

Efectos de iones y sales en la productividad y acumulación de prolina en *Lippia graveolens* H.B.K.

Ion and salt effects on the productivity and proline accumulation in *Lippia graveolens* H.B.K.

Valdés Oyervides FJ¹, C Rivas Morales², A Benavides Mendoza¹, MA Núñez González², J Verde Star², A Oranday Cárdenas², V Robledo Torres²

Resumen. Se investigaron cuatro condiciones de manejo para evaluar los efectos de estrés sobre la producción de biomasa, aceites esenciales, timol y carvacrol, y acumulación de prolina en *Lippia graveolens* H.B.K. bajo condiciones de invernadero. En un diseño bifactorial se evaluaron cuatro condiciones o ambientes (Factor B): Solución nutritiva comercial (B0); Agua (B1); estrés moderado (B2) e intermedio (B3), anidados en condiciones estresantes (Factor A): salinidad (NaCl) y concentración iónica (Cu²⁺) y (Fe²⁺). La producción de peso fresco y número de hojas fue reducida por el NaCl y las concentraciones de Cu²⁺ y Fe²⁺. Sin embargo, en el promedio de los cuatro ambientes no se observaron diferencias significativas. La cantidad de aceites esenciales fue significativamente mayor en el ambiente de estrés con Fe²⁺ y Cu²⁺ en ambas concentraciones. Los porcentajes promedio de timol y carvacrol fueron superiores en las concentraciones de Cu²⁺ y Fe²⁺ estudiadas. Los valores más altos para timol y carvacrol se observaron en los ambientes de inducción de estrés en intensidad moderada. La acumulación de prolina fue mayor en la raíz que en el follaje. Las condiciones estresantes de los elementos en ambas intensidades expusieron valores superiores en la acumulación de prolina. Sin embargo, los ambientes de no estrés también acumularon altas cantidades. Se mostró una correlación positiva ($r = 0,997$) entre la producción de aceites esenciales y prolina acumulada. El estrés inducido con salinidad y iones (Cu²⁺) y (Fe²⁺) derivó en mayor acumulación de metabolitos secundarios.

Palabras clave: Orégano; Sales; Metales; Timol; Carvacrol; Prolina.

Abstract. Four dynamic conditions to evaluate the effects of stress on production of biomass, essential oils, Thymol, carvacrol and proline accumulation in *Lippia graveolens* H.B.K. were investigated under greenhouse conditions. A bifactorial design assessed four environmental conditions (factor B): commercial nutritive solution (B0); Water (B1); moderate stress (B2), and intermediate (B3) stress nested under (Factor A) salinity (NaCl) and ion concentration (Cu²⁺) and (Fe²⁺) stresses. Average production of fresh weight and number of leaves were reduced under NaCl and both ion concentration conditions. However, there were no significant differences on average for the four environments. The amounts of essential oils were significantly higher under the stressful environments with Fe²⁺ and Cu²⁺ at both concentrations. The average percentages of Thymol and carvacrol were higher under both study concentrations of Cu²⁺ and Fe²⁺ than under NaCl. The greater values for Thymol and carvacrol were observed under moderate stress intensity. Accumulation of proline was greater in the root than in the foliage. Stressful conditions of ionic elements at both intensities determine greater proline accumulation. High proline accumulation, however, was also observed under non-stressful conditions. A positive correlation ($r = 0.997$) between production of essential oils and proline accumulation was shown. The stress induced with salinity and ions Cu²⁺ and Fe²⁺ led to a greater accumulation of secondary metabolites.

Keywords: Oregano; Salt; Metals; Thymol; Carvacrol; Proline.

¹ Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923 Tel / fax (844) 411-03-00 Saltillo Coahuila, México. C.P 25315.

² Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Cd Universitaria, San Nicolás de los Garza N.L. México. CP. 66450.

Address Correspondence to: Francisco J. Valdés Oyervides, Tel.: (01) 8444152892; e-mail: ollerval12@hotmail.com

Recibido / Received 25.XI.2011. Aceptado / Accepted 25.II.2012.

