

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA



Efecto de la aplicación exógena del ácido giberélico y del ácido jasmónico sobre la síntesis de terpenos en *Lippia graveolens* Kuhn.

TESIS

que para obtener el título de biólogo presenta:

Hernández Correa Eduardo

Directora de tesis:

M. en C. Vázquez Medrano Josefina

México, 2015

Los Reyes Iztacala, Estado de México



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A mi tutora la M. en C. Josefina Vázquez Medrano por su paciencia (más de una vez de las que me desaparecía del laboratorio por largo tiempo, me preguntaba si ya habían tirado mis plantitas y nunca fue así), por su tiempo (porque cuando iba al laboratorio siempre tuvo la mejor disposición para ayudarme, incluso si tenía trabajo), por su dirección y consejos. Todos los trabajos que haga como si fuera un sello, siempre van a tener impreso parte de lo que aprendí de usted. Profesora es una excelente persona a seguir

A la Dra. Amanda Moreno Rodríguez por compartir sus conocimientos y por sus aportaciones, sin las cuales este trabajo no hubiera sido el mismo

Al M. en C. Rafael Quintanar Zuñiga por su tiempo, colaboración y apoyo para poder utilizar el MEB

Al M. en C. Luis Barbo Hernández Padilla por su tiempo y apoyo para poder utilizar el CG-EM

Al Dr. Elías Piedra Ibarra por sus constantes motivaciones y por reconocer siempre mi compromiso y mi esfuerzo

A mis sinodales por tomarse el tiempo de revisar este trabajo

M. en C. Alberto Arriaga Frías

Dra. Ana María García Bores

Dr. Hugo Virgilio Perales Vela

Dr. Cesar Mateo Flores Ortiz

A toda mi familia y a mis amigos por su apoyo y por alentare a seguir, en especial a mi mamá

Índice de Contenido

Resumen.....	5
1. Introducción.....	7
1.1 Lippia graveolens	7
1.2 Nombres comunes	7
1.3 Descripción botánica	7
1.4 Propagación	8
Uso de giberelinas.....	9
1.5 Aceite esencial	10
Herbivorismo	11
2. Hipótesis.....	13
3. Objetivos	13
3.1 Objetivos generales.....	13
3.2 Objetivos particulares	13
4. Material y métodos	14
4.1 Ubicación y características de la zona de estudio.....	14
4.2 Primer experimento: Aplicación del AG ₃	15
4.3 Segundo experimento: Aplicación del AJ	17
5. Resultados y discusión.....	21
5.1 Experimento 1: Aplicación de AG ₃	21
5.1.1 Germinación	21
5.1.2 Biomasa	26
5.1.3 Índice vástago-raíz (V-R).....	27
5.1.4 Terpenos	28
5.2 Experimento 2: Aplicación de AJ.....	29
5.2.1 Parámetros fotosintéticos e intercambio gaseoso	29
5.2.2 Pigmentos fotosintéticos.....	31
5.2.3 Número de tricomas glandulares por área	32
5.2.4 Terpenos	34
6. Conclusiones.....	47
7. Bibliografía	48

Índice de Figuras

Figura 1. Ubicación geográfica del poblado de San Rafael, con referencia a la reserva de la Biósfera Valle de Tehuacán-Cuicatlán.....	15
Figura 2. Diagrama de flujo del experimento 1. Aplicación de AG3.	16
Figura 5. Semilla de <i>L. graveolens</i> proveniente de un individuo silvestre	21
Figura 7. Porcentaje acumulado de germinación de semillas de <i>L. graveolens</i> , sin imbibición y con AG3 diluido en el medio (0, 150, 250 y 350 mgL ⁻¹).....	22
Figura 6. Porcentaje acumulado de germinación de semillas de <i>L. graveolens</i> , con 0, 6 y 12 h de imbibición.....	23
Figura 8. Porcentaje acumulado de germinación de semillas de <i>L. graveolens</i> , con 6 h de imbibición y concentraciones de AG ₃ (0, 150, 250 y 350 mgL ⁻¹)	24
Figura 9. Porcentaje acumulado de germinación de semillas de <i>L. graveolens</i> , con 12 h de imbibición y concentraciones de AG ₃ (0, 150, 250 y 350 mgL ⁻¹)	24
Figura 10. Biomasa de plántulas de 25 días de edad de <i>L. graveolens</i>	26
Figura 11. Plántulas de <i>L. graveolens</i> con 25 días de edad.....	26
Figura 12. Índice vástago/raíz de plántulas de 25 días de edad de <i>L. graveolens</i>	27
Figura 13. Acumulación de terpenos en plántulas de 25 días de edad de <i>L. graveolens</i>	28
Figura 14. Parámetros fotosintéticos e hídricos de plantas de <i>L. graveolens</i>	30
Figura 15. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos de la parte apical y basal de <i>L. graveolens</i>	31
Figura 16. Número de tricomas de la parte apical y basal del haz y del envés de <i>L. graveolens</i>	33
Figura 17. Tricomas glandulares	34
Figura 18. Cromatograma obtenido en CG-EM de extracto hexánico de hojas de un individuo de <i>L. graveolens</i>	35
Figura 19. Acumulación de terpenos totales	36
Figura 20 Acumulación de α-pineno.....	37
Figura 21. Acumulación de camfeno	37
Figura 22 Acumulación de β-terpineno.....	38
Figura 23 Acumulación de 4(10)thujeno.....	38
Figura 24. Acumulación de β-mirceno.....	39
Figura 25. Acumulación de limoneno	39
Figura 26. Acumulación de α-felandreno.....	40
Figura 27. Acumulación de p-cimeno	40
Figura 28. Acumulación de α-terpineno.....	41
Figura 29. Acumulación de eucaliptol.....	41
Figura 30. Acumulación de α-felandreno.....	42
Figura 31. Acumulación de cariofileno	43
Figura 32. Acumulación de α-cariofileno	43

Resumen

México es uno de los mayores exportadores de orégano en el mundo, con 35-40% del mercado internacional, el cual se extrae principalmente de poblaciones silvestres, entre ellas las poblaciones de *L. graveolens*, las cuales se han ido reduciendo, por lo que es importante estudiar los aspectos de reproducción y propagación. El ácido giberélico ha sido usado ampliamente como promotor de la germinación en gran cantidad de estudios debido a que posee dos mecanismos de acción que promueven la germinación de la semilla, el primero un efecto estimulante sobre el crecimiento del embrión y el segundo es la inducción de la expresión de genes que codifican enzimas hidrolizantes del endospermo. Por otro lado, es necesario conocer los factores involucrados en la producción de altos niveles de los componentes del aceite esencial. Uno de los principales factores bióticos que determinan la composición del aceite esencial es el herbivorismo. En las respuestas de las plantas ante las heridas por herbivorismo participa el ácido jasmónico; uno de sus efectos en las plantas es el incremento en la producción de compuestos de defensa, como alcaloides, fenoles, flavonoides y terpenos. Por lo cual el primer objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del ácido giberélico como promotor de la germinación de semillas de *L. graveolens* y en la biomasa y acumulación de terpenos en la plántula y el segundo objetivo fue evaluar el efecto del ácido jasmónico en el contenido y composición de terpenos en plantas de *L. graveolens*, así como el número de tricomas y examinar las respuestas fotosintéticas. Para lo cual en octubre del 2011 se colectaron semillas de *L. graveolens* de la comunidad de San Rafael, Coaxcatlan, Puebla; las cuales se desinfectaron y en un primer experimento se les aplicaron concentraciones de 0, 150, 250 y 350 mgL⁻¹ de ácido giberélico de dos distintas maneras, bajo 3 tiempos de imbibición 0, 6 y 12 horas. Se monitoreo la germinación y a los 25 días de haber germinado se evaluó la biomasa y el contenido de terpenos. En un segundo experimento, a plantas de un año de edad se les aplicaron 0, 0.1 y 1 mM de ácido jasmónico sobre 5 hojas de una rama. A las 0, 8, 24 y 48 horas se evaluaron parámetros fotosintéticos y el contenido de terpenos tanto de la parte apical y basal y a los 8 días se cuantificó el número de tricomas. Para ambos experimentos se aplicó un análisis de varianza y una prueba LSD cuando se requirió. En el primer experimento se obtuvo un 90% de germinación al embeber las semillas por 12 horas sin ácido giberélico. A mayor concentración de dicho compuesto menor es el porcentaje de germinación, no obstante, una imbibición por 12 horas con 250 mgL⁻¹ de ácido giberélico provocó en la plántula un incremento en la biomasa aérea y en el contenido de timol, por otro lado, embeber las semillas por 6 y 12 horas resultó en un mayor contenido de biomasa en la parte radicular. En el segundo experimento la aplicación de 0.1 y 1 mM de ácido jasmónico no tuvo un efecto perjudicial sobre los parámetros fotosintéticos y al aplicar 1 mM de esta hormona elevó el contenido de clorofila *a*, así como de carotenos totales en la parte basal de la

planta. El número de tricomas y el contenido de terpenos totales se incrementó con la aplicación de 0.1 y 1 mM de ácido jasmónico y la aplicación de 1 mM de dicho compuesto provocó el incremento de *alfa*-pineno, limoneno, *alfa*-felandreno, *para*-cimeno, eucaliptol, cariofileno y *alfa*-cariofileno. Las plantas de *L. graveolens* de la comunidad de San Rafael, Coaxcatlan, sintetizan timol y carvacrol en etapa de plántula, sin embargo, al superar esta etapa, la síntesis de estos compuestos se suprime. De tal manera que las plantas adultas de esta comunidad no presentan estos compuestos. Las conclusiones de la presente investigación son que una imbibición por 12 h provocó una germinación del 90%, además embeber las semillas causa un incremento en la biomasa radicular de las plántulas, mientras que, altas dosis de AG₃ provocaron una inhibición en la germinación de *L. graveolens*, no obstante, la aplicación de 250 mgL⁻¹ de AG₃ como tratamiento pregerminativo provocó un efecto a largo plazo al aumentar la biomasa y el contenido de timol en las plántulas. Al aplicar 0.1 y 1 mM de AJ en *L. graveolens* se incrementó el contenido de terpenos y el número de tricomas y no se observó una afectación en los parámetros fotosintéticos evaluados, incluso, se elevó el contenido de clorofila a y carotenos.

1. Introducción

La república Mexicana cuenta con una gran riqueza y tradición ancestral acerca del uso de plantas medicinales y se estima que en la actualidad cerca de 3000 especies son empleadas con esta finalidad (Linares *et al.*, 1999; Hernández *et al.*, 2005). Existe un interés creciente en la medicina alternativa para la cura de numerosos padecimientos y enfermedades que afectan a los seres humanos, por lo que las investigaciones cuyo objetivo sea el cultivo, estudio y procesamiento de plantas medicinales con fines terapéuticos se consideran estratégicas e importantes (Soto *et al.*, 2002).

1.1 *Lippia graveolens*

Aproximadamente 40 especies se conocen de plantas herbáceas pertenecientes a cuatro familias botánicas en la república mexicana con el nombre de orégano (Huerta, 1997); varias especies del género *Lippia* son usadas en la medicina tradicional principalmente en padecimientos dermatológicos, gastrointestinales y respiratorios (Argueta y Cano, 1994; McGaw *et al.*, 2000; Hernández *et al.*, 2005; Canales *et al.*, 2005, 2006). *L. graveolens* (Nov. Gen Sp. [H.B.K.] 2: 267. 1818; International Plant Names Index, 2005) es una especie aromática y planta medicinal conocida como “Orégano Mexicano”, la parte aérea de esta especie es usada como un antiséptico, antipirético, analgésico, abortivo, antiespasmódico, agente antiinflamatorio y para tratar la diabetes (Pascual *et al.*, 2001).

1.2 Nombres comunes

Los nombres comunes reportados para la especie de *L. graveolens* en el país son:

- Oreganillo u orégano loco (Coahuila, Chihuahua)
- Orégano (Coahuila, Durango, Guerrero, Puebla, Veracruz, Yucatán)
- Hierba dulce, salvia real (Hidalgo y Veracruz)
- Salvia (Chiapas)
- Salvia de castilla (Oaxaca)
- Orégano mexicano
- Orégano de castilla

1.3 Descripción botánica

La planta forma un pequeño arbusto achaparrado que mide de 45 cm hasta 1.80 m de alto. Los tallos a menudo adquieren una tonalidad rojiza, se ramifican en su parte superior, tienden a deshojarse en las partes inferiores y contienen sustancias tánicas (Sánchez, 2007).

La raíz contiene estaquiosa y las ramas son cortamente pilosas. Las hojas son opuestas ovales y anchas de entre 2 a 5 cm de largo, con bordes enteros o ligeramente dentados con el haz denso y suavemente piloso, el envés es

glandular y densamente tomentoso a piloso, el margen finamente crenado y el ápice es generalmente obtuso o redondeado, raramente agudo, la base es redondeada a subcordada; los peciolos son de 5-10 mm de largo. Las flores son diminutas y de color blanco, que nacen en apretadas inflorescencias terminales muy ramificadas y están protegidas por diminutas hojillas de color rojizo. Las inflorescencias contienen de 2-6 pedúnculos en las axilas de las hojas, de 4-12 mm de largo, las espigas primero subglobosas pero a menudo van cambiando a oblongas de 4-12 mm de largo; las brácteas comúnmente en 4 hileras, son ovaladas a lanceoladas, glandulares y densamente pilósulas, agudas; El cáliz 1-2 mm de largo es glandular y veloso; la corola es blanca, con el tubo estriguloso, de alrededor de 3 mm de largo. Los frutos son pequeños y se encuentran encerrados en el cáliz (Villavicencio-Gutiérrez *et al.*, 2010).

Toda la planta posee unas pequeñas glándulas donde esta almacenada la esencia aromática, de color amarillo limón, compuesta por dos tipos de fenoles, uno de ellos Carvacrol y el otro Timol (Villavicencio-Gutiérrez *et al.*, 2010)

Una gran variedad de estudios se han realizado sobre la actividad de *L. graveolens* para contrarrestar la proliferación de algunos organismos entre ellos bacterias (Hernández *et al.*, 2008; Salgueiro *et al.*, 2003), hongos (Arana-Sánchez *et al.*, 2010), acaros (Martínez- Velázquez *et al.*, 2011) y virus (Ribas *et al.*, 2011). Además, el orégano Mexicano es ampliamente utilizado en México y Estados Unidos como condimento característico de algunos platillos, en las comidas saborizadas, bebidas alcohólicas, productos horneados, carnes, productos lácteos, vegetales procesados, productos de aperitivo y aceites (Leung y Foster, 1996).

México es uno de los mayores exportadores de orégano en el mundo, con 35-40% del mercado internacional; esta alta demanda es debida a la calidad del aceite esencial que está presente en las hojas (González-Güereca *et al.*, 2007).

1.4 Propagación

La búsqueda de mejores métodos para la multiplicación de una especie constituye una de las tareas primordiales cuando se pretende la introducción de una especie a un cultivo con fines de aprovechamiento. Muchas especies silvestres dependen de varias señales ambientales, como la disponibilidad de agua y las condiciones de luz para poder germinar, estos mecanismos de sobrevivencia, involucran una germinación poco uniforme, lo cual resulta poco ventajoso cuando se pretende cultivar ampliamente la especie, pues es casi imposible obtener cultivos fenológicamente homogéneos, que faciliten las labores de cultivo y cosecha, y permitan establecer pronósticos relacionados con rendimientos de metabolitos secundarios (González-Güereca, 2005). Además es importante estudiar la reproducción y propagación del orégano mexicano porque se extrae principalmente de poblaciones silvestres y su

colecta coincide con la etapa de floración, alterando la formación de frutos y semillas, esto ha ocasionado que dichas poblaciones se encuentren reducidas en superficie y densidad (Ocampo-Velázquez *et al.*, 2009).

Uso de giberelinas

Las giberelinas son fitorreguladores que son sintetizados en muchas partes de la planta, pero más especialmente en áreas de crecimiento activo como los embriones o tejidos meristemáticos (Rojas-Garcidueñas y Rovalo, 1985).

Dos diferentes mecanismos de acción se han propuesto para explicar el papel del ácido giberélico (AG_3) en el control de la germinación. El primero es la inducción de la expresión de los genes que codifican enzimas hidrolizantes del endospermo. Existe un receptor para la giberelina en la capa de aleurona de la semilla. El AG_3 induce la síntesis de α -amilasa, que es la enzima que toma parte en la desintegración de las reservas de almidón durante la germinación de las semillas (Lewak y Khan, 1977; Bewley y Black, 1994; Baskin y Baskin, 1998). Además, este tejido confiere parte de la resistencia mecánica a la protrusión radicular, como se demuestra en tomate (Groot y Karssen, 1987; Groot *et al.*, 1988), tabaco (Leubner-Metzger *et al.*, 1996), y cebada (Schuurink *et al.*, 1992).

El segundo mecanismo consiste en un efecto estimulante directo sobre el crecimiento del embrión, como se sugiere en *Arabidopsis* (Karssen y Laacka, 1986). Se asume que este potencial de crecimiento está restringido por la fitohormona ácido abscísico (ABA), que se sintetiza en el embrión (Karssen *et al.*, 1983). ABA induce un estado de inactividad durante las fases posteriores de la maduración de la semilla; después de este punto, su función está limitada porque la concentración cae por debajo de un nivel de inhibición. El AG_3 es necesario para superar este estado latente inducido por el ABA (Le Page-Degivry y Garelo, 1992; Wang *et al.*, 1995; Grappin *et al.*, 2000). Estos dos mecanismos, uno dirigido a estructuras externas y el otro dirigido al embrión, no tienen por qué ser excluyentes uno del otro, ya que la latencia y la germinación son probablemente el resultado neto de un balance entre muchos factores promotores e inhibidores (White *et al.*, 2000).

Algunas especies presentan bajos porcentajes de germinación, donde la aplicación de AG_3 aumenta la capacidad de germinación de las semillas y, frecuentemente, reemplaza la necesidad de estímulos ambientales tales como la luz y la temperatura (Riley, 1987).

González-Nieves *et al.* en el 2010 evaluaron diferentes tratamientos pregerminativos con AG_3 en *L. graveolens*, y encontraron que al embeber las semillas por 12 h con 250 mgL^{-1} de AG_3 obtuvieron un 47% de plántulas emergentes, 20% más plántulas que en su grupo control; además reportan un incremento en la altura, área foliar y biomasa en las plántulas a las que se les aplicó AG_3 .

Gehan y Mona en el 2011 evaluaron tres concentraciones de AG₃ (50, 100 y 150 ppm) con 14 horas de imbibición, obteniendo con la concentración de 150 ppm entre 97 y 99.8% de germinación de semillas de datilero del desierto (*Balanites aegyptiaca*).

Min-Seok *et al.* en el 2011 evaluaron en semillas de papa (*Solanum tuberosum* L.) el efecto de diferentes concentraciones de AG₃ con 24 h de imbibición, las cuales se sometieron a un segundo tratamiento con la adición al medio de siembra de diferentes concentraciones de AG₃, obteniendo un 84.1% de germinación con una concentración de 1500 ppm de AG₃ en la imbibición y 0.5 ppm de AG₃ en el medio.

Saldívar-Iglesias *et al.* en el 2010 evaluaron la germinación de jaltomate (*Jaltomata procumbens*) sometida a concentraciones de 0, 50, 100, 150, 200 y 250 mgL⁻¹ de AG₃ y dos tiempos de imbibición de 12 y 24 horas, hallando que conforme aumenta la concentración AG₃, aumenta la velocidad de germinación. También encuentran resultados similares para el tiempo de imbibición. El tratamiento de 250 mgL⁻¹ de AG₃ tuvo un 87% de germinación con respecto al 28% del control.

Borboa-Flores *et al.* (2007) encontraron que aplicando a semillas de orégano (*L. palmeri*) 100, 200 y 300 ppm de AG₃ con tiempos de imbibición de 30, 60 y 120 minutos incrementaron la germinación en un 80 y 100% con respecto a su control.

Fuentes-Fiallo *et al.* señalaron en 1996 que en especies de albahaca (*Ocimum gratissimum*) es posible mejorar la germinación con aplicaciones exógenas de AG₃ a partir de concentraciones de 250 ppm y un tiempo de imbibición de 24 horas.

Moreno-Rodríguez en el 2009, al embeber semillas de *L. graveolens* por 12 h, (las cuales se habían almacenado por 2 años) obtiene menos del 70% de germinación. Sin embargo, en el 2014 reporta que al coleccionar semillas en el mes de octubre, tiempo en el que se ha alcanzado la maduración de la semilla se alcanza un 87.2% de germinación al embeber las semillas por 12 h.

Además de los aspectos de reproducción y multiplicación del orégano, es necesario conocer los factores involucrados en la producción de altos niveles de los componentes del aceite esencial.

1.5 Aceite esencial

La composición del aceite esencial de una especie depende de múltiples factores principalmente del origen geográfico, la temporada de cosecha (Burt, 2004), el clima y la altitud (Martínez-Domínguez, 1991). Ha sido reportado que varias condiciones agronómicas como la duración de la luz del día, la radiación y el estrés hídrico afectan el desarrollo de la planta de orégano y la composición de su aceite esencial (Vázquez y Dunford, 2005). Entre los

factores bióticos que alteran la composición del aceite esencial se encuentran el nivel de poliploidía, la ontogenia y el herbivorismo (Marchese y Figueira, 2005).

El aceite esencial de *L. graveolens* es una mezcla de varios compuestos, y está constituido principalmente de los monoterpenos fenólicos timol, carvacrol y su precursor *p*-cimeno (Kintzios 2002). Los terpenos tienen diversas funciones en las plantas, se pueden encontrar como hormonas (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos fotosintéticos (carotenos y fitol), acarreadores electrónicos (ubiquinona, plastoquinona), mediadores del ensamblaje de polisacáridos (poliprenil fosfatos); y componentes estructurales de la membrana (fitoesteroles) (McGarvey y Croteau, 1995; Lange y Ghassemian, 2003). Los terpenos son frecuentemente usados por las plantas en las interacciones con el ambiente, como en la protección contra enemigos, los parásitos y los patógenos, así como quimioatrayentes de polinizadores y dispersadores de semillas (Lou *et al.*, 2005).

