizado con el análisis de extractos de plantas de nurite germinadas y mantenidas en cultivos *in vitro*, plantas *in situ* y plantas micropropagadas cultivadas en invernadero.

7.4.1. Compuestos volátiles en plantas de nurite cultivadas *in vitro*

Con el propósito de determinar la variabilidad en el contenido de volátiles en plántulas germinadas *in vitro* de nurite, se seleccionaron 10 plántulas de 90 días de cultivo, para el análisis y de esta manera micropropagar aquellas que mostraran un contenido homogéneo de volátiles, para que no interfiriera la variabilidad natural del contenido de éstos sobre los efectos de las prácticas de cultivo como la fertilización y la micorrización. Para este análisis, las muestras consistieron en la parte apical de cada una de las plántulas (yema apical con tallo y un par de hojas).

7.4.2. Compuestos volátiles en plantas de nurite *in situ* y cultivadas en invernadero

El primer muestreo de plantas de nurite creciendo en el sitio de colecta (*in situ*) se realizó el 30 de agosto de 2011, tomando tres muestras al azar de plantas rotuladas. Para el muestreo de plantas micropropagadas de nurite creciendo en invernadero, se obtuvieron a los 30 días de su cultivo.

Para la determinación del efecto fenológico sobre el contenido de volátiles en plantas de nurite *in situ*, se realizaron muestreos cada 4 meses, de agosto 2011 a agosto 2012. Así mismo, se realizaron observaciones morfológicas para determinar los eventos fenológicos presentes como desarrollo vegetativo, floración y fructificación.

En plantas de nurite en invernadero se determinó el efecto del crecimiento sobre el contenido de volátiles, obteniendo muestras cada cuatro meses al azar, en el mismo período de las colectas *in situ*. El sustrato fue suplementado con fertilizante al momento de la siembra, se adicionó 1 g/maceta del fertilizante Triple 17 (17% de nitrógeno, 17% fósforo y 17% potasio).

7.5. TRATAMIENTOS DE FERTILIZACIÓN Y MICORRIZACIÓN EN PLANTAS DE NURITE CULTIVADAS EN INVERNADERO

Para determinar el efecto de la fertilización química con fertilizantes comerciales, y biológica con micorriza, éstos fueron aplicados sobre suelo en macetas conteniendo las plantas de nurite.

7.5.1. Aplicación de fertilizantes químicos

Las plantas de nurite cultivadas en invernadero (n=6) fueron tratadas con 4 niveles de fertilización mostrados en la Tabla 5, utilizando fertilizantes comerciales denominados TRIPLE por su contenido de nitrógeno, fósforo y potasio (N-P-K), la concentración es expresada en porcentaje de cada macronutriente por kilogramo de fertilizante. La aplicación fue de 1 g/planta, equivalente a 0.1 g/planta de cada nutriente (N-P-K). El fertilizante se adicionó sobre el sustrato cada 30 días con un total de tres aplicaciones, considerando la primera de ellas como día 0 del experimento, la segunda y tercera aplicación se realizaron a los días 30 y 60, respectivamente. Por lo que, el efecto de las concentraciones de fertilizante N-P-K sobre el contenido de los volátiles fue sumatorio.

Tabla 5. Tratamientos de fertilización aplicados en plantas de nurite (*S. macrostema*) cultivadas en invernadero.

TRATAMIENTO	FERTILIZANTE N-P-K (%)
T1	0
T2	10-10-10
T3	17-17-17
T4	20-20-20

7.5.2. Inoculación de micorriza arbuscular

Las plantas de *S. macrostema* de 30 días de cultivo establecidas en maceta en invernadero que presentaban una altura promedio de 13.9 ± 0.3 cm fueron inoculadas directamente en la raíz en contacto con el sustrato, con el hongo micorrízico arbuscular *Glomus intraradices*, donada por el Laboratorio de Interacción Planta-Suelo-Microorganismo a cargo del D.C. Javier Villegas Moreno. Dicha cepa fue mantenida en medio mínimo para crecimiento de micorriza *in vitro* (Fortin *et al.*, 2002) en raíces de zanahoria (*Daucus carota* L.) como hospedero. El inóculo se preparó a partir de una solución de 570 esporas/mL, la cual se aforó a 200 mL con agua destilada estéril. Se aplicaron 2 mL del inóculo por planta que correspondió a 60 esporas de *G. intrarradices* por planta (n=6).

El porcentaje de colonización micorrízica se evaluó 30 días después de la inoculación, por el método de clareo y tinción con tinta china descrito por Vierheilig *et al.* (1998), para lo cual se tomaron al azar 3 plantas no inoculadas (- micorriza) y 3 inoculadas (+ micorriza). De éstas, las raíces nuevas fueron separadas y limpiadas de exceso de sustrato y colocadas en rejillas o casetes especiales para tinción que permiten la entrada y salida de líquidos. Para realizar el aclaramiento se colocaron las rejillas en vaso de precipitado al que se agregó suficiente solución de hidróxido de potasio (KOH) al 10% hasta cubrirlas. Se procedió a

calentar el vaso de precipitado hasta ebullición, a partir de ello se dio un periodo de 10 minutos para un efectivo aclareo de las raíces. Transcurrido el tiempo se retiró el KOH y se hicieron lavados al chorro de agua por 10 minutos.

Para la tinción de las raíces se preparó una solución de vinagre blanco (ácido acético 5%) con tinta china negra (Sheater®) al 5%. Esta solución se calentó hasta alcanzar su punto de ebullición, seguido a esto las rejillas se colocan en la solución en ebullición durante 7 min. Finalizado este tiempo se retiraron las rejillas y se lavaron en agua corriente por espacio de 10 min, hasta que el agua de enjuague estuvo clara.

El porcentaje de colonización se realizó con microscopía óptica para evaluar la presencia o ausencia de estructuras micorrízicas como hifas, vesículas y/o arbúsculos. Esta se llevó a cabo a los 30 y 90 días, respectivamente después de la inoculación. Se cortaron segmentos de 1cm de longitud de las raíces teñidas, 10 segmentos fueron colocados en portaobjetos con agujas de disección, paralelamente unas a otras, agregando suficiente agua con un gotero para mejorar su visualización y de esta manera se les colocó el cubreobjetos. Para realizar la evaluación se observó al microscopio óptico con el aumento 10X y 40X. Cada segmento se revisó cada 2 mm, de tal manera que cada uno de éstos se dividió en cinco puntos para su observación a lo largo del segmento. La presencia o ausencia de estructuras micorrízicas (segmentos con hifas, vesículas y/o arbúsculos) se reportó como (+) ó (-), respectivamente. Para evaluar la colonización micorrízica se le dio un valor de 20% a cada uno de los cinco puntos de cada segmento; esto, siempre que se haya observado alguna estructura micorrízica, a la ausencia de éstas se le otorgó un valor de 0%. Este proceso se hizo para los 10 segmentos montados en cada preparación. Al final se realizó la sumatoria total de los porcentajes obtenidos de cada una de las preparaciones dividiéndose entre el número total de segmentos (10) para obtener el porcentaje promedio de la preparación.

7.5.3. Parámetros determinados

Las variables de crecimiento que se determinaron en plantas de nurite (n=6) tratadas con fertilizantes químicos, fueron altura, número de hojas y área foliar a los 0, 30, 60 y 90 días; la biomasa en base a peso fresco y peso seco se determinó al final del experimento (90 días). Estas variables se registraron antes de realizar el corte de material vegetal para el análisis de compuestos volátiles.

Las variables de crecimiento determinados en plantas no micorrizadas (-micorriza) y plantas micorrizadas (+ micorriza) fueron altura de las plantas, longitud de la raíz y biomasa en peso fresco y peso seco, determinados a los 0, 30, 60 y 90 días; considerando como día 0, cuando se realizó la inoculación de las esporas del hongo micorrízico en la raíz de la planta; día 30, la evaluación inicial del porcentaje de colonización y día 90, terminación del experimento con evaluación final del porcentaje de colonización.

Para el análisis y cuantificación de los compuestos volátiles, se realizaron cuatro muestreos a los 0, 30, 60 y 90 días, tomando como muestra, 1 g peso fresco de parte aérea apical (hojas y tallo) de plantas; tanto de los tratamientos con fertilización química, como de los dos tratamientos de micorrización.

7.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de cada uno de los experimentos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), utilizando la prueba de diferenciación de medias Tukey ($p \leq 0.05$), analizando un número variable de muestras (n) según el experimento. Se utilizó el programa estadístico JMP.

8. RESULTADOS

8.1. MICROPROPAGACIÓN *S. macrostema*

8.1.1. Germinación *in vitro* de semillas de nurite

Se seleccionaron 100 semillas que no mostraran ruptura de la testa y que presentaran un tamaño aproximado de 1 a 1.5 mm, como las mostradas en la Figura 3A, cultivando 5 semillas por frasco de cultivo (Figura 3B).

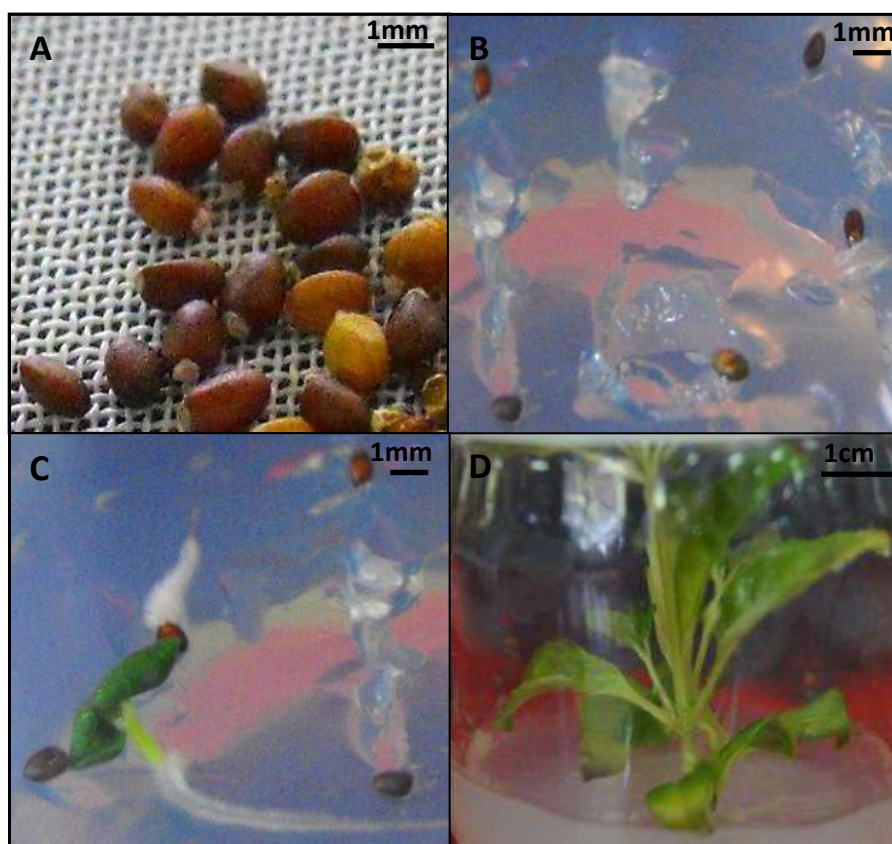


Figura 3. Semillas de nurite (A), su cultivo (B) y germinación *in vitro* (C), así como el desarrollo de plántulas a los 60 días del cultivo (D).

Con el método de asepsia utilizado solamente se obtuvo un 2% de contaminación, quedando un total de 98 semillas, lo cual no afectó la obtención del número de plántulas, dicha contaminación fue de tipo fungosa.

La germinación inició a los 15 días del cultivo con 1 semilla del total (98 semillas, 1.02%), incrementándose durante el tiempo del cultivo, obteniendo un 45.91% de germinación a los 30 días del cultivo, encontrando que 30 días después, aún germinó un 31.64% más dando lugar al desarrollo de 76 plántulas. La germinación concluyó al día 60, ya que al tiempo 90, ninguna de las semillas restantes germinó (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de germinación (%) de semillas de nurite en medio nutritivo MS con 0.05 mg/L BA, a diferentes tiempos de cultivo.

Tiempo (Días)	Porcentaje de germinación (%)
15	1.02
30	45.91
60	77.55
90	77.55

Después de 15 días de la germinación, las plántulas mostraron cotiledones de un tamaño de 3 mm x 1.5 mm, un epicotilo de 2.1 mm y una radícula de 1 cm de longitud, la cual presentó pelos radiculares (Figura 3C), éstas fueron recultivadas a medio fresco, sembrando una plántula por frasco, las cuales alcanzaron los 5.7 cm de altura, 6 pares de hojas y hasta 11.2 raíces por plántula de 1.9 cm de largo, a los 90 días de cultivo (Figura 3D).

El método de desinfección usado presentó una alta efectividad y no alteró la viabilidad de las semillas, ni el posterior desarrollo de las plantas. El 22.45% de las semillas no germinó.

8.1.2. Multiplicación de brotes

La micropropagación de nurite se obtuvo mediante la regeneración y multiplicación de brotes en yemas axiales (Figura 4A) de manera directa (organogénesis), con el fin de conseguir en forma rápida la formación de plántulas. Por ello, los explantes fueron cultivados en medio MS con 2.5 mg/L de BA, una concentración apta para la brotación según lo reportado por Villa-Patricio (2011), obteniéndose 23 brotes por explante a los 45 días del cultivo (Figura 4B), en un 95% de los explantes cultivados.

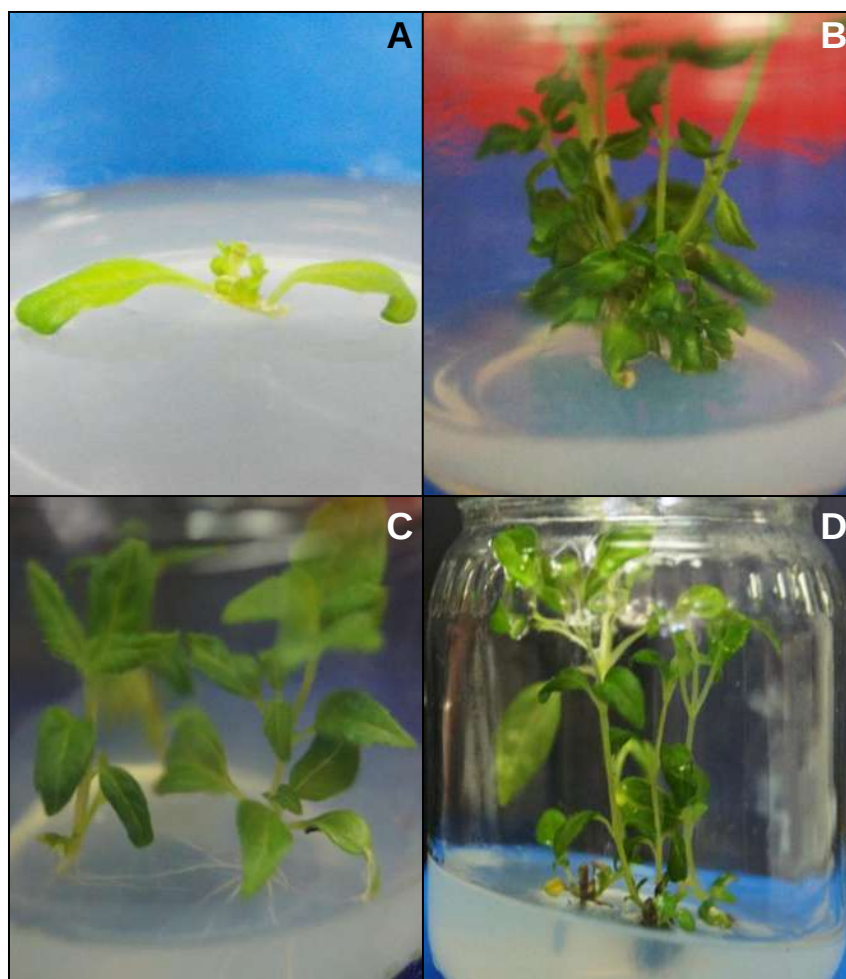


Figura 4. Proceso de micropropagación de nurite, desde la siembra *in vitro* del explante (A), desarrollo de brotes (B), enraizado de éstos (C) y el desarrollo de plántulas (D).

8.1.3. Enraizado y desarrollo de las plántulas

Los brotes fueron separados de manera individual y cultivados en el medio de cultivo a la mitad de sus componentes (MS ½) suplementado con la auxina, ácido indol-3-butírico en una concentración de 0.1 mg/L, lo anterior con el propósito de optimizar el enraizado de los brotes, ya que en los resultados reportados por Villa-Patricio (2011) obtenían bajo porcentaje y desarrollo de raíces. En este medio de cultivo, los brotes produjeron 12.1 raíces a los 15 días, de hasta 1.8 cm de longitud (Figura 4C). Las plántulas mostraron un buen desarrollo consiguiéndose una altura de 5.1 cm (Figura 4D).

8.1.4. Trasplante, aclimatación y cultivo en invernadero

El trasplante y aclimatación de las plántulas de nurite micropropagadas se realizó al cabo de 15 días de su cultivo en el medio de enraizado y desarrollo. Las plántulas fueron extraídas de los frascos de cultivo y lavadas con agua corriente con el fin de eliminar nutrimentos del MS y sacarosa, para evitar el crecimiento de hongos durante el trasplante.

Posteriormente fueron colocadas en papel secante (Figura 5A) para eliminar el agua y fueron cultivadas en charolas de plástico transparente con tapa en el sustrato turba (peat-moss) y agrolita (1:1) humedecido a saturación con agua corriente (Figura 5B). Las charolas se mantuvieron cerradas durante 15 días y paulatinamente fueron abiertas las tapas durante 15 días, tiempo a partir del cual se mantuvieron abiertas por el día y cerradas en la tarde, en condiciones de invernadero (sin condiciones controladas de temperatura y luz), incubándose por otros 10 días de cultivo más (Figura 5C). El sustrato se mantuvo húmedo con agua corriente.

A los 30 días del trasplante, las plántulas fueron individualmente cultivadas en macetas con 1 Kg del mismo sustrato, observando un 95% de viabilidad y

plántulas de 8.3 cm de altura. La viabilidad se mantuvo durante el cultivo en maceta; a los 30 días, mostraron un óptimo crecimiento y desarrollo ya que las plantas alcanzaron los 13.6 cm de altura (Figura 5D).

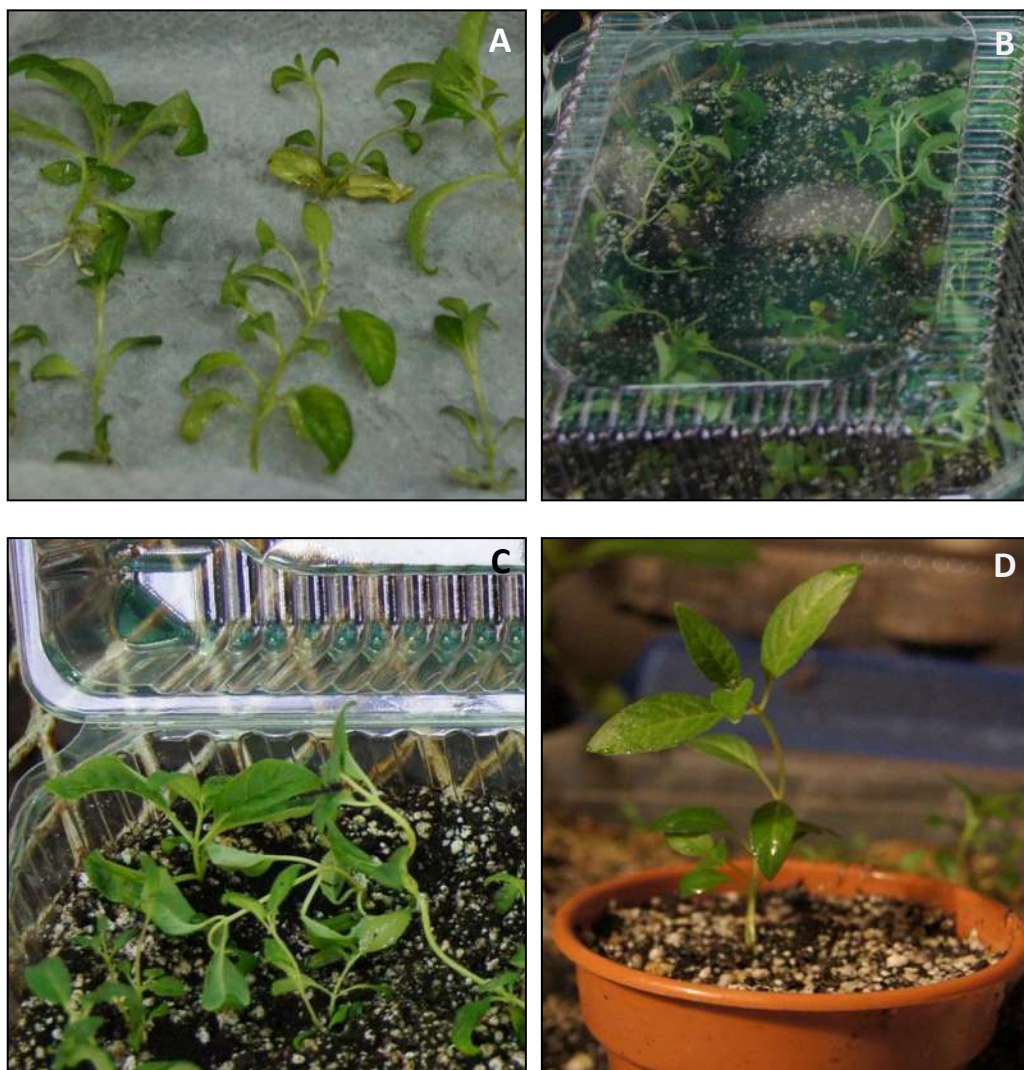


Figura 5. Fases del trasplante y aclimatación de plántulas micropropagadas de nurite (*S. macrostema*): A) Previo al trasplante durante enjuague y secado de las plántulas; B) 15 días de cultivo en cámara húmeda cerrada; C) 15 días en cámara abierta; D) a los 30 días del cultivo en maceta.

Las plantas de nurite micropropagadas se mantuvieron bajo cultivo en invernadero con fines de analizar las condiciones de manejo como fertilización y micorrización para determinar los factores más importantes en la producción de plantas como fuente de compuestos volátiles.