INTRODUCCIÓN

La composición y la cantidad de metabolitos secundarios de las plantas dependen en gran medida de factores ambientales. Cuando son sometidas a condiciones adversas, se genera un efecto que desarrolla una respuesta en procesos fisiológicos, bioquímicos y metabólicos (Benavides et al., 2001). Esto indica la posibilidad de manipular la concentración o cantidad relativa de los metabolitos a través de técnicas de manejo agronómico. La inducción controlada de estrés a través de compuestos señalizadores o prooxidantes es una herramienta conocida cada vez más utilizada para explorar las respuestas fisiológicas y metabólicas adaptativas de la planta (Kessmann et al., 1994). Por ello se considera factible su aplicación con el propósito de promover y/o incrementar la biosíntesis de metabolitos secundarios (Gantet y Memelink, 2002).

La aplicación controlada de algún tipo de estrés ambiental que origina estrés oxidativo celular, o bien la aplicación de un compuesto prooxidante como H_2O_2 , ácido salicílico o metales pesados, pueden causar cambios en el metabolismo redox de las plantas. Estos pueden originar, a través de una cascada de señales, la modificación de la expresión genética y la obtención de fenotipos con una composición química diferente (Benavides et al., 2002). En el caso de iones libres de metales, el factor inductor de la respuesta puede ocasionar la acumulación de radicales libres (Stohs y Bagchi, 1995). Este mecanismo de toxicidad de los metales en forma iónica fue descrito para el cobre (Mangel y Kirkby, 2001) y el hierro (Xing et al., 2010). En el caso de estrés inducido por salinidad, el fenómeno oxidativo se manifiesta a través de la acumulación de osmolitos en hojas y raíces (Ahmed et al., 2009), y el control de la apertura estomática (Chartzoulaki et al., 2009), determinados por la acumulación de prolina en hojas y raíces (Munn, 2008).

El orégano mexicano (*Lippia graveolens* H.B.K.) tiene un amplio potencial de aprovechamiento en el campo alimenticio y farmacéutico. La composición química del aceite esencial del orégano es de gran importancia por su actividad biológica, ya que tiene compuestos fenólicos de efectividad antimicrobiana, como el timol y el carvacrol, que tienen efectos contra las bacterias Gram negativas (Arzila-Lozano et al., 2004). Por otro lado, los aceites esenciales del orégano poseen potencial anticancerígeno (Sivropoulou, 1996). Existen reportes sobre la variabilidad en los contenidos de timol y carvacrol por efecto del medio ambiente (Russo et al., 1998; Gurudatt et al., 2010). Los objetivos de este trabajo fueron evaluar los efectos del NaCl y soluciones iónicas (con cobre y hierro) sobre (1) el crecimiento de plantas, (2) la producción de aceites esenciales, (3) los contenidos de timol y carvacrol, y (4) la producción de prolina en *Lippia graveolens*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se llevó a cabo bajo condiciones de invernadero en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila, México. Cuando las plantas *Lippia graveolens* H.B.K. alcanzaron una altura de 30 cm, se trasplantaron en macetas plásticas de 16 L de capacidad. Como sustrato se utilizó una mezcla comercial BERGER peatmoss (80% turba, 10% Perlita y 10% vermiculita). Las plantas fueron regadas con agua natural con un pH de 7,65 y una conductividad eléctrica de 715 microS/cm. La temperatura promedio en el invernadero fue de 26 °C, y humedad relativa osciló entre 60 y 70%. Cuando las plantas alcanzaron tres meses de edad se podaron a una altura de 30 cm. Posteriormente se seleccionaron 88 plantas, se distribuyeron en forma balanceada en base a un diseño completamente al azar con arreglo bifactorial, anidando los niveles de concentración de los elementos estresantes, con el fin de evaluar cuatro condiciones o ambientes en el factor B: B0 = ambiente óptimo (solución nutritiva comercial fertiplus), B1 = ambiente natural (agua natural), B2 = ambiente con inducción de estrés moderado (50 mM NaCl; 3 mM Cu^{2+} ; 2,5 mM Fe^{2+}), B3 = inducción de estrés intermedio (100 mM NaCl; 6 mM Cu^{2+} ; 5 mM Fe^{2+}), anidadas en tres elementos inductores de estrés, identificados como factor A (A1 = NaCl, A2 = Cu^{2+} y A3 = Fe^{2+}).