Aunque los terpenos son extensamente diversos todos ellos se sintetizan a partir de difosfato de isopentenilo (IPP) y difosfato de dimetilalilo (DMAPP). En las plantas superiores, dos rutas, localizadas en diferentes compartimentos intracelulares, están envueltas en la biosíntesis de IPP y DMAPP. En el citosol el IPP es derivado de la ruta del ácido mevalónico que comienza de la acetil-CoA (Porter y Spurgeon, 1981), mientras que, en los plastidos, el IPP es formado de piruvato y gliceraldehido 3-fosfato, via la ruta del metil-eritritol fosfato (MEP) (Eisenreich *et al.*, 2001). EL IPP y el DMAPP citosólicos son convertidos a farnesil difosfato (C15), el cual sirve como un precursor para la biosíntesis de sesquiterpenos y triterpenos en el citosol. En contraste, el IPP/DMAPP en el cloroplasto es convertido a geranil difosfato (C10) y geranilgeranil difosfato (C20) el cual sirve como precursor de monoterpenos y diterpenos y tetraterpenos respectivamente (Lange *et al.*, 2001).

Herbivorismo

El herbivorismo es un mecanismo común en la naturaleza, que realiza el herbívoro para tomar nutrientes de su organismo hospedero. Las plantas han desarrollado estrategias de defensas químicas y físicas para abatir tales ataques, entre éstas se encuentran la formación de compuestos químicos que afectan la nutrición de los insectos como las proteinasas inhibitoras en tomate (*Lycopersicon esculentum*), la formación de compuestos tóxicos como la nicotina (defensas directas), la emisión de compuestos volátiles que tienen como función atraer a depredadores de herbívoros (defensas indirectas). Además de las defensas químicas muchas plantas responden al daño incrementando la densidad y/o el número de tricomas en sus hojas (Traw y Dawson, 2002). En estas respuestas de las plantas a las heridas por el

herbivorismo, el ácido jasmónico (AJ) participa como una molécula señalizadora (Wasternack *et al.*, 2006).

El AJ y su metil-éster jasmonato (MEAJ) son derivados de ácidos grasos sintetizados a través de la ruta del ácido octadecanóico (Shoji *et al.*, 2000). Estos compuestos están ampliamente distribuidos en las plantas y se ha reportado que participan en diversos procesos fisiológicos como la maduración del fruto, el crecimiento de la raíz, la producción de polen viable, la senescencia, la respuesta de la planta a las heridas, la respuesta en defensa al ataque de insectos y patógenos y diferentes tipos de estrés abióticos (Maciejewska *et al.*, 2004; Chung y Liu, 2005) y la tolerancia al estrés oxidativo (Poonam *et al.*, 2013).

La aplicación exógena del AJ ejerce numerosos efectos en los procesos del desarrollo de las plantas, estos son tanto inductivos como inhibitorios. Uno de los efectos más remarcables del AJ en las plantas es el incremento en la producción de compuestos de defensa de manera local y sistémica, incluyendo alcaloides, fenoles, flavonoides, y varios terpenos (Wasternack y Parthier, 1997). Estos últimos, son de gran importancia para *L. graveolens*. Se han realizado diversos estudios sobre la inducción en la producción de terpenos debido a la aplicación exógena del AJ o su derivado MEAJ.

Dicke *et al.* en 1999 mostraron que en haba de Lima (*Phaseolus lunatus*) se incrementa hasta 3 veces la emisión de terpenos volátiles por la aplicación tanto de AJ (0.1 mM, 1 mM) como por la presencia del ácaro huésped la araña roja (*Tetranychus urticae*); este incremento no se mostró cuando sólo se realizó daño mecánico. Resultados parecidos encontraron Horiuchi *et al.* en el 2001 en esta misma planta aplicando 0.3 mM de JA.

Rodríguez-Saona *et al.* en el 2001 con la aplicación de 18 μ M de MEAJ en plantas de algodón (*Gossypium hirsutum*) reportaron elevados niveles de terpenos con respecto a su grupo control.

Fard *et al.* en el 2012 en hisopo de anís (*Agastache foeniculum*) aplicando 1 mM de MEAJ documentaron una elevación en el contenido del aceite esencial a las 48 y 72 h después del inicio del tratamiento.

Cooper y Rieske en el 2011 trabajaron con 2 especies de nueces del género *Castanea* y determinaron que con la aplicación de 1.5 mM de AJ se aumentaron las defensas de la planta contra su avispa huésped.

War *et al.* en el 2013 asperjaron 1mM de AJ en plantas de cacahuete (*Arachis hypogaea*) y hallaron que a los 5 y 10 días de su aplicación se incrementó la densidad de tricomas.

Además, se ha reportado un efecto tanto inductivo como inhibitorio en el contenido de pigmentos fotosintéticos debido a la aplicación de jasmonatos; en

frijol (*P. vulgaris* L.) se incrementa el contenido de clorofilas (Farouk y Osman, 2011) y en varias especies se reporta una reducción en la tasa de fotosíntesis después del ataque del herbívoro o la aplicación del AJ (Kim *et al.*, 2009; Nability *et al.*, 2012), en *Arabidopsis* se disminuye la eficiencia cuántica fotoquímica del centro de reacción del fotosistema II (*Fv/Fm*) (He *et al.*, 2002); sin embargo, a pesar de su ya demostrado efecto del AJ en la inducción de metabolitos secundarios en varias plantas, su efecto no ha sido probado en *L. graveolens*.

2. Hipótesis

El AG₃ induce mecanismos de acción que promueven la germinación de la semilla, por lo que su uso como tratamiento pregerminativo en semillas de *L. graveolens* incrementará la tasa de germinación.

El AJ es conocido por inducir la producción de los metabolitos secundarios entre ellos los terpenos, por lo que sí se aplica de manera exógena en *L. graveolens* se incrementará la producción y la acumulación de estos compuestos.

3. Objetivos

3.1 Objetivos generales

Evaluar el efecto del AG₃ como promotor de la germinación de semillas de *L. graveolens* y en la biomasa y acumulación de terpenos en la plántula

Evaluar el efecto del AJ en el contenido y composición de terpenos en plantas de *L. graveolens*, así como el número de tricomas y examinar las respuestas fotosintéticas

3.2 Objetivos particulares

Evaluar el efecto del AG₃ en el porcentaje de germinación acumulado

Evaluar el efecto del AG₃ en la biomasa de la parte aérea y radicular en plántulas de *L. graveolens*

Evaluar el efecto del AG₃ en síntesis de terpenos en plántulas de *L. graveolens*

Examinar la respuestas fotosintéticas de *L. graveolens* expuesta al AJ a través de la medición de parámetros fotosintéticos

Evaluar el efecto del AG₃ en el número de tricomas en el envés y el haz de las hojas de *L. graveolens*

4. Material y métodos

4.1 Ubicación y características de la zona de estudio

San Rafael, se encuentra ubicado en el municipio de Coxcatlán, Puebla, y se localiza al sureste de Tehuacán, en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, entre 18°12' y 18°14' de latitud norte, así como 97°07' y 97°09' de longitud oeste, en intervalos altitudinales de 957 a 1400 m snm (Fig. 1). El clima es de categoría BS1 (h')weg de acuerdo con la clasificación de Köppen, modificada por García (1981). El cual corresponde a un tipo seco árido con lluvias en verano y temperatura media anual de 22 °C variando entre 25 °C en abril y mayo, y 18°C en enero (Medina-Sánchez, 2000).

Los suelos en la localidad de San Rafael son regosol fútrico y xerosol háplico, los cuales soportan vegetación de bosque tropical caducifolio y matorral xerófilo, con especies como Mulato (*Bursera morelensis*), Cuajote amarillo (*B. aptera*), Candelabro (*Pachycereus weberi*), Tetencholete (*Opuntia pubera*), Ceiba (*Ceiba aescilifolia* ssp.), *Parvifolia*, Cubata (*Acacia cochliacantha*), Jiotilla (*Escontria chiotilla*), Tetecho (*Neobuxbamia tetetzo*), Cardón blanco (*Cephalocereus columna-trajani*) y Agave (*Agave macroacantha*), entre otras (Medina-Sánchez, 2000).

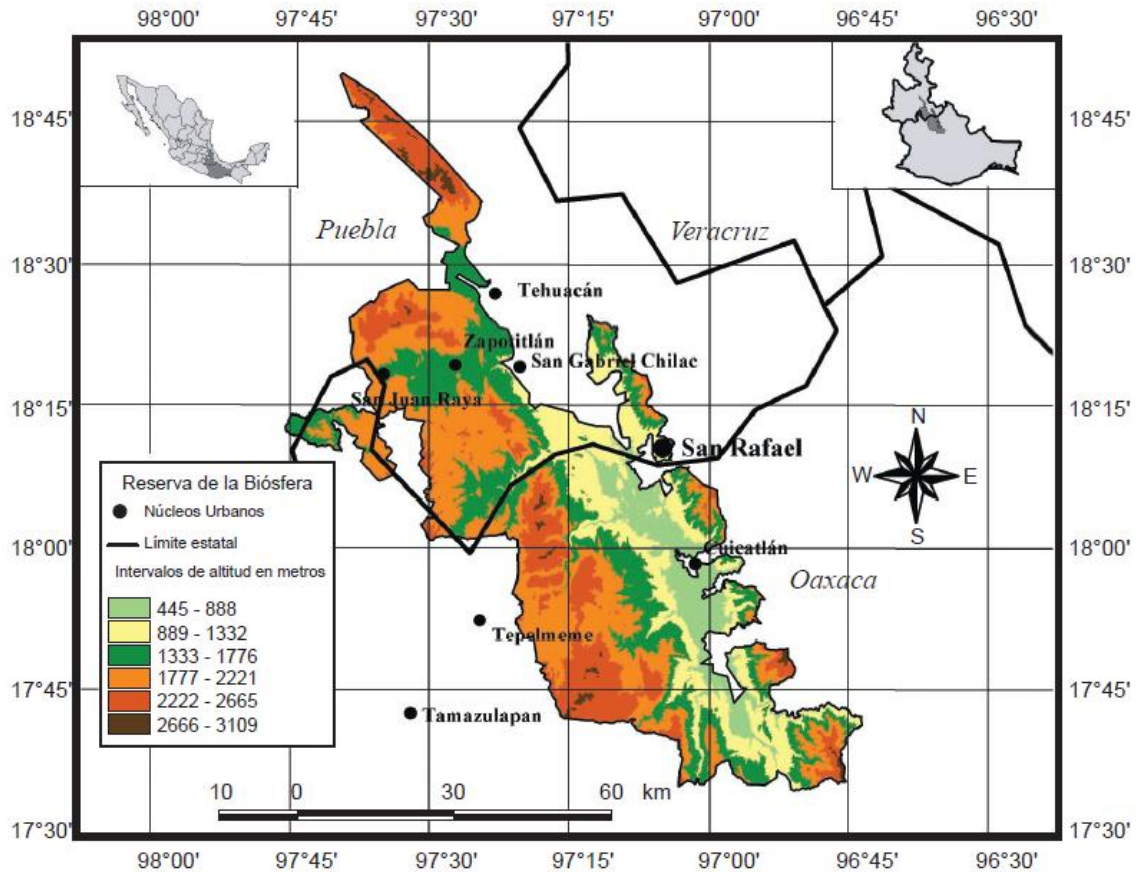


Figura 1. Ubicación geográfica del poblado de San Rafael, con referencia a la reserva de la Biósfera Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

Las semillas de *L. graveolens* fueron colectadas en octubre del 2011 en San Rafael por el personal del Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) (solo se colectó menos del 30% de semillas de cada planta muestreada), las cuales se almacenaron a temperatura ambiente hasta el momento del experimento.

La limpieza de las semillas de *L. graveolens* se realizó liberando la semilla de la estructura de floración, para lo cual, la estructura seca se trituró manualmente sobre un tamiz de pruebas físicas No. 25 (Standar Screen Scale Equiv USA, Det Norske Veritas quality certificate N°Qsc 4264150). Posteriormente, las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% durante 5 minutos, y se realizaron 3 enjuagues con agua destilada (Moreno-Rodríguez, 2009).

4.2 Primer experimento: Aplicación del AG₃

Diseño experimental aplicación de AG₃

La figura 2 muestra el diagrama de flujo del experimento 1. En el cual se explica la forma en la que se llevo a cabo la aplicación del AG₃.

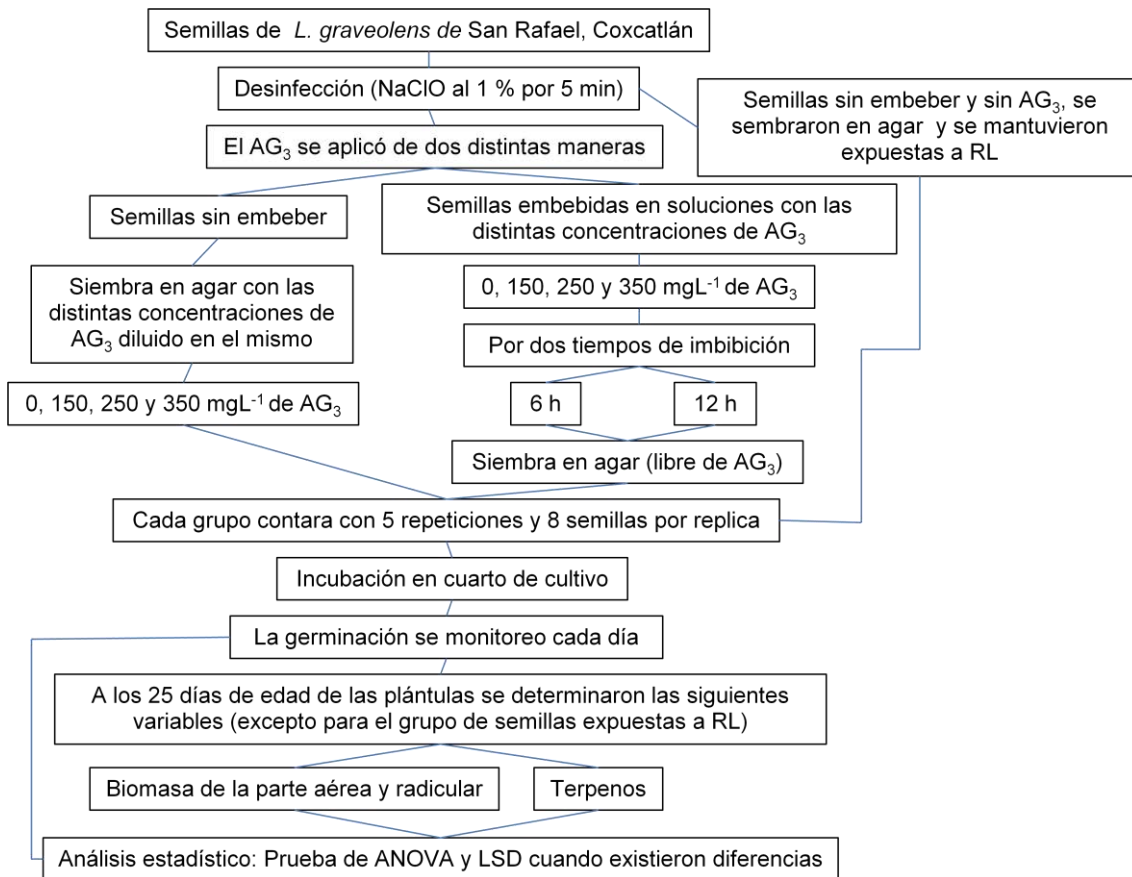


Figura 2. Diagrama de flujo del experimento 1. Aplicación de AG3. RL= Rojo lejano, AG₃= ácido giberélico,

El AG₃ se aplicó de dos distintas maneras, la primera diluida en el agar y la segunda manera diluida en la solución de imbibición.

Para el diseño experimental se manejaron 3 tiempos de imbibición (0, 6 y 12 h). Las semillas sin imbibición (con un tiempo 0 de imbibición) se sembraron directamente después de la desinfección en agar bacteriológico al 1% con cuatro distintas concentraciones de AG₃ diluidas en el agar (0, 150, 250 y 350 mgL⁻¹). Para las semillas que tuvieron un tiempo de imbibición por 6 y 12 horas, fueron embebidas en soluciones con diferentes concentraciones de AG₃ (0, 150, 250 y 350 mgL⁻¹), y posteriormente se sembraron en agar bacteriológico al 1% sin AG₃ (Tabla 1).

Una extensión del diseño experimental consistió en un grupo en donde las semillas se sembraron directamente en el agar y posteriormente durante el tiempo de germinación se expusieron a 12 h continuas de rojo lejano (RL) y 12 h de oscuridad por 20 días. Para los tratamientos de luz RL se colocaron las cajas petri dentro de una caja de acrílico rojo y azul (plexiglás No. Serie 2424 y 2423, respectivamente) en la cual hubo una proporción de rojo y RL (R:FR) igual a 0.05 y una densidad de flujo fotónico de 9.715 μmol m⁻² s⁻¹. Las mediciones se realizaron con un espectroradiómetro portátil (LI-COR, Inc., Nebraska, U.S.A.) la luz roja lejana se midió entre 724-736 nm, la densidad de flujo fotónico se midió entre 400 y 750 nm (Ordoñez-Salanueva, 2008).

Todos los tratamientos se incubaron en un cuarto de cultivo bajo las siguientes condiciones: temperatura promedio de 25 ± 3 °C; humedad máxima de 82%, mínima de 32% y un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Cada uno de los 13 grupos, contó con 5 repeticiones y 8 semillas por replica.

Una semilla germinada se consideró cuando ocurrió la protrusión de la radícula. La germinación fue monitoreada diariamente para todos los grupos hasta que fue constante el número de semillas germinadas, excepto en el grupo que fue expuesto a RL, en el cual se registró la germinación total hasta los 20 días después de la siembra.

Cuando las plántulas de *L. graveolens* cumplieron 25 días después de haber germinado se determinaron las variables siguientes:

Biomasa

Se cosecho la parte aérea y radicular, la cual fue pesada individualmente para obtener el peso fresco, se registraron al menos 5 repeticiones por tratamiento. El peso seco se obtuvo manteniendo la parte aérea y radicular por 72 horas a 70°C hasta alcanzar su peso constante.

Índice vástago-raíz

El índice vástago-raíz se obtuvo mediante el cociente del peso seco de la parte aérea entre el peso seco de la raíz.

Tabla 1. Clave de los grupos experimentales y descripción del diseño experimental

Clave	Tiempo de imbibición (h)	Concentración de AG ₃ (mgL ⁻¹)
RL	0	0
T0AG0	0	0
T0AG150	0	150
T0AG250	0	250
T0AG350	0	350
T06AG0	6	0
T6AG150	6	150
T6AG250	6	250
T6AG350	6	350
T12AG0	12	0
T12AG150	12	150
T12AG250	12	250
T12AG350	12	350

RL: Luz Rojo lejano, T: tiempo, AG: ácido giberélico.

4.3 Segundo experimento: Aplicación del AJ

Diseño experimental AJ

La figura 3 muestra un diagrama de flujo del experimento 2. En el cual se explica la forma en la que se llevo a cabo la aplicación del AJ.

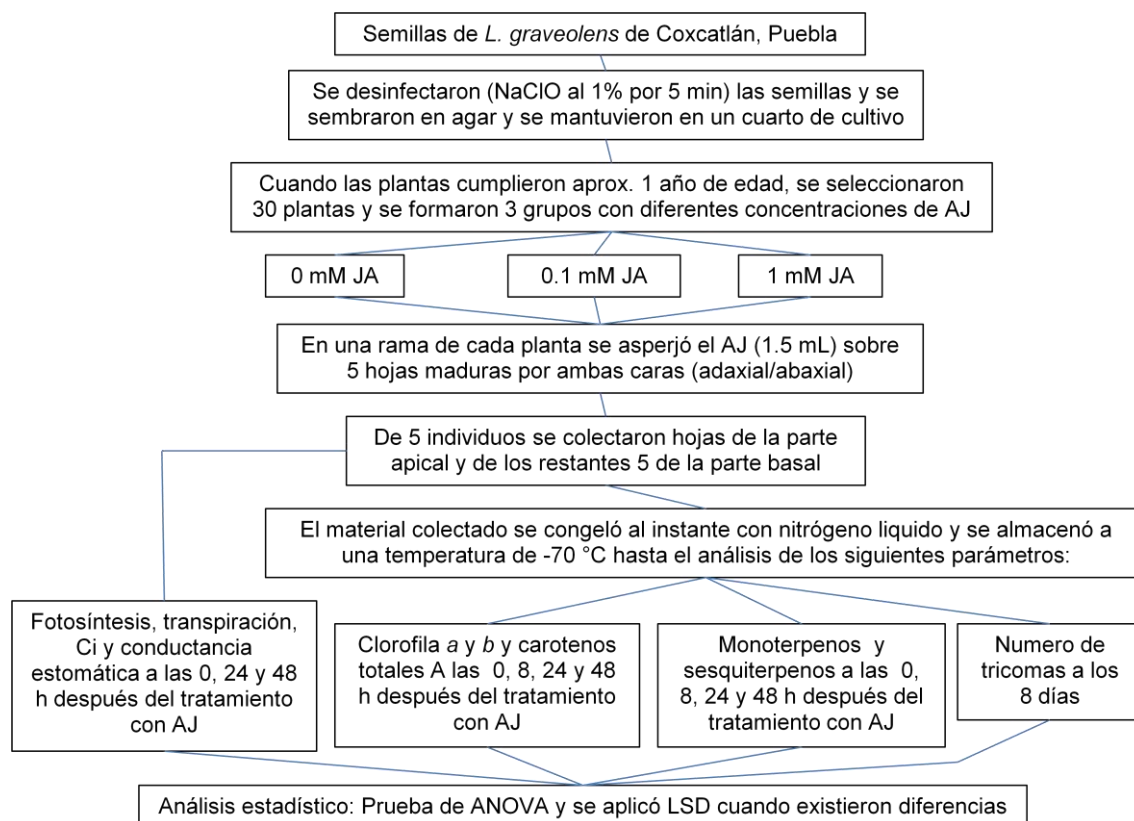


Figura 3. Diagrama de flujo de método del experimento 2. Aplicación del AJ. AJ= ácido jasmónico, Ci= Concentración intercelular de CO₂.