8.2. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES EN PLANTAS DE NURITE

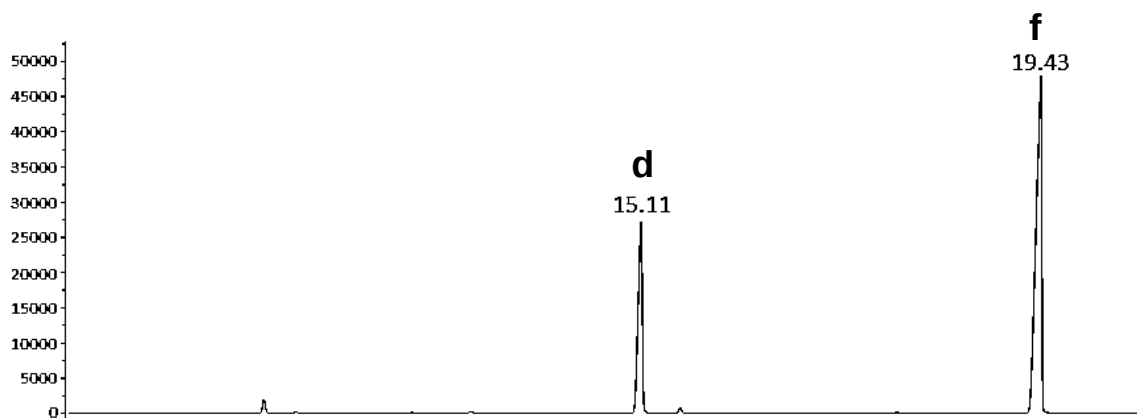
8.2.1. Plantas *in vitro*

Las plántulas de 90 días de cultivo *in vitro*, obtenidas por la germinación de las semillas de nurite y cultivadas individualmente en medio MS suplementado con 0.05 mg/L BA, fueron sometidas a un análisis de compuestos volátiles por el método de extracción hexánica, con el fin de determinar la posible variación de éstos entre las plantas. El muestreo se realizó al azar con 10 plántulas, las cuales presentaron en promedio una altura de 5.7 cm, 12 hojas, 11.2 raíces/plántula, éstas con una longitud de 1.9 cm (Figura 3A).

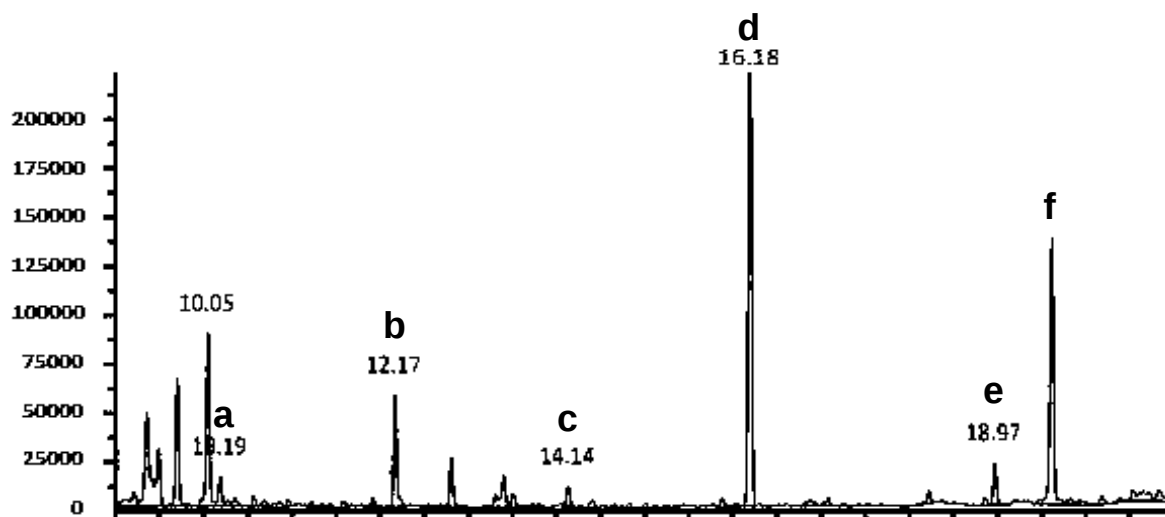
Los extractos hexánicos mostraron solamente la presencia del compuesto terpénico pulegona (Figura 6A), que presentó un tiempo de retención (Tr) de 15.11 min, identificado con el espectro de masas correspondiente (Anexo I). En promedio, el contenido de pulegona fue de 1.55 µg/g peso fresco, observando una alta homogeneidad en la cantidad del compuesto volátil (Anexo II), por lo que estas plántulas fueron elegidas como fuente de explantes para realizar la micropropagación de nurite.

Abundancia

A)



B)



C)

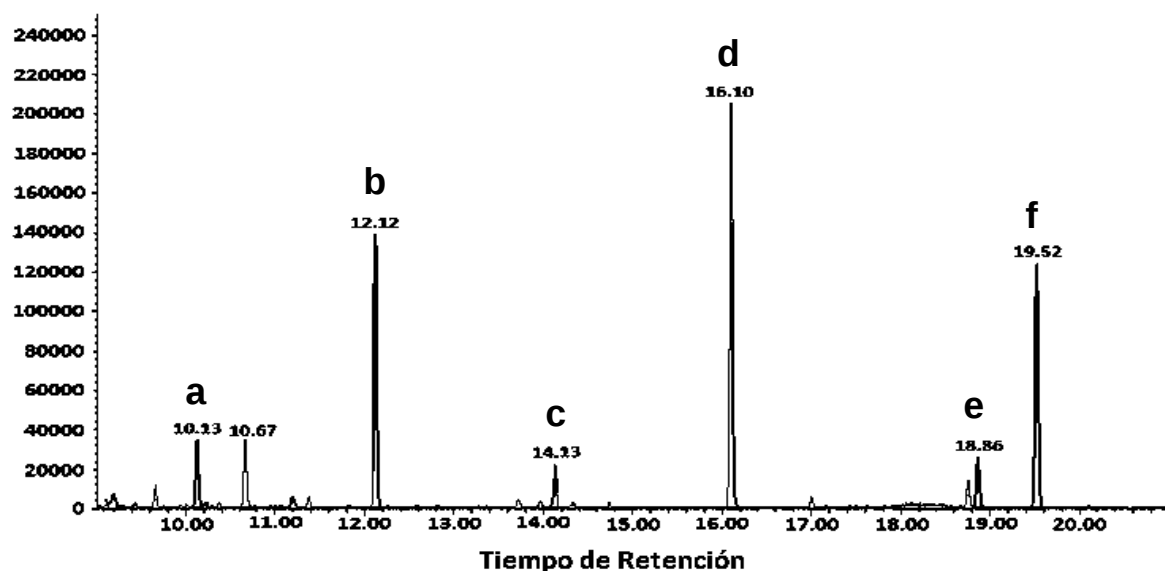


Figura 6. Cromatogramas representativos de extractos hexánicos de plantas de nurite (*S. macrostema*): A) Planta *in vitro*; B) Planta *in situ*; C) Planta en invernadero, donde limoneno (a), linalol (b), mentona (c), pulegona (d), verbenona (e) y tetradecano (f) son los volátiles de interés.

8.2.2. Plantas *in situ*

La determinación de volátiles en plantas de nurite *in situ* (campo) se inició en el mes de agosto de 2011, las plantas se encontraban en la fase de crecimiento vegetativo. En esta colecta se identificaron y cuantificaron los compuestos volátiles presentes en los extractos hexánicos, encontrado que los terpenos limoneno, linalol, mentona, pulegona y verbenona constituyen mayormente el extracto. Las señales para dichos compuestos y la presencia del tetradecano (estándar interno). En la Figura 6B se muestra un cromatograma representativo de estos extractos hexánicos. Cada uno de ellos fue identificado por su respectivo espectro de masas (Anexo I, III, IV, V y VI). La pulegona es el compuesto volátil mayoritario en plantas *in situ* con 101.73 µg/g peso fresco, seguido en contenido por los terpenos linalol, verbenona, mentona y limoneno (Tabla 7). Estos compuestos representan el 70.23% de los compuestos de cada uno de los extractos.

Tabla 7. Composición, tiempo de retención y contenido de los compuestos volátiles del extracto hexánico de parte aérea de plantas *in vitro*, *in situ* y cultivadas en invernadero de *S. macrostema*. Letras diferentes indican diferencia significativa entre tipos de plantas para cada compuesto por separado $\pm$ desviación estándar (n=9, Tukey $p \leq 0.05$).

Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Contenido (µg/g peso fresco)		
		<i>in vitro</i>	<i>in situ</i>	Invernadero
Limoneno	10.19	n/d	16.72 $\pm$ 1.03 a	4.05 $\pm$ 1.03 b
Linalol	12.17	n/d	43.28 $\pm$ 5.54 a	3.70 $\pm$ 1.36 b
Mentona	14.14	n/d	23.76 $\pm$ 2.52 a	5.10 $\pm$ 1.86 b
Pulegona	16.18	1.55 $\pm$ 0.18 c	101.73 $\pm$ 8.11 a	34.05 $\pm$ 4.52 b
Verbenona	18.97	n/d	29.81 $\pm$ 4.09 a	5.40 $\pm$ 2.27 b

n/d: compuesto no detectado en las muestras

8.2.3. Plantas en invernadero

Los extractos hexánicos de las plantas cultivadas en invernadero por 30 días mostraron la presencia de compuestos volátiles similares al obtenido en plantas de nurite *in situ* (limoneno, linalol, mentona, pulegona y verbenona, Tabla 7, en los cuales la pulegona también es el compuesto de mayor cantidad. Sus señales correspondientes para cada uno de los compuestos se muestran en un cromatograma representativo para este tipo de extractos (Figura 6C).

Dichos compuestos coincidieron en tipo e identidad con los encontrados en plantas *in situ*; sin embargo, la cantidad es menor en plantas de invernadero, el contenido de pulegona fue de 34.05 $\mu\text{g/g}$ peso fresco, 2.99 veces menos que lo observado en las plantas de nurite *in situ*. La cantidad de limoneno, mentona y verbenona fue entre 4 a 6 veces menos en promedio, sin embargo en el contenido de linalol se obtuvo una diferencia significativa, con 11.7 veces menos (3.7 $\mu\text{g/g}$ peso fresco) que lo encontrado en planta *in situ* (43.28 $\mu\text{g/g}$ peso fresco), donde este es el segundo compuesto mayoritario (Tabla 7).

8.3. EFECTO SOBRE EL CONTENIDO DE COMPUESTOS VOLÁTILES SEGÚN LAS ETAPAS DE DESARROLLO Y CRECIMIENTO EN PLANTAS DE NURITE

8.3.1. Efecto de la fenología sobre los compuestos volátiles en plantas *in situ* de nurite

Durante el período de 12 meses de colecta de muestras de parte aérea de planta de nurite *in situ* para la obtención de los extractos hexánicos, se caracterizaron las diferentes etapas fenológicas. En la primera colecta, Agosto 2011, las plantas presentaron etapa de desarrollo vegetativo (Figura 7A); la floración estuvo presente en la segunda colecta (Diciembre 2011) (Figura 7B). En la tercera colecta había la formación de frutos y desarrollo de semillas, etapa denominada fructificación, Abril 2012 (Figura 7C). En la última colecta, Agosto 2012, las plantas nuevamente presentaron la etapa de desarrollo vegetativo (Figura 7D).

En este mismo período de experimentación, las plantas de nurite micropropagadas cultivadas en invernadero se mantuvieron en desarrollo vegetativo (estado juvenil) durante los 12 meses de experimentación, observando un crecimiento en cuanto altura y follaje sin presentarse la etapa de floración como se observa en la Fig. 8.



Figura 7. Desarrollo en campo de plantas de nurite (*S. macrostema*) durante 12 meses: A) Planta durante desarrollo vegetativo; B) Planta durante la etapa de floración; C) Planta en etapa de fructificación; D) Planta durante siguiente desarrollo vegetativo.

Los compuestos principales de los extractos hexánicos en plantas de nurite *in situ* fueron: limoneno, linalol, mentona, pulegona y verbenona; los cuales se presentaron cualitativamente de forma constante durante las diferentes etapas fenológicas de las plantas, pero sus cantidades presentaron variaciones según la fecha del muestreo. Al comparar el contenido de éstos volátiles durante las etapas de desarrollo en plantas de nurite en campo, pudo observarse una variación dependiente de la etapa fenológica. Durante el crecimiento vegetativo (Figura 7A), los terpenos se presentaron en los niveles más altos (colecta de agosto de dos ciclos), pero durante la floración (Figura 7B) y fructificación (colecta de diciembre 2011 y abril 2012), éstos disminuyeron (Tabla 8). El compuesto pulegona fue mayoritario, con un contenido promedio de 101.73 $\mu\text{g/g}$ peso fresco, seguido de linalol 43.28 $\mu\text{g/g}$, verbenona 29.81 $\mu\text{g/g}$, mentona 23.76 $\mu\text{g/g}$ y limoneno 16.72 $\mu\text{g/g}$ todos expresados en peso fresco. Con estas determinaciones, se observó que el mayor contenido de compuestos volátiles se presenta durante el desarrollo

vegetativo de las plantas de nurite *in situ*. No encontrando diferencia significativa entre ambas colectas de desarrollo vegetativo 2011 y 2012.

Tabla 8. Composición y contenido de los compuestos volátiles de los extractos hexánicos de parte aérea de plantas *in situ* de *S. macrostema*, durante sus etapas fenológicas. Letras diferentes indican diferencia significativa entre etapas fenológicas para cada compuesto por separado $\pm$ desviación estándar (n=9, Tukey $p \leq 0.05$).

Compuesto	Contenido/Etapa fenológica ($\mu\text{g/g}$ peso fresco)			
	Desarrollo vegetativo (Agosto 2011)	Floración (Diciembre 2011)	Fructificación (Abril 2012)	Desarrollo vegetativo (Agosto 2012)
Limoneno	16.72 $\pm$ 1.03a	13.27 $\pm$ 1.09b	12.70 $\pm$ 0.91b	14.49 $\pm$ 1.38a
Linalol	43.28 $\pm$ 5.54a	13.79 $\pm$ 3.55b	13.94 $\pm$ 2.97b	35.69 $\pm$ 2.61a
Mentona	23.76 $\pm$ 2.52a	15.91 $\pm$ 1.12b	14.59 $\pm$ 1.71b	20.19 $\pm$ 1.16a
Pulegona	101.73 $\pm$ 8.11a	33.16 $\pm$ 4.79b	37.53 $\pm$ 3.91b	84.22 $\pm$ 5.25a
Verbenona	29.81 $\pm$ 4.09a	12.86 $\pm$ 2.51b	14.63 $\pm$ 3.18b	25.02 $\pm$ 2.25a

8.3.2. Efecto del crecimiento sobre los compuestos volátiles en plantas de nurite cultivadas en invernadero

Los compuestos volátiles del extracto hexánico en plantas cultivadas en invernadero, fueron similares a los encontrados en plantas *in situ* (campo). Sin embargo, el contenido de volátiles (limoneno, linalol, mentona, pulegona y verbenona) no fue equiparable, siendo menor en plantas de invernadero. Estas plantas solo presentaron desarrollo vegetativo durante 12 meses de cultivo en invernadero, incrementando altura, número de ramas y hojas como se observa en la Figura 8.

Inicialmente se realizó la primera determinación en plantas de un mes de cultivo en invernadero, Agosto 2011 (Figura 8A), etapa en la cual el contenido de los terpenos fue el más bajo. Sin embargo a partir de los 4 meses (Figura 8B), el contenido aumentó considerablemente para los 5 compuestos cuantificados, encontrando un máximo para pulegona de 71.36 $\mu\text{g/g}$ peso fresco, el cual

disminuyó posteriormente (Tabla 9). El contenido de verbenona, 40.61 $\mu\text{g/g}$ y limoneno 10.64 $\mu\text{g/g}$ peso fresco aumentó durante el crecimiento de las plantas, el correspondiente a linalol 14.15 $\mu\text{g/g}$ y mentona 14.44 $\mu\text{g/g}$ fue similar en cada colecta durante los últimos 8 meses del cultivo (Tabla 9). Estos resultados sugieren que la variación de los compuestos terpénicos fue dependiente de la edad o del desarrollo de las plantas, observando un incremento en cada uno de ellos al comparar el contenido en plantas de 1 y 12 meses de cultivo en invernadero (Tabla 9).

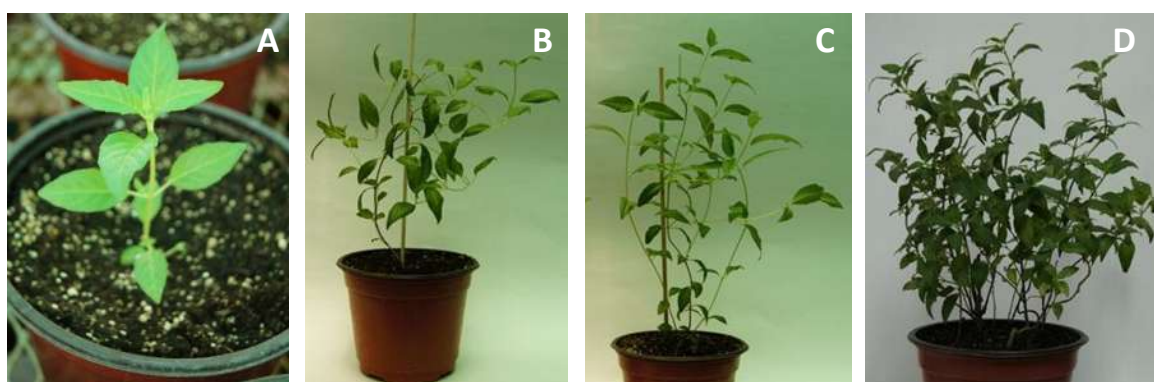


Figura 8. Plantas de nurite (*Satureja macrostema*) durante su desarrollo en invernadero: A) Planta de 30 días de cultivo (etapa 1); B) Planta de 4 meses de cultivo (etapa 2); C) Planta de 8 meses de cultivo (etapa 3); D) Planta 12 meses de cultivo (etapa 4).

Tabla 9. Composición y contenido de los compuestos volátiles de los extractos hexánicos de parte aérea de plantas de *S. macrostema*, durante su desarrollo por 12 meses en invernadero. Letras diferentes indican diferencia significativa entre etapas de desarrollo para cada compuesto por separado $\pm$ desviación estándar ($n=9$, Tukey $p \leq 0.05$).

Compuesto	Contenido/Etapa de desarrollo ($\mu\text{g/g}$ peso fresco)			
	Etapa 1 (Agosto 2011)	Etapa 2 (Diciembre 2011)	Etapa 3 (Abril 2012)	Etapa 4 (Agosto 2012)
Limoneno	4.05 $\pm$ 1.03c	7.83 $\pm$ 0.49b	8.51 $\pm$ 0.63 b	10.64 $\pm$ 0.62a
Linalol	3.70 $\pm$ 1.36c	14.15 $\pm$ 1.21a	13.11 $\pm$ 1.16a	9.88 $\pm$ 1.44b
Mentona	5.10 $\pm$ 1.86c	12.66 $\pm$ 1.39b	12.62 $\pm$ 1.49b	14.44 $\pm$ 1.28a
Pulegona	34.05 $\pm$ 4.52c	71.36 $\pm$ 6.62a	25.94 $\pm$ 3.92d	53.45 $\pm$ 3.40b
Verbenona	5.40 $\pm$ 2.27c	21.28 $\pm$ 2.36b	17.00 $\pm$ 2.18b	40.61 $\pm$ 3.22a

8.4. EFECTO DE LA FERTILIZACIÓN Y LA MICORRIZACIÓN EN PLANTAS DE NURITE CULTIVADAS EN INVERNADERO SOBRE EL CONTENIDO DE COMPUESTOS VOLÁTILES

8.4.1. Efecto de la fertilización química

Durante 90 días de experimentación con la aplicación de diferentes concentraciones del fertilizante comercial Triple (N-P-K) a plantas de nurite cultivadas en invernadero, se determinaron diferentes parámetros de crecimiento, así como el contenido de los compuestos volátiles de las plantas de nurite.

8.4.1.1. Altura

Las plantas de nurite micropropagadas y cultivadas en invernadero, a los 30 días de cultivo presentaron una altura entre 12.08 y 13.66 cm, a este tiempo se inició el experimento, tomado como día 0, aplicando los cuatro tratamientos de fertilización T1, T2, T3 y T4 cada 30 días. A los 30 días de tratamiento, las plantas del tratamiento T1 (sin fertilización) alcanzaron una altura de 16.25 ± 1.53 cm, sin embargo las tratadas con T2 (24.66 ± 1.03 cm), T3 (26.5 ± 1.51 cm) y T4 (28 ± 1.41), mostraron una altura superior que las plantas no tratadas (Figura 9A). No hubo diferencia significativa entre estos tres tratamientos pero si contra el tratamiento control (T1).

A los 60 del cultivo se presentó de igual manera, una mayor altura en plantas tratadas con fertilizante respecto a plantas no tratadas; las plantas tratadas con 17-17-17 (T3) y 20-20-20 (T4) mostraron una mayor altura, 36 ± 1.26 cm y 39.25 ± 2.29 cm respectivamente, sin diferencia significativa entre ellos pero sí con la altura observada en plantas del tratamiento T2 (31.66 ± 1.21 cm) y plantas no tratadas T1 (22.58 ± 1.56 cm) (Figura 9A).

Esta misma tendencia del efecto de la fertilización sobre la altura de las plantas de nurite cultivadas en invernadero, fue observada a los 90 días, no encontrando diferencia entre los tratamientos T3 y T4, que alcanzaron la mayor altura $46.83 \pm$

1.81 cm y 50.33 ± 2.33 cm, respectivamente, pero éstos si mostraron diferencia significativa al compararse con T2 (40.83 ± 2.56 cm) y T1 (27.5 ± 1.87 cm) (Figura 9A).

Las plantas de nurite no tratadas (T1) solo presentaron un crecimiento de 2.28 veces más (127%), determinado por la altura a los 90 días del cultivo; sin embargo las plantas de los tratamientos T3 y T4, aumentaron su altura por 3.53 (253.4%) y 4.14 (313.9%) más, respectivamente, que representa más del 125% respecto al de las plantas no tratadas.

8.4.1.2. Número de hojas

Las plantas de nurite a los 0 días del experimento, presentaron un promedio de 12.83 ± 2.78 hojas/planta. Dicho número se incrementó a los 30 días, encontrando en plantas fertilizadas hasta 57.66 ± 2.86 hojas (T4), 3.46 veces más que las plantas no fertilizadas (T1). En el día 60 de cultivo, el tratamiento T4 presentó el mayor número de hojas (124.33), mostrando diferencia significativa comparada con los demás tratamientos. Esta tendencia se mantuvo hacia el día 90, donde el mayor número de hojas (227.16) se dio con el tratamiento T4, hasta 7.4 veces más que las plantas control no tratadas (Figura 9B).

8.4.1.3. Área foliar

Para el caso del área foliar; las plantas de nurite, al inicio del experimento presentaron 3.15 cm^2 como promedio. A partir del día 30; las plantas fertilizadas T2, T3 y T4, mostraron incremento en su área foliar al compararse con las no fertilizadas (T1), encontrando un máximo de 4.97 cm^2 (T4). Para los días 60 y 90, el tratamiento T4, mostró diferencia significativa al compararse con los demás tratamientos (T1, T2 y T3), encontrando hasta 7.58 y 9.52 cm^2 de área foliar, respectivamente. El área de las hojas se incrementó 2.07 veces en plantas tratadas con 20% de N-P-K comparado con las no tratadas (4.58 cm^2) (Fig. 9C).