El tratamiento fertiplus tuvo los siguientes porcentajes de elementos nutritivos; N = 7,28; K_2O_2 = 14,07; Fe = 0,006; Zn = 0,002; S = 1,31; Mo = TRAZA; P_2O_5 = 8,21; Mg = 0,086; Cu = 0,001; Mn = 0,075; B = 0,002; Ca = 0,19. Para la elaboración de las soluciones estresantes se emplearon NaCl (PM = 58,4 g/mol); $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ (PM = 285,7168 g/mol), y $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (PM = 278,0157 g/mol) grado reactivo. Las soluciones se aplicaron cada semana según correspondía a cada ambiente. Las soluciones de Cu^{2+} y Fe^{2+} se aplicaron con una bomba de aspersión manual a punto de goteo. Las soluciones de NaCl y nutritiva se aplicaron directamente al sustrato con una regadera tipo jardín en un volumen de 1,5 L/planta.

Las variables evaluadas fueron:

Biomasa para Peso fresco y seco, se tomaron ocho plantas de cada tratamiento, a las cuales se les separaron las hojas, los brotes, los tallos y las raíces y se pesaron inmediatamente para obtener el peso fresco. Para esto se utilizó una balanza analítica digital OHAUS modelo TS120. Posteriormente, este material vegetal se secó con aire caliente a 65 °C durante 48 horas para obtener el peso seco usando una estufa MAPSA modelo HDP334. Para determinar área foliar y número de hojas se usaron tres plantas por tratamiento, las cuales se defoliaron y luego determinaron dichas variables. El área foliar se determinó con un medidor de área foliar portátil, marca LI-cor- Modelo LI-3000A.

Aceites esenciales. El contenido fue determinado en las 3 plantas utilizadas para medir área foliar. El material fue

triturado con un Molino THOMSOM modelo 3383-L10. Posteriormente se procedió a la extracción de los aceites esenciales por la técnica de destilación por arrastre de vapor AOAC (1990).

Timol y carvacrol. La identificación de los componentes se llevó a cabo por análisis de cromatografía de gases - Espectrometría de masas (GC / MS) en un HP 6890 acoplado a un HP 5972 MSD (con rango de masa m/z 50-550) y un Agilent DB-5MS de columna capilar de (30 m × 0,25 mm) con un espesor de 0,25 μ m de película. El gas acarreador usado fue helio. El programa de temperatura inicial fue 60 °C/min; la temperatura final fue de 280 °C con un gradiente de 9 °C/min.

Los índices de retención (IR) para la identificación de los compuestos fueron determinados sobre las bases de homólogos *n*- alcanos hidrocarbonados bajo las mismas condiciones. El reactivo fenchone fue usado como estándar a una concentración de 0,01 mg/mL de diclorometano; la composición fue obtenida por el área normalizada y la respuesta para cada factor fue considerada como 1. Los compuestos fueron identificados por comparación de (IR) y espectro de masas de acuerdo con los datos publicados por Adams (1995) y McLafferty (1989). Con las áreas de cada muestra se obtuvo la concentración en ppm de timol y carvacrol mediante la siguiente fórmula:

$$Y = 2,9693x - 2,6052$$

$$r^2 = 0,9168$$

$$X = (Y + 2,6052) / 2,9693$$

En donde:

Y = área o superficie obtenida en el cromatograma,
X = concentración en ppm de timol y carvacrol.