Plantas de *L. graveolens* de 1 año de edad libres de herbívoros fueron cultivadas bajo las mismas condiciones del cuarto de cultivo y regadas con solución Hoagland con una frecuencia de 1 vez cada dos semanas (Fig. 4). Las plantas fueron tratadas aleatoriamente con tres concentraciones de 0, 0.1 y 1 mM de AJ, formando 3 grupos, cada uno con 10 replicas, de las cuales 5 plantas fueron ocupadas para las tomas de muestras de la parte superior de la planta y las restantes 5 para la toma la parte inferior.

Las concentraciones de 0, 0.1 y 1 mM de AJ fueron diluidas en acetona al 1%, las soluciones resultantes se asperjaron a cada grupo con la ayuda de un atomizador sobre la cara adaxial y abaxial de 5 hojas maduras de una misma rama que se mantuvo intacta durante el desarrollo del experimento (se aplicó 1.5 mL de la solución por planta). Se colectó material vegetal para la cuantificación de pigmentos fotosintéticos y terpenos, el cual se congeló al momento de ser colectado con nitrógeno líquido y se almacenó a -70 °C hasta el momento de su análisis.



Figura 4. Plantas de *L. graveolens*. Plantas de *L. graveolens* de 1 año de edad aisladas en una bolsa de plástico para evitar la presencia de insectos herbívoros.

Fotosíntesis

Parámetros fotosintéticos

Los parámetros fotosintéticos evaluados fueron: tasa de fijación de CO₂, concentración intracelular de CO₂ (Ci), conductancia estomática y transpiración; los cuales se midieron con la ayuda de un Analizador Infrarrojo de Gases Portátil (IRGA), marca Li-COR modelo Li-6400. La radiación fotosintética activa (PAR) que se utilizó fue de 1000 $\mu\text{Mol/m}^2 \text{s}^{-1}$, basado en trabajos previos llevados a cabo en el laboratorio. La temperatura de la hoja se mantuvo constante a 25 °C. Se seleccionaron hojas de la parte intermedia de la planta. Los datos se registraron a las 0, 24 y 48 horas después de la aplicación de la AJ.

Determinación de pigmentos fotosintéticos

Para la determinación de los pigmentos fotosintéticos se registró el peso del material colectado, posteriormente se maceró con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino al cual se le agregaron 1.5 mL de acetona fría al 80%, posteriormente se centrifugó a 3500 RPM por 5 minutos a 4 °C, se recuperó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en acetona al 80%, para ser macerada nuevamente. Se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones. Los sobrenadantes resultantes de cada muestra (3 mL) fueron mezclados para realizar la medición de la absorbancia. Se realizó la medición de la absorbancia mediante la ayuda de un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo Lambda 2S, se registró la absorbancia de cada muestra a las siguientes longitudes de onda 470, 663 y 645 nm. Como medida para prevenir la fotooxidación de los pigmentos se trabajó en un cuarto frío a 10 °C y en condiciones de baja luz.

La cuantificación de la clorofila *a* y *b*, así como la de los carotenos se realizó mediante las siguientes formulas (Coombs *et al.*, 1988)

$\text{Chl } a = (15.65)(\text{abs } 663) - (7.34)(\text{abs } 645)$
 $\text{Chl } b = (27.05)(\text{abs } 645) - (11.21)(\text{abs } 663)$
 $\text{Carotenos} = (1000)(\text{abs } 470) - (11.21)(\text{Chl } a) - (11.21)(\text{Chl } b)$

Cuantificación de terpenos (La cuantificación se realizó para ambos experimentos)

Las muestras colectadas fueron maceradas con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino al cual se le agregaron 250 μL de hexano y 50 μL de la solución estándar, la cual consistió de un estándar interno 4-isopropil fenol o también conocido como *p*-cumeno (Sigm-Aldrich, CAS99-89-8, una concentración final de 83.33 $\mu\text{g/mL}$) que fue utilizado para conocer la concentración relativa de los compuestos terpénicos encontrados en el extracto hexánico. Una vez agregados los 300 μL , las muestras se agitaron por 10 min y posteriormente fueron centrifugadas por 5 min a 14000 rpm a 4 °C en una centrifuga (Brinkmann Instruments, Inc., New York, USA). El sobrenadante se recuperó y se inyectaron 2 μL de cada muestra modo Split (1:80) a un cromatógrafo de gases Agilent Technologies modelo 6850 equipado con una columna capilar 19091 s-433E HP-5; S 5% fenil metil siloxano (30 m x 0.25 mm, 0.25 μm); acoplado a un espectrómetro de masas (EM) 5975C VL MSD, Agilent Technologies (Moreno-Rodríguez, 2014).

Condiciones del análisis de la cromatografía de gases – espectrometría de masas

La temperatura del inyector fue de 270 °C. La temperatura inicial fue mantenida por 2 min a 70 °C, la rampa de calentamiento fue de 20 °C min^{-1} hasta alcanzar los 230 °C. El gas acarreador utilizado fue Helio (20 mL min^{-1}). Los parámetros de operación del EM fueron los siguientes: Voltaje de ionización electrónica de 230 °C, temperatura de cuadrupolo de 150 °C y un rango de escaneo de 35 a 750 unidades de masa atómica. Los terpenos fueron identificados con el software Agilent Technologies usando la biblioteca NIST08.

Número de tricomas por unidad de área

Hojas completamente desarrolladas se colectaron a los 8 días después de la aplicación del AJ, las cuales se mantuvieron a -70 °C hasta que fueron utilizadas para determinar el número de tricomas por unidad de área, para esto se montaron sobre soportes de aluminio, con cinta adhesiva doble faz de carbono (Los cortes no tuvieron cubierta de oro, ya que basados en trabajos previos no se mostraron diferencias entre hojas con o sin cubierta). Las fotografías fueron tomadas en un microscopio electrónico de barrido (MEB) marca Jeol modelo 6380LV (JEOL Ltd., Tokio, Japón) con un voltaje de aceleración de 10 kV. Se realizaron 3 replicas y cada una fue fotografiada tanto en el haz como el envés a 100X.

Análisis Estadísticos

Los resultados que se obtuvieron del porcentaje de germinación, biomasa, parámetros fotosintéticos, pigmentos fotosintéticos, terpenos y tricomas glandulares fueron analizados mediante pruebas de ANOVA de dos vías, con una $\alpha \leq 0.05$ como valor de significancia y en los casos donde existieron diferencias significativas se aplicó el método de la mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher. Las barras de error representan el error estándar.

5. Resultados y discusión

5.1 Experimento 1: Aplicación de AG₃

5.1.1 Germinación

Muchas especies silvestres poseen mecanismos de sobrevivencia, que involucran una germinación escasa y poco uniforme, en *L. graveolens* se han reportado problemas de germinación y sobrevivencia de las plántulas (Moreno-Rodríguez, 2009; González-Nieves *et al.*, 2010). El AG₃ ha sido utilizado para aumentar la tasa de germinación de la semillas de numerosas especies, ya que, frecuentemente reemplaza la necesidad de estímulos ambientales tales como la luz y la temperatura, por lo cual se decidió probar su efecto en semillas de *L. graveolens*. En la Fig. 5 se observa una semilla de *L. graveolens* fotografiada con MEB.

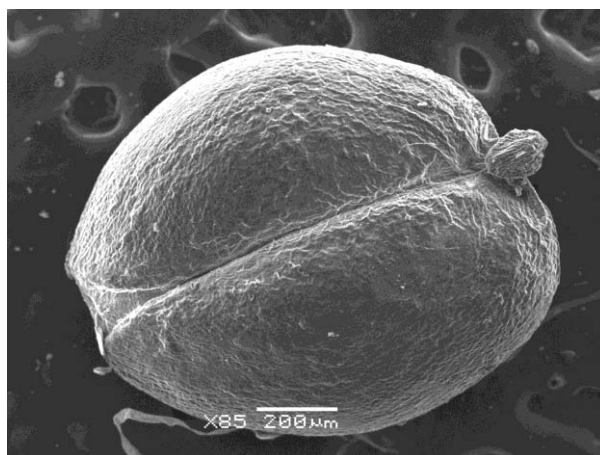


Figura 3. Semilla de *L. graveolens* proveniente de un individuo silvestre. 85X. MEB UBIPRO. Imagen Rafael Quintanar.

La protrusión de la radícula se registró desde el tercer día y hasta el día 20 cuando el número de semillas germinadas fue constante. Una imbibición de 12 h sin la presencia del AG₃ (T12AG0) resultó ser el tratamiento más efectivo al lograr un alto porcentaje de germinación (90%), además desde el quinto día el 80% de las semillas ya habían germinado y hasta el séptimo día este tratamiento es diferente de forma significativa ($P \leq 0.05$) al registrado en el resto de los tratamientos (Fig. 6). Un alto porcentaje de germinación, así como una

germinación sincrónica puede llevar a la obtención de plántulas homogéneas, un porcentaje de germinación similar reportó Moreno-Rodríguez (2014) al embeber igualmente por 12 h las semillas de *L. graveolens*.

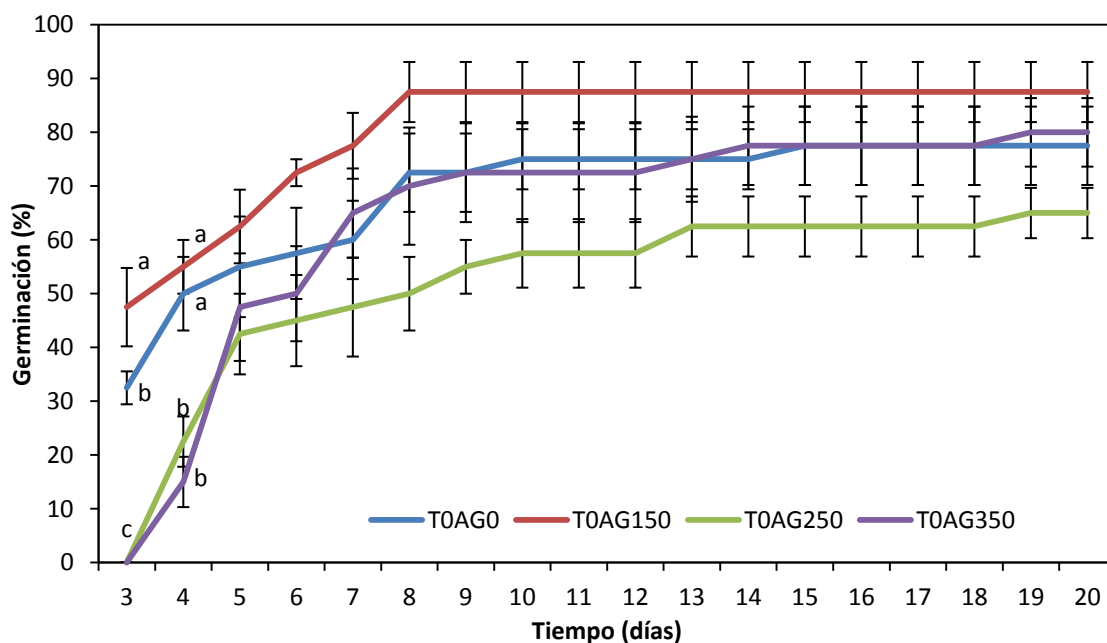


Figura 4. Porcentaje acumulado de germinación de semillas de *L. graveolens*, sin imbibición y con AG3 diluido en el medio (0, 150, 250 y 350 mgL⁻¹). (Promedio ± Error Est., las diferencias significativas se marcan con letras y solo representan las diferencias entre los distintos tratamientos y no en tiempo, medias marcadas con distinta letra son diferentes de manera significativa P≤0.05).

En las semillas de *L. graveolens* a las que se les aplicó 150 mgL⁻¹ de AG₃ (T0AG150) diluido en el agar se registró un porcentaje de germinación a los ocho días después de la siembra del 87.5%, aunque no existieron diferencias significativas con el grupo control después del tercer día. Las concentraciones de 250 y 350 mgL⁻¹ de AG₃ retrasaron hasta el cuarto día la germinación, sin embargo, en los días posteriores no existen diferencias significativas para ningún tratamiento (Fig. 7).

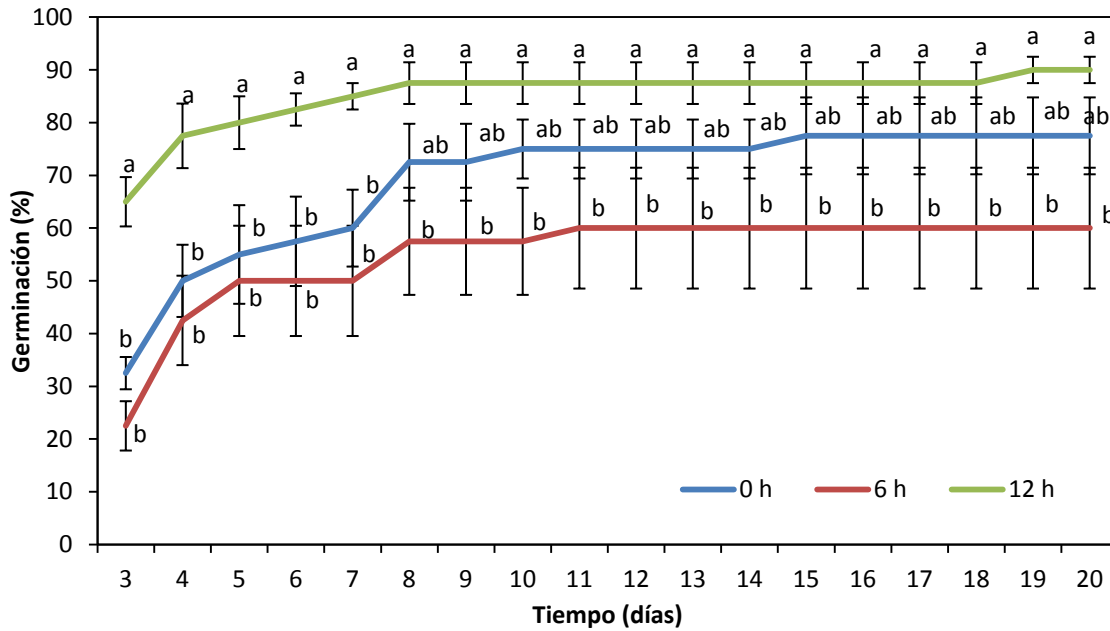


Figura 5. Porcentaje acumulado de germinación de semillas de *L. graveolens*, con 0, 6 y 12 h de imbibición (Promedio \pm Error Est., las diferencias significativas se marcan con letras y solo representan las diferencias entre los distintos tratamientos y no en tiempo, medias marcadas con distinta letra son diferentes de manera significativa $P \leq 0.05$).

En semillas donde el AG₃ fue diluido en el agar no parece afectar la germinación de forma tan severa como cuando se agrega en la solución de imbibición, esto puede ser debido a que la semilla al estar en la superficie del agar tiene menos contacto con la hormona y por lo tanto, es poca la penetración de la misma a diferencia de cuando es embebida en la solución con AG₃ en donde está en completo contacto y la velocidad de penetración de la hormona pudiera ser mucho mayor.

Las semillas embebidas por 6 h en soluciones con 0, 150 y 250 mgL⁻¹ de AG₃ alcanzaron porcentajes de germinación entre el 52.5 y el 67.5% y no existieron diferencias significativas entre estos tres primeros grupos, mientras que, cuando se aplicó la concentración más alta de AG₃ (350 mgL⁻¹) solo se alcanzó un 20% de germinación, por lo cual se inhibió la germinación de manera significativa (Fig. 8).

Un resultado similar se obtuvo al embeber las semillas de *L. graveolens* por 12 h en soluciones con AG₃, donde una mayor concentración de AG₃ disminuyó de manera significativa el porcentaje de germinación. En el tratamiento T12GA350 solo se registró una germinación después de 20 días del 7.5% (Fig. 9).

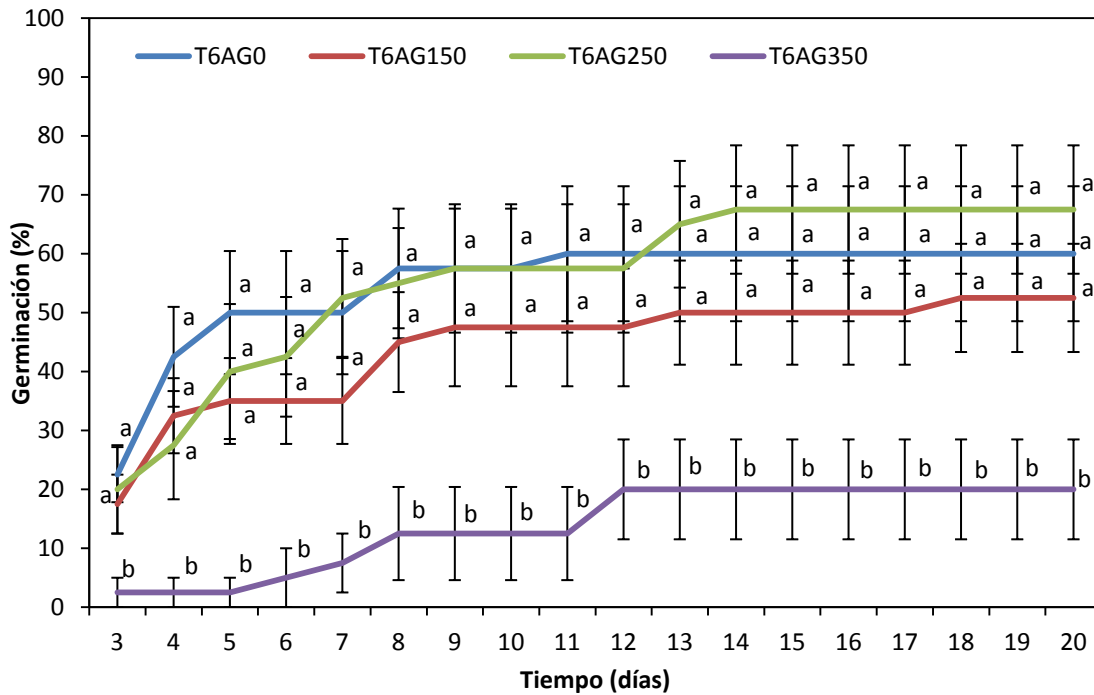


Figura 6. Porcentaje acumulado de germinación de semillas de *L. graveolens*, con 6 h de imbibición y concentraciones de AG₃ (0, 150, 250 y 350 mgL⁻¹). (Promedio ± Error Est., las diferencias significativas se marcan con letras y solo representan las diferencias entre los distintos tratamientos y no en tiempo, medias marcadas con distinta letra son diferentes de manera significativa P≤0.0 5).

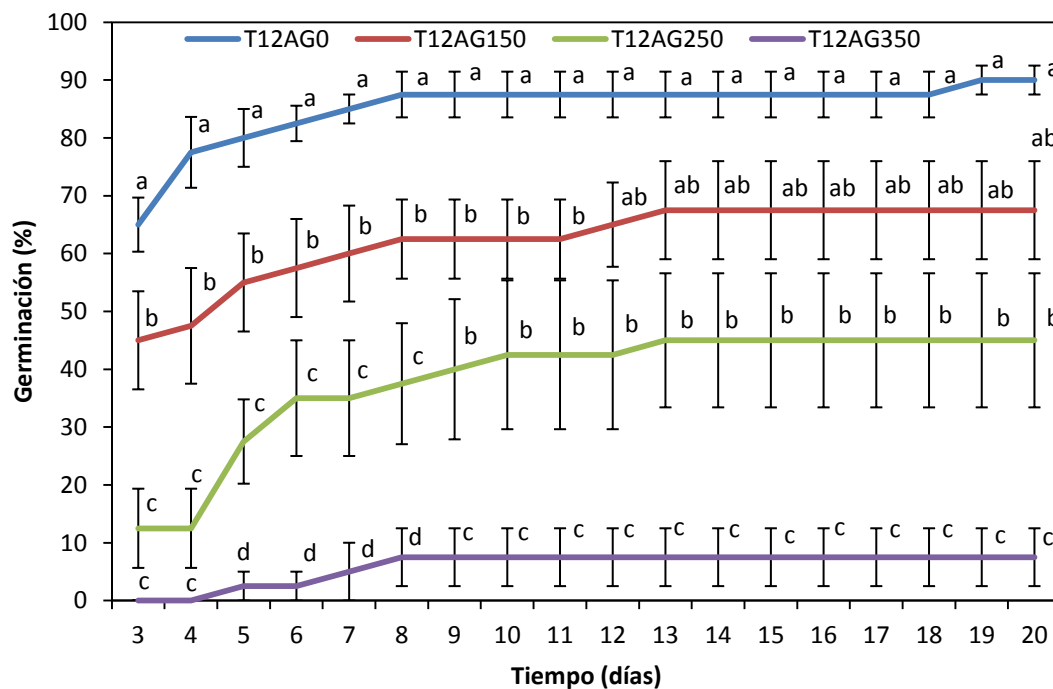


Figura 7. Porcentaje acumulado de germinación de semillas de *L. graveolens*, con 12 h de imbibición y concentraciones de AG₃ (0, 150, 250 y 350 mgL⁻¹). (Promedio ± Error Est., las diferencias significativas se marcan con letras y solo representan las diferencias entre los distintos tratamientos y no en tiempo, medias marcadas con distinta letra son diferentes de manera significativa P≤0.0 5).

Contrario a varias investigaciones, son pocos los trabajos donde se ha reportado una inhibición en la germinación por la aplicación de concentraciones altas de AG₃. En semillas de café (*Coffea arabica*) confirmaron la pérdida de viabilidad del embrión debido a la aplicación del AG₃, principalmente la muerte del tejido del eje embrionario, además se menciona hallaron dos umbrales de sensibilidad de las semillas de café al AG₃ (Da Silva *et al.*, 2005).