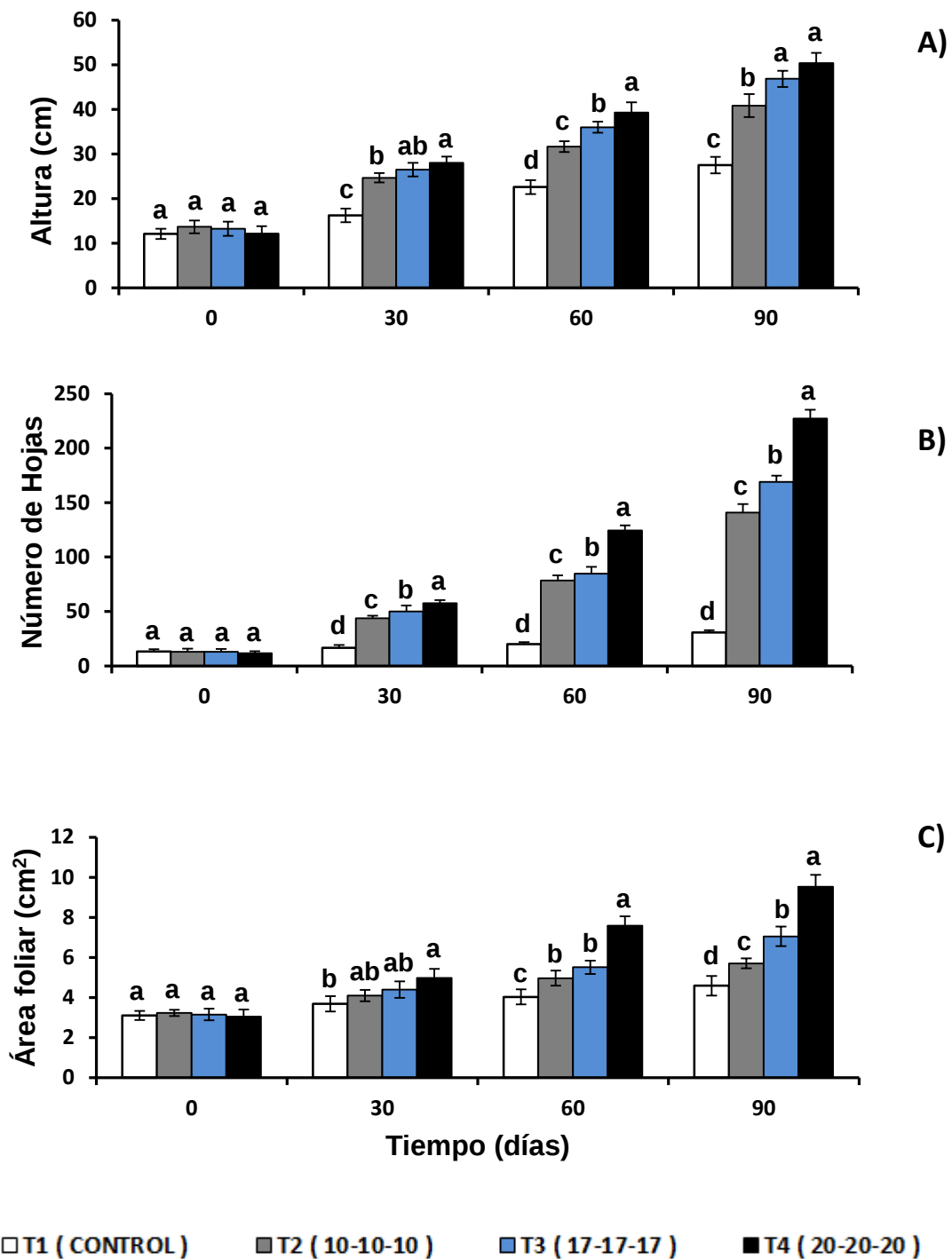


Figura 9. Parámetros de crecimiento en plantas de nurite (*S. macrostema*) cultivadas en invernadero durante 90 días: A) altura, B) número de hojas y C) área foliar; tratadas con cuatro niveles de fertilización: T1 (no tratadas), T2 (10-10-10), T3 (17-17-17) y T4 (20-20-20). Letras diferentes indican diferencia significativa en cada bloque de tiempo $\pm$ desviación estándar ($n=6$, Tukey $p \leq 0.05$).

8.4.1.4. Efecto de la fertilización sobre la biomasa en peso fresco y seco

A los 90 días, tras finalizar el experimento con los cuatro niveles de fertilización (T1, T2, T3 Y T4), se determinó la biomasa en peso fresco y seco, que incluyó la parte aérea y radical de las plantas de nurite. Las plantas no fertilizadas (T1), presentaron una biomasa promedio en peso fresco de 4.23 ± 1.05 g; sin embargo, las tratadas con T2 (12.16 ± 0.92 g), T3 (16.78 ± 1.31 g) y T4 (24.94 ± 1.51 g), mostraron un peso fresco superior que las plantas no tratadas (Figura 10). Siendo las plantas tratadas con 20-20-20, las que mostraron diferencia significativa comparado con los tratamientos T1, T2 Y T3.

En cuestión de biomasa peso seco, se observó la misma tendencia, encontrando diferencia significativa de T4 (4.72 ± 1.2 g) contra los tratamientos T1 (0.67 ± 0.4 g), T2 (2.43 ± 0.7 g) y T3 (2.99 ± 0.97 g). Esto representa un aumento de 7.01 veces más en peso seco de las plantas tratadas con 20-20-20 respecto al de las plantas no tratadas (Figura 10).

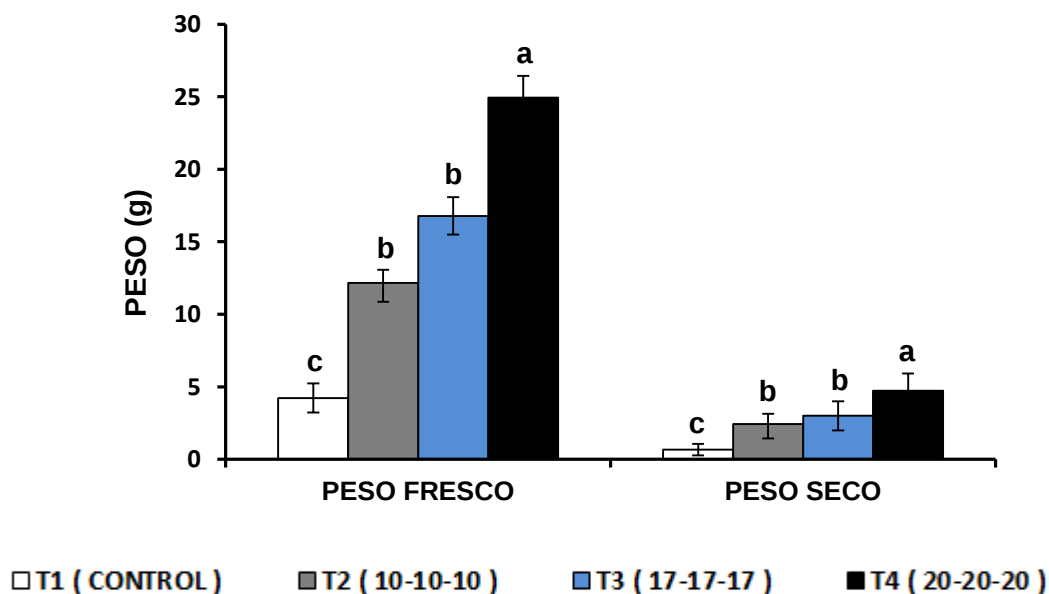


Figura 10. Biomasa: peso fresco y seco, en plantas de nurite (*S. macrostema*) a 90 días de cultivo en invernadero; tratadas con cuatro niveles de fertilización: T1 (no tratadas), T2 (10-10-10), T3 (17-17-17) y T4 (20-20-20). Letras diferentes indican diferencia significativa en cada bloque de peso $\pm$ desviación estándar ($n=6$, Tukey $p \leq 0.05$).

8.4.1.5. Efecto de la fertilización sobre el contenido de compuestos volátiles

En la determinación de volátiles en plantas de nurite cultivadas en invernadero y fertilizadas con los tratamientos T1, T2, T3 y T4, se identificaron y cuantificaron los volátiles presentes en los extractos hexánicos, encontrando que los terpenos limoneno, linalol, mentona, pulegona y verbenona constituyen mayormente el extracto. La presencia de estos volátiles se mantuvo durante los 90 días de experimentación, pero su contenido tuvo variación según el tratamiento aplicado.

Al tiempo 0 de iniciado el experimento, las plantas de nurite presentaron un contenido promedio de limoneno entre 1.97 y 2.08 $\mu\text{g/g}$ peso fresco. El contenido de limoneno en plantas no tratadas con fertilizante (T1) se mantuvo por debajo de los 2.05 $\mu\text{g/g}$ hasta llegar a un mínimo de 0.73 $\mu\text{g/g}$ a los 90 días del experimento (Figura 11A). Esta tendencia fue observada en las plantas que fueron tratadas con T2 y T3, su contenido disminuyó a partir del día 30, hasta llegar a un mínimo a el día 90 de 0.85 y 0.82 $\mu\text{g/g}$, respectivamente.

Las plantas tratadas con 20-20-20 (T4) alcanzaron un máximo contenido de limoneno de 2.17 ± 0.14 $\mu\text{g/g}$ a los 30 días de cultivo, con un tendencia a disminuir hacia los días 60 y 90 (Figura 11A). Aunque el contenido de limoneno disminuyó conforme avanzó el tiempo de experimentación, el tratamiento T4 mostró significancia ante los demás tratamientos (Figura 11A).

El contenido inicial de limoneno en las plantas de nurite osciló entre 3.70 y 4.04 $\mu\text{g/g}$ peso fresco. Las plantas no tratadas (T1) mantuvieron un contenido homogéneo durante todo el experimento, llegando a un máximo de 4.34 $\mu\text{g/g}$ a los 60 días (Fig. 11B).

El contenido de linalol en plantas tratadas con T2 (10-10-10) se incrementó con el tiempo de cultivo, encontrando a los 90 días el mayor contenido (4.89 $\mu\text{g/g}$) (Figura 11B). Este fenómeno se observó en las plantas que se trataron con T3 y

T4, alcanzando un máximo contenido de linalol a los 90 días de 6.55 y 10.79 $\mu\text{g/g}$, respectivamente (Fig. 11B).

Finalizado el experimento, se encontró que las plantas tratadas con 20-20-20, mostraron significancia respecto a los demás tratamientos; ya que, el contenido de linalol se incrementó 3.2 veces más que en plantas no tratadas (Figura 11B).

Inicialmente el contenido de mentona en plantas de nurite fluctuó entre 1.11 y 1.23 $\mu\text{g/g}$ peso fresco. Las plantas no fertilizadas (T1) presentaron una ligera disminución en el contenido de este volátil (Figura 11C), ya que a los 90 días se cuantificó el mínimo de 0.48 $\mu\text{g/g}$, incluso por debajo de los niveles iniciales.

En comparación con el control (0.86 $\mu\text{g/g}$), los tratamientos T2 y T3 incrementaron el contenido de mentona, alcanzando a los 30 días la cantidad máxima de 1.16 y 1.18 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Posteriormente los niveles de mentona disminuyeron hacia los 90 días (Figura 11C).

El tratamiento T4 ejerció el mayor efecto sobre el contenido de mentona, se encontró un contenido máximo de 3.06 $\mu\text{g/g}$ peso fresco. Dicho tratamiento mostró significancia al compararse con los demás tratamientos, aumentando hasta 5.5 veces más el contenido de mentona a los 60 días (Fig. 11C).

Los niveles iniciales de pulegona en plantas de nurite cultivadas en invernadero, presentaron un promedio entre 33.83 y 35.91 $\mu\text{g/g}$ peso fresco. La cantidad de pulegona en plantas no tratadas (T1), incrementó ligeramente a los 30 días (35.66 $\mu\text{g/g}$) y posteriormente disminuyó hacia los 60 (31.57 $\mu\text{g/g}$) y 90 (29.64 $\mu\text{g/g}$) días, llegando a cantidades menores que las basales. Esta misma tendencia fue observada para las plantas tratadas con T2, donde el máximo contenido se obtuvo a los 30 días (35.97 $\mu\text{g/g}$) y el mínimo a los 90 días (31.95 $\mu\text{g/g}$).

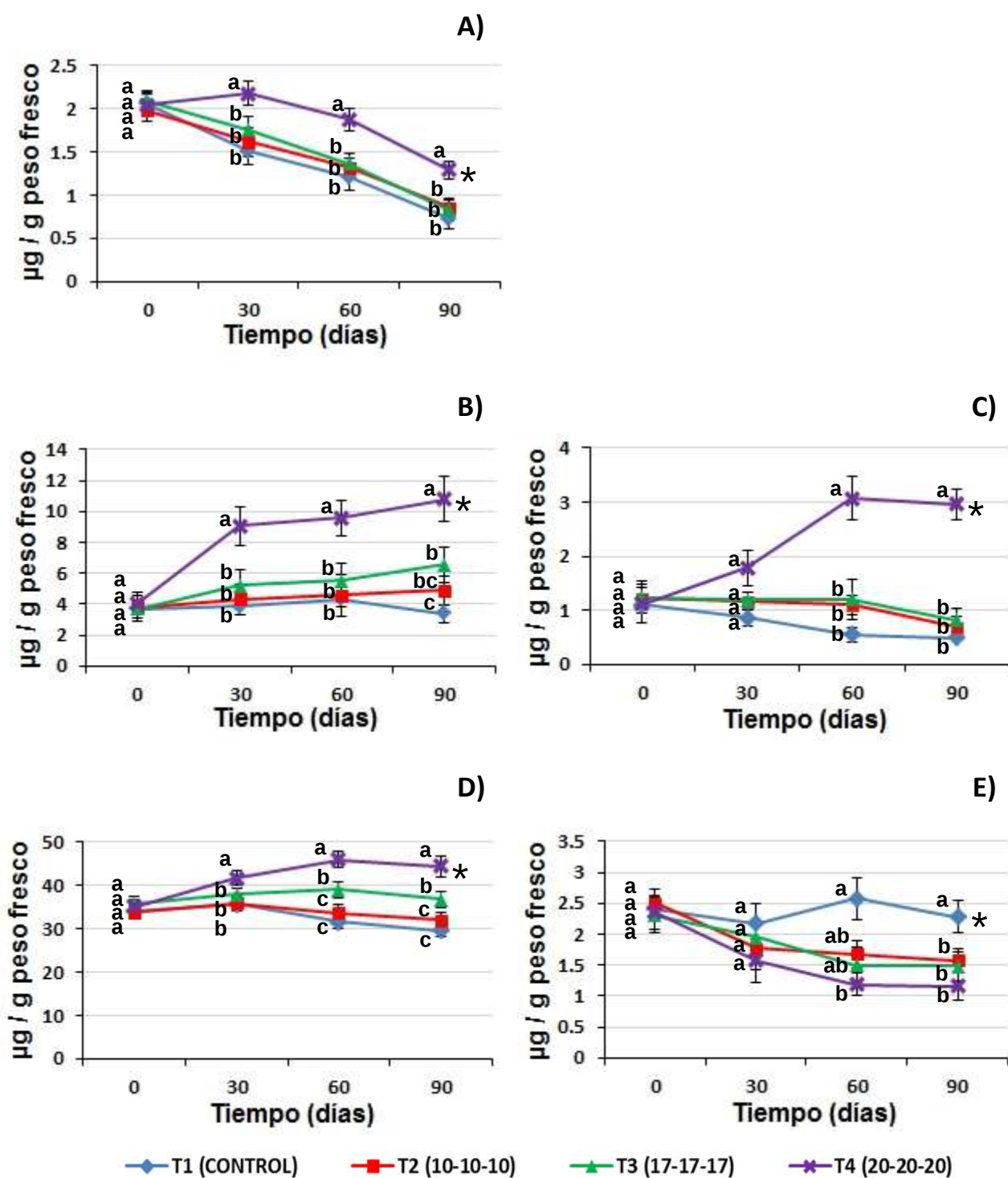


Figura 11. Contenido de volátiles: A) limoneno; B) linalol; C) mentona; D) pulegona; E) verbenona, determinado en plantas de nurite (*S. macrostema*) cultivadas en invernadero durante 90 días, tratadas con cuatro niveles de fertilización (N-P-K). Letras diferentes indican diferencia significativa en cada tiempo de muestreo para cada compuesto $\pm$ desviación estándar. *Diferencia significativa entre tratamientos (n=9, Tukey $p \leq 0.05$).

El contenido de pulegona en plantas tratadas con T3 y T4 se incrementó a partir de los 30 días (37.89 y 41.70 $\mu\text{g/g}$, respectivamente), hasta llegar a un máximo de 38.97 $\mu\text{g/g}$ (T3) y 45.95 $\mu\text{g/g}$ (T4), a los 60 días. Al día 90 se observó una disminución en el contenido en ambos tratamientos. Sin embargo, se determinó que el tratamiento 20-20-20, presentó diferencia significativa versus los demás tratamientos, ya que se aumentó hasta 1.49 veces más que las plantas no fertilizadas (Figura 11D).

El contenido inicial de verbenona en plantas de nurite a los 0 días de iniciado el experimento, fue entre los 2.30 y 2.49 $\mu\text{g/g}$ peso fresco. En plantas no fertilizadas (T1), los niveles se presentaron con los siguientes valores: 2.16 $\mu\text{g/g}$ (30 días), 2.58 $\mu\text{g/g}$ (60 días) y 2.28 $\mu\text{g/g}$ (90 días).

Para las plantas que fueron tratadas con T2, T3 y T4, se observó una drástica disminución en el contenido de verbenona a partir de los 30 días (1.77 $\mu\text{g/g}$, 1.95 $\mu\text{g/g}$ y 1.57 $\mu\text{g/g}$, respectivamente). Esta disminución se mantuvo hasta los 90 días, llegando a valores mínimos de 1.57 $\mu\text{g/g}$ (T2), 1.48 $\mu\text{g/g}$ (T3) y 1.16 $\mu\text{g/g}$ (T4) de pulegona. A pesar de la disminución en el contenido de pulegona, los tratamientos T2, T3 y T4 no presentaron diferencia significativa entre ellos, pero si con los niveles de las plantas no tratadas (Figura 11E).

8.4.2. Efecto de la micorrización

El experimento se llevó a cabo durante 90 días, con la aplicación del hongo micorrízico arbuscular *Glomus intraradices*, a plantas de nurite micropropagadas y cultivadas en invernadero, a las cuales se determinó diferentes parámetros de crecimiento, así como el contenido de los compuestos volátiles.

8.4.2.1. Porcentaje de colonización

Después de 30 días de la inoculación con *Glomus intraradices*, las plantas de nurite presentaron un 20% de colonización micorrízica. Al día 60 de la inoculación fue de 40% y al final de experimento (90 días), las plantas presentaron un 80% de colonización fúngica.

8.4.2.2. Altura

Las plantas de nurite cultivadas en invernadero presentaron una altura inicial promedio de 13.9 ± 0.3 cm.; a los 30 días de iniciado el tratamiento, las plantas no micorrizadas (- micorriza) alcanzaron una altura de 19.7 ± 2.16 cm y las que fueron micorrizadas con *Glomus intraradices* (+ micorriza) mostraron un ligero aumento en la altura (22.6 ± 2.11 cm) comparado con las plantas no tratadas (Figura 12A). No hubo diferencia significativa entre estos dos tratamientos.

En cambio, al día 60 del cultivo se presentó una mayor altura en plantas tratadas con fertilizante orgánico (47.56 ± 4.97 cm) respecto a plantas no tratadas (28.6 ± 2.11 cm); mostrando diferencia significativa entre ambos tratamientos (Figura 12A). Esta misma tendencia del efecto de la fertilización orgánica sobre la altura de las plantas de nurite, se observó a los 90 días, encontrando diferencia entre los tratamientos – micorriza y + micorriza, que alcanzaron la altura de 39.21 ± 2.88 cm y 59.5 ± 5.11 cm, respectivamente (Figura 12A).

8.4.2.3. Longitud de raíz

Al inicio del experimento, las plantas de nurite presentaron una longitud de la raíz entre 5.52 ± 0.33 y 5.77 ± 0.44 . A partir del día 30, 60 y 90 del experimento, la mayor longitud de raíz se encontró en las plantas micorrizadas (13.9 ± 1.77 , 21.7 ± 2.22 y 33.5 ± 3.11 cm, respectivamente) respecto a las plantas no micorrizadas (7.11 ± 0.66 , 16.9 ± 1.13 y 24.87 ± 1.88 cm, respectivamente), donde las plantas

micorrizadas presentaron diferencia significativa a partir del día 30 y hasta el final del experimento (Figura 12B).

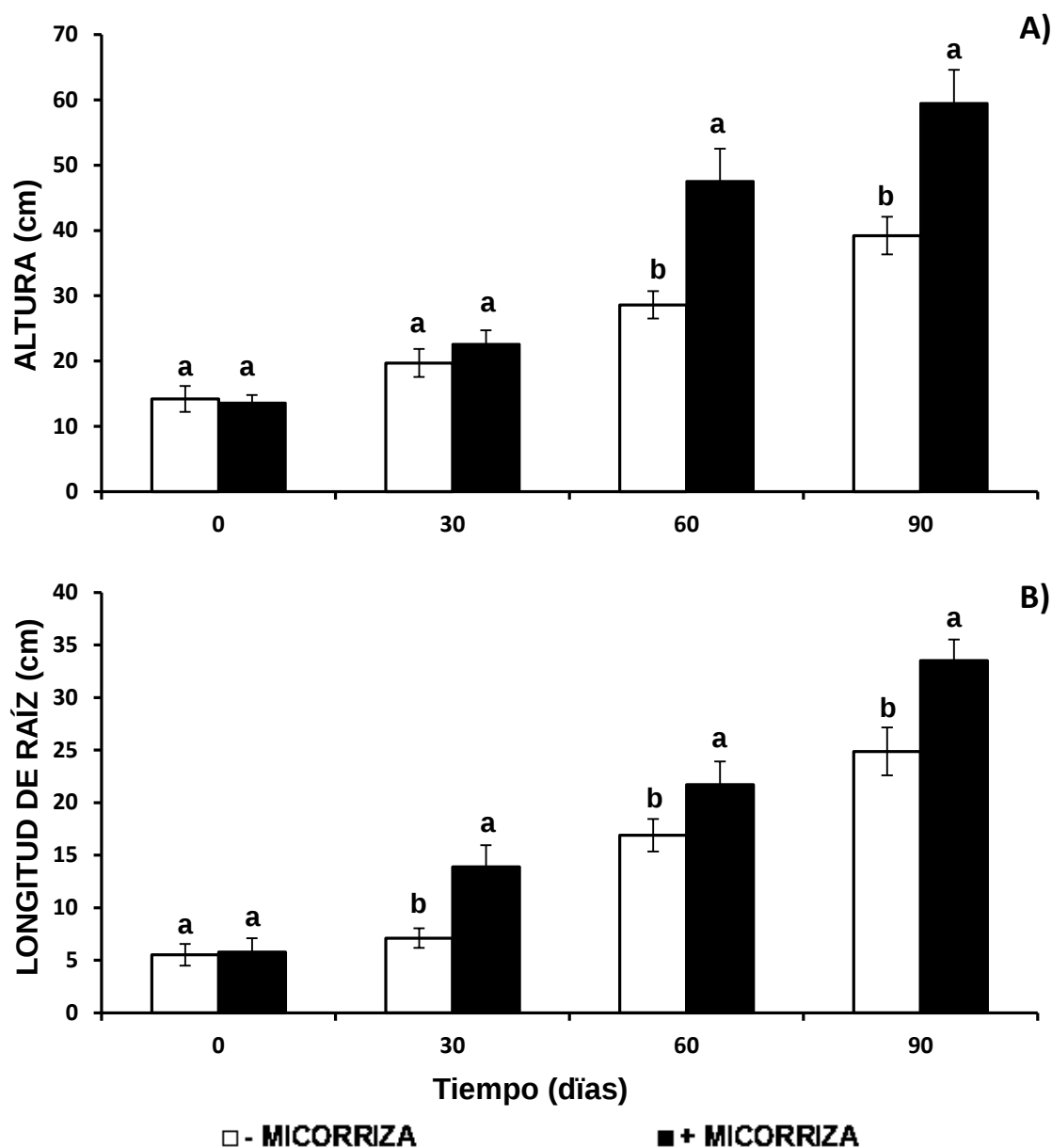


Figura 12. Parámetros de crecimiento en plantas de *S. macrostema*, cultivadas en invernadero: A) altura y B) longitud de raíz; tratadas con *G. intraradices*: no micorrizadas (- micorriza) y micorrizadas (+ micorriza), durante 90 días. Letras diferentes indican diferencia significativa en cada bloque de tiempo $\pm$ desviación estándar ($n=6$, Tukey $p \leq 0.05$).