Prolina. Ésta se realizó en follaje y raíz en base al análisis propuesto por Bates et al. (1973). Medio gramo de hoja o raíz se maceraron en 10 mL en una solución acuosa de ácido sulfosalicílico al 3% (peso/volumen), y posteriormente se sonicó por 5 minutos y se filtró la solución en un embudo de filtración rápida utilizando papel Whatman No. 2. Una alícuota (2 mL) se colocó en un tubo de ensayo al que se le agregaron 2 mL de ácido ninhidrírico y 2 mL de ácido acético glacial, para después colocar el tubo a una temperatura de 100 °C durante una hora. Finalmente la reacción se completó en un baño de hielo. Se agregaron 4 mL de tolueno y el contenido del tubo se mezcló vigorosamente durante 20 segundos. Posteriormente se aspiró la parte de tolueno con una pipeta, se estabilizó a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia ($\lambda = 520$ nm) en un espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER-690. Se usó tolueno como blanco para calibrar el aparato. La concentración de prolina se determinó a partir de una curva de calibración y se calculó en base a peso fresco de la siguiente manera:

$$\frac{\text{ppm de prolina de la curva}}{\text{g de material peso fresco}} \times (\text{volumen de aforación}) = \text{ppm de prolina}$$

Análisis estadístico. A los datos obtenidos se les realizó análisis de varianza en base a un modelo bifactorial anidado de ambientes (factor B) en elemento estresantes (factor A), por medio del paquete estadístico SAS 9.2 (SAS Institute, 2009). Las diferencias estadísticas entre las medias de los factores se separaron por Tukey ($p \leq 0,05$), empleando el paquete estadístico de la FAUANL (Olivares, 1989). Además se realizaron análisis de correlaciones entre las variables de aceite esencial y contenido de prolina.

RESULTADOS

Biomasa. Los resultados obtenidos de peso fresco y número de hojas mostraron diferencias estadísticas en el promedio del factor A. El estrés inducido con Cu^{2+} y Fe^{2+} produjeron 156,1 y 145,7 g/planta, y 1640 y 1538 hojas por planta (Tukey $p \leq 0,05$, Tabla 1), respectivamente. El NaCl produjo 137,9 g/planta y 1331 hojas. El área foliar y peso seco no expuso diferencias estadísticas. Los valores promedio en los ambientes estresantes del factor B no tuvieron diferencias significativas en el desarrollo de ninguna variable vegetativa. Las condiciones inducidas en los ambientes de estrés moderado (B2) e intermedio (B3) anidados en el factor A, determinaron diferencias significativas. La inducción con 100,0 mM de NaCl en la condición B3 afectó negativamente el peso fresco al producir el valor más bajo (110,9 g/planta). Esto significó una reducción de alrededor de 40 g/planta comparativamente con los ambientes sin inducción de estrés en B0 y B1. Respecto al número de hojas con inducción de estrés de 50,0 y 100,0 mM, que corresponden a los ambientes B2 Y B3, respectivamente, se produjo un efecto negativo al producir 38,1 y 42,8% menos hojas, respectivamente, en relación con los ambientes de B0 (que identificaron a la solución nutritiva).

Aceite esenciales. Las plantas que crecieron con Fe^{2+} acumularon en promedio 43 y 34% más aceite que aquellas expuestas a NaCl y Cu^{2+} , respectivamente (Tukey $p \leq 0,05$, Tabla 2). Las plantas que crecieron bajo estrés moderado (B2) o intermedio (B3) produjeron en promedio 80 y 84% más que en los ambientes B0 (solución nutritiva) y B1 (agua), respectivamente.

El estrés inducido con el Fe^{2+} a concentraciones de 2,5 y 5,0 mM produjo la mayor cantidad de aceite, con 1,2 y 1,3%, respectivamente. Esta producción superó por más del doble a aquella obtenida en los ambientes sin inducción de estrés. De igual manera, pero en menor escala se obtuvieron incrementos significativos con las concentraciones de Cu^{2+} de 3,0 y 6,0 mM, y 50,0 mM de NaCl. La producción de aceites esenciales fue similar a 100,0 mM NaCl que en los ambientes sin estrés.