Un mayor tiempo de imbibición favorece la entrada de agua hasta el embrión, desencadenando el proceso germinativo, como se observa al embeber por 12 h, por otro lado, las concentraciones de AG₃ utilizadas mostraron tener un efecto inhibitorio en la germinación, ha sido bien documentado este efecto cuando se aplican concentraciones por arriba de lo óptimo. Da Silva *et al.* (2005) proponen que demasiado AG₃ libera uno o más factores del endospermo que inducen la muerte celular en el embrión y que esta muerte celular ocurre justo antes de la emergencia de la radícula; lo cual concuerda con la presente investigación donde las concentraciones utilizadas redujeron el porcentaje de germinación. Aplicar AG₃ en altas concentraciones causa una desincronización en los procesos de germinación que ocurren entre las células del endospermo y el embrión. Es conocido que los procesos del desarrollo en plantas son regulados por la acción y balance de los diferentes grupos de los reguladores de crecimiento, los cuales pueden actuar como promotores o inhibidores de estos procesos (White *et al.*, 2000).

Las semillas que fueron expuestas a RL mostraron una germinación del 57.5% a los 20 días después de la siembra, mientras que, semillas expuestas a luz blanca alcanzaron un 77.5% de germinación, no obstante, no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre ambos tratamientos. Se ha reportado en semillas sensibles a la luz un efecto positivo de la luz roja y un efecto negativo de la luz RL en la germinación debido a la forma activa Pfr o inactiva Pr del fitocromo que regula la germinación (Mathews, 2006). Otros estudios han mostrado que algunas especies de zonas áridas son capaces de germinar en luz RL (Benítez-Rodríguez, 2004).

Las semillas de *L. graveolens* son capaces de germinar cuando son irradiadas con luz blanca o luz RL, se requiere un posterior trabajo en donde se germinen en oscuridad para saber si son dependientes de la luz. Como lo propone Ordoñez-Salanueva (2008), la capacidad de las semillas de esta especie para germinar en luz RL, podría indicar que pueden germinar a unos cuantos milímetros de la superficie del suelo. Este comportamiento ha sido observado en varias especies de la misma área de estudio (Rojas-Arechiga *et al.*, 1997). La posición de las semillas muy cerca de la superficie del suelo, las expone a la depredación y a la deshidratación, mientras que, cuando se encuentran a cierta profundidad del suelo podrían disminuir estos riesgos.

Cabe mencionar que sí las semillas de *L. graveolens* presentaban algún estado de latencia, este pudo haber sido superado por el periodo en el que estuvieron almacenadas (1 año), ya que se ha reportado la interrupción de la latencia por un periodo de post-maduración (Gubler *et al.*, 2005). Por lo que los tratamientos probados en el presente ensayo, podrían tener un efecto distinto en semillas recién colectadas.

5.1.2 Biomasa

Los grupos donde se registró una menor biomasa aérea y radicular fueron los tratamientos en donde no hubo imbibición y el AG₃ estuvo presente diluido en el agar (Fig. 10).

Un tiempo de imbibición de 12 h combinado con 250 mgL⁻¹ de AG₃ incrementa la biomasa de la parte aérea de manera significativa ($p \leq 0.05$) y no se observa un decremento en la biomasa de la raíz, lo cual concuerda con una investigación reportada en el estado de Durango, México, en la cual, al embeber semillas de *L. graveolens* en una solución con 250 mgL⁻¹ de AG₃ por 12 h se incrementó la biomasa aérea y radicular en un 130% y un 47% respectivamente a los 110 días después de la siembra (González-Nieves *et al.*, 2010). En ningún caso la aplicación de 350 mgL⁻¹ de AG₃ favoreció la acumulación de biomasa (Fig. 11).

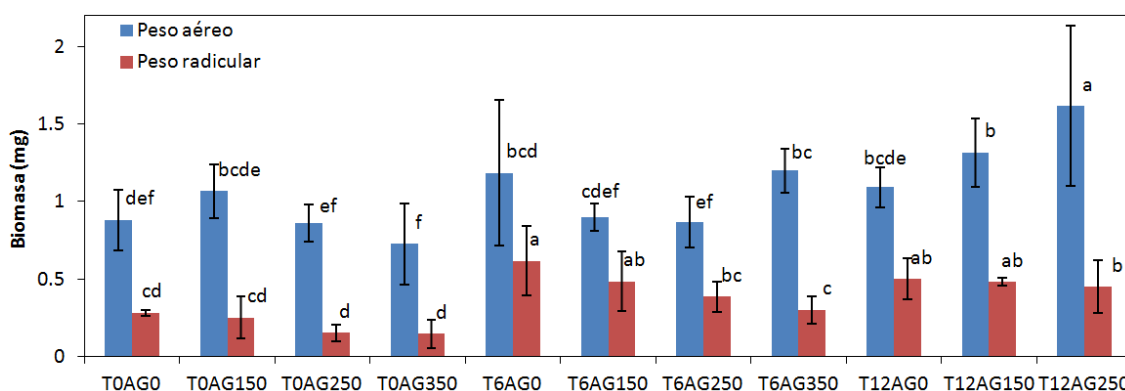


Figura 8. Biomasa de plántulas de 25 días de edad de *L. graveolens*. Biomasa de la parte aérea y parte radicular de plántulas de 25 días de edad de *L. graveolens* sometidas a tres tiempos de imbibición (0, 6 y 12 h) los cuales se sometieron a su vez a cuatro concentraciones de AG₃ (0, 150, 250 y 350 mgL⁻¹). No se muestran valores para el tratamiento T12AG350 (Promedio \pm Error Est., las diferencias significativas se marcan con letras, medias marcadas con distinta letra son diferentes de manera significativa $P \leq 0.05$).

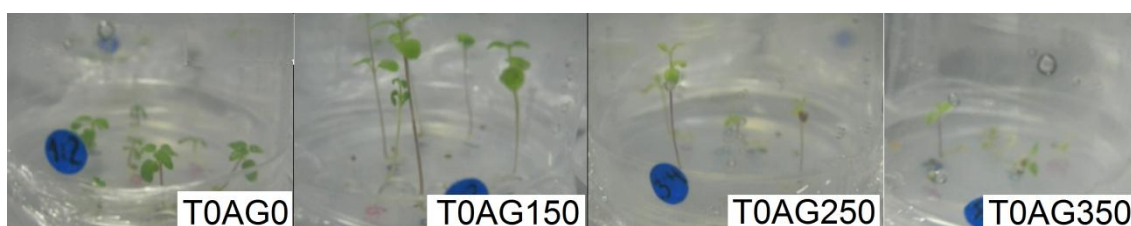


Figura 9. Plántulas de *L. graveolens* con 25 días de edad. En las imágenes se muestran las plántulas de *L. graveolens* con 0 h de imbibición, de izquierda a derecha se muestran las concentraciones de 0, 150, 250 y 350 mgL⁻¹ de AG₃ respectivamente.

En datilero del desierto (*B. aegyptiaca*) se reportó que embeber las semillas por 14 h en 50 mgL^{-1} de AG_3 incrementa la germinación, la altura de la plántula, el número de hojas, la biomasa y la clorofila total (Gehan y Mona, 2011), este efecto a largo plazo se encontró también en el presente ensayo, donde al aplicar 250 mgL^{-1} de AG_3 se incrementó la biomasa área, como ya se ha reportado previamente en *L. graveolens* este incremento pudo ir acompañado de un aumento en el área foliar debido a la aplicación de AG_3 (González-Nieves *et al.*, 2010).

5.1.3 Índice vástago-raíz (V-R)

Los tratamientos en los cuales se aplica el AG_3 diluido en el agar (T0AG150, T0AG250 y T0AG350), la hormona no solo está en contacto con las semillas durante el proceso de germinación, lo está también con la plántula durante 25 días después de haber germinado. Fue en estos tratamientos donde se registraron los índices V-R más altos que van desde 5.5 hasta 6.6 debido a una elongación del tallo (Fig. 12), además en la parte radicular de estas plantas se registraron los valores más bajos en biomasa.

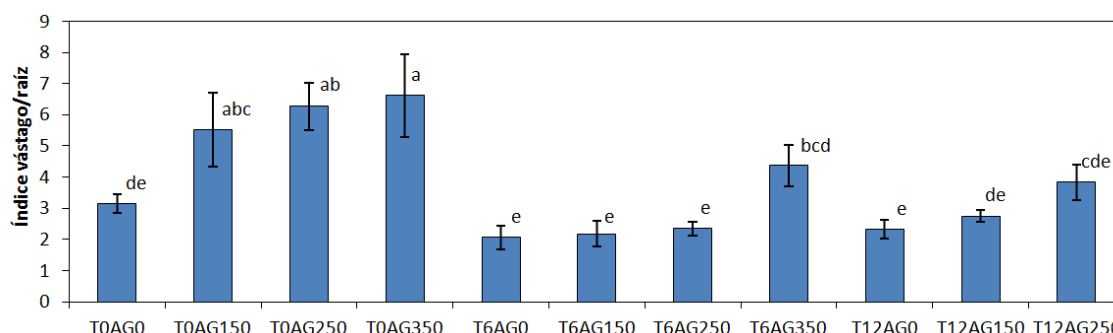


Figura 10. Índice vástago/raíz de plántulas de 25 días de edad de *L. graveolens*. plántulas de 25 días de edad de *L. graveolens* sometidas a tres tiempos de imbibición (0, 6 y 12 h) los cuales se sometieron a su vez a cuatro concentraciones de AG_3 (0, 150, 250 y 350 mgL^{-1}). No se muestran valores para el tratamiento T12AG350. (Promedio \pm Error Est., las diferencias significativas se marcan con letras, medias marcadas con distinta letra son diferentes de manera significativa $P \leq 0.05$).

González-Nieves *et al.* (2010) reportaron que al embeber semillas de *L. graveolens* en soluciones con 250 mgL^{-1} de AG_3 por 12 h o con 200 mgL^{-1} de AG_3 por 24 h lograron en la plántula una altura a los 110 días después de la siembra de 2.8 cm superior a su grupo control, mientras que, en el presente ensayo los grupos control donde no se aplicó AG_3 rondaron los 10 cm de altura a los 25 días después de haber germinado (datos no mostrados), probablemente esta diferencia se deba a que las plantas producidas en esta investigación se cultivaron bajo condiciones controladas que favorecieron el

crecimiento de la planta, o bien, se deba a una diferencia característica de la población con la que se trabajó.

Al embeber semillas de ajonjolí (*Sesamum indicum*) por 2 h en una solución con 500 mgL⁻¹ de AG₃ se mejora la relación V-R, sin embargo, también reportan una reducción en el crecimiento de la raíz por la aplicación de AG₃ (Kyauk *et al.*, 1995). Las semillas que fueron embebidas por 6 y 12 h presentaron un incremento en la biomasa de la raíz con respecto a semillas sin embeber, este resultado favorece el anclaje y exploración en profundidad de las plántulas para poder establecerse y la hace menos susceptible a la desecación.

5.1.4 Terpenos

Los terpenos medidos en la parte aérea de las plántulas fueron β-mirceno, γ-terpineno, timol, carvacrol y α-cariofileno. Timol y α-cariofileno fueron los más abundantes, el tratamiento T12GA250 tuvo aproximadamente seis veces más

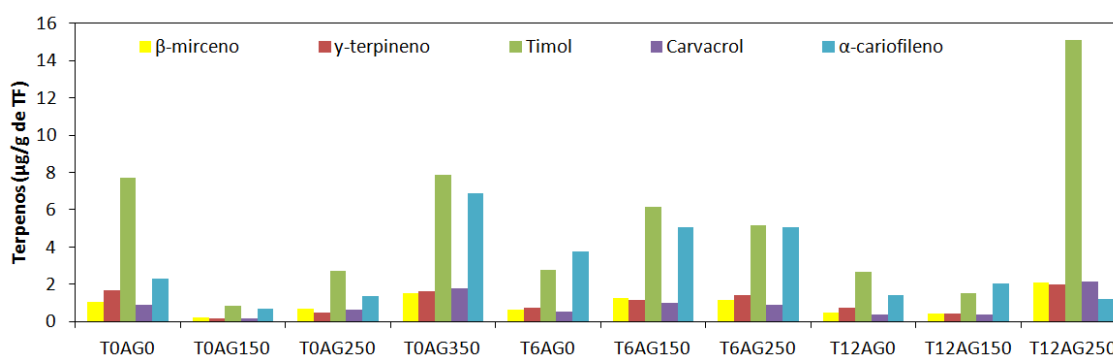


Figura 11. Acumulación de terpenos en plántulas de 25 días de edad de *L. graveolens*, la barra representa una muestra de 5 individuos, por lo que no se cuentan con repeticiones. TF: Tejido fresco

timol con respecto a su control (Fig. 13).

Contrario a lo reportado en el presente reporte, en datilero del desierto (*B. aegyptiaca*) al embeber las semillas por 14 h en soluciones con AG₃ se disminuyó el contenido de compuestos fenólicos, mientras que, se incrementó el contenido de alcaloides y saponinas en las plántulas (Gehan y Mona, 2011). Es importante mencionar que en plantas adultas de *L. graveolens* de la comunidad de San Rafael no se presentan los compuestos timol y carvacrol, mientras que, en el presente trabajo solo se presentan los mencionados compuestos en la etapa de plántula, probablemente se deba a que la plántula los requiera por su actividad antimicrobiana.

Las semillas de *L. graveolens* de la comunidad de San Rafael embebidas por 12 h alcanzan un 90% de germinación, la aplicación de 150, 250 y 350 mgL⁻¹ de AG₃ disminuye el porcentaje de germinación, sin embargo, las plantas

obtenidas de semillas embebidas en 250 mgL^{-1} de AG_3 por 12 h mostraron un incremento en la biomasa aérea y en monoterpenos, especialmente timol.

En plantas de soya (*Glycine max*) cuando se aplica el AG_3 asperjándolo sobre las hojas se incrementan el número de ramas, de hojas, de flores y de semillas (Sarkar *et al.*, 2002), por lo cual, se podría sugerir para futuros trabajos en *L. graveolens* que se aplique el AG_3 en la etapa de plántula y no como tratamiento pregerminativo, con lo cual se podrían obtener plantas de mayor tamaño y biomasa.

El incremento de la biomasa en *L. graveolens* inducido por la aplicación de AG_3 podría ser atribuido a un rápido incremento en la división celular, elongación celular y la acumulación de fotosintatos (Abdel-Latef, 2003).

5.2 Experimento 2: Aplicación de AJ

5.2.1 Parámetros fotosintéticos e intercambio gaseoso

En numerosas especies se ha registrado un incremento en la producción de los componentes del aceite esencial como alcaloides, fenoles, flavonoides y varios terpenos debido a la aplicación de AJ, por lo cual se decidió probar su efecto en *L. graveolens*, encontrando los siguientes resultados:

La aplicación del AJ en las dos concentraciones utilizadas no mostró un efecto significativo ($p \leq 0.05$) en el intercambio gaseoso ni en la fijación de CO_2 en plantas de *L. graveolens*; aunque existieron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tiempos de medición en la tasa de fijación de CO_2 y la concentración de CO_2 interna (C_i) (Fig. 14A y 14C), este efecto fue debido a que el primer registro a las 0 h, se realizó en una condición de saturación de CO_2 con respecto a las mediciones realizadas a las 24 y 48 h.

Se muestra una reducción estadísticamente no significativa ($p \leq 0.05$) en la conductancia estomática y la transpiración a las 48 h con la aplicación del AJ, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la tasa de fijación de CO_2 , conductancia estomática, C_i ni transpiración (Fig. 14).

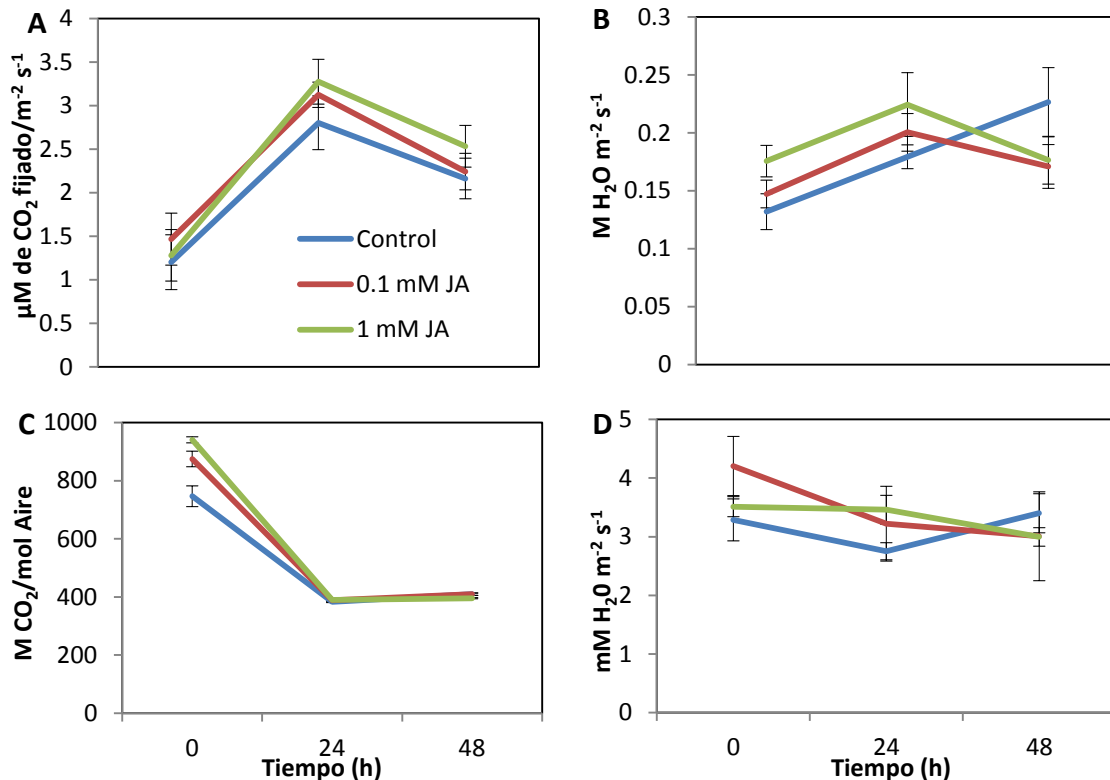


Figura 12. Parámetros fotosintéticos e hídricos de plantas de *L. graveolens*. Tasa de fijación de CO_2 (A), conductancia estomática (B), C_i (C) y transpiración (D) de plantas tratadas con 3 concentraciones de AJ 0. 0.1 y 1 mM, los valores mostrados representan los tiempos de 0, 8, 24 y 48 h después del tratamiento de AJ. (Promedio \pm Error Est., las diferencias significativas se marcan con letras, medias marcadas con distinta letra son diferentes de manera significativa $P \leq 0.05$).

Resultados similares se reportaron en *L. graveolens*, donde después de pasadas 24 h de haber causado daño foliar (perforación en 3 hojas con dos orificios de 5 mm) se registró una reducción en la conductancia estomática y la transpiración con respecto a su control (Moreno-Rodríguez, 2014).

La aplicación exógena del AJ causa múltiples efectos, se ha reportado un efecto en diferentes especies en la inducción del cierre estomático como en haba (*Vicia faba*; Liu *et al.*, 2002), *Avena sativa* (Satler y Thimann, 1981), una reducción en la tasa de fijación de CO_2 y en la actividad de la enzima RuBisCO (Ribulosa 1,5 biosfato carboxilasa-oxigenasa) en cebada (*Hordeum vulgare*; Tsonev *et al.*, 1998); además, también redujo la transpiración en tomate (*L. esculentum*; Herde *et al.*, 1997); Horton (1981) menciona que es necesario utilizar dosis altas de jasmonatos para inducir el cierre estomático, ya que a bajas concentraciones no se logra este efecto; los trabajos donde el AJ ha reducido las variables mencionadas anteriormente, la hormona se aplicó diluido en el medio donde se cultivaron las plantas, por lo cual, el tiempo de exposición de las mismas fue mucho más prolongado en comparación con lo reportado en la presente investigación donde solo de asperjó una sola ocasión.

5.2.2 Pigmentos fotosintéticos

En la presente investigación el AJ incrementó significativamente ($p \leq 0.05$) el contenido de clorofila *a* a las 48 h después de la aplicación de 0.1 mM de AJ, pero solo en la parte basal de la planta, mientras que, no se encontraron diferencias significativas en el contenido de clorofila *b*, por otro lado, se incrementó el contenido de carotenos totales en ambos tratamientos experimentales en la parte basal de la planta (Fig. 15).