8.4.2.4. Biomasa (peso fresco y seco)

Finalizado el experimento, las plantas no fertilizadas (- micorriza), presentaron una biomasa promedio en peso fresco y peso seco de 5.71 ± 0.57 y 0.99 ± 0.27 g, respectivamente; sin embargo, las que fueron fertilizadas (+ micorriza) mostraron un peso fresco y seco superior que las plantas no tratadas (18.1 ± 1.01 y 2.99 ± 0.37 g, respectivamente); siendo estas últimas, las que mostraron diferencia significativa respecto a las no micorrizadas (Figura 13).

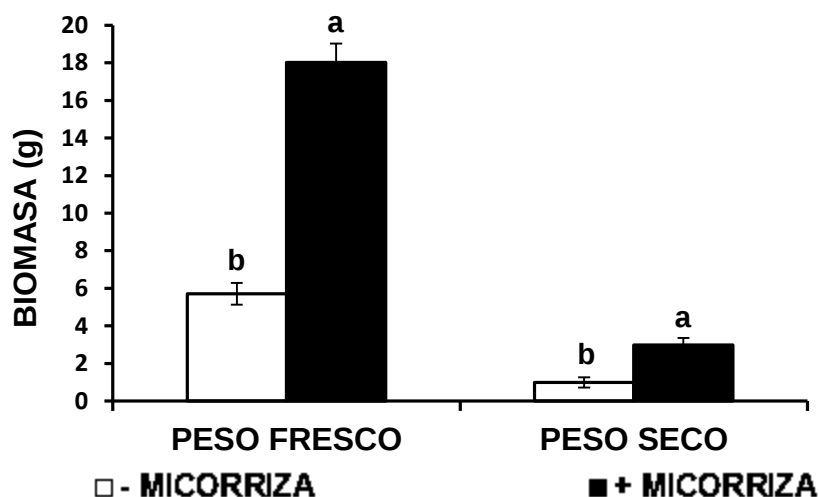


Figura 13. Biomasa: peso fresco y seco, en plantas de nurite (*S. macrostema*) a 90 días de cultivo en invernadero; tratadas con *Glomus intraradices*: no micorrizadas (- micorriza) y micorrizadas (+ micorriza). Letras diferentes indican diferencia significativa en cada bloque de peso $\pm$ desviación estándar (n=6, Tukey $p \leq 0.05$).

8.4.2.5. Efecto de la micorriza sobre el contenido de compuestos volátiles

Durante los 90 días de experimentación se identificaron y cuantificaron los compuestos volátiles presentes en los extractos hexánicos, encontrando que los terpenos limoneno, linalol, mentona, pulegona y verbenona constituyen mayormente el extracto, los cuales estuvieron presentes durante todo el experimento, sin embargo, su contenido tuvo variación según el tratamiento aplicado y tiempo de muestreo.

Las plantas de nurite cultivadas en invernadero presentaron un contenido promedio inicial de limoneno entre 1.73 ± 0.09 y 1.77 ± 0.19 $\mu\text{g/g}$ peso fresco. El contenido de limoneno en plantas no micorrizadas a los 30, 60 y 90 días se mantuvo constante mostrando pequeñas variaciones en las cantidades de limoneno; siendo de 2.19 ± 0.19 , 1.78 ± 0.11 y 1.87 ± 0.18 $\mu\text{g/g}$, respectivamente (Fig. 14A).

Las plantas inoculadas con *Glomus intraradices* mostraron un incremento en el contenido de limoneno presentando 2.23 ± 0.12 , 3.17 ± 0.22 y 3.39 ± 0.23 $\mu\text{g/g}$, a los 30, 60 y 90 días, respectivamente. Dichas plantas mostraron diferencia significativa en contenido de limoneno, respecto a las no micorrizadas (Figura 14A).

El contenido inicial de linalol en las plantas de nurite osciló entre 4.19 ± 0.33 y 4.47 ± 0.34 $\mu\text{g/g}$ peso fresco. Las plantas no tratadas (- micorriza) incrementaron su contenido de linalol al día 30 (6.73 ± 0.55 $\mu\text{g/g}$) y 60 (8.11 ± 0.77 $\mu\text{g/g}$); posteriormente mostró disminución hacia el día 90 (6.47 ± 0.71 $\mu\text{g/g}$) (Figura 14B).

El contenido de linalol en plantas tratadas (+ micorriza), fue superior respecto a las plantas no tratadas, presentando 8.97 ± 0.78 $\mu\text{g/g}$ (día 30), 10.87 ± 0.99 $\mu\text{g/g}$ (día 60) y 12.67 ± 1.31 $\mu\text{g/g}$ (día 90). El contenido se incremento hasta 1.95 veces, donde las plantas micorrizadas fueron las que mostraron significancia (Fig. 14B).

Al inicio del experimento (día 0), el contenido de mentona en plantas de nurite osciló entre 0.67 ± 0.06 y 0.79 ± 0.08 $\mu\text{g/g}$ peso fresco. Durante el experimento, el contenido de mentona se incremento dependiendo del tiempo. El mayor contenido se presento a los 90 días, tanto para plantas no micorrizadas (1.45 ± 0.15 $\mu\text{g/g}$) como las micorrizadas (2.17 ± 0.19 $\mu\text{g/g}$). Sin embargo, las plantas que fueron tratadas presentaron significancia respecto a las no tratadas, el contenido se aumento hasta 1.45 veces (Figura 14C).

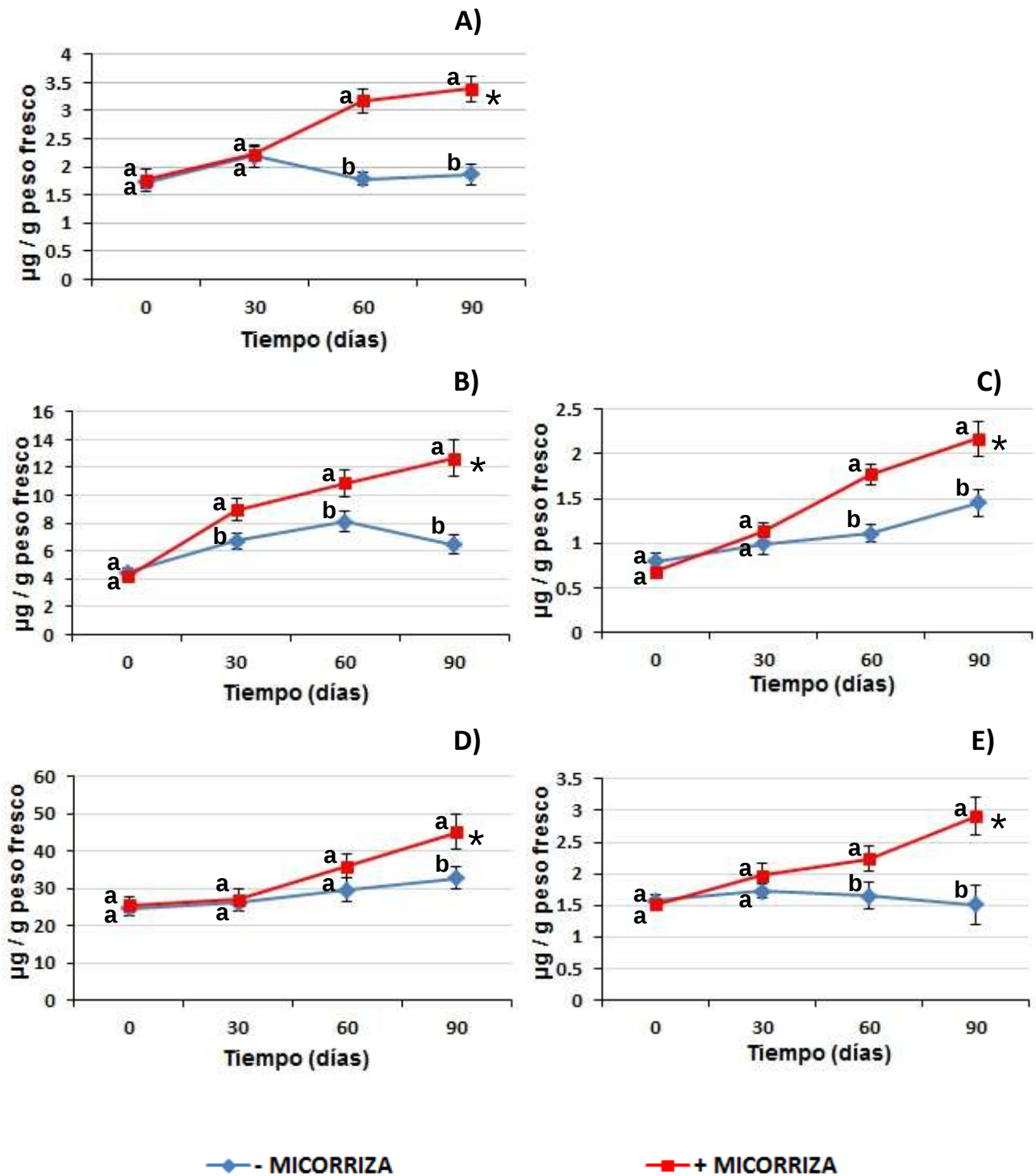


Figura 14. Contenido de volátiles: A) limoneno; B) linalol; C) mentona; D) pulegona; E) verbenona, determinado en plantas de nurite (*S. macrostema*) cultivadas en invernadero durante 90 días, tratadas con *G. intraradices*: no micorrizadas (- micorriza) y micorrizadas (+ micorriza). Letras diferentes indican diferencia significativa en cada tiempo de muestreo para cada compuesto $\pm$ desviación estándar. * Diferencia significativa entre tratamientos (n=9, Tukey $p \leq 0.05$).

La pulegona fue el compuesto volátil mayoritario en los extractos hexánicos de plantas de nurite tratadas con fertilizante biológico (hongo formador de micorrizas: *G. intraradices*). El contenido inicial de pulegona encontrado osciló entre 24.70 ± 2.09 y 25.57 ± 2.11 $\mu\text{g/g}$ peso fresco. Su contenido aumento conforme pasó el tiempo, incrementó a partir del día 30 y hasta el final del experimento.

En el día 30 de experimentación el contenido de pulegona fue de 26.10 ± 2.11 y 27.11 ± 2.99 $\mu\text{g/g}$ (- micorriza y + micorriza, respectivamente) y para el día 60 fue de 29.66 ± 3.22 y 35.99 ± 3.11 $\mu\text{g/g}$ (- micorriza y + micorriza, respectivamente). La mayor cantidad se presento a los 90 días, en plantas micorrizadas fue de 45.11 ± 4.75 $\mu\text{g/g}$ y en no micorrizadas de 32.87 ± 3.17 $\mu\text{g/g}$. El contenido se incremento hasta 1.37 veces que representa el 37.23% más respecto a las plantas no tratadas (- micorriza), el tratamiento + micorriza fue el que mostro diferencia significativa (Fig. 14D).

El contenido inicial de verbenona en plantas de nurite a los 0 días de iniciado el experimento, estuvo entre los 1.51 ± 0.10 y 1.57 ± 0.09 $\mu\text{g/g}$ peso fresco. En plantas no fertilizadas (- micorriza), el contenido de verbenona presentó los siguientes valores: 1.72 ± 0.11 $\mu\text{g/g}$ (30 días), 1.65 ± 0.21 $\mu\text{g/g}$ (60 días) y 1.51 ± 0.31 $\mu\text{g/g}$ (90 días). En las plantas que fueron tratadas (+ micorriza), se observo un aumento en el contenido de verbenona a los 30 días (1.97 ± 0.20 $\mu\text{g/g}$). Este aumento se mantuvo hasta los 90 días, llegando a un valor máximo de 2.91 ± 0.29 $\mu\text{g/g}$ de verbenona. El tratamiento + micorriza mostró diferencia significativa al compararse con los niveles de las plantas no tratadas (Figura 14E).

9. DISCUSIÓN

9.1. MICROPROPAGACIÓN DE NURITE

9.1.1. Germinación

En general, puede describirse que la germinación *in vitro* de nurite se optimizó en tiempo y porcentaje, respecto a lo reportado en 2011 por Villa-Patricio (Germinación: 38%, 60 días); ya que en 30 días de cultivo *in vitro*, se obtuvo un 45.91% de germinación de las semillas de nurite. Esto se debió al uso del regulador de crecimiento vegetal benciladenina (BA), el cuál fue adicionado en una concentración de 0.05 mg/L al medio de cultivo MS para la germinación de las semillas. Reportes indican altos niveles de citocininas en semillas en germinación (Kakimoto, 2003), ya que éstas promueven la salida de la dormancia de diversas semillas, la aplicación de citocininas como BA induce la germinación de semillas de diversas plantas (Jordán y Casaretto, 2006). Este efecto ha sido observado en *Bursera copallifera*, donde la aplicación de BA aumentó en un 52% (3.46 veces) la germinación en comparación con aquellas no tratadas (15%), produciéndose una germinación más temprana y sincronizada (Bonfil-Sanders *et al.*, 2008).

El proceso de germinación en nurite *in vitro*, concluyó a los 60 días de cultivo con un 77.55%, este porcentaje es relativamente alto si se compara con la germinación reportada bajo cultivo en campo o en invernadero, el cual oscila entre un 30 y 40% (Aguilar-Ramírez, 2002). A los 60 días fue posible obtener plántulas sin gran diferencia de edad entre ellas, esta homogeneidad es importante para desarrollar experimentos *in vitro*, sobre todo para determinar el efecto de reguladores de crecimiento sobre la regeneración y multiplicación *in vitro* (Dodds y Roberts, 1995).

9.1.2. Multiplicación y desarrollo de brotes

El número de brotes obtenidos (23 brotes/explante) a los 45 días del cultivo, de manera directa mediante la siembra de yemas axilares basales con 2.5 mg/L de BA, fue equiparable a lo reportado por Villa-Patricio (2011) (21 brotes/explante a los 42 días). La respuesta morfogénica favorable de los explantes cultivados es ocasionada por la acción de BA, este regulador de crecimiento promueve la división celular y la multiplicación adventicia de brotes (Howell *et al.*, 2003). Generalmente, todas las células de un organismo se consideran de un mismo genotipo, sin embargo, existen diferencias de célula a célula y de órgano a órgano de una misma planta, con relación a su capacidad para regenerar en cultivo; aunque todos los tejidos tienen la capacidad de formar brotes *in vitro*, no todos los producen en el mismo número (Berthouly y Michaux-Ferriere, 1996).

El tipo de explante y la posición de los nudos también influyen en la regeneración y producción de brotes, en varios trabajos se ha demostrado que el número de brotes se relaciona con la posición de los nudos o yemas y que esta capacidad regenerativa se debe a la acción de los reguladores de crecimiento, tanto auxinas como citocininas endógenas (presentes en los tejidos) (Santana, 1993; De Winnar, 1997).

La formación *in vitro* de brotes en varias plantas medicinales se produce generalmente con la adición de concentraciones de BA iguales o mayores a 2 mg/L: En *Phyllanthus niruri* (Euphorbiaceae), la máxima proliferación de brotes se obtuvo con 3 mg/L de BA, produciendo 12 brotes/yema (Jiménez *et al.*, 2007). En *Larrea divaricta* se reportan hasta 5.41 brotes en yemas basales, al cultivarse con 2 mg/L de BA con 0.05 mg/L de ácido naftalenacético (ANA) (Palacio *et al.*, 2007); Arrebola *et al.* (1997), reportaron la regeneración máxima de brotes (11 brotes/explante) en *Satureja obovata*, al cultivar yemas nodales en 2 mg/L de BA. Estos resultados coincide con lo obtenido para *S. macrostema*, siendo con las

yemas de nudo basal, con las que se obtiene el mayor número de brotes (Villa-patricio, 2011).

9.1.3. Enraizado y desarrollo de plántulas

El enraizado de brotes *in vitro* generalmente ocurre al adicionar concentraciones de bajas a moderadas de auxina (0.01 – 1.0 mg/L), particularmente se utiliza ácido indolbutírico (AIB), salvo pocas excepciones donde deben de adicionarse hasta 10 mg/L (Villalobos, 1994). Fue el caso para *S. macrostema*, donde se adicionó AIB (0.1 mg/L) al medio MS, con lo cual se optimizó el enraizado (12.1 raíces/explante, 15 días), superando en tiempo y número lo reportado por Villa-Patricio (2011); cuyo surgimiento de raíces al no agregar fitohormonas, se dio a los 28 días con 6 de ellas por explante.

Los resultados de enraizamiento *in vitro* para brotes de nurite concuerdan con lo reportado para otras especies de *Satureja*, ya que en *S. obovata* fue necesario adicionar 1.25 mg/L de AIB (Arrebola *et al.*, 1997) y 0.5 mg/L en *S. khuzistanica* (Ramak *et al.*, 2011).

9.1.4. Trasplante y aclimatación

Tras el trasplante y aclimatación de las plantas micropropagadas de nurite, se obtuvo plantas de 8.3 cm de altura, las cuales alcanzaron un máximo de 13.6 cm. Estos resultados son equiparables a lo reportado por Villa-Patricio (2011), donde el uso de cámara de crecimiento no fue necesario para lograr la sobrevivencia de *S. macrostema*, obteniendo una aclimatación rápida y con alto porcentaje de sobrevivencia de las plantas (95% a los 30 días de cultivo en maceta). Por lo cual, se recomienda para *S. macrostema* el uso de turba:agrolita (1:1) como un sustrato apto para su trasplante y aclimatación; al igual que, un riego constante cada 3 días para mantener la humedad requerida por las plantas.

9.2. COMPUESTOS VOLÁTILES EN PLANTAS DE NURITE

9.2.1. Plantas *in vitro*

En este estudio el compuesto pulegona fue determinado como el único volátil presente en plántulas de nurite cultivadas *in vitro* (90 días) en medio MS suplementado con 0.05 mg/L BA, donde presentan un óptimo crecimiento y desarrollo. El contenido promedio de pulegona fue de 1.55 µg/g peso fresco. Estos datos indican que la pulegona es el compuesto mayoritario de las muestras de plántulas *in vitro*. Estos datos concuerdan con lo reportado para otras especies de *Satureja* como *S. parvifolia* y *S. odora*, siendo pulegona el volátil mayoritario en muestras de dichas plantas (Juárez *et al.*, 2000; Molina *et al.*, 2002 y Viturro *et al.*, 2000).

Las concentraciones de pulegona son bajas al compararse con el encontrado en plantas *in situ* (101.73 µg/g peso fresco). Resultados similares han sido descritos, tal es el caso del estudio realizado en *Lantana camara*, donde el contenido de los compuestos volátiles mayoritarios (α -pineno y β -pineno) disminuyeron en plántulas cultivadas *in vitro* bajo la influencia de reguladores de crecimiento que en plantas madre (Ribeiro-Affonso *et al.*, 2007).

9.2.2. Compuestos volátiles en las etapas de desarrollo y fenología de plantas de nurite *in situ* y cultivadas en invernadero

En colectas realizadas en plantas de nurite, tanto de campo (*in situ*) como cultivadas en invernadero, se identificaron y cuantificaron los compuestos volátiles presentes en los extractos hexánicos. Se encontró que los terpenos limoneno, linalol, mentona, pulegona y verbenona fueron los metabolitos mayoritarios. Estos componentes del extracto fueron similares tanto en plantas de campo como de invernadero.

Al comparar el contenido de éstos durante las etapas de desarrollo en plantas de nurite en campo, pudo observarse una variación dependiente de la etapa fenológica. Durante el crecimiento vegetativo, que ocurre durante los meses de julio a septiembre, los terpenos se presentaron en los niveles más altos, colecta de agosto de dos ciclos, durante la floración y fructificación, colecta de noviembre y abril 2012, éstos disminuyeron. El compuesto pulegona fue en todos los casos el mayoritario.

En plantas micropropagadas de nurite y cultivadas en invernadero, la variación de los compuestos terpénicos fue dependiente de la edad o del desarrollo de las plantas. Inicialmente se realizó la primera determinación en plantas de 30 días de edad, etapa en la cual el contenido de los terpenos fue el más bajo, sin embargo a partir de los 3 meses éste aumentó considerablemente para los 5 compuestos cuantificados, encontrando un máximo de pulegona (71.36 µg/g) el cual después disminuyó. El contenido de verbenona (40.61 µg/g) y limoneno (10.64 µg/g) aumentó durante el crecimiento de las plantas, el correspondiente a linalol (14.15 µg/g) y mentona (14.44 µg/g) fue similar en cada colecta durante los últimos 9 meses del cultivo.

En la composición química volátil resultante en los extractos hexánicos de plantas de nurite de diferentes edades se pudo constatar que la diferencia en composición, es afectada en gran medida por el estado fenológico de la planta, además de que la expresión de compuestos aumenta con la edad o del desarrollo de las plantas.

El género *Satureja* presenta gran variabilidad en la concentración y composición de sus aceites esenciales no solo debido a la existencia de diferentes especies y subespecies, sino también a numerosos parámetros, principalmente el ambiente y condiciones climáticas. Se ha reportado en diversas especies del género *Satureja* que la composición química de sus aceites esenciales, puede variar en gran proporción, sin embargo existen metabolitos constitutivos. Por ejemplo: para los

aceites esenciales de plantas de *S. montana* de Croacia, Bosnia y Herzegovina, se han encontrado concentraciones de carvacrol siempre superiores al 84.19%, estos resultados indican la presencia de un metabolito secundario mayoritario (Kuštrak *et al.*, 1996; Gülluce *et al.*, 2003; Skočibušić y Bezić, 2003). Cazin *et al.* (1985), reportaron grandes variaciones en la concentración relativa de los principales compuestos del aceite esencial de *S. montana*, dependientes de las etapas de desarrollo y lugar de procedencias de las plantas.