Tabla 1. Producción de biomasa en diferentes ambientes bajo estrés con NaCl, Cu²⁺ y Fe²⁺ en Orégano Mexicano (*Lippia graveolens* H.B.K.).
Table 1. Production of biomass in different environments under stress with NaCl, Cu²⁺ and Fe²⁺ in Mexican oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.).

*Ambientes (factor B)					
Elemento (factor A)	B0	B1	B2	B3	Prom. factor A
Peso fresco (g/planta)					
NaCl	158,1 A a	156,9 A a	125,9 A ab	110,9 A b	137,9 b
Cu ²⁺	158,1 A a	156,9 A a	171,0 A a	138,5 A a	156,1 a
Fe ²⁺	158,1 A a	156,9 A a	139,8 A a	128,12 A a	145,7 a
Prom.factor B	158,1 A	156,9 A	145,6 A	125,8 A	
Peso seco (g/planta)					
NaCl	74,6 A a	72,9 A a	64,5 A a	56,3 A a	67,1 a
Cu ²⁺	74,6 A a	72,9 A a	83,3 A a	66,3 A a	74,2 a
Fe ²⁺	74,6 A a	72,9 A a	68,3 A a	63,3 A a	69,9 a
Prom.factor B	74,6 A	72,9 A	72,0 A	62,1A	
Área foliar (cm²)					
NaCl	360 A a	260 A a	179 A a	165 A a	241,0 a
Cu ²⁺	361 A a	261 A a	277 A a	298 A a	299,3 a
Fe ²⁺	362 A a	262 A a	252 A a	271 A a	286,8 a
Prom.factor B	361 A	261 A	236A	245 A	
Nº de hojas					
NaCl	1720 A a	1537 A ab	1070 B b	988 B b	1331 b
Cu ²⁺	1730 A a	1537 A a	1536 A a	1756 A a	1640 a
Fe ²⁺	1730 A a	1537 A a	1334 A a	1548 A a	1538 a
Prom.factor B	1730 A	1537 A	1313 A	1431 A	
* Ambientes	B0	B1	B2: intensidad moderada	B3: intensidad intermedia	
Soluciones evaluadas	Sol. Nutritiva	Agua	(mM) NaCl 50,0; Cu 3,0; Fe 2,5	(mM) NaCl 100,0; Cu 6,0; Fe 5,0	

Diferentes letras mayúsculas entre (factor A) y minúsculas entre (factor B) indican diferencias significativas (Tukey p≤0,05).

Tabla 2. Porcentaje de aceites esenciales en diferentes ambientes bajo estrés con NaCl, Cu²⁺ y Fe²⁺ en Orégano Mexicano (*Lippia graveolens* H.B.K.).

Table 2. Percentage of essential oils in different environments under stress with NaCl, Cu²⁺ y Fe²⁺ in Mexican oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.).

*Ambientes (factor B)					
Elemento (factor A)	B0	B1	B2	B3	Prom. Factor A
NaCl	0,5167 A b	0,5033 A b	0,770 B a	0,672 C a b	0,616 B
Cu ²⁺	0,5167 A b	0,5033 A b	0,793 B a	0,816 B a	0,658 B
Fe ²⁺	0,5167 A b	0,5033 A b	1,233 A a	1,267 A a	0,880 A
Prom. Factor B	0,5167 b	0,5033 b	0,9322 a	0,9186 a	
* Ambientes	B0	B1	B2: intensidad moderada	B3: intensidad intermedia	
Soluciones evaluadas	Sol. Nutritiva	Agua	(mM) NaCl 50,0; Cu 3,0; Fe 2,5	(mM) NaCl 100,0; Cu 6,0; Fe 5,0	

Diferentes letras mayúsculas entre (factor A) y minúsculas entre (factor B) indican diferencias significativas (Tukey p≤0,05).