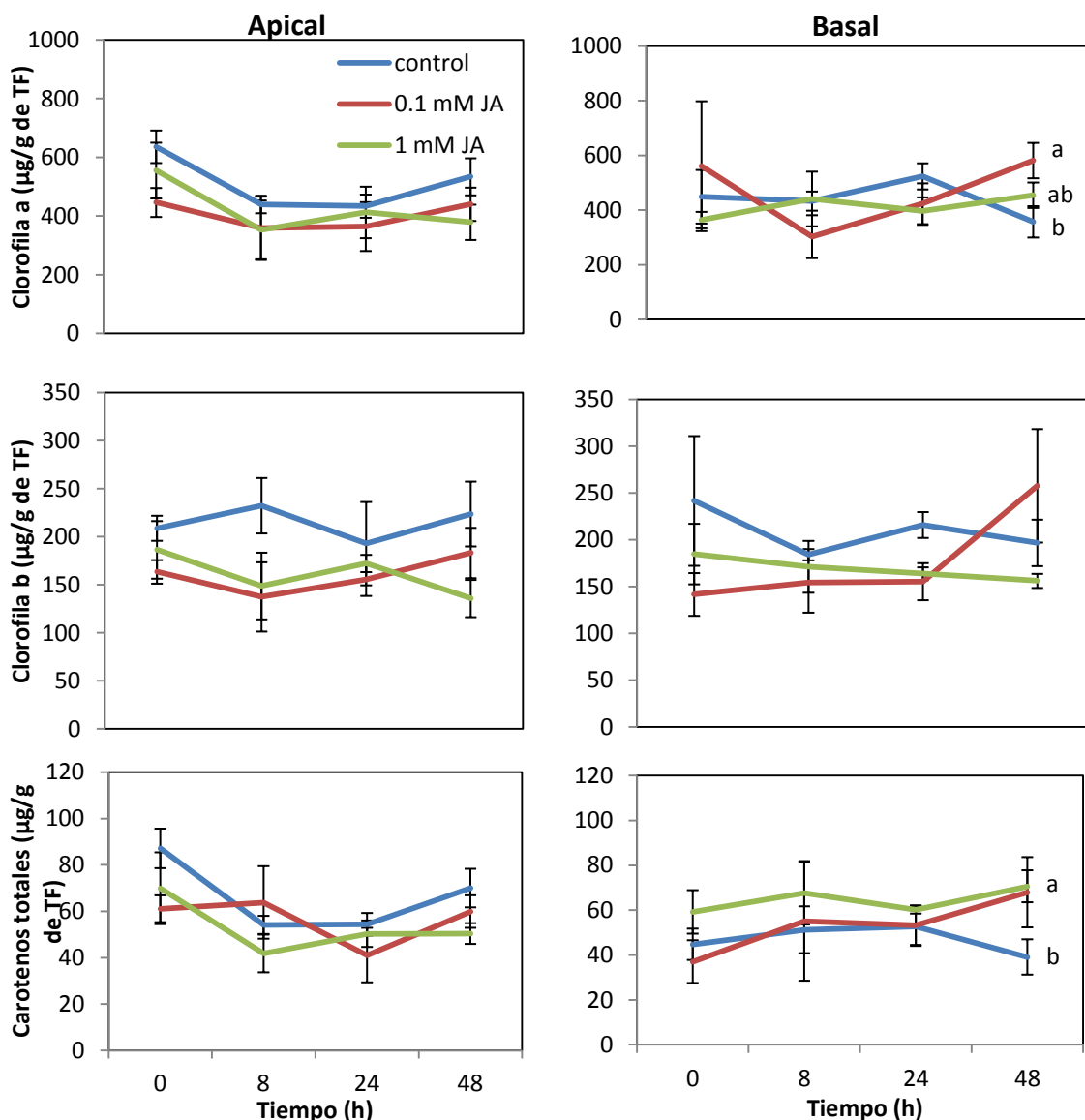


Figura 13. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos de la parte apical y basal de *L. graveolens*. Contenido de clorofila *a*, *b* y carotenos totales de plantas tratadas con 3 concentraciones de AJ 0. 0.1 y 1 mM, los valores mostrados representan los tiempos 0, 8, 24 y 48 h después del tratamiento con AJ. TF: Tejido fresco. (Promedio \pm Error Est., las diferencias significativas se marcan con letras, medias marcadas con distinta letra son diferentes de manera significativa $P \leq 0.05$).

El AJ tiene un efecto inhibitor en la síntesis y acumulación de clorofilas y carotenoides, ya que induce la senescencia de manera aislada en las hojas, y con ello la degradación de pigmentos fotosintéticos (He *et al.*, 2002); Contrario a lo que se ha reportado en la mayoría de los estudios, en el presente ensayo y en otros trabajos se ha reportado en que el AJ y su derivado el MEAJ al ser asperjados en la planta incrementan el contenido de las clorofilas *a* y *b* y de carotenos en frijol (*P. vulgaris*; Farouk y Osman, 2011), chícharo (*Pisum sativum*; Farouk, 2005), pepino (*Cucumis sativa*; Farouk *et al.*, 2008) en este último, el incremento en los pigmentos fotosintéticos se acompañó de un incremento en el contenido de carbohidratos totales, además en otro estudio también se reportó un aumento de las clorofilas y carotenos en chícharo (*Cajanus cajan*; Poonam *et al.*, 2013).

Farouk *et al.* (2005, 2008 y 2011) mencionan que el incremento en los pigmentos pudiera estar relacionado con un aumento en el contenido de potasio, el cual podría elevar el número de cloroplastos por célula por hoja (Possingham, 1980). En lenteja de agua (*Wolffia arhriza*) concentraciones bajas de AJ indujeron la acumulación tanto de clorofilas como de carotenos, mientras que, dosis altas de AJ inhibieron la síntesis de clorofilas pero no de carotenos (Piotrowska *et al.*, 2010). El AJ activó la síntesis de carotenos los cuales protegen a las clorofilas de la oxidación y finalmente contribuyen al incremento en el contenido de clorofilas.

Estos datos comprueban que la aplicación de 0.1 y 1 mM de AJ en *L. graveolens* no tiene efectos perjudiciales sobre los parámetros fotosintéticos, es decir, que la planta no se encuentra en un estrés que cause la senescencia.

5.2.3 Número de tricomas glandulares por área

El número de tricomas glandulares de las hojas de *L. graveolens* aumentó de manera significativa tanto en la parte apical como en la parte basal de la planta. En ambos casos este incremento solo se observa en el envés de la hoja el cuál, registró un mayor efecto con la aplicación de 1 mM de AJ, ya que se incrementó el número de tricomas en un 224% y un 151% en la parte apical y basal respectivamente en comparación con su grupo control (Fig. 16).

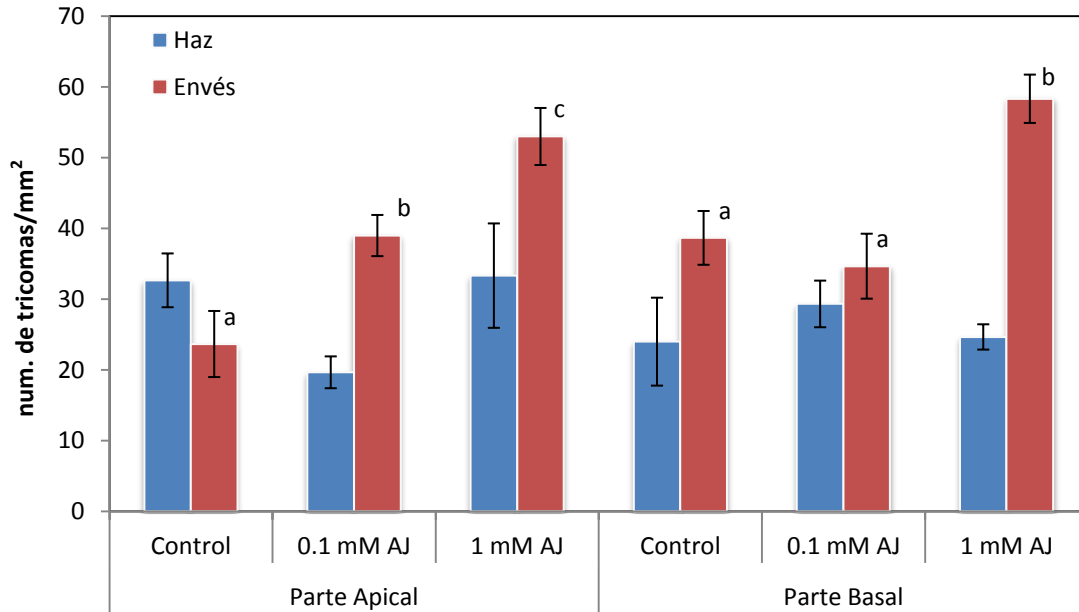


Figura 14. Número de tricomas de la parte apical y basal del haz y del envés de *L. graveolens* Número de tricomas 8 días después de la aplicación de los siguientes tratamientos 0, 0.1 y 1 mM de AJ. (Promedio \pm Error. Est., las diferencias significativas se marcan con letras, medias marcadas con distinta letra son diferentes de manera significativa $P \leq 0.05$).

Estos resultados concuerdan con los encontrados en tomate (*L. esculentum*), donde la densidad de tricomas fue nueve veces más alta a los 7 y 14 días después de aplicar MeAJ que en el grupo control (Boughton *et al.*, 2005); en cacahuate (*A. hypogaea*) se incrementó el número de tricomas a los 5 y 10 días después de aplicar 1 mM de AJ (War *et al.*, 2013). De igual forma en *Arabidopsis thaliana* aplicando las mismas concentraciones de AJ que en el presente trabajo (0.1 y 1 mM) se incrementó la producción de tricomas (Traw y Bergelson, 2003). Moreno-Rodríguez (2014) reporta que en *L. graveolens* al simular el herbivorismo causando daño foliar (perforación en 3 hojas con dos orificios de 5 mm) se disminuyó la cantidad de tricomas glandulares en el haz y en el envés de las hojas adyacentes a los 8 días después del daño, lo cual es contrario a lo encontrado en el presente ensayo, es probable que el daño causado no haya sido suficiente estímulo para desencadenar la producción de tricomas glandulares o el daño haya sido demasiado severo.

Muchas plantas responden al daño por herbivorismo con un incremento en los tricomas, los cuales tienen la función de proveer una barrera física (tricomas no glandulares) o química (tricomas glandulares; Fig. 17) contra los herbívoros, protegen de la radiación UV, ayudan a regular la temperatura y la transpiración de la hoja (Wagner *et al.*, 2004).

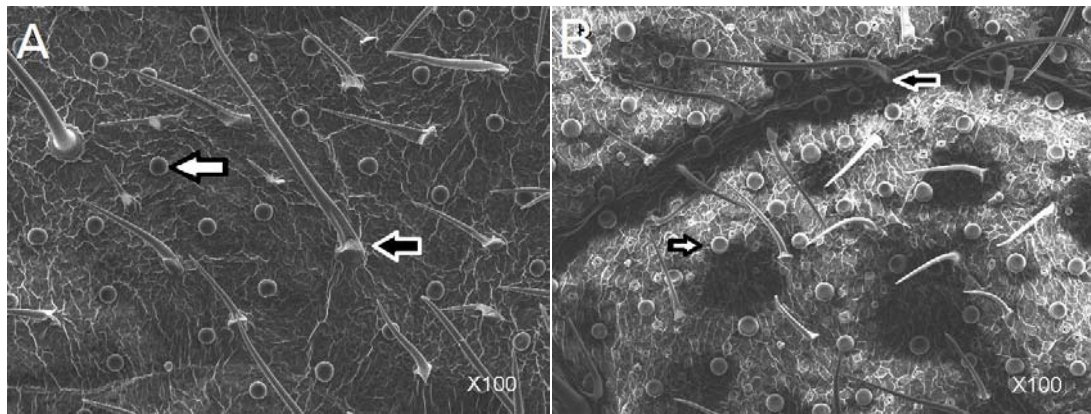


Figura 15. Tricomas glandulares (flechas con relleno blanco) y no glandulares (flechas con relleno negro) en el haz (A) y el envés (B) de hojas de *L. graveolens* del grupo control. 100X. MEB UBIPRO. Imagen Rafael Quintanar.

Los tricomas glandulares contienen varios exudados tóxicos que pueden ser secretados en la superficie de la planta o puede romperse en contacto con herbívoros, causando irritación, atrapamiento o la muerte (Simmons y Gurr, 2004). Se ha reportado que el AJ activa factores de transcripción bHLH (Transparent Testa8, Glabra 3, Enhancer of Glabra 3 y R2R3 MYB) en *Arabidopsis* que funciona como un switch permitiendo que se desencadene la formación de tricomas, vistas las cosas de esta manera, algo similar podría estar ocurriendo en *L. graveolens*.

5.2.4 Terpenos

Moreno-Rodríguez (2014) reportó que las plantas silvestres de *L. graveolens* provenientes de San Rafael Coxcatlan, Puebla presentan como componente principal de su aceite esencial eucaliptol, γ -terpineno y cimeno, lo cual concuerda con lo encontrado en el presente trabajo. En el cual se registraron 13 terpenos, 11 monoterpenos y 2 sesquiterpenos (Fig. 18), los cuales ya habían sido reportados previamente para *L. graveolens* (Salgueiro *et al.*, 2003; Vázquez y Dunford, 2005; Rivero-Cruz *et al.*, 2011; Moreno-Rodríguez, 2014).

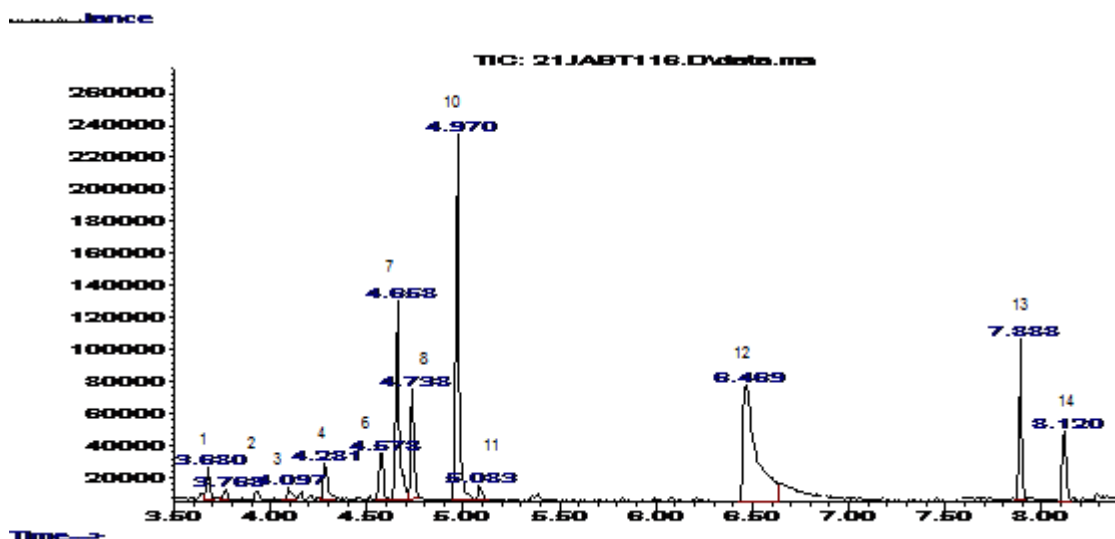


Figura 16. Cromatograma obtenido en CG-EM de extracto hexánico de hojas de un individuo de *L. graveolens*.

Tabla 2. Terpenos encontrados en hojas de *L. graveolens* por CG-EM y su tiempo de retención (tR).

Número	Compuesto	tR (min)	Abundancia (%)
1	4(10)thujeno	3.696	2.507484045
2	α -pineno	3.792	5.105936329
3	camfeno	3.96	4.949195183
4	β -mirceneno	4.313	2.875612531
5	α -felandreno	4.489	11.85320297
6	α -terpineno	4.61	3.493486665
7	<i>p</i> -cimeno	4.69	3.790332743
8	limoneno	4.73	3.567786614
9	β -terpineno	4.746	2.702017759
10	eucaliptol	4.786	19.7631073
11	γ -terpineno	5.01	11.79034853
12	estándar interno	6.485	
13	cariofileno	7.96	17.73129674
14	α -cariofileno	8.201	9.870192582

Los principales monoterpenos reportados en *L. graveolens* de la comunidad de San Rafael fueron eucaliptol, γ -terpineno, α -felandreno (Tabla 2), contrario a lo reportado en la literatura las plantas de esta comunidad no tienen como componente principal del aceite esencial timol y carvacrol, como las plantas de la localidad de Zapotitlan de las Salinas en Puebla o plantas del estado de Chihuahua (Vázquez y Dunford, 2005), las cuales si presentan altas concentraciones de estos terpenos, como indicativo de que existen diversos quimiotipos por localidad. Es probable que estas diferencias se deban a la funcionalidad de los compuestos, ya que se ha reportado que eucaliptol y *p*-cimeno se presentan en mayor cantidad en época de sequía y se les relaciona

con una actividad antioxidante, mientras que, timol y carvacrol se presentan en mayor cantidad en época de lluvias y se les relaciona con una actividad antifúngica (Moreno-Rodríguez, 2014). La precipitación pluvial media anual reportada para las localidades de San Rafael y Zapotitlan de las Salinas son 424.5 y 394.6 mm respectivamente (Dávila y Lira, 2002; Díaz *et al.*, 2007), no obstante, otros autores han reportado que la humedad no afecta el contenido de timol y carvacrol en *L. graveolens* (Vázquez y Dunford, 2005).

En los resultados se muestra una tendencia donde disminuyen los terpenos en las primeras horas, una menor cantidad de compuestos puede ser debida a una temprana liberación mediante su emisión para disuadir al herbívoro y posteriormente se da la acumulación con el fin de evitar el herbivorismo, sin embargo, no se muestran diferencias significativas.

En albahaca (*O. basilicum*) una concentración de 0.5 mM de MEAJ incrementó significativamente la cantidad de terpenos totales con respecto a concentraciones de 0, 0.01 y 0.1 de MEAJ (Kim *et al.*, 2006), un comportamiento similar ocurrió en el presente trabajo donde la concentración mayor de AJ (1 mM), tuvo un efecto en *L. graveolens* incrementado de manera significativa el contenido total de terpenos con respecto a 0 y 0.1 mM de AJ tanto en la parte apical como en la parte basal de la planta (Fig. 19).

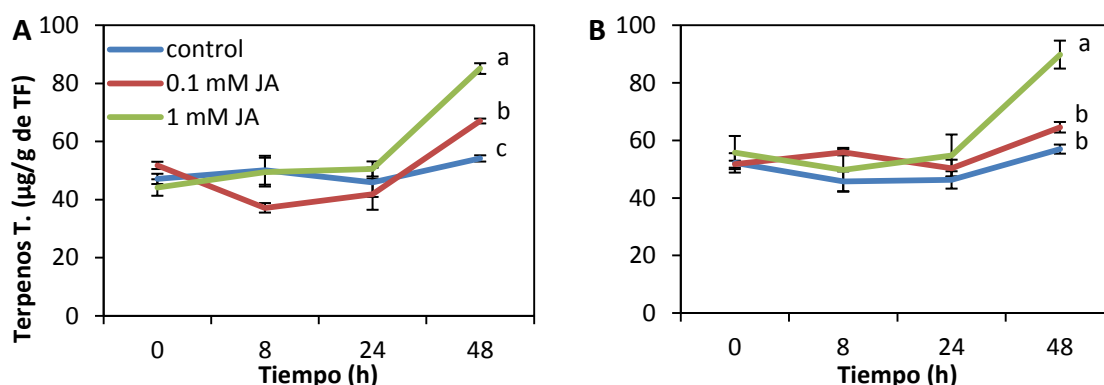


Figura 17. Acumulación de terpenos totales de la parte apical (A) y basal (B) de *L. graveolens*. Contenido de terpenos totales de plantas tratadas con 0, 0.1 y 1 mM de AJ, los valores mostrados representan los tiempos 0, 8, 24 y 48 h después del tratamiento de AJ. (Promedio \pm Error Est., las diferencias significativas se marcan con letras, medias marcadas con distinta letra son diferentes de manera significativa $P \leq 0.05$).

Con respecto al compuesto α -pineno se registró una acumulación estadísticamente significativa a partir de las 24 h para el tratamiento de 1 mM de AJ en ambas partes de la planta, mientras que, el tratamiento de 0.1 mM de AJ solo se encontraron diferencias significativas hasta las 48 h y solo en la parte apical de la planta (Fig. 20). Contrario a lo encontrado en el presente trabajo, se ha reportado que el daño foliar en *L. graveolens* disminuye el contenido de este compuesto (Moreno-Rodríguez, 2014). La aplicación de MEAJ en plantas de comino (*Cuminum cyminum*) incremento la cantidad de su isómero estructural β -pineno (Rahimi *et al.*, 2013).

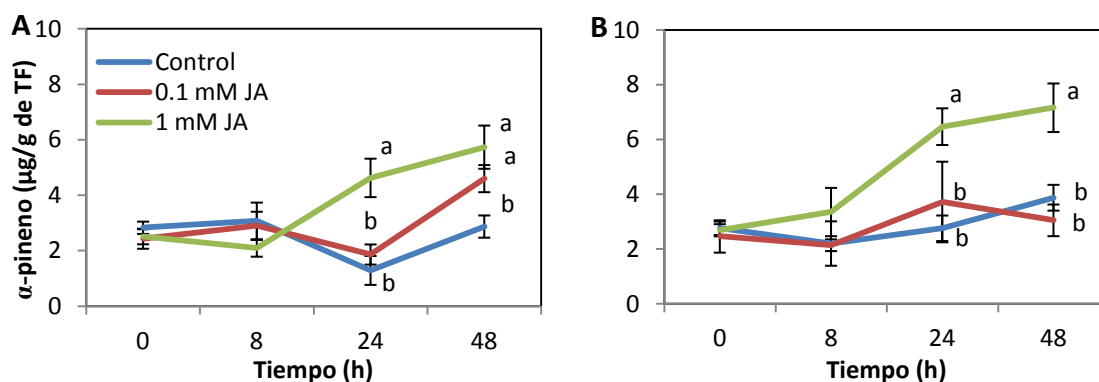


Figura 18 Acumulación de α -pineno en la parte apical (A) y basal (B) de *L. graveolens*. Contenido de α -pineno en plantas tratadas con 3 concentraciones de 0, 0.1 y 1 mM de AJ, los valores mostrados representan los tiempos 0, 8, 24 y 48 h después del tratamiento de AJ. (Promedio \pm Error Est., las diferencias significativas se marcan con letras, medias marcadas con distinta letra son diferentes de manera significativa $P \leq 0.05$).

La aplicación de AJ no ejerce un efecto significativo sobre el compuesto camfeno, a pesar de que se marca una tendencia hacia el incremento de este compuesto a las 48 h con la aplicación de 1 mM de AJ (Fig. 21). En cacahuate (*A. hypogaea*) con la aplicación de 1 mM de AJ se incrementaron las defensas químicas de la planta a las 48 h, aunque los valores más altos los registraron a las 96 h (War *et al.*, 2011). Es probable que algo similar pudiera haber ocurrido con respecto a camfeno y los demás terpenos que se evaluaron en el presente trabajo, es necesario realizar algún estudio donde se consideren tiempos de medición posteriores a las 48 h.