Las plantas de nurite de 12 meses de edad, cultivadas en invernadero, aunque no presentaron los mismos niveles en el contenido de terpenos que de plantas en campo, de las cuales no se conoce su edad, la cantidad de volátiles se considera aceptable ya que las plantas permanecieron en estado juvenil, no presentando floración. Este comportamiento ha sido reportado para *S. montana* y *S. cuneifolia*, en las que se demostró la gran variabilidad que existe en la composición química en tres estados de desarrollo, y la presencia constitutiva de geraniol en el aceite esencial de *S. montana* y de linalol y borneol en el de *S. cuneifolia*, ambas en tres diferentes estados ontogénicos (Skočibušić, 2003; Skočibušić *et al.*, 2004).

Aunque algunas plantas producen mayormente los metabolitos secundarios durante la floración (Sangwan *et al.*, 2001; Ruiz-Nova, 2008) y es en esta etapa fenológica donde se pueden obtener mayores rendimientos en el contenido y composición de aceites (Zheljazkov *et al.*, 2010), especies de la familia Lamiaceae como menta y hierbabuena, acumulan mayor contenido de aceites esenciales durante el desarrollo vegetativo (Farooqi *et al.*, 1999), mismo que ocurrió en las plantas de nurite, tanto en campo como en invernadero.

El cultivo de algunas plantas que acumulan compuestos volátiles, en condiciones fuera del hábitat, afecta negativamente provocando la disminución del contenido de éstos. También la edad de la planta es un factor importante, ya que diversas especies requieren hasta 2 años para su primera floración y la madurez provoca un aumento de los volátiles terpénicos (Echeverrigaray *et al.*, 2001). Las plantas

productoras de compuestos volátiles, cultivadas en invernadero o campo (fuera del hábitat), pueden producir un alto contenido de éstos mediante prácticas de cultivo como fertilización, micorrización y podas (Sangwan *et al.*, 2001).

9.3. EFECTO DE LA FERTILIZACIÓN Y LA MICORRIZACIÓN EN PLANTAS DE NURITE CULTIVADAS EN INVERNADERO SOBRE EL CONTENIDO DE COMPUESTOS VOLÁTILES

9.3.1. Efecto de la fertilización Inorgánica (NPK) sobre el crecimiento

La influencia de la fertilización inorgánica (NPK) fue apreciada en los diferentes parámetros de crecimiento analizados en plantas de nurite (*S. macrostema*) durante su cultivo en invernadero.

Tanto la altura, número de hojas/planta, área foliar y biomasa (peso fresco y seco) se incrementaron en forma dependiente de la concentración de fertilizante aplicada y el tiempo del muestreo. Con el tratamiento T1 (sin fertilización) las plantas de nurite mostraron los niveles más bajos en cada uno de los parámetros de crecimiento. La aplicación de los tratamientos T2 (10-10-10), T3 (17-17-17) y T4 (20-20-20) incrementaron la biomasa total de las plantas, siendo con este ultimo tratamiento (T4) con el que se logro obtener los mayores resultados en cada tiempo de muestreo.

Al finalizar el tiempo de experimentación (90 díasde cultivo), la altura se incrementó 1.83 veces (50.33 cm), el número de hojas: 7.4 veces (227.16 hojas), área foliar: 2.07 veces (9.52 cm²), peso fresco: 5.89 veces (24.94 g) y peso seco: 7.04 veces (4.72 g), respecto a las plantas no fertilizadas (27.5 cm, 30.6 hojas, 4.58 cm², 4.23 g y 0.67 g, respectivamente).

Debido a que *S. macrostema* es una especie de la cual no se conoce reportes para su cultivo y manejo en invernadero, se esperaba una respuesta positiva a la aplicación de fertilizante inorgánico, en cuanto al incremento de los parámetros de

crecimiento de las plantas; y fue así, la biomasa aumentó en proporción de la concentración de fertilizante (NPK) aplicada, obteniéndose mayores rendimientos. Estos resultados eran los esperados ya que en diversos reportes se indica que la fertilización (orgánica e inorgánica) es un factor agronómico sumamente importante ya que mejora la nutrición de los cultivos e incrementa la producción de biomasa (Mohamed y Abdum, 2004; Nagdhi-Badi *et al.*, 2004; Pavlovic *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2008; Zheljazkov *et al.*, 2009).

En concordancia con los resultados obtenidos, Juárez-Rosete (2010) encontró que la fertilización inorgánica influyó en el incremento de las variables altura, peso fresco y seco en plantas de *Matricaria recutita*. También ha sido demostrado en *Cymbopogon citratus*, al aplicar fertilización inorgánica (Nitrógeno), se obtuvieron rendimientos anuales de 60 toneladas de biomasa verde (Soto *et al.*, 2002). De igual forma, ha sido descrito por Omidbaigi (2002) y Berti *et al.* (2002) que la fertilización con nitrógeno en *Thymus vulgaris* y *Echinacea angustifolia*, respectivamente, es responsable del incremento de la biomasa de dichas plantas.

También los resultados observados en el comportamiento de plantas de nurite fertilizadas y cultivadas en invernado, pueden deberse a las condiciones de temperatura, luminosidad y humedad relativa durante su cultivo, ya que éstos factores favorecen la acumulación de los foto-asimilados (Azcón y Talón, 2000). Además, el abastecimiento de nutrientes mediante la fertilización y a las características del sustrato utilizado (turba:agrolita, 1:1), como la porosidad y retención de la humedad, pudieron ser responsables del aumento de la tasa de adsorción de minerales, la distribución a los sitios funcionales y la movilidad dentro de la planta, promoviendo un crecimiento vigoroso (Alcántar y Sandoval, 1999).

En este estudio se refuerza el conocimiento reportado por otros trabajos, en los que se indica que la producción de biomasa se modifica por las condiciones agronómicas (McConkey *et al.*, 2000), la época de cosecha, la etapa fenológica, la

densidad de siembra (Chauhan *et al.*, 2009), la temperatura, humedad relativa y fotoperiodo (Figueiredo *et al.*, 2008).

Bajo condiciones de fertilización inorgánica (NPK) se obtuvo mayor rendimiento en términos de peso de biomasa total en comparación que las plantas no fertilizadas. El tratamiento T4 (20-20-20) representó la mejor alternativa con el cual se presentó un mayor crecimiento de las plantas de nurite, lo que significa una mayor cantidad de materia verde. Por lo que, al estar las plantas de nurite sometidas a las mismas condiciones de invernadero y ser micropropagadas (clones), se observó un efecto exclusivo de la fertilización (NPK) sobre el crecimiento de las plantas.

9.3.2. Efecto de la fertilización Inorgánica (NPK) sobre el contenido de compuestos volátiles

En la parte aérea (hojas y tallos) de plantas de *S. macrostema* cultivadas en invernadero se identificaron y cuantificaron los compuestos volátiles presentes en los extractos hexánicos. Los terpenos limoneno, linalol, mentona, pulegona y verbenona fueron los constituyentes principales y su presencia se mantuvo durante los 90 días de experimentación, pero su contenido tuvo variación según el tratamiento aplicado, siendo la pulegona el compuesto mayoritario.

La producción de cada uno de los 5 terpenos fue diferente en los 90 días de experimentación, posiblemente debido a la información genética de las plantas, cabe mencionar que las plantas de *S. macrostema* presentaron solamente desarrollo vegetativo durante su cultivo en invernadero. En algunas investigaciones recientes se indica que en plantas como *Hedeoma multiflorum* (Fernández *et al.*, 2007), *Minthostachys verticillata* (Cariddi *et al.*, 2007), *Minthostachys mollis* (Cano *et al.*, 2008), *Minthostachys setosa* (Chaquilla-Quilca *et al.*, 2011) y en algunas especies de *Satureja*, *S. parvifolia* (Juárez *et al.*, 2000) y *S. odora* (Molina *et al.*, 2002), presentan a la pulegona como el volátil en mayor proporción.

Los tratamientos T2 (10-10-10), T3 (17-17-17) y T4 (20-20-20) influyeron positivamente aumentando la cantidad de pulegona con respecto a las plantas no fertilizadas (tratamiento T1). El aumento en este volátil fue dependiente de la concentración y el tiempo en que se colectaron las muestras. El máximo contenido de pulegona se alcanzó a los 60 días (45.95 $\mu\text{g/g}$) con la concentración de fertilizante 20-20-20 (NPK). Los niveles de este metabolito siempre fueron superiores con dicho tratamiento.

Los compuestos linalol y mentona presentaron la misma tendencia que la pulegona, su contenido se incrementó con la aplicación de fertilizante. La máxima cantidad se presentó en las plantas que fueron fertilizadas con 20-20-20, llegando a niveles de 10.79 $\mu\text{g/g}$ para linalol (90 días) y 3.06 $\mu\text{g/g}$ para mentona (60 días). Dicho tratamiento (T4) fue el que ejerció el mayor efecto sobre los valores de ambos compuestos.

Para el caso de limoneno, se observó que el contenido del volátil mostró una tendencia a disminuir hasta 2.8 veces su valor basal (2.05 $\mu\text{g/g}$) conforme paso el tiempo de experimentación. Sin embargo, las plantas que fueron tratadas con T4 (20-20-20) mostraron cantidades superiores que los demás tratamientos (T1, T2 y T3), alcanzando un máximo de 2.17 $\mu\text{g/g}$ de limoneno a los 30 días de cultivo.

Caso contrario fue el comportamiento del contenido de verbenona, ya que éste disminuyó con la aplicación de fertilizante. Los tratamientos T2, T3 y T4 mostraron cantidades menores a lo encontrado en plantas de nuri no fertilizadas (T1). En estas últimas se tuvo un máximo de 2.58 $\mu\text{g/g}$ de verbenona a los 60 días de cultivo.

De acuerdo a la literatura, para especies de la familia Lamiaceae, muchos de los metabolitos son biosintetizados a partir del limoneno y la pulegona (Soheil y Rodney, 2003). Se sabe que la pulegona es biosintetizada a partir del limoneno y existe muy poca información acerca de la reversibilidad de esta reacción

(Bohlmann *et al.*, 1998; Muruyama *et al.*, 2002). Quizá sea la razón por la cual, las concentraciones de limoneno disminuyen durante los 90 días de experimentación (a pesar de la aplicación de fertilizante) y las concentraciones de pulegona aumenta en este periodo de tiempo. Precisamente Bouwmeester y col. (1998), reportan la síntesis de carvona (un intermediario hacia la síntesis de pulegona) a expensas del limoneno en frutos de *Carum carvi*. Al parecer, en *Lippia alba* ocurre lo mismo, la cantidad relativa del limoneno tiende a disminuir (4.7%) mientras la de la carvona aumenta (23.6%) (Parra-Garcés *et al.*, 2010).

La tendencia a disminuir en concentración, que presenta la pulegona a partir de los 60 días de cultivo, pueda explicarse por el aumento en los niveles que muestra la mentona. Este comportamiento ha sido reportado en *Mentha arvensis* (Nassiff *et al.*, 2002), *Mentha x piperita* (Arzani *et al.*, 2007), *Mentha pulegium* (Nassiff *et al.*, 2004), *Minthostachys verticillata* (Cariddi *et al.*, 2007) y *Minthostachys mollis* (Cano *et al.*, 2008), donde la pulegona es el intermediario central en la biosíntesis de mentona y dependiendo de las condiciones ambientales, este metabolito puede ser reducido a mentol por la pulegona reductasa u oxidado a mentofurano por la mentofurano sintasa (Barrera *et al.*, 2008), situación que no sucedió en este estudio porque solo se determinó al compuesto mentona como tal.

El aumento en las concentraciones de linalol durante la fertilización con 20-20-20, está correlacionada con la disminución en los niveles de verbenona al aplicar el fertilizante. Esto puede ser explicado por los hallazgos de Gouinguéné y Turlings (2002), quienes observaron que la tasa de fertilización completa causa cambios en las proporciones de los volátiles, disminuyendo el contenido de mirceno y bergamoteno, este último en su estructura presenta un doble ciclo. Tal es el caso de verbenona cuya síntesis implica el cierre de dos ciclos, formando un terpeno de 10 carbonos (monoterpeno), por lo que este tipo de compuestos son susceptibles a ruptura por cambios ambientales o debidos a la fertilización. Además, la disminución en contenido del mirceno por la fertilización, no permite que se dé la formación de verbenona, ya que la reacción de dos moléculas de mirceno origina

al terpeno α -pineno, el cual es el intermediario para la biosíntesis de verbenona (Barrera *et al.*, 2008). En cuanto al linalol, los resultados obtenidos para *S. macrostema* coinciden con lo encontrado en el trabajo antes mencionado (Gouinguéné y Turlings, 2002), donde la aplicación de fertilizante completo incrementó los niveles de dicho compuesto respecto a las plantas no fertilizadas.

Para *S. macrostema* el rendimiento del aceite y el contenido de mentona se incrementa con la madurez de las hojas y bajo los diferentes niveles de fertilización, la tendencia es a la acumulación de pulegona, linalol y mentona. El medio por el cual estos factores que influyen en las rutas de biosíntesis de estos terpenos no están lo suficientemente claros (Soheil y Rodney, 2003).

Como ya se ha mencionado, diversos estudios han demostrado que debido a varios factores, entre los principales tenemos los quimiotipos, la variación de los factores físicos ambientales, tales como la luz, temperatura, lluvia, orientación, duración del día, altitud, nutrientes del suelo (Cipollini *et al.*, 2002; Peñuelas y Llusà, 2003; Dudareva y Negre, 2005), herbivoría (Kessler y Baldwin, 2001; Birkett *et al.*, 2003; Bukovinszky *et al.*, 2005; Lou *et al.*, 2005), estrés, duración total de la insolación y el régimen de los vientos sobre todo en especies que poseen estructuras histológicas de almacenamiento superficiales, frecuentemente producen cambios en la composición y cuantificación de terpenos, por lo tanto, los metabolitos se deben obtener controlando las condiciones de producción y procesos para su obtención, con lo que se tendrá cierta homogeneidad (Dharmagadda *et al.*, 2004; Kordali *et al.*, 2005; Kan *et al.*, 2006).

Otro factor a considerar es la edad de las plantas, debido a que Rohloff *et al.* (2005) señalan que el contenido de monoterpenos se incrementa con la edad de las hojas, pero puede ir disminuyendo cuando éstas son mayores de tres semanas. También se ha reportado que el rendimiento de los aceites esenciales, depende del incremento en área foliar y de tricomas glandulares (Jeliazkova *et al.*, 1999).

Los resultados de la presente investigación reflejan que bajo condiciones de invernadero y fertilizando con diferentes niveles de NPK, se puede obtener una alta calidad (tipo y cantidad) de compuestos volátiles, sin la necesidad de llegar a la etapa de floración (Golmakani y Rezaei, 2008). Marín-Loaiza y Céspedes (2007), sugiere que los factores ambientales y genéticos son causantes de que las plantas no reaccionen de la misma manera o de igual magnitud frente a la fertilización. Debido a que las plantas de nurite estuvieron sometidas a las mismas condiciones de invernadero (temperatura, fotoperiodo, humedad relativa), las variaciones en el contenido de los volátiles fueron efecto de la aplicación del fertilizante, descartando el factor genético ya que las plantas utilizadas en el experimento fueron micropropagadas (clones), para lo cual se eligieron aquellas plantas que presentaron un contenido promedio *in vitro* de 1.55 µg/g de pulegona.

No hay que olvidar el efecto de la fertilización sobre el metabolismo secundario, ya que está confirmado que dicho efecto modifica las concentraciones de los compuestos secundarios, en este caso los terpenos, aumentando su concentración frente a este factor (Antolínez-González *et al.*, 2008). De acuerdo a lo anterior, las plantas fertilizadas con 20-20-20 (NPK) representan el mejor prospecto para la obtención de compuestos volátiles de nurite (*S. macrostema*) en comparación con las plantas no fertilizadas, ya que se eleva el rendimiento de biomasa que presentara un alto contenido de volátiles.

9.3.3. Efecto de la micorrización sobre el crecimiento

El efecto que produjo la inoculación de *Glomus intraradices* sobre el crecimiento de plantas de nurite (*S. macrostema*) fue determinada en las diferentes variables agronómicas analizadas durante su cultivo en invernadero. Los parámetros como altura, longitud de raíz y biomasa en peso fresco y seco en las plantas micorrizadas (+ micorriza), se incrementaron en comparación a las plantas no tratadas (- micorriza) según el tiempo en que se realizó la determinación.

Los datos de altura muestran que, a los 30 días de la inoculación las plantas micorrizadas y no micorrizadas, éstas presentaron un crecimiento similar en la parte aérea. Pero a partir del día 60 y hasta el 90, las plantas con la presencia del hongo en su raíz (+ micorriza) mostraron una notable diferencia en altura (47.56 y 59.5 cm, respectivamente) que sus contraparte no micorrizadas (28.6 y 39.21 cm, respectivamente). En el caso de la longitud de raíz, las plantas micorrizadas mostraron diferencia significativa respecto a las no micorrizadas a partir del día 30 de la inoculación (13.9 y 7.11 cm, respectivamente) y hasta el final de la experimentación de 90 días (33.5 y 24.87 cm, respectivamente).

La biomasa tanto en peso fresco y seco también mostró un incremento en aquellas plantas que fueron fertilizadas (+ micorriza) (18.1 y 2.99 g, respectivamente) que aquellas que no lo fueron (- micorriza) (5.71 y 0.99 g, respectivamente), a los 90 días en que se determinaron los pesos.

Lo anterior concuerda con lo reportado en otros trabajos en el sentido de que la inoculación de *Glomus intraradices* en plantas como *Coriandrum sativum* (Farahani *et al.*, 2008), *Fragaria x ananassa* (Reyes-Sanchez, 2008), *Lactuca sativa* (Marulanda *et al.*, 2003), *Persea americana* Mill. (Hernández-Artaza, 2001), *Sorghum bicolor* (Cho *et al.*, 2006) y *Zea mays* (Sheng *et al.*, 2008) es responsable del aumento en el tamaño, vigor y biomasa de dichas plantas.

En otros estudios, el efecto de la colonización de hongos micorrízicos como *G. mosseae*, *G. fasciculatum* y *G. versiforme*, es aumentar el crecimiento de tallos y raíces, así como, la biomasa fresca y seca, como en *Triticum aestivum*, *Capsicum annuum* y *Poncirus trifoliata*, respectivamente (Al-Karaki *et al.*, 2004; Mena-Violante *et al.*, 2006; Qiang-Sheng *et al.*, 2007).

Este efecto atribuido a la acción de los hongos micorrízicos del género *Glomus*, coincide con los resultados encontrados en esta investigación en donde se presentó un efecto positivo de la colonización micorrízica con *Glomus intraradices*

sobre el incremento en altura, longitud de raíz y biomasa (peso fresco y seco) en plantas de *S. macrostema*.

9.3.4. Efecto de la micorrización sobre el contenido de compuestos volátiles

Se confirmó la presencia de los compuestos volátiles principales de nurite bajo cultivo en invernadero (limoneno, linalol, mentona, pulegona y verbenona), el contenido de éstos varió por el efecto de la micorrización. El compuesto pulegona continuó siendo el mayoritario, su concentración aumentó en las plantas micorrizadas durante todo el período de experimentación, en comparación a las plantas no micorrizadas, las cuales presentaron concentraciones menores. La mayor concentración de pulegona se alcanzó al tiempo 90 de determinación (45.11 µg/g).

Los compuestos linalol, limoneno, verbenona y mentona presentaron la misma tendencia a aumentar en las plantas micorrizadas, el contenido máximo que presentaron al día 90 fue de 12.67 µg/g, 3.39 µg/g, 2.91 µg/g, 2.17 µg/g, respectivamente. Al analizar los resultados de este experimento, se encontró que la aplicación de *Glomus intraradices* en las raíces de la plantas de nurite induce modificaciones en cuanto al contenido de volátiles ejerciendo un efecto positivo sobre la concentración de los mismos, ya que el contenido de los 5 compuestos se incrementó con dicho tratamiento respecto a sus contrapartes no inoculadas.

Se han desarrollado estudios en distintas especies de plantas donde los efectos producidos por los hongos formadores de micorrizas sobre la morfología y las variaciones metabólicas han sido determinados. De acuerdo a la literatura, las micorrizas ejercen cambios en la arquitectura de la raíz (Jakobsen *et al.*, 2005), tamaño de la planta (Graham, 2004), aumentan la capacidad fotosintética de la planta y por ende la producción de biomasa (Franken *et al.*, 2007), disminuyen el estrés causado por factores ambientales (Akhtar y Siddiqui, 2008), por mencionar algunos. Además, se ha informado de que la aplicación de hongos micorrízicos arbusculares contribuye a la síntesis, acumulación y la calidad de algunos

metabolitos secundarios, tales como los terpenoides, flavonoides, fitoalexinas (Akiyama *et al.*, 2002; Larose *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2003).

En un trabajo realizado por Morone-Fortunato y Avato (2008), demostraron que la inoculación del hongo *Glomus viscosum* incrementa el área foliar, peso seco y peso fresco, número de ramificaciones en tallos y raíces y la producción de glándulas secretoras en las plantas micropropagadas e inoculadas de orégano (*Origanum vulgare* ssp. *Hirtum*). También son responsables del incremento de la calidad y la cantidad de la fuente de aceites esenciales con respecto a las plantas no inoculadas. El carvacrol uno de los principales compuestos producidos en esta planta, presentó variaciones en rangos del 81 a 95% de los compuestos esenciales. Al respecto, Khaosaad *et al.* (2006) reportaron el efecto de *Glomus mosseae* en la calidad y cantidad de aceite esencial de tres genotipos de orégano. Dicho trabajo demostró que la micorrización incrementa la concentración del aceite esencial en *Origanum vulgare* var. *Cona* y *Origanum vulgare* b13/2 en comparación con los tratamientos no micorrizados, como ha sido demostrado en albahaca, *Ocimum basilicum* (Toussaint *et al.*, 2007).

Por su parte, Kapoor *et al.* (2007), evaluaron el efecto de la micorrización y el incremento del contenido de artemisina en *Artemisia annua*. Los resultados muestran que los dos hongos micorrízicos inoculados (*Glomus macrocarpum* y *G. fasciculatum*) incrementaron 29 veces la concentración del terpeno artemisina en la planta. Lo anterior sugiere que el incremento de artemisina está relacionado con la alta densidad de tricomas glandulares foliares (sitio en donde se desarrolla la síntesis de artemisina) encontrados en las plantas micorrizadas, en comparación con las plantas no micorrizadas. Lo cual ha sido demostrado en *Ocimum basilicum* var. *Genovese*, donde se incrementó el total de aceites esenciales en especial del terpeno α -terpineol por efecto del hongo *Gigaspora rosae* BEG 19, esto debido a un aumento del número de tricomas glandulares en las zonas basales y centrales de las hojas (Copetta *et al.*, 2006).