Timol y carvacrol. Los factores A y B influyeron ($p \leq 0,05$) sobre el contenido de estos quimiotipos (Tabla 3). Respecto a la producción de timol se encontró que el Cu^{2+} produjo el mayor promedio (36,48%), superior estadísticamente ($p \leq 0,05$) a los tratamientos con NaCl y Fe^{2+} que promediaron 24,91 y 19,83%, respectivamente. Respecto al contenido de carvacrol,

el tratamiento con Fe^{2+} también fue estadísticamente superior con un promedio de 8,92 %.

El ambiente B1, con suministro de agua natural, tuvo el mayor contenido de timol (46,47%), superando estadísticamente a los otros tres ambientes bajo estudio. El valor más alto de carvacrol se obtuvo en el ambiente B0 con un promedio de 9,57 %.

Tabla 3. Porcentaje de timol y carvacrol en diferentes ambientes bajo estrés con NaCl, Cu^{2+} y Fe^{2+} en Orégano Mexicano (*Lippia graveolens* H.B.K.).

Table 3. Percentage of Thymol and carvacrol in different environments under stress with NaCl, Cu^{2+} y Fe^{2+} in Mexican oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.).

		Ambientes (factor B)				
	Elemento (factor A)	B0	B1	B2	B3	Prom. factor A
Timol	NaCl	5,43 A c	46,04 A a	25,22 B b	22,95 B b	24,91 b
	Cu^{2+}	5,43 A d	46,04 A b	63,05 A a	31,38 A c	36,48 a
	Fe^{2+}	5,43 A c	46,04 A a	2,70 C c	25,1367 B b	19,83 c
	Prom. Nivel B	5,433 d	46,047 a	30,32 b	26,49 c	
Carvacrol	NaCl	9,57 A a	0,57 A b	0,25 B b	0,23 B b	2,66 b
	Cu^{2+}	9,57 A a	0,57 A b	0,51 B b	0,89 B b	2,92 b
	Fe^{2+}	9,57 A b	0,57 A b	21,43 A a	3,92 A c	8,92 a
	Prom.factor B	9,570 a	0,577 d	7,400 b	3,350 c	
* Ambientes	B0	B1	B2: intensidad moderada	B3: intensidad intermedia		
Soluciones evaluadas	Sol. Nutritiva	Agua	(mM) NaCl 50,0; Cu 3,0; Fe 2,5	(mM) NaCl 100,0; Cu 6,0; Fe 5,0		

Diferentes letras mayúsculas entre (factor A) y minúsculas entre (factor B) indican diferencias significativas (Tuyey $p \leq 0,05$)

Tabla 4. Prolina acumulada en ppm en diferentes ambientes bajo estrés con NaCl, Cu^{2+} y Fe^{2+} en Orégano Mexicano (*Lippia graveolens* H.B.K.).

Table 4. Proline accumulated (ppm) in different environments under stress with NaCl, Cu^{2+} y Fe^{2+} in Mexican oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.).

		*Ambientes (factor B)				
	Elemento (factor A)	B0	B1	B2	B3	Prom. factor A
Follaje	NaCl	100,00 A b	276,33 Aa	33,66 B b	60,00 B bc	117,5 B
	Cu^{2+}	100,00 A b	276,33 Aa	242,00 A a	21,00 B c	127,2 B
	Fe^{2+}	100,00 A b	276,33 Aa	43,00 B b	89,33 A b	159,8 A
	Prom. factor B	100 b	276 a	106,2 b	59,6 c	
Raíz	NaCl	46,66 A b	192,00 A a	176,66 A a	12,66 C b	107,0 B
	Cu^{2+}	46,66 A b	192,00 A a	213,6 A a	89,33 B b	135,42 B
	Fe^{2+}	46,66 A c	192,00 A b	27,00 B c	471,00 A a	184,16 A
	Prom. factor B	46,7 c	192,0 a	139,1 b	191,0 a	
* Ambientes	B0	B1	B2: intensidad moderada	B3: intensidad intermedia		
Soluciones evaluadas	Sol. Nutritiva	Agua	(mM) NaCl 50,0; Cu 3,0; Fe 2,5	(mM) NaCl 100,0; Cu 6,0; Fe 5,0		

Diferentes letras mayúsculas entre (factor A) y minúsculas entre (factor B) indican diferencias significativas (Tukey $p \leq 0,05$).