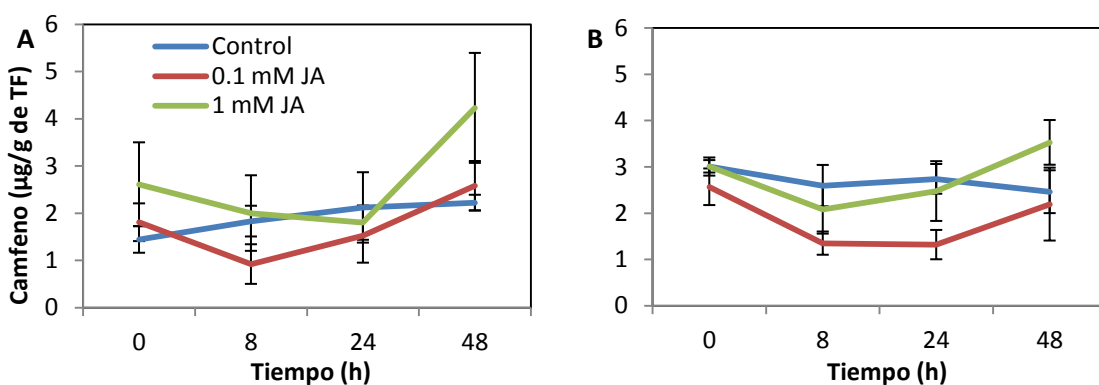


Figura 19. Acumulación de camfeno en la parte apical (A) y basal (B) de *L. graveolens*. Contenido de camfeno en plantas tratadas con 3 concentraciones de AJ (0, 0.1 y 1 mM), los valores mostrados representan los tiempos 0, 8, 24 y 48 h después del tratamiento de AJ. (Promedio \pm Error Est., las diferencias significativas se marcan con letras, medias marcadas con distinta letra son diferentes de manera significativa $P \leq 0.05$).

Ningún tratamiento con AJ mostró un efecto significativo sobre la acumulación de β -terpineno (Fig. 22).

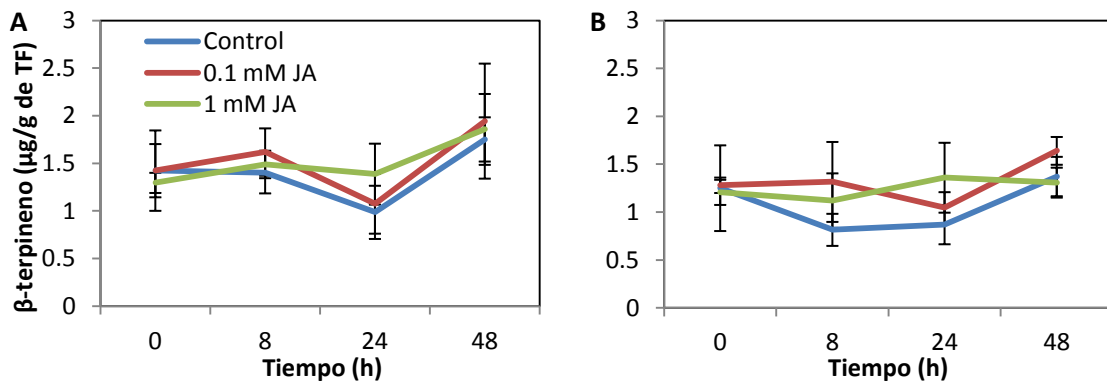


Figura 20 Acumulación de β -terpineno en la parte apical (A) y basal (B) de *L. graveolens*. Contenido de β -terpineno en plantas tratadas con 0, 0.1 y 1 mM de AJ, los valores mostrados representan los tiempos 0, 8, 24 y 48 h después del tratamiento de AJ. (Promedio \pm Error Est., las diferencias significativas se marcan con letras, medias marcadas con distinta letra son diferentes de manera significativa $P \leq 0.05$).

En el presente trabajo ningún tratamiento de AJ afectó la acumulación de los compuestos 4(10)thujeno y β -mirceno (Fig. 23 y 24), este resultado concuerda con los encontrados en tomate (*L. esculentum*) donde la aplicación de AJ no induce la expresión de la enzima LeMTS2, la cual es responsable de la síntesis de 4(10)thujeno (también conocido como sabineno), β -mirceno y β -fellandreno.

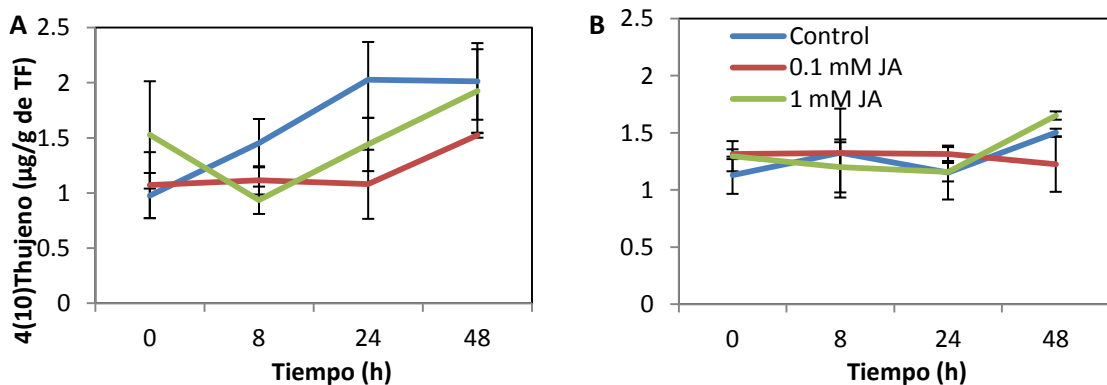


Figura 21 Acumulación de 4(10)thujeno en la parte apical (A) y basal (B) de *L. graveolens*. Contenido de 4(10)thujeno en plantas tratadas con 0, 0.1 y 1 mM de AJ, los valores mostrados representan los tiempos 0, 8, 24 y 48 h después del tratamiento de AJ. (Promedio \pm Error Est., las diferencias significativas se marcan con letras, medias marcadas con distinta letra son diferentes de manera significativa $P \leq 0.05$).

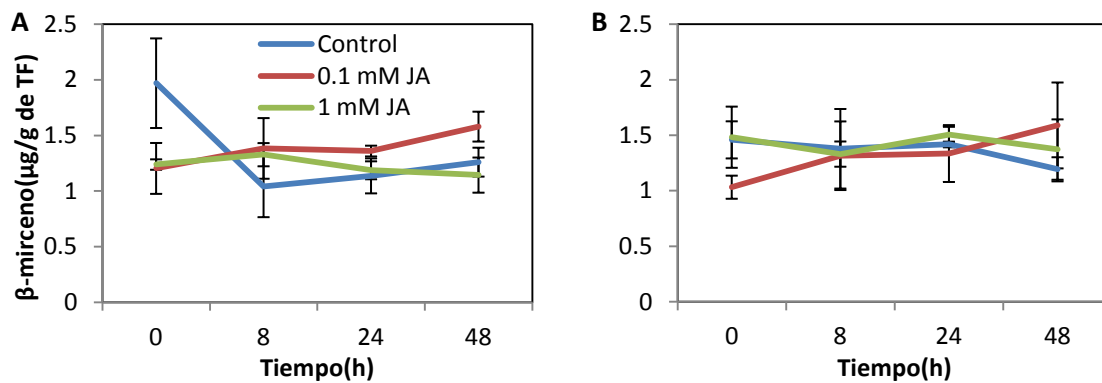


Figura 22. Acumulación de β -mirceeno en la parte apical (A) y basal (B) de *L. graveolens*. Contenido de β -mirceeno en plantas tratadas con 0, 0.1 y 1 mM de AJ, los valores mostrados representan los tiempos 0, 8, 24 y 48 h después del tratamiento de AJ. (Promedio \pm Error Est., las diferencias significativas se marcan con letras, medias marcadas con distinta letra son diferentes de manera significativa $P \leq 0.05$).

En la parte apical de la planta los tratamientos con AJ se encontró mayor contenido de limoneno a las 48 h con respecto al grupo control, mientras que, en la parte basal se registró un aumento de limoneno en ambos tratamientos de AJ con respecto al grupo control e incluso también se encontraron diferencias entre los tratamientos experimentales. El tratamiento con 1 mM de AJ tuvo un mayor contenido de limoneno a las 48 h que el tratamiento de menor concentración de AJ (Fig. 25). De igual manera en plantas de arroz (*Oryza sativa*) la aplicación de 10 mM de AJ incremento hasta 4 veces la emisión de limoneno (Lou *et al.*, 2005), contrario a estos resultados en hisopo de Anís (*A. foeniculum*) la aplicación de MEAJ decreció la cantidad de limoneno a las 48 h, no obstante, a las 72 h no se mostraron diferencias entre grupo control y el grupo experimental (Fard *et al.*, 2012).

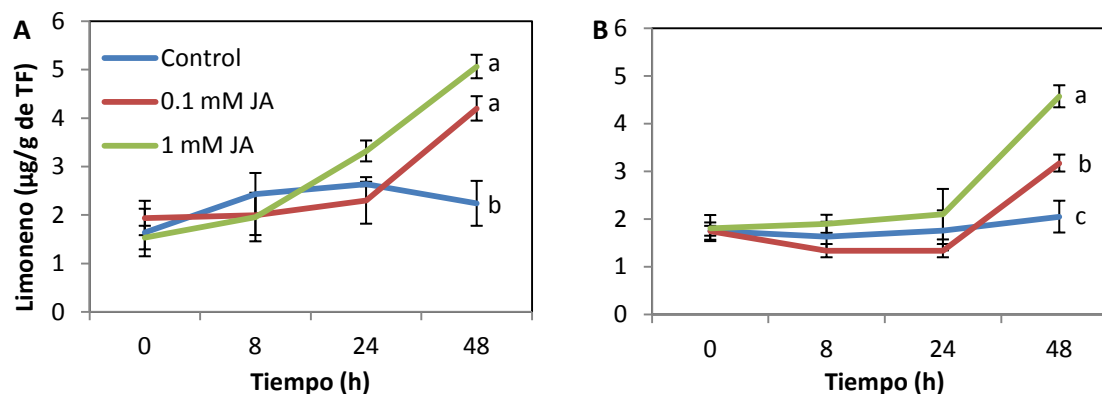


Figura 23. Acumulación de limoneno en la parte apical (A) y basal (B) de *L. graveolens*. Contenido de limoneno en plantas tratadas con 0, 0.1 y 1 mM de AJ, los valores mostrados representan los tiempos 0, 8, 24 y 48 h después del tratamiento de AJ. (Promedio \pm Error Est., las diferencias significativas se marcan con letras, medias marcadas con distinta letra son diferentes de manera significativa $P \leq 0.05$).

Un incremento del compuesto α -felandreno se registró en la parte basal de la planta a las 48 h, debido a la aplicación de los tratamientos experimentales, además en la parte apical se muestra una tendencia a las 48 h donde el tratamiento de 1 mM de AJ parece estar aumentando a diferencia del grupo control y del tratamiento con 0.1 mM de AJ aunque no es estadísticamente significativo (Fig. 26).

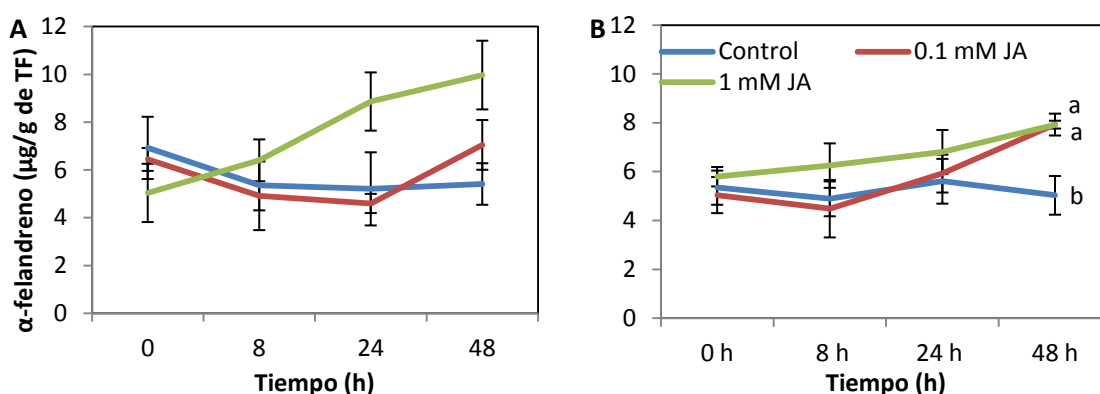


Figura 24. Acumulación de α -felandreno en la parte apical (A) y basal (B) de *L. graveolens*. Contenido de α -felandreno en plantas tratadas con 0, 0.1 y 1 mM de AJ, los valores mostrados representan los tiempos 0, 8, 24 y 48 h después del tratamiento de AJ. (Promedio \pm Error Est., las diferencias significativas se marcan con letras, medias marcadas con distinta letra son diferentes de manera significativa $P \leq 0.05$).

En las plantas de *L. graveolens* que fueron tratadas con 1 mM de AJ se incrementó el contenido de *p*-cimeno a las 48 h tanto en la parte apical como en la parte basal con respecto al grupo control y 0.1 mM de AJ (Fig. 27).

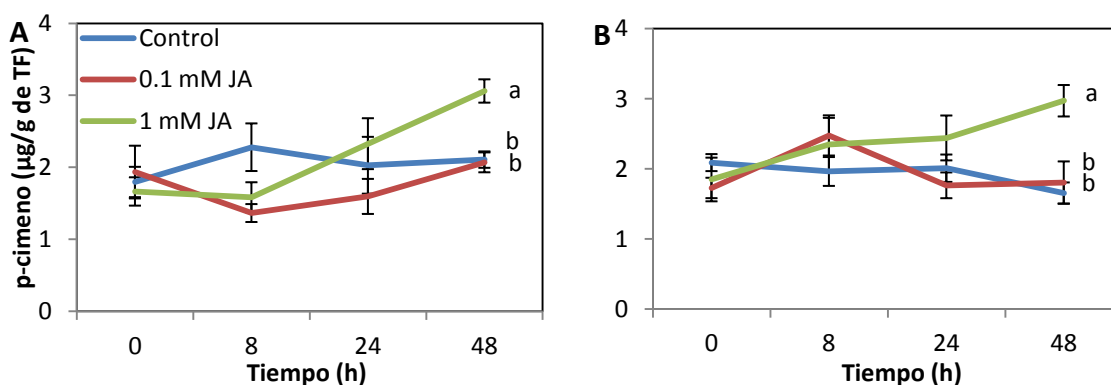


Figura 25. Acumulación de *p*-cimeno en la parte apical (A) y basal (B) de *L. graveolens*. Contenido de *p*-cimeno en plantas tratadas con 0, 0.1 y 1 mM de AJ, los valores mostrados representan los tiempos 0, 8, 24 y 48 h después del tratamiento de AJ. (Promedio \pm Error Est., las diferencias significativas se marcan con letras, medias marcadas con distinta letra son diferentes de manera significativa $P \leq 0.05$).

Se ha reportado previamente que la aplicación de jasmonatos (MEAJ) en plantas de comino (*C. cyminum*) incrementa la acumulación de este compuesto (Rahimi *et al.*, 2013). *p*-cimeno es precursor de timol y carvacrol, de los cuales

ya se ha mencionado su importancia para *L. graveolens*; además, estos compuestos se incrementan a las 24 h en esta especie después de causarle daño foliar (Moreno-Rodríguez, 2014); o aplicando 0.1 mM de AJ en plantas de tomillo (*Thymus daenensis*; Ashrafi *et al.*, 2012). Es probable que la síntesis de timol y carvacrol pudiera ser inducida por el AJ en plantas de *L. graveolens* de un quimiotipo que si produzca estos compuestos, como el de Zapotitlán de las Salinas, Puebla.

Al aplicar 0.1 y 1 mM de AJ en plantas de *L. graveolens* no se encontraron diferencias significativas en la acumulación de α -terpineno (Fig. 28). Sin embargo, se ha reportado que al causar daño foliar en *L. graveolens* se logra incrementar este compuesto (Moreno-Rodríguez, 2014).

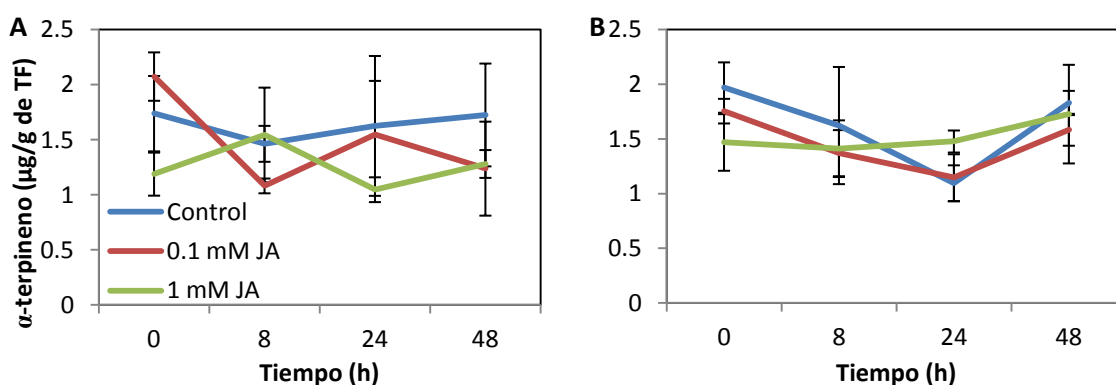


Figura 26. Acumulación de α -terpineno en la parte apical (A) y basal (B) de *L. graveolens*. Contenido de α -terpineno en plantas tratadas 0, 0.1 y 1 mM de AJ, los valores mostrados representan los tiempos 0, 8, 24 y 48 h después del tratamiento de AJ. (Promedio \pm Error Est., las diferencias significativas se marcan con letras, medias marcadas con distinta letra son diferentes de manera significativa $P \leq 0.05$).

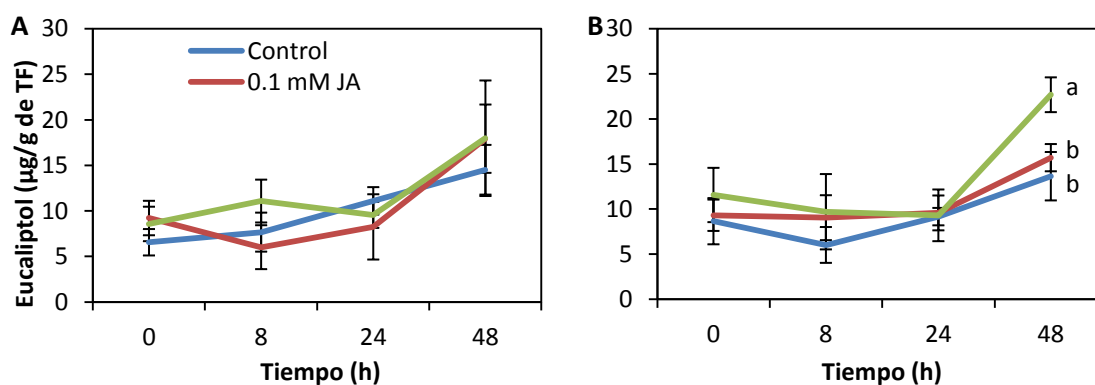


Figura 27. Acumulación de eucaliptol en la parte apical (A) y basal (B) de *L. graveolens*. Contenido de eucaliptol en plantas tratadas con 0, 0.1 y 1 mM de AJ, los valores mostrados representan los tiempos 0, 8, 24 y 48 h después del tratamiento de AJ. (Promedio \pm Error Est., las diferencias significativas se marcan con letras, medias marcadas con distinta letra son diferentes de manera significativa $P \leq 0.05$).

Al aplicar 1 mM de AJ se induce una mayor acumulación de eucaliptol a las 48 h en la parte basal de la planta con respecto al grupo control (Fig. 29). El 1,8-

cineol o eucaliptol es el principal constituyente de numerosos aceites esenciales y es uno de los monoterpenos más abundantes en el aceite esencial de *L. graveolens* de la comunidad de San Rafael y se ha reportado que es un poderoso agente alelopático (Chain *et al.*, 2007).

El daño foliar en *L. graveolens* (Moreno-Rodríguez, 2014) y el MEAJ en comino (*C. cyminum*; Rahimi *et al.*, 2013) provocan un decremento en la cantidad de γ -terpineno, en este trabajo no se encuentran cambios en la concentración de este compuesto en *L. graveolens* cuando son tratadas con AJ (Fig. 30), el cual es precursor de *p*-cimeno, es probable que el γ -terpineno que se esté produciendo sea inmediatamente transformado a *p*-cimeno (Poulouse y Croteau, 1978).

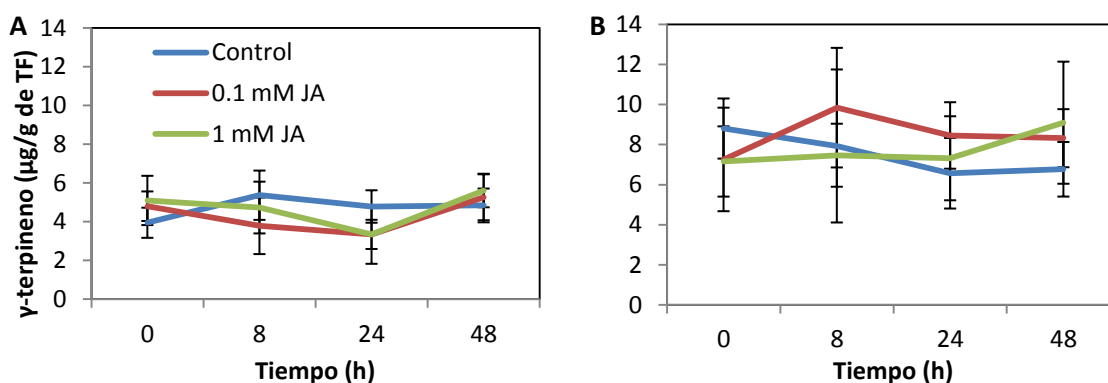


Figura 28. Acumulación de α -felandreno en la parte apical (A) y basal (B) de *L. graveolens*. Contenido de α -felandreno en plantas tratadas con 0, 0.1 y 1 mM de AJ, los valores mostrados representan los tiempos 0, 8, 24 y 48 h después del tratamiento de AJ. (Promedio \pm Error Est., las diferencias significativas se marcan con letras, medias marcadas con distinta letra son diferentes de manera significativa $P \leq 0.05$).