El incremento de crecimiento y desarrollo de las plantas micorrizadas ha sido explicado mediante varios mecanismos, Monzón y Azcón (2001) observaron que la colonización micorrízica con *G. intraradices* además de incrementar la biomasa de las plantas incrementan la absorción y utilización de fósforo en *Alnus*. Otros estudios han puesto de manifiesto que la mayoría de las plantas aumentan la absorción de fósforo al establecer asociaciones micorrizicas (Rauschy Baucher 2002; Jia *et al.*, 2004) y que también a través de la simbiosis micorrízica se incrementa la transferencia de nitrógeno del suelo a la planta, particularmente en forma de nitrato (George *et al.*, 1992; Tobar *et al.*, 1994; Bago *et al.*, 1996).

Bücking y Shachar-Hill (2005) encontraron en condiciones normales, sin estrés, en un experimento en maceta, que la capacidad de transporte y transferencia de P en *G. intraradices* es estimulado por el transporte de carbohidratos de la planta hacia el hongo. Cruz-Cruz (2005) en un experimento *in vitro* bajo condiciones de estrés hídrico y salinidad encontraron que la trealosa y otros disacáridos se acumulan en el micelio externo de *G. intraradices*. Se ha documentado que el beneficio de los hongos micorrízicos es mayor bajo condiciones de estrés ya que incrementan la adquisición de fósforo, también se ha observado que bajo fertilización nitrogenada este efecto es más pronunciado. En el caso de plantas sin estrés hídrico se ha observado que el incremento en la adquisición de fósforo se debe a un mayor flujo de carbohidratos de la planta huésped hacia el hongo. Este efecto puede estar asociado con la presencia del hongo que estabilizó el pH del suelo (Zepeda *et al.*, 2010), lo que pudo haber resultado en una mayor solubilización y absorción de P por el hongo micorrízico *G. intraradices* en las plantas de nurite, ya que el principal papel de la micorriza es proveer fósforo a la planta.

Lo anterior indica que la absorción de N y P favorece el crecimiento y metabolismo de la planta, ya que estos macronutrientes son fundamentales para el crecimiento vegetativo y transferencia de energía que da lugar a la fosforilación, ocasionando una aceleración en el metabolismo de intermediarios activados al volverlos más reactivos (Kirkby y Römheld, 2007), lo cual genera que la planta gane biomasa y

produzca metabolitos secundarios, situación que pudo estar pasando en la colonización de *S. macrostema* por *G. intraradices*.

En específico, en diversas investigaciones se muestra que la micorrización con *G. intraradices* presenta un efecto positivo sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, ya que mejora el estado hídrico de las plantas (Mena-Violante *et al.*, 2006; Reyes-Sanchez, 2008), aumenta la biomasa (Sánchez de la Cruz *et al.*, 2008), conduce a una floración más temprana (Gaur y Adholeya, 2005; Usha *et al.*, 2005), pero también incrementa el contenido de metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos (De la Rosa-Mera, 2009) y volátiles (Frost *et al.*, 2008; Guerrieri *et al.*, 2004; Van-Bel y Gaupels, 2004; Heil y Ton, 2008). El incremento en la producción de compuestos volátiles fue demostrado en los resultados de este trabajo, donde la inoculación de *G. intraradices* en plantas de *S. macrostema*, aumentó las concentraciones de los terpenos limoneno, linalol, mentona, pulegona y verbenona respecto a las plantas no micorrizadas. Mientras que la inducción de la floración por parte de *G. intraradices*, no fue observada en *S. macrostema*, debido a que las plantas pueden tardar hasta 2 años en florecer (Echeverrigaray *et al.*, 2001) y este experimento se realizó durante 90 días, tiempo insuficiente para observar dicho fenómeno.

Estos resultados son muy importantes si se considera que el efecto medicinal de *S. macrostema* se le atribuye a la presencia de sus compuestos volátiles, por lo que podría ser una especie potencial para ser producida en invernadero utilizando la fertilización orgánica (hongos micorrízicos) ya que permitiría la producción de plantas con un alto contenido de volátiles, incluso llegando a concentraciones equiparables a las encontradas en plantas tratadas con fertilizante inorgánico, contribuyendo así, a la conservación de esta especie dejando de explotar las poblaciones silvestres y evitando la contaminación de suelos, ríos, mantos freáticos que la aplicación de fertilizantes químicos ocasiona al lixiviarse hasta un 50% del fertilizante aplicado.

10. CONCLUSIONES

El contenido de volátiles en *S. macrostema*, en todos los casos estudiados, es dependiente de las etapas de desarrollo. En plantas en campo se incrementa durante el desarrollo vegetativo y en plantas de invernadero con la edad de la planta.

La fertilización inorgánica (N-P-K) y la colonización micorrízica por *Glomus intraradices* en nurite, mostraron un efecto positivo sobre el crecimiento y el aumento del contenido de los compuestos volátiles mayoritarios (pulegona, linalol, limoneno, verbenona y mentona). El principal componente volátil en todos los casos fue la pullegona.

11. PERSPECTIVAS

Cuantificación de los compuestos volátiles presentes en plantas de nurite durante la fertilización con N-P-K y micorrización con *G. intraradices*, en un periodo de 12 meses de cultivo en invernadero o hasta la etapa de floración.

En plantas de nurite cultivadas en invernadero, realizar la determinación del efecto de diferentes sustratos, concentraciones mayores del fertilizante N-P-K, interacción fertilizante-micorriza y podas, sobre el contenido de compuestos volátiles.

12. LITERATURA CITADA

Acosta, L. L., Rodríguez, F. C., Hechevarría, S. I. y Milanés, F. M. 2010. Determinación de la fecha de plantación en *Tagetes lucida* Cav. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 15(4): 236-245.

Aguilar-Contreras, A., Camacho, J. R., Chino, S., Jáquez, P. y López, M. E. 1994. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. IMSS, México D.F.

Aguilar-Ramírez, J. M. 2002. Especiación recombinacional y relaciones filogenéticas en *Satureja macrostema* var. *laevigata*. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Colima.

Akhtar, M. S. y Siddiqui, Z. A. 2008. Biocontrol of a root-rot disease complex of chickpea by *Glomus intraradices*, *Rhizobium* sp. and *Pseudomonas straita*. Crop Prot. 27: 410-417.

Akiyama, K. y Hayashi, H. 2002. Arbuscular mycorrhizal fungus-promoted accumulation of two new triterpenoids in cucumber roots. Biosci Biotechnol Biochem. 66: 762-769.

Akiyama, K., Matsuoka, H. y Hayasi, H. 2002. Isolation and identification of a phosphate deficiency-induced C-glycosylflavonoid that stimulates arbuscular mycorrhiza formation in melón roots. Molecular Plant Microbe Interaction. 15: 334-340.

Al-Karaki, G., McMichael, B. y Zak, J. 2004. Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. Mycorrhiza. 14: 263-269.

Alcántar, G. G. y Sandoval V. M. 1999. Manual de análisis químico de tejido vegetal. Guía de muestreo, preparación, análisis e interpretación. Publicación especial 10. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Chapingo, México. 155 pp.

Alonso, J. 2004. Congreso iberoamericano de plantas medicinales. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 3(3): 51.

Amzallag, G. N., Larkov, O., Ben, H. M. y Dudai, N. 2005. Soil microvariations as a source of variability in the wild: The case of secondary metabolism in *Origanum dayi* Post. Journal of chemical Ecology. 31(6): 1235-1255.

Antolinez-González, J. C., de Colmenares, N. G., Usubillaga, A., Darghan, E. y Linares, S. 2008. Evaluación de variables agronómicas en el cultivo del limonaria (*Cymbopogon citratus* Stapf) para la producción de aceite esencial. Interciencia. 33(9): 693-699.

Arrebola, M. L., Socorro, O., Barcelo-Muñoz, A., Simon-Pérez, E. y Pliego-Alfaro, F. 1997. Micropropagation of *Satureja obovata*. Lag. Hort Sci. 32(7): 1278-1280.

Arzani, A., Zeinadi, H. y Razmjo, K. 2007. Iron and magnesium concentrations of mint accessions (*Mentha spp.*). Plant Physiology and Biochemistry. 45: 323-329.

Ateia, E. M., Osman, Y. A. H. y Meawad, A. E. A. 2009. Effect of organic fertilization on yield and active constituents of *Thymus vulgaris* L. under North Sinai conditions. Res. J. Agric. Biol. Sci. 5(4): 555-565.

Ávalos, G. A. y Pérez-Urria, C. E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2(3): 119-145.

Azaz, D., Demirci, F., Satil, F., Kürkçüoğlu, M. y Başer, K. 2002. Antimicrobial activity of some *Satureja* essential oils. Z.Naturforsch. 57: 817-821.

Azcon-Bieto J. y Talón, M. 2000. Fundamentos de fisiología vegetal. Editorial McGraw Hill Interamericana, Madrid, España. 522 p.

Azizi, M., Rezwanee, F., Hassanzadeh, K. M., Lackzian, A. y Neamati, H. 2008. The effect of different levels of vermicompost and irrigation on morphological properties and essential oil content of German chamomile (*Matricaria recutita*) cv. Goral. Iranian J. Med. Aroma Plants. 24(1): 82-93.

Bago, B., Pfeffer, P. E. y Schachar-Hill, Y. 2000. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. Plant Physiol. 124: 949-957.

Bago, B., Vierheilig, H., Piche, Y. y Azcón-Aguilar, C. 1996. Nitrate depletion and pH changes induced by the external mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown in monoxenic culture. New Phytologist. 133: 273-280.

Barrera, R. J., Alarcón, E. A., González, L. M., Villa, A. L. y Montes, C. C. 2008. Síntesis de carveol, carvona, verbenol y verbenona. Ingeniería y Competitividad. 10(1): 43-63.

Bello, G. M. A. 1993. Plantas útiles no maderables de la Sierra Purépecha, Michoacán, México, INIFAP. México. Folleto Técnico No. 10. 115.

Bello, G. M. A. 2006. Catálogo de plantas medicinales de la comunidad Indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán. México. Libro Técnico No. 4. Campo Experimental Uruapan. CIRPAC. INIFAP. Michoacán, México. 138 p.

Bello, G. M. A., Molina, T. J., Calderón, M. J., García, Ch. A. y Salgado, G. R. 2006. Propiedades antimicrobianas y análisis fitoquímico de seis plantas medicinales de la comunidad indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro,

Michoacán, México. 2º Congreso de Investigación Científica. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.

Berthouly, M. y Michaux-Ferriere, M. 1996. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*, induction conditions and histological evolution. Plant Cell Org. Cult. 44: 169-176.

Berti, M., Wilckens, R., Fischer, S. y Hevia, F. 2002. Effect of harvest season, nitrogen, phosphorus and potassium on root yield, echinacoside and alkylamides in *Echinacea angustifolia*. Acta Horticulturae. 576: 303-310.

Betancourt, A. S. Y. y Gutiérrez, D. M. A. 1999. Proyecto mercados verdes herbolarios. Informe técnico final. Fondo de América del Norte para la Cooperación Ambiental (FANCA), Ecología y Desarrollo de Tlaxcala y Puebla A.C. México, D.F. 250 pp.

Bezić, N., Skočibušić, M. y Dunkić, V. 2005. Phytochemical composition and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. and *Satureja cuneifolia* Ten. Essential oils. Acta Bot. Croat. 64: 313-322.

Binet, M. N., van Tuinen, D., Deprêtre, N., Koszela, N., Chambon, C. y Gianinazzi, S. 2011. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Artemisia umbelliformis* Lam, an endangered aromatic species in Southern French Alps, influence plant P and essential oil contents. Mycorrhiza. 21: 523-535.

Birkett, M. A., Chamberlain, K., Guerrieri, E., Pickett, J. A., Wadhams, L. J. y Yasuda, T. 2003. Volatiles from whitefly-infested plants elicit a host-locating response in the parasitoid, *Encarsia formosa*. J. Chem. Ecol. 29: 1589-1600.

Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G. y Croteau, R. 1998. Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 4126-4133.

Bonfil-Sanders, C., Cajero-Lázaro, I. y Evans, Y. R. 2008. Germinación de semillas de seis especies de *Bursera* del centro de México. Agrociencia. 42: 827-834.

Bouwmeester, H. J., Gershenzon, J., Konings, M. y Croteau, R. 1998. Biosynthesis of the monoterpenes limonene and carvone in the fruit of caraway. Demonstration of enzyme activities and their changes with development. Am. Soc. Plant. Biol. 117: 901-912.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. y Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science. 161: 839-851.

Bücking, H. y Shachar-Hill, Y. 2005. Phosphate uptake, transport and transfer by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is stimulated by increased carbohydrate availability. New Phytologist. 165(3): 899-912.

Bukovinszky, T., Gols, R., Posthumus, M. A., Vet, L. E. M. y van Lenteren, J. C. 2005. Variation in plant volatiles and attraction of the parasitoid *Diadegma semiclausum* (hellen). J. Chem. Ecol. 31: 461-480.

Cano, C., Bonilla, P., Roque, M. y Ruiz, J. 2008. Actividad antimicótica *in vitro* y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). Rev Peru Med Exp Salud Pública. 25(3): 298-301.

Cano, M. A. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: micorrizas, *Trichoderma* spp. Y *Pseudomonas* spp. Una revisión. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica. 14(2): 15-31.

Cañigüeral, S., Vila, R. 2003. La fitoterapia racional. En Fitoterapia. Vademecum deprescripción. Vanaclocha, B., Cañigüeral, S (Eds). Masson. 1091 pp.

Cariddi, L. N., Moser, M., Zygadlo, J., Sabini, L. I. y Maldonado, A. M. Compuestos puros aislados del aceite esencial de *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling como activadores policlonales *in vitro*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 6(5): 236-237.

Cases, C. M. A. 2007. Las plantas aromáticas y medicinales. Descripción de las especies fundamentales y principios activos. Jornadas Técnicas Dedicadas a las Plantas Aromáticas y Medicinales. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Guadalajara, España. 11-18 pp.

Catapano, A. L. 1997. Antioxidant effect of flavonoids. Angiology. 48(1): 39-44.

Cazin, C., Jonard, R., Alain, P. y Pellecuer, J. 1985. L'évolution de la composition des essentiales chez divers chemotypes des Sarriette des montagnes (*Satureja montana* L.) obtenus par l'isolement *in vitro* des apex. CR Acad. Sc., Paris. 6: 237-240.

Chalchat, J. C. y Ozcan, M. M. 2008. Comparative essential oil composition of flowers, leaves and stems of basil (*Ocimum basilicum* L.) used as herb. Food Chemistry. 110: 501-503.

Chaquilla-Quilca, G., Escalante, W. D. E., Torres, M. V., Ballinas, C. M. L., Gastélum, F. M. G. y Nevárez-Moorillón, G. V. 2011. Composición química y contenido de fenoles totales en aceites esenciales de muña (*Minthostachys setosa*) Briq Epl y anís (*Pimpinella anísium*) L. En: Encuentro Científico Internacional de Invierno (ECI 2011) "Neantro Saavedra Rivano". Lima, 2-5 de agosto del 2011.

Chauhan, R. S., Kaul, M. K., Shahi, A. K., Kumar, A., Ram, G. y Tawa, A. 2009. Chemical composition of essential oils in *Mentha spicata* L. accession [III(J)26] from North West Himalayan region India. Industrial Crops and Products. 29: 654-656.

Chen, Y., Clapp, C. E. y Magen, H. 2004. Mechanisms of plant growth stimulation by humic substances: the role of organic iron complexes. *Japan. Soc. Soil Sci. Plant Nut.* 50(7): 1089-1095.

Cho, K., Toler, H., Lee, J., Ownley, B., Stutz, J. C., Moore, J. L. y Augé, R. M. 2006. Mycorrhizal symbiosis and response of sorghum plants to combined drought and salinity stresses. *J. Plant Physiol.* 163: 517-528.

Cipollini, M. L., Paulk, E. y Cipollini, D. F. 2002. Effect of nitrogen and water treatment on leaf chemistry in horsenettle (*Solanum carolinense*), and relationship to herbivory by flea beetles (*Epitrix* spp.) and tobacco hornworm (*Manduca sexta*). *Journal of Chemical Ecology.* 28(12): 2377-2398.

Cooper, K. M. 1984. Physiology of VA mycorrhizal associations. En: C. L. Power y D. J. VA mycorrhiza. CRC Press, Boca Raton Bagyaraj (eds.). 155-186.

Copetta, A., Lingua, G. y Berta, G. 2006. Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production of *Ocimum basilicum* L. var. *Genovese*. *Mycorrhiza.* 16: 485-494.

Cordeiro, M. A. S., Carneiro, M. A. C., Paulino, H. B. y Junior, O. J. S. 2005. Colonização e densidade de esporos de fungos micorrízicos em dois solos do cerrado. *Pesquisa Agropecuária Tropical.* 35: 147-153.

Craker, L. E. 1999. Trends in medicinal and aromatic plant production in the United States. *Acta Horticulturae.* 502: 71-75.

Cruz, C., Green, J. J., Watson, C. A., Wilson, F. y Martins-Loução, M. A. 2004. Functional aspects of root architecture and mycorrhizal inoculation with respect to nutrient uptake capacity. *Micorriza.* 14: 177-184.

Cruz-Cruz, C. A. 2005. Acumulación de carbohidratos en micorizas arbusculares sometidas a estrés in vitro. Tesis de maestría en biología experimental. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Morelia, Michoacán, México.

Damián-Badillo, L. M., Salgado-Garciglia, R., Martínez-Muñoz, R. E. y Martínez-Pacheco, M. M. 2008. Antifungal properties of some Mexican medicinal plants. *The Open Natural Products Journal.* 1: 27-33.

Davies, P. 2004. Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Proyecto FPTA 137. 7-23 pp.

De la Rosa-Mera, C. J. 2009. Micorriza arbuscular y estrés abiótico en el contenido de alcaloides (vinblastina y vincristina) de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Tesis

de maestría, Colegio de Postgraduados. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 117 pp.

De la Torre-Carreras, R. y López-González, J. 2010. Las plantas aromáticas y medicinales: futuro y potencialidad en Extremadura. En La agricultura y la ganadería extremeñas en 2010. 139-151 pp.

Dewick, P. M. 2002. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. Second edition. Wiley & Sons. Great Britain. 507 pp.

De Winnaar, W. 1997. Micropropagation of *Carica papaya* L. J. Amer. Soc. Hort. Science. 156: 735-738.

Dharmagadda, V., Naik, S., Mittal, P. y Vasudevan, P. 2004. Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. Bioresource Tech. 96: 1235-1240.

Dodds, J. H. y Roberts, L. W. 1995. Experiments in plant tissue culture. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U. S. A. 178 p.

Douds, D. D. y Schenck, N. C. 1990. Relationship of colonization and sporulation by VA mycorrhizal fungi to plant nutrient and carbohydrate contents. New Phytologist. 116: 621-627.

Dudareva, N. y Negre, F. 2005. Practical applications of research into the regulation of plant volatile emission. Curr. Op. Plant Biol. 8: 113-118.

Dudareva, N., Pichersky, E., Gershenzon, J. 2004. Biochemistry of plant volatiles. Plant Physiol. 135: 1893-1902.

Echeverrigaray, S., Agostini, G., Atti-Serfini, L., Paroul, N., Pauletti, G. F. y Atti-dos Santos, A. C. 2001. Correlation between the chemical and genetic relationships among commercial thyme cultivars. J. Agric. Food Chem., 49(9): 4220-4223.

Estrada, L. E. 2002. Cultivo de plantas medicinales, una urgencia Latinoamericana. Lecturas para el diplomado internacional plantas medicinales de México. Segunda reimpresión. Universidad Autónoma Chapingo. México. 437-440 pp.

Fanlo, M., Melero, R., Moré, E., Cristóbal, R. 2009. Cultivo de plantas aromáticas, medicinales y condimentarias en Cataluña: 6 años de campos de demostración. Centro Tecnológico Forestal de Cataluña, Productos Secundarios del Bosque. Primera edición. Solsona, España. 80 pp.

Farahani, H. A., Labaschi, M. H. y Hamidi, A. 2008. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi, phosphorus and water stress on quantity and quality characteristics of coriander. Advances in Natural and Applied Science. 2: 55-59.

Farooqi, A. H. A. y Samgwan, N. S. y Sangwan, R. S. 1999. Effect of different photoperiodic regimes on growth, flowering and essential oil in *Mentha* species. *Plant Growth Regulation*. 29(3): 181-187.

Fernández, E. A., Martínez, E., Juárez, M. A., Elechosa, M. A., Molina, A. M., Baren, C. M. van, Di Leo Lira, P. y Bandoni, A. L. 2007. Estudio del aceite esencial de *Hedeoma multiflorum* Benth. (Lamiaceae) "Peperina de las lomas" obtenido de poblaciones naturales en la provincia de San Luis. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 6(5): 246-247.

Fester, T., Schmidt, D., Lohse, S., Walter, M. H., Giuliano, G., Bramley, P. M., Fraser, P. D., Hause, B. y Strack, D. 2002. Stimulation of carotenoid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots. *Planta*. 216: 148-154.

Fierro, A. A., González-López, M. M., Montiel, S. D., Ruiz, J. D., Olivares, O. L. J. y Romualdo, J. C. 2005. La recolección y cultivo de especies medicinales y aromáticas silvestres: una propuesta de manejo sostenible. *Jornadas técnicas dedicadas a plantas aromáticas y medicinales*. 11 pp.

Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G. y Scheffer, J. J. C. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*. 23: 213-226.

Flück, H. 1954. The influence of the soil on the content of active principals in medicinal plants. *J. Pharmacy Pharmacol*. 6: 153-163.

Forlín, A. M. 2012. Plantas aromáticas: diferentes formas de multiplicación. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Primera edición. El Colorado-Formosa, Argentina. 4-13 pp.

Fortin, J. A., Bécard, G., Declerck, S., Dalpé, Y., St-Arnaud, M., Coughlan, A. P. y Piché, Y. 2002. Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. *Can J. Bot*. 80: 1-20.

Franken, P., Donges, K., Grunwald, U., Kost, G., Rexer, K. H., Tamasloukh, M., Waschke, A., Zeuske, D. 2007. Gene expression analysis of arbuscule development and functioning. *Phytochem*. 68: 68-74.

Franz, C. 1984. Apuntes de catedra: cultivo de plantas medicinales y aromáticas. Technische Universität München-Weihenstephan.

Freiteas, M. S. M., Martins, M. A. y Curcino, V. I. J. 2004. Yield and quality of essential oils of *Mentha arvensis* in response to inoculation with arbuscula mycorrhizal fungi. *Pesquisa Agropecuaria Bras*. 39: 887-894.

Fretes, F. 2010. Plantas medicinales y aromáticas: una alternativa de producción comercial. Agencia del Gobierno de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID), programa Paraguay Vende. 60 pp.

Frost, C. J., Mescher, M. C., Carlson, J. E. y De Moraes, C. M. 2008. Why do distance limitations exist on plant-plant signaling via airborne volatiles? *Plant Signaling and Behavior*. 3: 466-468.

Gang, D. R., Wang, J., Dudareva, N., Hee-Nam, K., Simon, J. E., Lewinsohn, E. y Pichersky, E. 2001. An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. *Plant Physiol*. 125: 539-555.