Con respecto a la acumulación de timol y carvacrol, la inducción con NaCl (50 y 100 mM) y Fe²⁺ (2,5 y 5,0 mM) produjeron la mitad o menos que en el ambiente B1 sin inducción de estrés. El valor más alto se logró en el ambiente estresante con 3,0 mM de Cu con 63,05%. La producción de carvacrol con 2,5 mM de Fe²⁺ produjo en B2 el valor más alto con 21,43%. Esta producción superó estadísticamente a las condiciones ambientales sin inducción de estrés, y a la concentración intermedia de Fe²⁺ ubicada en el ambiente B3.

Prolina. En follaje, el Fe²⁺ estimuló la acumulación de prolina (159,8 ppm) (Tabla 4), superando estadísticamente a aquella producida por Cu²⁺ y NaCl (Tukey $p \leq 0,05$). El Fe²⁺ permitió la mayor cantidad de prolina en raíces (184,16 ppm), superando a los otros dos elementos. La prolina acumulada en los ambientes con intensidad moderada (B2) e intermedia (B3) fue menor que la determinada en el ambiente B1 (condición con agua), que acumuló 276 ppm. La acumulación de prolina en raíz en B1 (192 ppm) fue estadísticamente similar al valor obtenido en B3.

El elemento Cu²⁺ en el ambiente B2 tuvo un efecto significativo, pero igual estadísticamente a la solución nutritiva en el ambiente B1. En la raíz fue más frecuente encontrar valores superiores de prolina; el Cu²⁺ en concentración moderada de 3,0 mM, y el ambiente salino dentro de la condición ambiental B2, acumularon una cantidad de 213,6 y 176,66 ppm de prolina, respectivamente. En el ambiente B3, el mayor valor de prolina (471 ppm) se obtuvo con 5,0 mM de Fe²⁺.

Hubo una estrecha relación entre la producción de aceites esenciales y la cantidad acumulada de prolina; los coeficientes de correlación fueron $r = 0,997$ y $r = 0,975$ en follaje y raíz, respectivamente.

DISCUSIÓN

Biomasa. La inducción de estrés en los ambientes con NaCl afectó negativamente la producción de biomasa (a través de las variables peso fresco y número de hojas). Sin embargo, las demás variables no mostraron efectos significativos entre los ambientes evaluados; resultados similares fueron reportados por Psarras et al. (2008) y Da Silva et al. (2008). Estos autores indicaron como factor causal al alto potencial osmótico invertido por las plantas por efecto del estrés salino en rangos de 35 a 100,0 mM de NaCl. El efecto inhibitorio en el crecimiento vegetativo fue reportado en *Origanum vulgare* por Said-Al Ahl y Mahomoud (2010). El Fe²⁺ y Cu²⁺ no tuvieron efectos negativos significativos en la producción de biomasa. Estos resultados difieren a los reportados por Xing et al. (2010). Estos autores informaron efectos negativos sobre brotes, raíz y hojas por exceso de Cu²⁺ y Fe²⁺ en *Spirodela polyrrhiza* (L.). Khurana et al. (2006) y Martins y Mourato (2006) encontraron una reducción de biomasa por exceso de cobre en concentraciones entre 0,015 y 0,35 mM, y entre 0,15

y 200 μmol en plántulas de *Licopersicum esculatum* y *Brassica napus*, respectivamente. Sin embargo, Kirbag y Kirbag (2007) señalaron que los niveles de Cu²⁺ por encima de los requerimientos de las plántulas no causaron efectos negativos en plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L.). Contrariamente, la altura de planta, raíz y superficie laminar fueron reducidos por exceso de cobre en *Origanum vulgare* (Panou-Filothou et al., 2001).