En plantas de col de Bruselas (*Brassica oleracea*) la aplicación de 20 mL por planta de 1 mM de AJ incrementó la emisión a las 24 h de varios compuestos como α -pineno, sabineno, β -mirceno, α -felandreno, α -terpineno, *p*-cimeno, limoneno, eucaliptol, γ -terpineno, entre otros terpenos (Bruinsma *et al.*, 2009). En el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas en β -mirceno, α -terpineno y γ -terpineno, por lo cual es probable que la cantidad y presencia de los componentes de la mezcla del aceite esencial sea dependiente de la dosis de AJ utilizada, lo que concuerda con los resultados aquí mostrados donde una dosis mayor de AJ resulta en una mayor acumulación de mono y sesquiterpenos.

Los sesquiterpenos tienen 3 unidades de isopreno y son emitidos por el daño de herbívoros en plantas (Dudareva *et al.*, 2004). Entre los sesquiterpenos más típicamente inducidos por el daño causado por un herbívoro son β -cariofileno (cariofileno) y α -farneseno (Chen *et al.*, 2003). La aplicación de 1 mM de AJ indujo la acumulación de cariofileno en *L. graveolens* a las 48 h en ambas partes de la planta con respecto al grupo control y 0.1 mM de AJ (Fig. 31). Además se ha reportado que el daño foliar en *L. graveolens* provoca un

incremento en cariofileno a las 24 h (Moreno-Rodríguez, 2014), y en arroz (*O. sativa*) se incrementa su emisión con la aplicación de 10 mM de AJ (Lou *et al.*, 2005).

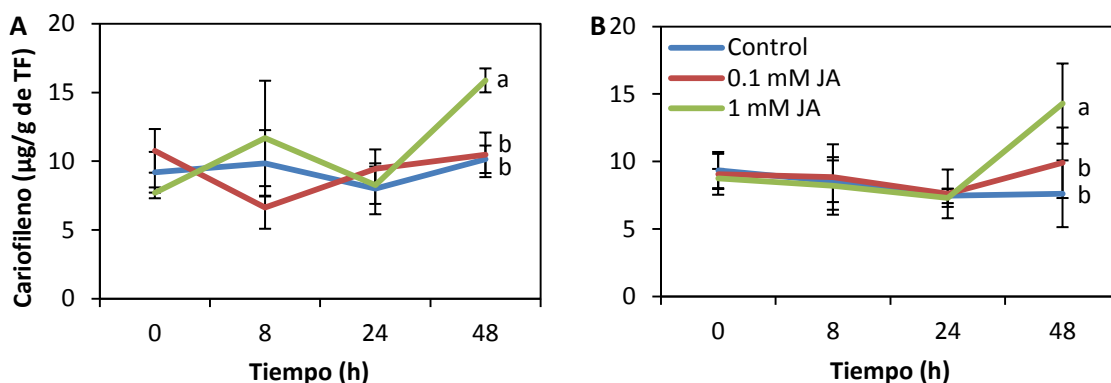


Figura 29. Acumulación de cariofileno en la parte apical (A) y basal (B) de *L. graveolens*. Contenido de cariofileno en plantas tratadas con 0, 0.1 y 1 mM de AJ, los valores mostrados representan los tiempos 0, 8, 24 y 48 h después del tratamiento de AJ. (Promedio \pm Error Est., las diferencias significativas se marcan con letras, medias marcadas con distinta letra son diferentes de manera significativa $P \leq 0.05$).

En α -cariofileno, también conocido como humuleno al aplicar 0.1 mM de AJ se registró un incremento en su acumulación a las 24 h en la parte apical; cuando se aplica 1 mM de AJ ocurre la acumulación hasta las 48 h tanto en la parte apical como en la basal (Fig. 32). En uva (*Vitis vinífera*) la aplicación de MEAJ indujo la síntesis de cariofileno y α -cariofileno, lo cual sugiere que el AJ provoca una síntesis de los mencionados sesquiterpenos en *L. graveolens* (Hampel *et al.*, 2005).

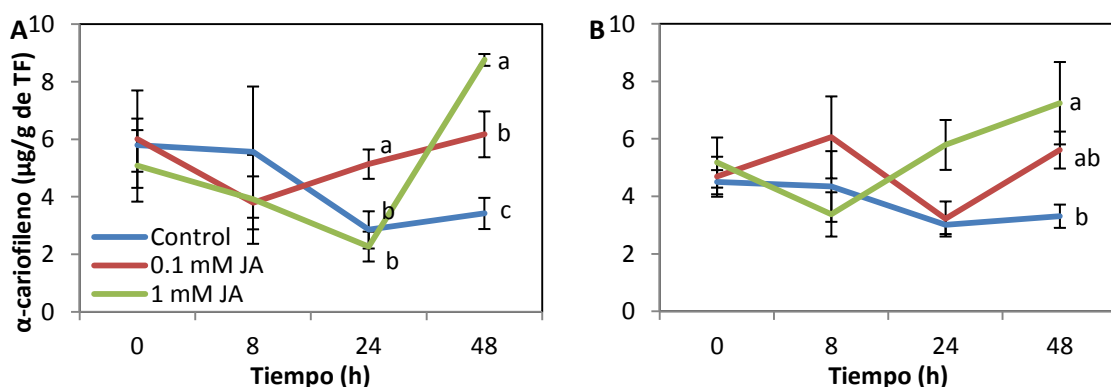


Figura 30. Acumulación de α -cariofileno en la parte apical (A) y basal (B) de *L. graveolens*. Contenido de α -cariofileno en plantas tratadas con 0, 0.1 y 1 mM de AJ, los valores mostrados representan los tiempos 0, 8, 24 y 48 h después del tratamiento de AJ. (Promedio \pm Error Est., las diferencias significativas se marcan con letras, medias marcadas con distinta letra son diferentes de manera significativa $P \leq 0.05$).

Los monoterpenos y sesquiterpenos son producidos por las enzimas monoterpeno y sesquiterpeno sintasas las cuales son inducidas por el herbivorismo. Por ejemplo la actividad de nerolidol sintasa es inducida en haba

de Lima (*P. lunatus*), pepino (*C. sativus*) y maíz (*Zea mays*) (Bouwmeester *et al.*, 1999; Degenhardt y Gershenzon 2000); mientras que, los niveles de transcritos de varias sesquiterpeno sintasas se incrementan en maíz (Shen *et al.*, 2000) y pepino (Mercke *et al.*, 2004). En *Arabidopsis*, la oruga (*Pieris rapae*) induce los transcritos de mirceno/ocimeno sintasa (AtTPs10) y β -ocimeno sintasa (AtTPS03), lo cual coincide con un incremento en la emisión de mirceno (Van Poecke *et al.*, 2001); aunque tratamientos como daño foliar o jasmonatos son suficientes para inducir la terpeno sintasa, por ejemplo en tomate (*L. esculentum*) la aplicación de 1 mM de AJ induce la expresión de la monoterpeno sintasa LeMTS1 la cual produce linalool y su inducción fue predominantemente en tricomas (Van Schie *et al.*, 2007); en *Arabidopsis* la aplicación de 20 μ M de MEAJ (diluido en el medio de cultivo), indujo la expresión de 513 genes a la 1, 6 y 48 h, los cuales se relacionan con el control de los metabolitos secundarios y dichos genes no se indujeron en plantas con el gen COI1 silenciado (coronatine insensitive 1) el cual es un componente en la señalización del AJ. De igual manera aplicando 30 μ M de MEAJ en *Arabidopsis* se da la inducción de genes, algunos de los cuales codifican para enzimas de metabolitos secundarios (Sasaki *et al.*, 2001; Devoto *et al.*, 2005). Aunque se ha reportado que el daño foliar induce los transcritos de terpeno sintasas en *L. graveolens* el daño foliar disminuyó la concentración de transcritos del gen *tps* a las 6 h (Moreno-Rodríguez, 2014) El AJ incrementa la expresión de genes relacionados en la defensa de la planta (Hampel *et al.*, 2005). Algo similar debió ocurrir en el presente trabajo con la aplicación de AJ y el incremento en los monoterpenos y sesquiterpenos.

En síntesis, muchos de los terpenos aquí reportados pueden inhibir el crecimiento de un amplio espectro de patógenos y herbívoros, así el aumento en la síntesis y acumulación de terpenos en los tratamientos experimentales pudo ser debido a que los terpenos sirven de protección para las plantas ante los herbívoros y patógenos debido a su toxicidad y poder de disuasión.

Los pigmentos fotosintéticos y algunos compuestos secundarios (eucaliptol y α -felandreno) se incrementaron solo en la parte basal y no en la apical, lo cual pudo deberse a que la rama donde fue asperjado el AJ se encontraba más próxima a la parte basal y hubo una acumulación temprana de las variables evaluadas, o también pudo deberse a la emisión de volátiles y pérdida de los mismos en la parte apical, o a una translocación de fotosintatos debido a las condiciones de intensidad lumínica (la baja intensidad lumínica en la parte basal combinado con la necesidad de la planta por contrarrestar el efecto del AJ).

Normalmente se espera que las hojas de la parte apical sean más jóvenes que las de la parte basal, sin embargo, en *L. graveolens* no es tan marcado este fenómeno ya que es una planta de hábitos arbustivos, con una alta tasa de renovación en sus hojas.

Las plantas silvestres usan una gran variedad de estrategias para sobrevivir a los ataques de los herbívoros, estas incluyen la producción de compuestos tóxicos y antidigestivos; la atracción de depredadores y parásitos de herbívoros (ya sea por vía de compuestos volátiles o por recompensa como el néctar extrafloral), barreras físicas para impedir la alimentación del herbívoro, una mejora en el crecimiento y la relocalización de fotosintatos para asegurar suficiente energía de almacén para la reproducción (Constabel, 1999; Schwachtje y Baldwin, 2008 y Schuman *et al.*, 2009). Muy pocos estudios se han realizado dentro de una población de una especie silvestre.

La aplicación de AJ ha sido implicada en la activación de múltiples defensas en la planta contra el herbívoro tanto defensas directas como inhibidores de proteínasa y enzimas oxidativas (Thaler *et al.*, 1996). Así como la producción de compuestos volátiles que pueden tener una función como defensas indirectas (Hopke *et al.*, 1994; Boland *et al.*, 1995; Dicke *et al.*, 1999 y Thaler 1999) y todas estas respuestas parecen estar reguladas por el mismo elicitador (AJ), el cual activa estas defensas de manera sistémica.

El aumento en la concentración de terpenos podría atribuirse a un incremento en el crecimiento vegetativo o a una mayor absorción de nutrientes, o debido a la elevada cantidad de tricomas glandulares registrada, que finalmente podría ser el lugar de síntesis y acumulación de dichos compuestos (Rahimi *et al.*, 2013). En las plantas que contienen tricomas glandulares como *L. graveolens*, se considera que la producción de monoterpenos es realizada exclusivamente en los tricomas (Van Schie *et al.*, 2007).

El mecanismo exacto del efecto del AJ en la síntesis de monoterpenos y sesquiterpenos no está completamente entendido (Rahimi *et al.*, 2013), no obstante, de acuerdo con previos estudios parece que el AJ tiene una participación en la regulación de genes y en la actividad enzimática de las rutas metabólicas implicadas en la síntesis de terpenos (Rodríguez-Saona *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2006; Rahimi *et al.*, 2013).

El AJ actúa como una molécula señalizadora que coordina una variedad de respuestas a las heridas en las plantas. En adición a su síntesis y acción local, el AJ también se mueve sistemáticamente a través de los haces vasculares para transmitir la señal de herida en los tejidos distales (Li *et al.*, 2002). De esta manera se puede dar una respuesta sistémica como lo ocurrido en el presente trabajo donde tanto en la parte apical como en la basal de la planta se presentan cambios en el contenido de terpenos y número de tricomas.

Una ventaja de aplicar AJ es que no ocasiona daño físico en los sitios de almacén de terpenos y no destruye los tejidos que están potencialmente implicados en la biosíntesis de terpenos. En plantas tratadas con AJ o su derivado al no darse la ruptura de estas estructuras debido a la técnica no destructiva utilizada es posible que se esté dando un aumento en estos

compuestos pero no su emisión, lo cual representa un beneficio para su uso tradicional.

Aunque en este estudio solo se evaluó el efecto del AJ en el contenido del aceite esencial en *L. graveolens*, futuros estudios sobre los genes y enzimas en la rutas biosintéticas de los terpenos podrían arrojar luz sobre la regulación en la acumulación de terpenos por el AJ en esta planta.

Aún faltan estudios para comprender el efecto del AJ en *L. graveolens*, ya que en varias especies se ha reportado que en condiciones de sequía y/o de salinidad se aumentan los niveles de AJ endógeno, activando la síntesis de proteínas relacionadas al estrés (Kim *et al.*, 2009).

El AJ se ha aplicado en campo en cultivos de tomate y se ha visto una reducción en el ataque de herbívoros (Thaler, 1999). Es posible reemplazar los pesticidas comúnmente utilizados con la aplicación de AJ quien puede proveer de una protección contra el ataque de herbívoros y otros organismos y así proveer de beneficios económicos y ecológicos al reducir el uso de pesticidas.

Existen en el mercado marcas como JAZ® la cual contiene metil-dihidrojasmonato, un compuesto derivado del AJ, el cual aseguran incrementa la producción de resina, reduce la clorosis, incrementa la tolerancia al estrés (calor, enfermedad, salinidad, sequía o inundación), incrementa la producción de tricomas, antioxidantes, compuestos fenólicos y defensas de la planta (hydrobuilder.com). En el presente reporte se sustenta que el AJ incrementa en el número de tricomas y pigmentos fotosintéticos (reducción de clorosis) y aumenta la defensa de la planta incrementando los terpenos en *L. graveolens*.

El orégano es cosechado en la etapa de floración y producción de semilla, ya que, coincide con el momento en donde existe en la planta una mayor acumulación de metabolitos secundarios, la aplicación del AJ podría ser una alternativa para cosechar antes o después del tiempo de reproducción de la especie y así lograr que las hojas tengan las características químicas deseadas.

En el presente ensayo se pudo observar que las plantas de *L. graveolens* crecen mejor en una capacidad de campo al 80% que en una saturada y que al estar permanentemente dentro de la bolsa se crea una alta humedad en el aire con lo cual, aparentemente favorece el crecimiento vegetativo; se requiere un posterior trabajo para confirmar lo antes dicho.

6. Conclusiones

Las plantas de *L. graveolens* de la comunidad de San Rafael, Coaxcatlan, sintetizan timol y carvacrol en la etapa de plántula, sin embargo, al superar esta etapa, la síntesis de estos compuestos se suprime. De tal manera que las plantas adultas de esta comunidad no presentan estos compuestos.

La aplicación de AG3 a la semillas de *L. graveolens* inhibió la germinación.

Las semillas de *L. graveolens* con un año de almacenamiento solo requieren una imbibición por 12 h para alcanzar un 90% de germinación, además germinan tanto en luz blanca como en luz RL.

Tratamientos pregerminativos como 6 y 12 h de imbibición provocaron una mayor acumulación en la biomasa radicular de las plántulas. Así mismo, una imbibición por 12 h en 250 mgL^{-1} de AG₃ tuvo un efecto a largo plazo al aumentar la biomasa aérea y el contenido de timol en las plántulas de *L. graveolens*.

Se ha propuesto que existe un costo en las plantas al desviar parte de sus recursos para incrementar sus defensas debido al herbivorismo, sin embargo, al aplicar 0.1 y 1 mM de AJ en *L. graveolens* se incrementó el contenido de terpenos y el número de tricomas y no se observó una reducción en los parámetros fotosintéticos evaluados, incluso se elevó el contenido de clorofila *a* y carotenos.

El número de tricomas glandulares en el envés de las hojas se incrementó con la aplicación de 0.1 y 1 mM de AJ a los 8 días después de haber aplicado el tratamiento. Se ha reportado que la producción de monoterpenos ocurre exclusivamente en estos órganos, los resultados del presente trabajo apoyan esta hipótesis, ya que, el contenido de terpenos totales se incrementó debido a la aplicación de ambos tratamientos con AJ. La aplicación de 1 mM de AJ provocó el incremento de α -pineno, limoneno, α -felandreno, *p*-cimeno, eucaliptol, cariofileno y α -cariofileno, mientras que, la aplicación de 0.1 mM de AJ incrementó α -pineno, limoneno, α -felandreno y α -cariofileno.

7. Bibliografía

Abdel-Latef A. A. 2003. Response of some *Sorghum* cultivars to salt stress and hormonal treatment. Tesis de Maestría. Facultad de Agricultura. Universidad Valle del Sur Qena, Egipto.

Arana-Sánchez A., Estarrón-Espinosa M., Obledo-Vázquez E.N., Padilla-Camberos E., Silva-Vázquez R. y Lugo-Cervantes E. 2010. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H.B.K.) with different composition when microencapsulated in β -cyclodextrin. LETT. APPL. MICROBIOL. 50:585–590.

Argueta V. A. y Cano A. J. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista, México. 15-34, 804:1073-1074.

Ashrafi M., Pirbalouti A. G., Rahimmalek M. y Hamedi B. 2012. Effect of foliar application of jasmonic acid (JA) on essential oil yield and its compositions of *Thymus daenensis* Celak. J. H. D. 3(2):75-80.

Baskin C. C. y Baskin J. M. 1998. Seeds-Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination. Academic Press, USA. pp 666.

Bewley J. D. y Black M. 1994. Seeds-Physiology of Development and Germination. 2nd edition. Plenum Press, NY. pp 445.

Boland W., Hopke J., Donath J., Nueske J. y Bublitz F. 1995. Jasmonic acid and coronatin induce odor production in plants. ANGEW. CHEM. INT. ED. ENGL. 34:1600-1602.

Borboa-Flores, J., Ortega-Nieblas, M. M., Wong-Corral F. J., Rueda-Puente E. O., Cinco-Moroyoqui F. J., León-Lara J. D. 2010. Germinación de semillas de orégano *Lippia palmeri* Watson. Proveniente de dos sitios silvestres del estado de Sonora. VII Simposio Internacional sobre la Flora Silvestre en Zonas Áridas 73-86.

Boughton A. J., Hoover K. y Felton G. W. 2005. Methyl jasmonate application induces increased densities of glandular trichomes on tomato, *Lycopersicon esculentum*. J. CHEM. ECOL. 31(9):2211-2216.

Bouwmeester H. J., Verstappen F. W., Posthumus M. A. y Dicke M. 1999. Spider mite-induced (3S)-(E)-nerolidol synthase activity in cucumber and lima bean. The first dedicated step in acyclic C11-homoterpene biosynthesis. PLANT PHYSIOL. 121:173-180.

Bruinsma M., Posthumus M. A., Mumm R., Mueller M. J., Van Loon J. J. A. y Dicke M. 2009. Jasmonic acid-induced volatiles of *Brassica oleracea* attract parasitoids: effects of time and dose, and comparison with induction by herbivores. J. EXP. BOT. 60(9):2575-2587.

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. INT. J. FOOD MICROBIOL. 94:223–253.

Canales M., Hernández T., Avila J. G., Duran A., Caballero J., Romo de Vivar A. y Lira R. 2005. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicine plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, Mexico. J. ETHNOPHARMACOL. 97:429-439.

Canales M., Hernández T., Avila J. G., Duran A., Caballero J., Romo de Vivar A. y Lira R. 2006. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. ACTA BOT. MEX. 75:21-43.

Chain F., Loandos M. H., Fortuna A. M. y Villecco M. B. 2007. Síntesis y actividad alelopática de derivados del 1,8-cineol sobre semillas de mono y dicotiledóneas. BLACPMA. 6(6):335-336.

Chen F., Tholl D., D'Auria J. C. Farooq A. y Pichersky E. 2003. Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from *Arabidopsis* flowers. PLANT CELL. 15:481-494.

Chung H. J. y Liu J.R. 2005. Analysis of transcripts in methyl jasmonate-treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginsenosides and other secondary metabolites. PLANT CELL REP. 23:557-566.

Constabel C. P. 1999. A survey of herbivore-inducible defensive proteins and phytochemicals. En: Agrawal A. A., Tuzun S. Bent E. eds. Induced plant defenses against pathogens and herbivores. APS Press. USA. 137-166.

Coombs J., Hall D. O. Long S. P. y Scurlock J. M. (Editores). 1988. Técnicas en fotosíntesis y bioproduktividad. Colegio de postgraduados. Chapingo. México. pp. 25

Cooper W. R. y Rieske L. K. 2011. Chestnut species and jasmonic acid treatment influence development and community interactions of galls produced by the Asian chestnut gall wasp, *Dryocosmus kuriphilus*. J. INSECT SCI. 11(40):1-14.

Da Silva E. A. A., Toorop P. E., Nijse J. Bewley J. D. y Hilhorst H. W. M. 2005. Exogenous gibberellins inhibit coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination and cause cell death in the embryo. J. EXP. BOT. 56(413):1029-1038.

Dávila-Aranda P. Lira-Saade R. 2002. La flora útil de dos comunidades indígenas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán: Coxcatlán y Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Informe Final SNIB-CONABIO proyecto No. T015. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Autónoma de México.

Degenhardt J. y Gershenzon J. 2000. Demonstration and characterization of (E)-nerolidol synthase from maize: a herbivore-inducible terpene synthase participating in (3E)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene biosynthesis. PLANTA. 210:815-822.