García, M. A. y Sanz, J. 2001. Analysis of *Origanum vulgare* volatiles by direct thermal desorption coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 918: 189-194.

García-Nieto, L. 2000. Las plantas medicinales y aromáticas: una alternativa de futuro para el desarrollo rural. *Boletín Económico de ICE* N° 2652. Madrid: CATICE. 29-40 pp.

Gardezi, A. K., Cetina, A. V. M., Talavera, M. D., Ferrera-Cerrato, R., Rodríguez, N. F. y Larqué, S. M. 2000. Efecto de inoculación con endomicorriza arbuscular y dosis crecientes de fertilización fosfatada en el crecimiento de Chapulixtle (*Dodonaea viscosa*). *Terra*. 18: 153-159.

Gaur, A. y Adholeya, A. 2005. Diverse Response of five ornamental plant species to mixed indigenous and single isolate arbuscular-mycorrhizal inocula in marginal soil amended with organic matter. *Journal of Plant Nutrition*. 28: 707-723.

George, E., Haussler, K., Vetterlein, G., Gorgus, E. y Marschner, H. 1992. Water and nutrient translocation by hyphae of *Glomus mosseae*. *Can J Bot*. 70: 2130-2137.

Giovannetti, M. y Gaeaninazzi-Pearson, V. 1994. Biodiversity and arbuscular mycorrhizal fungi. *Review Mycology Research*. 98(7): 705-715.

Glick, B. R. 2003. Plant growth promoting bacteria. En: Glick, B.R. and J. J. Pasternak (eds.), *Molecular Biology-Principles and Applications of Recombinant DNA*, 436-54 pp. ASM Press, Washington DC, USA.

Goel, D., Singh, V., Ali, M., Mallavarupu, G. R. y Kumar, S. 2007. Essential oils of petal, leaf and stem of the antimalarial plant *Artemisia annua*. *Journal of Natural Medicines*. 61: 187-191.

Goleniowski, M. y Silva, G. 1993. *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Medicinal and Aromatic Plants*. 3: 41-53.

- Golmakani, M. T. y Rezaei, K. 2008. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of the essential oils from *Thymus vulgaris* L. Food Chem. 109: 925-930.
- González-Chávez, M. C., Ferrera-Cerrato, R. y Pérez-Moreno, J. 1998. Biotecnología de la micorriza arbuscular en fruticultura. Universidad Autónoma de Tlaxcala y Colegio de Posgraduados. 72 pp.
- Gouinguéné, S. P. y Turlings, T. C. J. 2002. The Effects of abiotic factors on induced volatile emissions in Corn Plants. Plant Physiology. 129: 1296-1307.
- Gosling, P., Hodge, A., Goodlass, G., Bending, G. D. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming Agric. Ecosyst. Environ. 113: 17-35.
- Govindarajulu, M., Pfeffer, P. E., Jin, H. R., Abubaker, J., Douds, D. D. y Allen, J. W. 2005. Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Nature. 435: 819-823.
- Graham, J. H. y Miller, R. M. 2004. Micorrizas: Gene to function. Plant and soil. 0: 1-21.
- Gruenwald, S. 2010. The global herbs. Botanical Market. 8: 29-56.
- Guerra, S. B. E. 2008. Micorriza arbuscular: recurso microbiológico en la agricultura sostenible. Tecnología en Marcha. 21: 191-201.
- Guerrieri E., Lingua, G., Digilio, M. C., Massa, N. y Berta, G. 2004. Do interactions between plant roots and the rhizosphere affect parasitoid behaviour? Ecol. Entomol. 29: 753-756.
- Gülluce, M., Sokmen, M., Daferera, D., Agar, G., Ozkan, 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. J. Agric. Food Chem. 51: 3958-3965.
- Harman, G. E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopath. 96: 190-194.
- Harrison, M. J. 1997. The arbuscular mycorrhizal symbiosis. Academic Press Inc. England. ISBN 0-12-325560-0.
- Harris-Valle, C., Esqueda, M., Valenzuela-Soto, E. M. y Castellanos, A. E. 2009. Tolerancia al estrés hídrico en la interacción planta-hongo micorrízico arbuscular: Metabolismo Energético y Fisiología. Revista Fitotecnia Mexicana. 32(4): 265-271.
- Hause, B. y Fester, T. 2005. Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal Symbiosis. Plant. 221: 184-196.

Heil, M. y Ton, J. 2008. Long-distance signalling in plant defense. *Trends Plant Sci.* 13: 264–272

Hernández-Artaza, C. A. 2001. Efecto del hongo micorriza (*Glomus intraradices* Schenk & Smith) en el crecimiento del portainjerto mexícola (*Persea americana* Mill.) cultivado bajo cinco tratamientos de fertilización. Tesis de Licenciatura, Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía, Área de Fruticultura. Quillota, Chile. 95 pp.

Hoitink, H. A. J., Madden, L. V., Dorrance, A. E. 2006. Systemic resistance induced by *Trichoderma* spp.: Interactions between the host, the pathogen, the biocontrol agent, and soil organic matter quality. *Phytopath.* 96: 186-189.

Hounscome, N., Hounscome, B., Tomos, D. y Edwards-Jones, G. 2008. Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. *Journal of Food Science.* 73: 48-65.

Howell, S. H., Lall, S. y Che, P. 2003. Cytokinins and shoot development. *Trends Plant Science.* 8: 453-459.

Jakobsen, I. 1998. Transport of phosphorus and carbón in arbuscular mycorrhizal. En: *Mycorrhiza. Structure, function, molecular biology and biotechnology.* Second edition. Springer. 305-332.

Jakobsen, I., Chen, B., Munkvold, L., Lundsgaard, T. y Zhu, Y. G. 2005. Contrasting phosphate acquisition of mycorrhizal fungi with that of root hairs using the root hairless barley mutant. *Plant Cell and Environment.* 28: 928-938.

Jeliazkova, E. A., Zheljazkov, V. D., Craker, L. E., Yankov, B. y Georgieva, T. 1999. NPK fertilizer and yield of pepper mint *Mentha x piperita*. *Acta Horticulturae.* 502: 231-237.

Jia, Y., Gray, V. M. y Straker, C. J. 2004. The influence of *Rhizobium* and arbuscular mycorrhizal fungi on nitrogen and phosphorus accumulation by *Vicia faba*. *Ann Bot.* 94: 251-258.

Jiménez, M., Alvarenga, S. y Alan, E. 2007. Establecimiento del protocolo de micropropagación para la planta medicinal *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae), *Tecnología en Marcha.* 20(2): 32-40.

Jordán, M. y Casaretto, J. 2006. Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. *Fisiología Vegetal* (F. A. Squeo & L. Cardemil, eds.) Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile. 28 pp.

Jordán, M. J., Martínez, R. M., Goodner, K. L., Balwin, E. A. y Sotomayor, J. A. 2006. Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oil composition. *Industrial Crops and Products*. 24: 253-263.

Juárez, M. A., Elechosa, M. A., Molina, A. C., Viturro, C. I., Heit, C. y López, M. A. 2000. Evaluación de aceites esenciales de *Satureja parvifolia* Phil (Epl) y *Satureja odora* Gris. (Epl) en colectas de Córdoba y San Luis. Variación de la composición. XIII Congreso Nacional de Recursos Naturales Aromáticos y Medicinales (EntreRios 11/00). 32 pp.

Juárez-Rosete, C. R. 2010. Fertilización orgánica e inorgánica en la producción y calidad de aceites esenciales en manzanilla, menta y tomillo. Tesis de doctorado, Colegio de Postgraduados. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 107 pp.

Kakimoto, T. 2003. Biosynthesis of cytokinins. *J Plant Research*. 116: 233-239.

Kaloustian, J., Abou, L., Mikail, C., Amiot, M. J y Portugal, H. 2005. Southern French thyme oils: chromatographic study of chenotipe. *J. Sci. Food. Agr.* 85(14): 2437-2444.

Kan, Y., Uan, U., Kartal, M., Aaltun, L., Aslan, S., Sayar, E. y Ceyhan, T. 2006. GC-MS Analysis and antibacterial activity of cultivated *Satureja cuneifolia* Ten. *Essential Oil. Turk J Chem*. 30: 253-259.

Kapoor, R., Sharma, D., Bhatnagar, A. K. 2008. Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. *Scientia Horticulturae*. 116: 227-239.

Kapoor, R., Chaudhary, V. y Bhatnagar, A. K. 2007. Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on artemisinin concentration in *Artemisia annua* L. *Mycorrhiza*. 17: 581-587.

Karagiannidis, N., Thomidis, T. y Panou-Filotheou, E. 2012. Effects of *Glomus lamellosum* on growth, essential oil production and nutrients uptake in selected medicinal plants. *Journal of Agricultural Science*. 4(3): 137-144.

Keskitalo, M., Pehu, E. y Simon, J. E. 2001. Variation in volatile compounds from tansy (*Tanacetum vulgare* L). related to genetic and morphological differences of genotypes. *Biochemical systematic and Ecology*. 29: 267-285.

Kessler, A. y Baldwin, I. T. 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*. 291: 2141-2144.

Khaosaad, T., Vierheilig, H., Nell, M., Zitterl-Eglsser, K. y Novak, J. 2006. Arbuscular mycorrhiza alter the concentration of essential oils in oregano (*Origanum* sp., Lamiaceae). *Mycorrhiza*. 16: 443-446.

Khazaie, H. R., Nadjafi, F. y Bannayan, M. 2008. Effect of irrigation frequency and planting density on herbage biomass and oil production of thyme (*Thymus vulgaris*) and hyssop (*Hyssopus officinalis*). Ind. Crops Prod. 27: 315-321.

Kirkby, E. A. y Römheld, V. 2007. Macronutrients and micronutrients in plant physiology: functions, uptake and mobility. Proceedings 543, The International Fertilizer Society, United Kingdom.1-20 pp.

Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A. y Yildirim, A. 2005. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *Artemisia dracunculus*, *Artemisia santonicum* and *Artemisia spicigera* essential oils. J. Agric. Food Chem. 53: 9452-9458.

Kuštrak, D., Kuftinec, J., Blažević, N. y Maffei, M. 1996. Comparison of the essential oil composition of two subspecies of *Satureja montana*. J. Essent. Oil Res. 11: 7-13

Lange, D. 2006. International trade in medicinal and aromatic plants. En Medicinal and aromatic plants. Agricultural, commercial, ecological, legal, pharmacological and social aspects. Bogers, R., Craker, L, Lange, D (Ed). Springer.309 pp.

Larose, G., Chenevert, R., Moutoglou, P., Gagne, S., Piché, Y. y Vierheilig, H. 2002. Flavonoid levels in roots of *Medicago sativa* are modulated by the developmental stage of the symbiosis and the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus. J Plant Physiol. 159: 1329-1339.

Lewinsohn, E., Ziv-Raz, I., Dudai, N., Tadmor, Y., Lastochkin, E., Larkov, O., Chaimovitch, D., Ravid, U., Putievsky, E., Pichersky, E. y Shoham, Y. 2000. Biosynthesis of estragole and methyl-eugenol in sweet basil (*Ocimum basilicum* L). Developmental and chemotypic association of allylphenol O-methyltransferase activities. Plant Science. 160: 27-35.

Lou, Y. G., Ma, B. y Cheng, J. A. 2005. Attraction of the parasitoid *Anagrus nilaparvatae* to rice volatiles induced by the rice brown planthopper *Nilaparvata lugens*. J. Chem. Ecol. 31: 2357-2372.

Maier, W., Peipp, H., Schmidt, J., Wray, V. y Strack, D. 1995. Levels of a terpenoid glycoside (blumenin) and cell wall-bound phenolics in some cereal mycorrhizas. Plant Physiol. 109: 465-470.

Marín-Loaiza, J. C. y Céspedes, C. L. 2007. Compuestos volátiles de plantas: origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones al agro. Revista Fitotecnia Mexicana. 30 (4): 327-351.

- Marschner, P. y Timonen, S. 2005. Interactions between plant species and mycorrhizal colonization on the bacterial community composition in the rhizosphere. *Applied Soil Ecology*. 28: 23-36.
- Martínez, M. S. 1986. Plantas Medicinales Jardín Botánico Michoacano "Melchor Ocampo". Serie Técnica N0 7, 3ra Comisión Forestal. Michoacán, México.
- Marulanda, A., Azcón, R. y Ruiz-Lozano, J. M. 2003. Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* plants under drought stress. *Physiol. Plant*. 119: 526-533.
- Mathimaran, N., Ruh, R., Vulllioud, P., Frossard, E. y Jansa, J. 2005. *Glomus intraradices* dominates arbuscular mycorrhizal communities in a heavy textured agricultural soil. *Mycorrhiza*. 16: 61-66.
- McConkey, M. E., Gerhenzon, J. y Croteau, R. B. 2000. Developmental regulation of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of peppermint. *Plant Physiology*. 122: 215-223.
- McVaugh, R. y Schmid, R. 1967. Novelties in *Satureia* Sect. *Gardoquia* (Labiatae). *Brittonia*. 19: 261-267.
- Melgares de Aguilar, J., González-Martínez, D., Gutiérrez, A., Honrubia, M., Morte, A. 2004. Efectos del hongo endomicorrícico *Glomus intraradices* en el cultivo ecológico de lechuga tipo Iceberg. VI Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica, Almería, España. 1-6 pp.
- Mena-Violante, H. G., Ocampo-Jiménez, O., Dendooven, L., Martínez-Soto, G., González-Castañeda, J., Davies, F. T. y Olalde-Portugal, V. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance fruit growth and quality of chile ancho (*Capsicum annuum* L. cv "San Luis") plants exposed to drought. *Mycorrhiza*. 16: 261-267.
- Miloš, M., Radonić, A., Bezić, N. y Dunkinć, V. 2001. Localities and seasonal variations in the chemical composition of essential oils of *Satureja montana* L. and *Satureja cuneifolia* Ten. *Flav.Fragr. J.* 16: 157-160.
- Misra, A., Dwivedi, S., Srivastava, A. K., Tewari, D. K., Khan, A. y Kumar, R. 2006. Low iron stress nutrition for evaluation of Fe-efficient genotype physiology, photosynthesis, and essential monoterpene oil(s) yield of *Ocimum sanctum*. *Photosynthetica*. 44(3): 474-477.
- Mohamed, M. y Abdum, A. A. 2004. Growth and oil production of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill): effect of irrigation and organic fertilization. *Biol. Agric. Hortic.* 22 (1): 31-39.
- Mohammad, M. J., Pan, W. L., Kennedy, A. C. 2005. Chemical alteration of the rhizosphere of the mycorrhizal-colonized wheat root. *Mycorrhiza*. 15: 259-266.

Molina, A., Viturro, C. I. y Campos, E. 2002. Estudio de volátiles de *Saturejas* sp por Micro Extracción en Fase Sólida. Congreso Regional de Ciencia y Tecnología NOA 2002. Catamarca, Argentina. 1-6 pp.

Monzon, A. y Azcon, R. 2001. Growth responses and N and P use efficiency of three *Alnus* species as affected by arbuscular-mycorrhizal colonization. Plant Growth Regulation. 35: 97-104.

Morandi, D. 1996. Occurrence of phytoalexins and phenolic compounds in endomycorrhizal interactions, and their potential role in biological control. Plant Soil. 185: 241-251.

Moré, E., Fanlo, M., Melero, R., Cristóbal, R. 2010. Guía para la producción sostenible de plantas aromáticas y medicinales. Centro Tecnológico Forestal de Cataluña, Productos Secundarios del Bosque, Solsona. 11-127 pp.

Moré, P. E. y Colom, G. A. 2002. Distribución comercial de plantas aromáticas y medicinales en Cataluña. Investigación. Agraria: Producción y Protección Vegetales. 17 (1): 44-66.

Morone-Fortunato, I. y Avato, P. 2008. Plant development and synthesis of essential oils in micropropagated and mycorrhiza inoculated plants of *Origanum vulgare* L. ssp. Hirtum (Link) Ietswaart. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 93: 139-149.

Mucciarelli, M., Scannerini, S., Berteà, C. y Maffei, M. 2003. *In vitro* and *in vivo* peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization. New Phytol. 158: 579-591.

Muñoz, L. B. F. 2002. Plantas medicinales y aromáticas: Estudio, cultivo y procesado. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 365 pp.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. Phys. Plant. 15: 473-493.

Muruyama, T., Saeki, D., Ito, M. y Honda, G. 2002. Molecular cloning, functional expression and characterization of d-Limonene synthase from *Agastache rugosa*. Biol. Pharm. Bull. 25: 661-665.

Naghdi-Badi, H., Yazdani, D., Mohammad, A. S. y Nazari, F. 2004. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. Industrial Crops and Products. 19: 231-236.

Napierale-Filipiak, A., Werner, A., Mardarowicz, M. y Gawdzik, J. 2002. The effects of heavy metals, content of nutrients and inoculation with mycorrhizal fungi on the

level of terpenoids in roots of *Pinus sylvestris* seedlings. *Acta Physiol Plant.* 24: 137-143.

Nassiff, A. A. E., Ricciardi, G. A. L., Torres, A. M. y Ricciardi, A. I. A. 2004. Contenido en pulegona de la infusión de *Mentha pulegium* L. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. 3 pp.

Nassiff, A. A. E., Torres, A. M., Ricciardi, G. A. L. y Ricciardi, A. I. A. 2002. Aceite esencial de *Mentha pulegium* L. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. 2 pp.

Omidbaigi, R. y Arjmandi, A. 2002. Effects of NP supply on growth, development, yield and active substances of garden thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Acta Horticulturae.* 576: 263-265.

Omidbaigi, R. y Hornok, L. 1992. Effect of N-fertilization on the production of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Acta Horticulturae.* 306: 249-252.

Ordookhani, K., Sharafzadeh, S. H. y Zare, M. 2011. Influence of PGPR on growth, essential oil and nutrients uptake of Sweet basil. *Adv. Environ. Biol.* 5(4): 672-677.

Palacio, L., Lloret, C. V., Baeza, C., Ortiz, L., Brunetti, P., Cantero, J. J. y Goleniowski, M. 2007. Determinación de metabolitos de interés farmacológico en plantas micropropagadas de *Larrea divaricata* Cav. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* 6(6): 405-406.

Parra-Garcés, M. I., Caroprese-Araque, J. F., Arrieta-Prieto, D. y Stashenko, E. 2010. Morfología, anatomía, ontogenia y composición química de metabolitos secundarios en inflorescencias de *Lippia alba* (Verbenaceae). *Rev. Biol. Trop.* 58 (4): 1533-1548.

Pavlovič, A., Masarovičová, E., Král'ová, K. y Kubova, J. 2006. Response of chamomile plants (*Matricaria recutita* L.) to cadmium treatment. *Bulletin of Environmental contamination and Toxicology.* 77(5): 763-771.

Peñuelas, J. y Llusià, J. 2003. BVOCs: plant defense against climate warming? *Trends Plant Sci.* 8: 105-108.

Pérez, C. R. 2009. Frutas y hortalizas orgánicas de la red de mercados y tianguis orgánicos de México. *Estudio del Sial. Claridades Agropecuarias.* 194: 35-45.

Pérez-Gutiérrez, R. M. y Gallardo-Navarro, Y. T. 2010. Antioxidant and hepatoprotective effects of the methanol extract of the leaves of *Satureja macrostema*. *Pharmacogn Mag.* 6(22): 125–131.

Pichersky, E. 2004. Plant scents. *Am.Sci.* 92: 514-521.

Qiang-Sheng, W., Ren-Xue, X., Ying-Ning, Z. y Gui-Yang, W. 2007. Osmotic solute responses of mycorrhizal citrus (*Poncirus trifoliata*) seedlings to drought stress. *Acta Physiol. Plant.* 29: 543-549.

Radjacommaré, R., Venkatesan, S. y Samiyappan, R. 2010. Biological control of phytopathogenic fungi of vanilla through lytic action of *Trichoderma* species and *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology and Plant Protection.* 43(1): 1-17.

Ramak, P., Sharifi, M., Kazempour, O. S., Ebrahimzadeh, H. y Behmanesh, M. 2011. Studies on seed germination and *in vitro* shoot multiplication of *Satureja khuzistanica* Jamzad, an important medicinal plant. *African Journal of Biotechnology.* 10(83): 19407-19414.

Ramesh, K. y Singh, V. 2008. Effect of planting date on growth, development, aerial biomass partitioning and essential oil productivity of wild marigold (*Tagetes minuta*) in mid hills of Indian western Himalaya. *Industrial Crops and Products.* 27: 380-384.

Rapparini, F., Llusà, J. y Penuelas, J. 2008. Effect of arbuscular mycorrhizal (AM) colonization on terpene emission and content of *Artemisia annua* L. *Plant Biol.* 10: 108-122.

Rausch, C. y Baucher, M. 2002. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Plant.* 216: 23-37.

Reyes-Sanchez, F. L. 2008. Contribución de *Glomus intraradices* en la producción y calidad de frutos de plantas de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) cultivadas con dos niveles de nitrógeno y disponibilidad hídrica. Tesis de Licenciatura, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México. 56 pp.

Ribeiro-Affonso, V., Ribeiro-Bizzo, H., Santos de Lima, S., Aparecida-Esquivela, M. y Sato, A. 2007. Solid Phase Microextraction (SPME) Analysis of volatile compounds produced by *in vitro* shoots of *Lantana camara* L. under the Influence of auxins and cytokinins. *J. Braz. Chem. Soc.* 18(8): 1504-1508.

Robertson, S. J., McGill, W. B., Massicote, H. B. y Rutherford, P. M. 2007. Petroleum hydrocarbon contamination in boreal forest soils: a mycorrhizal ecosystems perspective. *Biological Reviews.* 82: 213-240.

Rohloff, J., Dragland, S., Mordal, R. y Iversen, T. H. 2005. Effect of harvest time and drying method on biomass production, essential oil yield and quality of peppermint (*Mentha x piperita* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 53: 4143-4148.

Röhricht, C., Solf, M. y Grunert, M. 1995. Der Einfluss einer gestaffelten Stickstoffdüngung auf Ertrag und Qualität von echtem Salbei (*Salvia officinalis* L.);

Fachtagung Heil- und Gewürzpflanzen; Kurzfassung der Referate und Poster; Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau. 14-15 pp.

Rodríguez, V. M. 1998. Flavonoides de la fase butanólica de la *Satureja macrostema*. Tesis de Licenciatura, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Rodríguez, J. S. y Espinosa, G. J. 1996. Listado florístico del Estado de Michoacán. Sección III. En: Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo complementario X. Instituto de Ecología A. C. Centro Regional del Bajío. Pátzcuaro, Michoacán, México. Conacyt. UMSNH. Conabio.

Ruíz-Lozano, J. M., Azcón, R. y Gómez, M. 1995. Effects of arbuscular mycorrhizal *Glomus* species on drought tolerance: physiological and nutritional plant responses. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 456-460.

Ruíz-Nova, C. A. 2008. Estudio de los metabolitos secundarios volátiles de *Lippia organoides* H.B.K., en tres estados fenológicos. Tesis de Licenciatura. Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química Bucaramanga. 140 pp.