Devoto A., Ellis C., Magusin A., Chang H., Chilcott C., Zhu T. y Turner J. G. 2005. Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved

in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *PLANT MOL. BIOL.* 58:497-513.

Díaz P. G., Medina G. G., Silva S. M. M. y Serrano A. V. 2007. Estadísticas climatológicas básicas del estado de Puebla (Período 1961-2003). INIFAP. CIRGOC. Campo Experimental Cotaxtla. Libro Técnico. Veracruz, México. 15:181.

Dicke M., Gols R. Ludeking D. y Posthumus M. A. 1999. Jasmonic acid and herbivory differentially induce carnivore-attracting plant volatiles in lima bean plants. *J. CHEM. ECOL.* 25(8):1907-1922.

Dudarera N. Pichersky E. y Gershenzon J. 2004. Biochemistry of plant volatiles. *PLANT PHYSIOL.* 135:1893-1902.

Eisenreich W., Rohdich F. y Bacher A. 2001. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *TRENDS PLANT SCI.* 6(2):78-84.

Fard F. R., Omidbaigi R., Sharifi M. Sefidkon F. y Behmanesh M. 2012. Effect of methyl jasmonate on essential oil content and composition of *Agastache foeniculum*. *J. MED. PLANTS RES.* 6(45):5701-5705.

Farouk S. 2005. Response of *Pisum sativum* L. to some osmoregulators and plant growth substances under salt stress. Tesis Doctoral, Facultad de Agricultura, Universidad de Mansoura, Egipto.

Farouk S., Ghoneem K. M. y Abeer A. A. 2008. Induction and expression of systematic resistance to downy mildew disease in cucumber plant by elicitors. *EGYPTIAN J. PHYTOPATHOL.* 36(1-2):95-111.

Farouk S. Y Osman M. A. 2011. The effect of plants defense elicitors on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) growth and yield in absence or presence of spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) infestation. *J. STRESS PHYSIOL. BIOCHEM.* 7(3):5-22.

Fuentes-Fiallo V. R., Rodríguez-Medina N. N. y Rodríguez-Ferradá C. 1996. Acerca de la propagación de *Ocimum gratissimum* L. *REV. CUBANA PLANT. MED.* 1(1):3-7.

García M. E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. 3ª ed. Instituto de Geografía, UNAM. México. pp 252.

Gehan G. M. y Mona F. A. A. 2011. Effect of gibberellic acid and indole 3-acetic acid on improving growth and accumulation of phytochemical composition in *Balanites aegyptiaca* plants. *AM. J. PLANT PHYSIOL.* 6(1):36-43.

González-Güereca M. C. 2005. Flavonoides en tallo de orégano (*Lippia graveolens* H.B.K. var. *Berlandieri* schauer.) y su actividad antiinflamatoria, antioxidante y citotóxica. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. México. pp. 220.

- González-Güereca M. C., Soto-Hernández M., Kite G. y Martínez-Vázquez M. 2007. Antioxidant activity of flavonoids from the stem of the Mexican oregano (*Lippia graveolens* H.B.K. var. *berlandieri* Schauer). REV. FITOTEC. MEX. 30:43–49.
- González-Nieves C., Arreola-Ávila J. G., García-Herrera G., Rodríguez-Lopez R., Carrillo-Flores R., Esquivel-Arriaga O. y Villa-Castorena M. 2010. Efectos de tratamientos pregerminativos en la emergencia y crecimiento de plántulas de orégano (*Lippia graveolens* HBK). RCHSZA. IX(2):129-134.
- Grappin P., Bouinot D., Sotta B., Miginiac E. y Jullien M. 2000. Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia*: a postimbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. PLANTA. 210(2):279-285.
- Groot S. P. C. y Karssen C. M. 1987. Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants. PLANTA. 171:525–531.
- Groot S. P. C., Kieliszewska-Rokicka B., Vermeer E. y Karssen C. M. 1988. Gibberellin-induced hydrolysis of endosperm cell walls in gibberellin-deficient tomato seeds prior to radicle protrusion. PLANTA. 174:500–504.
- Gubler F., Millar A. y Jacobsen J. 2005. Dormancy release, ABA and pre-harvest sprouting. CURR. OPIN. PLANT BIOL. 8(2):183.187.
- Hampel D., Mosandl A. y Wüst M. 2005. Induction of *de novo* volatile terpene biosynthesis via cytosolic and plastidial pathways by methyl jasmonate in foliage of *Vitis vinifera* L. J. AGRIC. FOOD CHEM. 53:2652-2657.
- He Y., Fukushige H., Hildebrand D. F., y Gan S. 2002. Evidence supporting a role of jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence. PLANT PHYSIOL. 128:876-884.
- Herde O., Peña-Cortés H., Willmitzer L., y Fisahn J. 1997. Stomatal responses to jasmonic acid, linoleic acid and abscisic acid in wild-type and ABA- deficient tomato plants. PLANT CELL ENVIRON. 20:136-141.
- Hernández T., Canales M., Caballero J., Duran A. y Lira R. 2005. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional sobre plantas utilizadas para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales en Zapotitlán de las Salinas, Puebla, México. INTERCIENCIA. 30(9):529-535.
- Hernández T., Canales M., García A. M., Duran Á., Meráz S., Dávila P. y Ávila G. J. 2008. Antifungal activity of the essential oils of two Verbenaceae: *Lantana achyranthifolia* and *Lippia graveolens* of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). BLACPMA. 7(4):202-206.
- Hopke J., Donath J., Blechert S. y Boland W. 1994. Herbivore-induced volatiles: the emission of acyclic homoterpenes from leaves of *Phaseolus lunatus* and *Zea mays* can be triggered by a β -glucosidase and jasmonic acid. FEBS LETT. 352:146-150.

- Horiuchi J., Arimura G., Ozawa R., Shimoda T., Takabayashi J. y Nishioka T. 2001. Exogenous ACC enhances volatiles production mediated by jasmonic acid in lima bean leaves. FEBS LETT. 509:332-336.
- Horton R. G. 1991. Methyl jasmonate and transpiration in barley. PLANT PHYSIOL. 96:1376-1378.
- Huerta C. 1997. Orégano mexicano: oro vegetal. CONABIO. BIODIVERSITAS 15: 8-13.
- Hydrobuilder.com. <http://hydrobuilder.com/plant-strengtheners-extra-concentrate-32-oz-w-methyl-dihydrojasmonate.html>. Consultada en enero, 2015.
- International Plant Names Project (IPNI). 2005. The International Plant Names Index. Disponible en: http://www.ipni.org/ipni/simplePlantNameSearch.do?find_wholeName=lippia+graveolens&output_format=normal&query_type=by_query&back_page=query_ipni.html (09/12/2014).
- Karssen C. M., Brinkhorst-van der Swan D. L. C., Breekland A. E y Koornneef M. 1983. Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. PLANTA 157:158–165.
- Karssen C. M. y Lacka E. 1986. A revision of the hormone balance theory of seed dormancy: studies on gibberellin and/or abscisic acid-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana*. In M Bopp, ed, PLANT GROWTH SUBSTANCES. Springer-Verlag, Berlin, pp 315–323.
- Kim H. J., Chen F., Wang X. y Rajapakse N. C. 2006. Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). J. AGR. FOOD CHEM. 54:2327-2332.
- Kim E. H., Kim Y. S., Park S. H., Koo Y. J., Choi Y. D., Chung Y. Y., Lee I. J., Kim J. K. 2009. Methyl jasmonate reduces grain yield by mediating stress signals to alter spikelet development in rice. PLANT PHYSIOL. 149:1751–1760.
- Kintzios, S. E. ed. 2002. Oregano. In The genera *Origanum* and *Lippia*. London, UK: Taylor & Francis. 11-64.
- Kyauk H., Hopper N. W. y Brigham R. D. 1995. Effects of temperature and presoaking on germination, root length and shoot length of sesame (*Sesamum indicum* L.) ENVIRON. EXP. BOT. 35(3):345-351.
- Lange B. M. Ketchum R. E. B. y Croteau R. B. 2001. Isoprenoid biosynthesis. Metabolite profiling of peppermint oil gland secretory cells and application to herbicide target analysis. PLANT PHYSIOL. 127:305-314.
- Lange B. M. y Ghassemian M. 2003. Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for gene involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. PLANT MOL. BIOL. 51:925-948.

- Le Page-Degivry M. T. y Garello G. 1992. *In situ* abscisic acid synthesis: a requirement for induction of embryo dormancy in *Helianthus annuus*. PLANT PHYSIOL 98:1386–1390.
- Leubner-Metzger G., Fründt C. y Meins F. Jr. 1996. Effects of gibberellins, darkness and osmotic stress on endosperm rupture and class I β -1,3 glucanase induction in tobacco seed germination. PLANTA 199:282–288.
- Leung A. Y., Foster S. 1996. Oregano. In: Leung, A.Y., Foster, S. (Eds.), Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetics, second ed. Wiley, New York, pp. 398–400.
- Lewak S. y Khan A. A. 1977. Mode of action of gibberellic acid and light on lettuce seed. PLANT PHYSIOL. 60:575-577.
- Li L., Chuanyou L., Lee G. I. y Howe G. A. 2002. Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 99(9):6416-6421.
- Linares D., Bye R. y Flores B. 1999. Plantas medicinales de México usos, remedios y tradiciones. Instituto de Biología. UNAM. México. 155 pp.
- Liu X., Zhan S. Q., Lou C. H. y Yu F. Y. 2002. Effect of localized scorch on the transport and distribution of exogenous jasmonic acid in *Vicia faba*. ACTA BOT. SIN. 44:164:167.
- Lou Y., Du M., Turlings T. C. J., Cheng J. y Shan W. 2005. Exogenous application of jasmonic acid induces volatile emissions in rice and enhances parasitism of *Nilaparvata lugens* eggs by the parasitoid *Anagrus nilaparvatae*. J. CHEM. ECOL. 31(9):1985-2002.
- Maciejewska B. D., Kesy J., Zielinska M., y Kopcewicz J. 2004. Jasmonates inhibit flowering in short-day plant *Pharbitis nil*. J. PLANT GROWTH REGUL. 43:1–8.
- Marchese J. A. y Figueira G. M. 2005. O uso de las tecnologías pré e pós-colheita e boas práticas agrícolas na produção de plantas medicinais e aromáticas. RBPM. 7(3):86-96.
- Martínez-Domínguez M. 1991. Innovación tecnológica para eficientar el rendimiento en cosecha de orégano *Lippia berlandieri* Shawer. Reunión Científica Forestal y Agropecuaria del Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro. México. 5:104.
- Martínez-Velázquez M., Rosario-Cruz R., Castillo-Herrera G., Flores-Fernández J. M., Alvarez A. H., y Lugo-Cervantes E. 2011. Acaricidal Effect of Essential Oils From *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) Against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) J. MED. ENTOMOL. 48(4):822-827.

- Mathews S. 2006. Phytochrome-mediated development in land plants: red light sensing evolves to meet the challenges of changing light environments. *MOL. ECOL.* 15(12):3483-3503.
- McGarvey D. J. y Croteau R. 1995. Terpenoid metabolism. *PLANT CELL* 7:1015-1026.
- McGaw L. J., Jager A. C. y Van Staden J. 2000. Antibacterial, anthelmintic and antiamebic activity in South African medicinal plants. *J ETHNOPHARMACOL.* 72:247-263.
- Medina-Sánchez J. 2000. Determinación del vigor y el estado reproductivo de *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) a lo largo de una cronosecuencia edáfica en un abanico aluvial en Coxcatlán, Valle de Tehuacan. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México. pp.48.
- Mercke P., Kappers I. F., Verstappen F. W. Vorst O., Dicke M., Bouwmeester H. J. 2004. Combined transcript and metabolite analysis reveals genes involved in spider mite induced volatile formation in cucumber plants. *PLANT PHYSIOL.* 135:2012-2024.
- Min-Seok C., Soojung K. y Tae-Ho P. 2011. Effects of gibberellic acid treatment and light conditions on germination of true potato seed. *AFR. J. AGRIC. RES.* 6(32):6720-6725.
- Moreno-Rodríguez A. 2009. Perfiles de acumulación de metabolitos secundarios en tres especies medicinales de San Rafael, Coxcatlán, Puebla, bajo diferentes prácticas de cultivo. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. pp. 29-31.
- Moreno-Rodríguez A. 2014. Respuestas fisiológicas y moleculares involucradas en la acumulación de terpenos y flavonoides en *lippia graveolens* kunth bajo condiciones de estrés abiótico. Tesis Doctoral. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. pp. 40-54.
- Nabity P. D., Zavala J. A. y De Lucia E. H. 2012. Herbivore induction in jasmonic acid and chemical defences reduce photosynthesis in *Nicotiana attenuata*. *J. EXP. BOT.* 64(2):685-694.
- Ocampo-Velázquez R. V., Malda-Barrera G. X., Suárez-Ramos G. 2009. Reproductive biology of mexican oregano (*Lippia graveolens* kunth) in three exploitation conditions. *AGROCIENCIA.* 43(5):475-482.
- Ordoñez-Salanueva C. A. 2008. Características ecológicas y fisiológicas del banco de semillas de *Polaskia chende*. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. pp. 40-53.
- Pascual M. E., Slowing K., Carretero E. Sánchez-Mata D. y Villar A. 2001. *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. *J. ETHNOPHARMACOL.* 76:201-214.

- Piotrowska A., Bajguz A., Czerpak R. y Kot K. 2010. Changes in the growth, chemical composition, and antioxidant activity in the aquatic plant *Wolffia arrhiza* (L.) Wimm. (Lemnaceae) exposed to jasmonic acid. J. PLANT GROWTH REGUL. 29:53-62.
- Poonam S., Kaur H. y Geetika S. 2013. Effect of jasmonic acid on photosynthetic pigments and stress markers in *Cajanus cajan* (L.) Millsp. Seedlings under copper stress. AM. J. PLANT SCI. 4:817-823.
- Porter J. W. y Spurgeon S. L. 1981. En: Porter J. W. y Spurgeon S. L. (Eds.), Introduction: Biosynthesis of isoprenoid compounds. John Wiley and Sons Inc., New York, pp. 1-46.
- Possingham J. V. 1980. Plastid replication and development in the cycle of higher plants. ANN. REV. PLANT PHYSIOL. 31:113-129.
- Poulose A. J. y Croteau R. 1978. Biosynthesis of aromatic monoterpenes. Conversion of gamma-terpinene to *p*-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS. 187(2):307-314.
- Rahimi A. R., Rokhzadi A., Amini S. y Karami E. 2013. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on growth and secondary metabolites in *Cuminum cyminum* L. J. BIO. & ENV. SCI. 3(12):140-149.
- Ribas P. M., Hartz A. S., Weiblen R., Arenhart S., Cueto A. P. y Teresinha L. 2011. Antiviral activity of the *Lippia graveolens* (mexican oregano) essential oil and its main compound carvacrol against human and animal viruses. BRAZ. J. MICROBIOL. 42:1616-1624.
- Rivero-Cruz I., Duarte G., Navarrete A., Bye R., Linares E. y Mata R. 2011. Chemical composition and antimicrobial and spasmolytic properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* essential oils. J. FOOD SCI. 76(2):C309-17.
- Rojas-Aréchiga M., Orozco-Segobia A. y Vázquez-Yanes. 1997. Effect of light on the germination of seven species of cacti from the Zapotitlán Valley in Puebla, México. J. ARID ENVIRON. 36:571-578.
- Rodríguez-Saona C., Crafts-Brandner S. J., Paré P. W. y Henneberry T. J. 2001. Exogenous methyl jasmonate induces volatile emissions in cotton plants. J. CHEM. ECOL. 27(4):679-695.
- Rojas-Garcidueñas M. y Rovalo M. 1985. Fisiología Vegetal Aplicada. McGraw Hill, México. pp. 120-123.
- Riley J. M. 1987. Gibberellic acid for fruit set and seed germination. CRFG JOURNAL. 19:10-12.

- Shen B., Zheng Z. y Dooner H. K. 2000. A maize sesquiterpene cyclase gene induced by insect herbivory and volicitin: characterization of wild-type and mutant alleles. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 97:14807-14812.
- Saldívar-Iglesias P., Laguna-Cerda A., Gutiérrez-Rodríguez F. y Domínguez-Galindo M. 2010. Ácido giberélico en la germinación de semillas de *Jaltomata procumbens* (Cav.) J. L. Gentry. AGRON. MESOAM. 21(2):327-331.
- Salgueiro L. R., Cavaleiro C., Gonçalves M. J. y Proença A. C. 2003. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. PLANTA MED. 69:80-83.
- Sánchez O. 2007. Método de evaluación del riesgo de extinción de las especies silvestres en México (MER) Instituto Nacional de Ecología. SBN9688178578, 9789688178577. pp. 91-107.
- Sarkar P. K., Haque Md. S. y Karim M. A. 2002. Effects of GA₃ and IAA and their frequency of application on morphology, yield contributing characters and yield of soybean. PAK. J. AGRON. 1(4):119-122.
- Sasaki Y., Asaizu E., Shibata D. Nakamura Y., Kaneko T. Awai K. Amagai M., Kuwata C., Tsugane T., Masuda T., Shimada H., Takamiya K., Ohta H. y Tabata S. 2001. Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis* by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and cross-talk with other phytohormone signaling pathways. DNA RES. 8:153-161.
- Satler S. O. y Thimann K. V. 1981. Le jasmonate de methyl: nouveau et puissant promoteur de la senescence des feuilles. C. R. ACAD. SCI. PARIS III. 293:735-740.
- Schuman M. C., Heinzl N., Gaquerel E., Svatos A. y Baldwin I. T. 2009. Polymorphism in jasmonate signalling partially accounts for the variety of volatiles produced by *Nicotiana attenuata* plants in a native population. NEW PHYTOL. 183:1134-1148.
- Schuurink R. C., Sedee N. J. A. y Wang M. 1992. Dormancy of the barley grain is correlated with gibberellic acid responsiveness of the isolated aleurone layer. PLANT PHYSIOL. 100: 1834–1839.
- Schwachtje J. y Baldwin I. T. 2008. Why does herbivore attack reconfigure primary metabolism?. PLANT PHYSIOL. 146:845-851.
- Shoji T., Nakajima K., Hashimoto T. 2000. Ethylene suppresses jasmonate-induced gene expression in nicotine biosynthesis. PLANT CELL PHYSIOL. 41:1072–1076.
- Simmons A. T. y Gurr G. M. 2004. Trichome-based host plant resistance of *Lycopersicon* species and the biocontrol agent *Mallada signata*: are they compatible?. ENTOMOL. EXP. APPL. 113:95-101.

- Soto R., Vega G. y Tamajón A. 2002. Instructivo técnico del cultivo de *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf (caña santa). REV. CUBANA PLANT. MED. 7:89-95.
- Thaler J. S. 1999. Induced resistance in agricultural crops: effects of jasmonic acid on herbivory and yield in tomato plants. ENVIRON. ENTOMOL. 28(1):30-37.
- Traw M. B. y Dawson T. E. 2002. Differential induction of trichomes by three herbivores of black mustard. OECOLOGIA. 131:526-532.
- Traw M. B. y Bergelson J. 2003. Interactive effects of jasmonic acid, salicylic acid, and gibberellin on induction of trichomes in *Arabidopsis*. PLANT PHYSIOL. 133:1367-1375.
- Tsonev T. D., Lazova G. N., Stoinova Z. G., Popova L. P. 1998. A possible role for jasmonic acid in adaptation of barley seedlings to salinity stress. J. PLANT GROWTH REGUL. 17: 153.159.
- Van Schie C. C. N., Haring M. A. y Schuurink R. C. 2007. Tomato linalool synthase is induced in trichomes by jasmonic acid. PLANT MOL. BIOL. 64:251-263.
- Van Poecke R. M. Posthumus M. A. y Dicke M. 2001. Herbivore-induced volatile production by *Arabidopsis thaliana* leads to attraction of the parasitoid *Cotesia rubecula*: chemical, behavioral, and gene-expression analysis. J CHEM. ECOL. 27:1911-1928.
- Vázquez S. R. y Dunford N. T. 2005. Bioactive components of Mexican oregano oil as affected by moisture and plant maturity. J. ESSENT. OIL. RES. 17:668-671.
- Villavicencio-Gutiérrez E., Cano-Pineda A. y García-Cuevas X. 2010. Metodología para determinar las existencias de orégano (*Lippia graveolens* H.B.K.) en rodales naturales de Parras de la Fuente, Coahuila. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias Centro de Investigación Regional Noroeste Campo Experimental Saltillo, Saltillo Coah. ISBN 978-607-425-295-8. pp 4-5.
- Wagner G. J., Wang E. y Shepherd R. W. 2004. New approaches for studying and exploiting and old protuberance the plant trichome. ANN. BOT. 93:3-11.
- Wang M., Heimovaara-Dijkstra S. y Van Duijn B. 1995. Modulation of germination of embryos isolated from dormant and nondormant barley grains by manipulation of endogenous abscisic acid. PLANTA 195: 586–592.
- War A. R., Paulraj M. G., War M. Y. y Ignacimuthu S. 2011. Jasmonic acid-mediated-induced resistance in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) against *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). J. PLANT GROWTH REGUL. 30: 512-523.

War A. R., Hussain B. y Sharma H. C. 2013. Induced resistance in groundnut by jasmonic acid and salicylic acid through alteration of trichome density and oviposition by *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). AoB PLANTS. 5:1-6.

Wasternack C. y Parthier B. 1997. Jasmonate-signalled plant gene expression. TRENDS PLANT SCI. 2 302-307.

Wasternack C., Stenzel I., Hause B., Hause G., Kutter C., Maucher H., Neumerkel., Feussner I. y Miersch O. 2006. The wound response in tomato – Role of jasmonic acid. J. PLANT PHYSIOL. 163:297-306.

White C. N. Proebsting W. M., Hedden P. y Rivin C. J. 2000. Gibberellins and seed development in maize. I. Evidence that gibberellins/abscisic acid balance governs germination versus maturation pathways. Plant Physiol. 122:1081-1088.