Rzedowski, J. y Rzedowski, G. 1985. Flora Fanerogámica del Valle de México. Volumen II. ENCB-INE. 674 p.

Salamon, I. 2007. Effect of the internal and external factors on yield and qualitative-quantitative characteristics of chamomile essential oils. *Acta Horticulturae*. 749: 45-64.

Sánchez de la Cruz, R., Díaz-Franco, A., Pecina-Quintero, V., Garza-Cano, I. y Loera-Gallardo, J. 2008. *Glomus intraradices* y *Azospirillum brasilense* en trigo bajo dos regímenes de humedad en el suelo. *Universidad y Ciencia*. 24(3): 239-245.

Sangwan, N. S., Farooqi, A. H. A., Shabih, F. y Sangwan, R. S. 2001. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*. 34(1): 3-21.

Santana, N. 1993. Embriogénesis somática en el cultivo del café (*Coffea* sp.). Tesis de doctorado en Ciencias Agrícolas, INCA, San José de Las Lajas, CUBA. 124 p.

SEMARNAP. 2000a. Proyecto de conservación y manejo sustentable de recursos forestales en México. PROCYMAF. SEMARNAP. México. (<http://beta.Semarnap.gob.mx/pfnm/medicinal.html>)

SEMARNAP. 2000b. Proyectos de productos forestales no maderables no tradicionales. PFNM. SEMARNAP. México. (<http://beta.Semarnap.gob.mx/pfnm/medicinal.html>)

Serrato, B. B. E., Bello, G. M. A., Del Río, R. E., Calderón, M. J. C. y Salgado-Garciglia, R. 2004. Evaluación biológica y elucidación estructural de un principio activo de *Satureja macrostema* (Benth) Briq. XIII Congreso Italolatinoamericano de etnomedicina. SILAE, Salerno, Italia.

Sheng, M., Tang, M., Chen, H., Yang, B., Zhang, F. y Huang, Y. 2008. Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza*. 18: 287-296.

Siddiqui, Z. A., Akhtar, M. S. 2008. Synergistic effects of antagonistic fungi and a plant growth promoting rhizobacterium, an arbuscular mycorrhizal fungus, or composted cow manure on populations of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. *Biocontrol Sci. Techn.* 18(3): 279-290.

Simon, J. E., Chadwick, A. F. y Craker, L. E. 1984. Herbs: An Indexed Bibliography. 1971-1980. The Scientific Literature on Selected Herbs, and Aromatic and Medicinal Plants of the Temperate Zone. Archon Books, 770 pp., Hamden, CT.

Skočibušić, M., Bezić, N. y Dunkić, V. 2004. Variability of *Satureja cuneifolia* Ten. Essential oils and their antimicrobial activity depending on the stage of development. *European Food Research and Technology*. 218: 367-371.

Skočibušić, M. 2003. Chemical composition and antimicrobial variability of *Satureja montana* L. Essential oils produced during ontogenesis. *Journal of Essential Oil Research*. 16: 387-391.

Skočibušić, M. y Bezić, N. 2003. Chemical composition and antidiarrhoeal activities of Winter Savory (*Satureja montana* L.). *Essential Oil. Pharmaceutical Biology*. 41: 622-626.

Skočibušić, M. y Bezić, N. 2004. Phytochemical analysis and *in vitro* antimicrobial activity of two *Satureja* species essential oils. *Phytotherapy Research*. 18: 967-970.

Smith, S. E. y Read, D. J. 1997. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press. Cambridge, MA, EEUU. 605 pp.

Soheil, S. y Rodney, B. 2003. Menthofuran regulates essential oil biosynthesis in peppermint by controlling a downstream monoterpene reductase. *PNAS*. 100: 14481-14486.

Solouki, M., Mehdikhani, H., Zeinali, H. y Emamjomeh, A. A. 2008. Study of genetic diversity in chamomile (*Matricaria chamomilla*) based on morphological traits and molecular markers. *Scientia Horticulturae*. 117: 281-287.

Soto, R., Vega, G. y Tamajon, A. 2002. Instructivo técnico del cultivo de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf (Caña Santa). Rev. Cub. Plant. Medic. 7: 1-11.

Standley, P. C. 1924. Trees and Shrubs of México. Contributions from the United States National Herbarium. Volume 23, part. 4. Smithsonian Institution. United States National Museum. Washington, D.C. USA.

Steeghs, M., Bais, H. P., de Gouw, J., Goldan, P., Kuster, W., Northway, M., Fall, R. y Vivanco, J. M. 2004. Proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS) as a new tool for real time analysis of root secreted volatile organic compounds (VOCs) in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 135: 47-58.

Tétényi, P. 2002. Chemical variation (Chemodifferentiation) in medicinal and aromatic plants. Acta Horticulturae. 576: 15-23.

Tilak, K. V. B. R. y Reddy, B. S. 2006. *B. cereus* and *B. circulans* novel inoculants for crops. Curr. Sci. 5: 642-644.

Tobar, R., Azcón, R. y Barea, J. M. 1994. Improved nitrogen uptake and transport from ¹⁵N-labelled nitrate by external hyphae of arbuscular mycorrhizal under water-stressed conditions. New Phytologist. 126: 119-122.

Torelli, A., Trotta, A., Acerbi, L., Arcidiacono, G., Berta, G. y Branca, C. 2000. IAA and ZR content in leek (*Allium porrum* L.) as influenced by P nutrition and arbuscular mycorrhizae, in relation to plant development. Plant Soil. 226: 29-35.

Toussaint, J. P., Smith, A. y Smith, E. 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi can induce the production of phytochemicals in sweet basil irrespective of phosphorus nutrition. Mycorrhiza. 17: 291-297.

Trejo, T. G. y Rodríguez, M. M. 2007. La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales *in vitro*. Interciencia. 32: 669-674.

Turgut, D. N. y Silva, V. R. 2005. Effect of water stress on thymol and carvacrol concentrations in Mexican oregano grown under controlled conditions. Journal of Applied Horticulture. 7(1): 20-22.

Usha, K., Mathew, R. y Singh, B. 2005. Effect of three species of arbuscular mycorrhiza on bud sprout and ripening in grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. Perlette. Biological Agriculture and Horticulture. 23: 73-83.

Van-Bel, A. J. E. y Gaupels, F. 2004. Pathogen-induced resistance and alarm signals in the phloem. Molecular Plant Pathology. 5(5): 495-504.

Vaughn, S. F. 2001. Plant volátiles. En Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. 1-6 pp.

- Velasco, J. V., Ferrera-Cerrato, R. y Suárez, J. J. A. 2001. Vermicomposta, micorriza arbuscular y *Azospirillum brasilense* en tomate de cáscara. Terra. 19: 241-248.
- Ventura, Q. O. 2010. Las plantas aromáticas y medicinales (PAM): una alternativa para los ecosistemas de montaña en el Perú. Centro de Estudios para el Desarrollo y la Participación (CEDEP). Primera edición. Lima, Perú. 10-153 pp.
- Vierheilig, H., Bennett, R., Kiddle, G., Kaldorf, M. y Ludwig-Müller, J. 2000. Differences in glucosinolate patterns and arbuscular mycorrhizal status of glucosinolate-containing plant species. New Phytol. 146: 343-352.
- Vierheilig, H., Coughlan, A. P., Wyss, U. y Piché, Y. 1998. Ink and Vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. Appl. Environ. Microbiol. 12: 5004-5007.
- Villa-Patricio, M. C. 2012. Micropropagación de nurite [*Satureja macrostema* (Benth.) Briq.]. Tesis de Lic., Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 45 p.
- Villalobos-Arámbula, A. V. 1994. Historia del cultivo de tejidos. En: Fundamentos teóricos-prácticos del cultivo de tejidos vegetales (Rossell C. H. y Villalobos A. V. M., Eds). FAO, 105:3-7.
- Villarino, V.T. 1999. Las plantas de extractos bases para un plan de desarrollo del sector. Primera edición. Editorial Mundi-prensa, Fundación Alfonso Martín Escudero. España.
- Vittal-Navi, H., Shivakumar, B. S., Suresh, C. K. y Earanna, N. 2006. Effect of *Glomus fasciculatum* and plant growth promoting rhizobacteria on growth and yield of *Ocimum basilicum*. Karnataka J. Agric. Sci. 19: 17-20.
- Vituro, C. I., Molina, A. C., De Arias, A., Inchausti, A., Juárez, M. y Fournet, A. 2000. Composición química y actividad antiparasitaria de AE de *Satureja odora* y *Satureja parvifolia* del centro de Argentina. XXIV Congreso Latinoamericano de Química. Lima-Perú. 64 pp.
- Vogel, H. y Berti, M. 2003. Como producir y procesar plantas medicinales y aromáticas de calidad. Fundación para la Innovación Agraria. Ministerio de Agricultura. Santiago, Chile. 3-169 pp.
- Walter, M. H., Fester, T. y Strack, D. 2000. Arbuscular mycorrhizal fungi induce the non-mevalonate methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis correlated with accumulation of the 'yellow pigment' and other apocarotenoids. Plant J. 21: 571-578.

Wang, M. y Lincoln, D. E. 2004. Effects of light intensity and artificial wounding on monoterpene production in *Myrica cerifera* from two different ecological habitats. Canadian Journal of Botany. 82: 1501-1508.

Watson, L. y Dallwitz, M. J. 1992. The Families of Flowering Plants: Descriptions, Identification, and Information retrieval. Versión: [http:// biodiversity.uno .edu/ delta/](http://biodiversity.uno.edu/delta/).

Weiss, M., Mikolajewski, S., Peipp, H., Schmidt, J., Wray, V. y Strack, D. 1997. Tissue-specific and development-dependent accumulation of phenylpropanoids in larch mycorrhizas. Plant Physiol. 114: 15-27.

Werner, A., Napierala-Filipiak, A., Mardarowicz, M. y Gawdzik, J. 2004. The effect of two substrates differing in the amount of toxic metals and nutrients on the content of volatile organic compounds in root of *Pinus sylvestris*. Acta Physiol Plant. 26: 187-196.

Yao, M. K., Désilets, H., Charles, M. T., Boulanger, R. y Tweddell, R. J. 2003. Effect of mycorrhization on the accumulation of rhishitin and solavetivone in potato plantlets challenged with *Rhizoctonia solani*. Micorrhiza. 13: 333-336.

Zengin, M., Özcan, M. M., Çetin, Ü. y Gezgin, S. 2008. Mineral contents of some aromatic plants, their growth soils and infusions. Journal of the Science of Food and Agriculture. 88: 581-589.

Zepeda, G. S., Ambriz, P. E., Dasgupta-Schuber, N. y Villegas-Moreno, H. J. A. 2010. Efecto de la interacción *Glomus intraradices*-Nitrógeno sobre el pH, acumulación de fósforo y desarrollo de *Tagetes erecta* L. bajo condiciones de agobio hídrico. Biológicas. 12(1): 52-56.

Zheljaskov, V. D., Cantrell, C. L., Astatkie, T. y Ebelhar, M. W. 2010. Aromatic plant production on metal contaminated soils. Agronomy Journal. 102: 124-128.

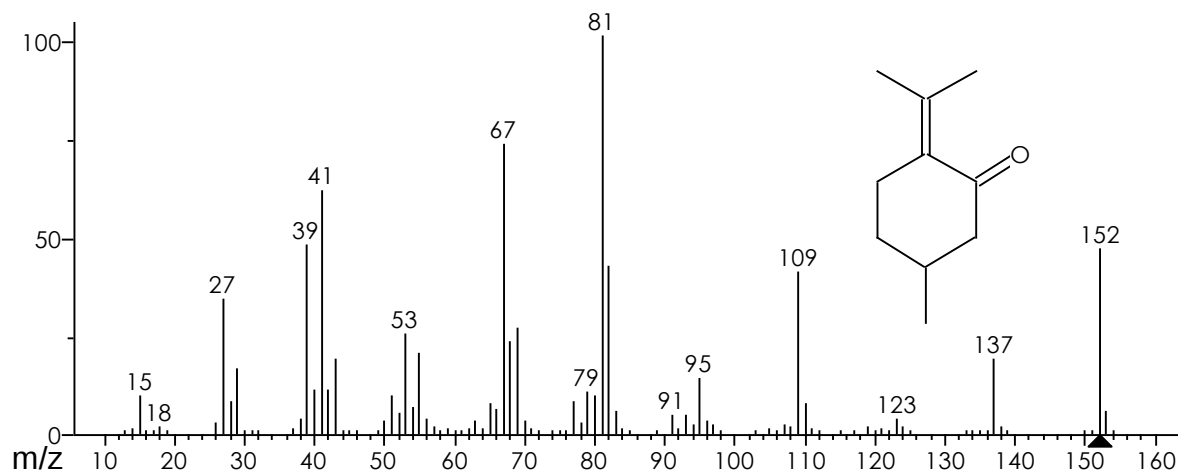
Zheljaskov, V. D., Cerven, V., Cantrell, C. L., Ebelhar, W. M. y Horgan, T. 2009. Effect of nitrogen, location and harvesting stage on peppermint productivity, oil content, and oil composition. Hort Science. 44(5): 1267-1270.

Zhu, H. H. y Yao, Q. 2004. Localized and systematic increase of phenols in tomato roots induced by *Glomus versiforme* inhibits *Ralstonia solanacearum*. J Phytopathol. 152: 537-542.

Zhu, Z., Liang, Z., Han, R. y Dong, J. 2008. Growth and saikosaponin production of the medicinal herb *Bluperum chinese* D. C. under different levels of nitrogen and phosphorus. Industrial Crops and Products.

13. ANEXOS

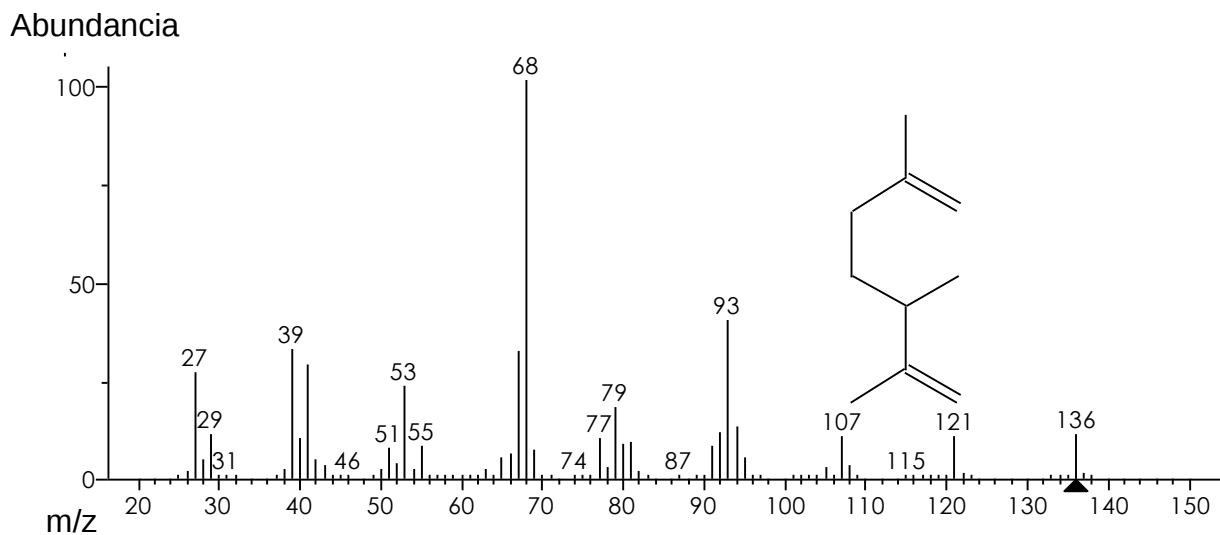
Abundancia



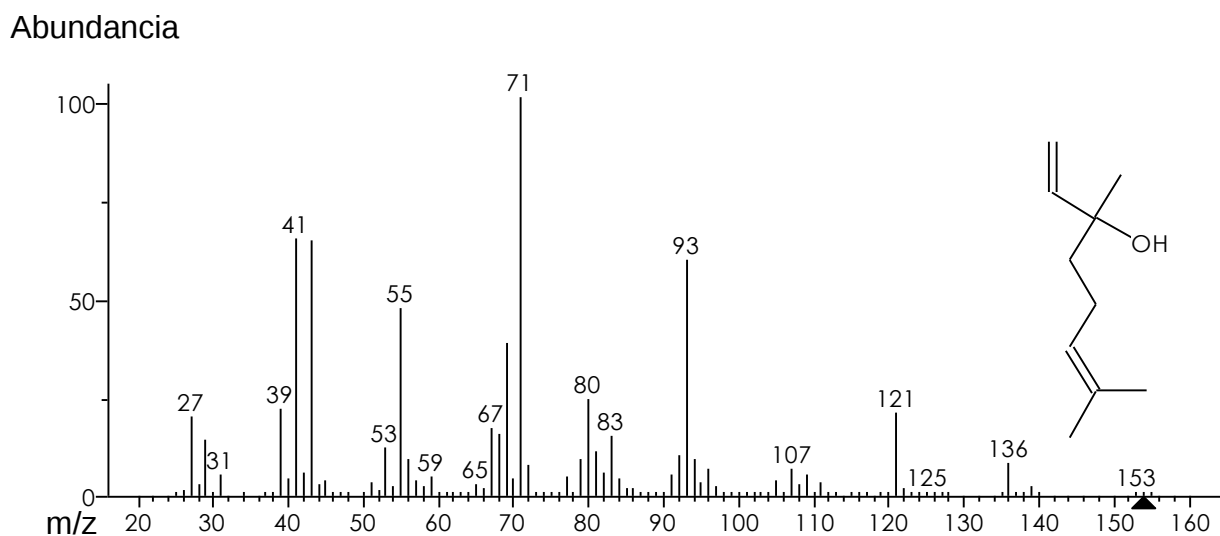
Anexo I. Espectro de masas del compuesto volátil pulegona, presente en los extractos hexánicos de plantas de nurite (*S. macrostema*) *in vitro*, cultivadas en invernadero e *in situ* (campo), identificado con la biblioteca NIST 08.

Plántula	Contenido de Pulegona ($\mu\text{g/g}$ peso fresco)
NU 1	1.54
NU 2	1.76
NU 3	1.51
NU 4	1.90
NU 5	1.47
NU 6	1.54
NU 7	1.55
NU 8	1.20
NU 9	1.48
NU 10	1.55
Promedio	1.55

Anexo II. Contenido de pulegona en plántulas micropropagadas de nurite (*S. macrostema*), a los 90 días de cultivo *in vitro*.

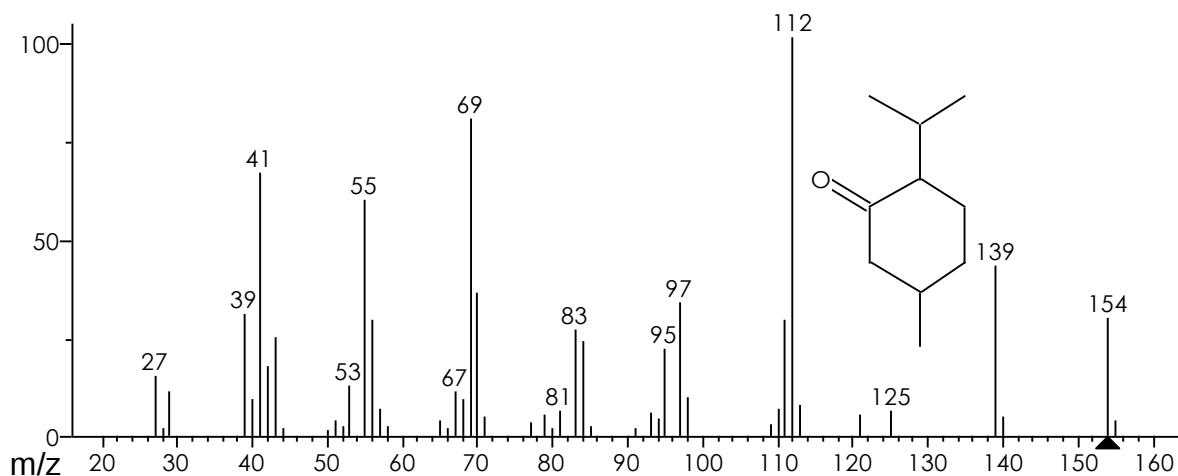


Anexo III. Espectro de masas del compuesto volátil limoneno, presente en los extractos hexánicos de plantas de nurite (*S. macrostema*) cultivadas en invernadero e *in situ* (campo), identificado con la biblioteca NIST 08.



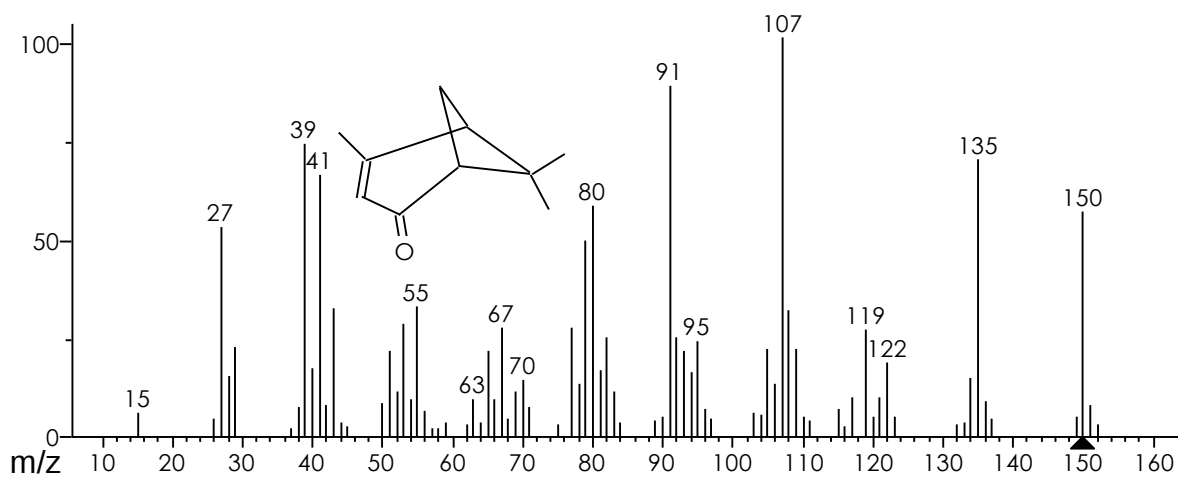
Anexo IV. Espectro de masas del compuesto volátil linalol, presente en los extractos hexánicos de plantas de nurite (*S. macrostema*) cultivadas en invernadero e *in situ* (campo), identificado con la biblioteca NIST 08.

Abundancia



Anexo V. Espectro de masas del compuesto volátil mentona, presente en los extractos hexánicos de plantas de nurite (*S. macrostema*) cultivadas en invernadero e *in situ* (campo), identificado con la biblioteca NIST 08.

Abundancia



Anexo VI. Espectro de masas del compuesto volátil verbenona, presente en los extractos hexánicos de plantas de nurite (*S. macrostema*) cultivadas en invernadero e *in situ* (campo), identificado con la biblioteca NIST 08.