Aceites esenciales. La producción de aceites esenciales fue superior en las plantas en los ambientes estresantes con intensidad moderada e intermedia. Estos resultados coinciden con los informados por Singh-Sangwan et al. (1994). Estos autores demostraron que la cantidad de aceites esenciales se mantuvo o aumentó por efecto del estrés como una respuesta metabólica de las plantas. La relación encontrada entre las condiciones de estrés y el aumento en el contenido de aceite en las plantas se podría atribuir a la disminución de la biosíntesis de metabolitos primarios por efectos del estrés, causando en consecuencia un aumento en la producción de metabolitos secundarios (Naghdi-Badi et al., 2004). La mayor producción de aceites esenciales debido al estrés de Cu²⁺ o Fe²⁺ coincide con los resultados obtenidos por Said y Mhamoud (2010). Estos autores hallaron mayor acumulación de aceites esenciales con aplicación foliar de hierro en *Ocimum basilicum*. Azis et al. (2010) reportaron que con aplicación foliar de hierro y zinc se logró un incremento significativo de aceite en *Cymbopogon citratus* L. El exceso de cobre y hierro causa estrés oxidativo y en consecuencia una respuesta antioxidante debido al incremento de radicales libres, lo cual incluye una mayor actividad de enzimas antioxidantes (De Vos y Schat, 1992). El efecto de estrés salino inducido en moderada intensidad causó un incremento significativo de aceite en comparación con las condiciones sin inducción de estrés. En *Ocimum basilicum* L. se han reportado cantidades altas de aceite esencial en plantas desarrolladas bajo condiciones de salinidad moderada (El-Hendaway et al., 2005; Al-Amier et al., 2008; Said-Al Ahl y Mahomoud, 2010). Sin embargo, Said-Al Ahl y Mahomoud (2010) reportaron un descenso en la síntesis de aceite por efecto de salinidad en *Origanum vulgare* L. Khorasaninejad et al. (2010) reportaron una baja producción de aceite por efecto de salinidad en *Mentha piperita* L.

Timol y carvacrol. Dentro de un mismo ambiente de manejo y con la misma concentración se obtuvieron cantidades contrastantes de timol y carvacrol, similar a lo reportado por Arcila et al. (2004). Estos autores señalaron que un incremento en el porcentaje de timol provocó una disminución de carvacrol, y viceversa. Los valores más altos de timol y carvacrol se observaron en los ambientes con inducción de estrés moderado en Cu²⁺ y Fe²⁺, respectivamente. Sin embargo, los valores promedio de los ambientes sin inducción de estrés fueron significativamente mayores, tal como lo reportaron Gurudatt et al. (2010). Estos autores indicaron que

la expresión de genes en diferentes estados de desarrollo es influenciada por el medio ambiente. Los resultados obtenidos en el ambiente salino coinciden con lo reportado por Said-Al Ahl y Mahomoud (2010), quienes demostraron una reducción de estos metabolitos por efecto de salinidad en *Origanum vulgare* L.

Prolina. La prolina en follaje y raíz se acumuló en mayor medida por efecto de estrés con Fe²⁺. En cambio, en los promedios del factor B los mayores valores de prolina se observaron en las condición del ambiente con solo agua, lo que sugiere que *Lippia graveolens* puede comportarse como una planta hiperacumuladora de prolina tal como lo reportaron Kavi- Kishor et al. (2005). En la raíz de las plantas, en ambientes estresantes, la prolina se acumuló en cantidades significativamente mayores; las plantas expuestas a estas condiciones exhibieron un desarrollo vegetativo normal y una producción de metabolitos notablemente superior a la obtenida bajo condiciones sin estrés. Probablemente la prolina actúa como un osmolito regulador ante el estrés oxidativo, actuando como una fuente de reserva de carbono y nitrógeno, susceptible de ser utilizada como fuente de energía (Zhang y Verma, 1997). Además, la prolina creada bajo estrés inducido por sales, metales y condiciones de deshidratación no solo es un señalizador en el sistema redox sino también un reductor de eficacia de radicales libres en especies reactivas a oxígeno (Alia y Pardha, 1991). En este sentido, Paleg et al. (1984) mencionaron que la actividad de las enzimas catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasas fueron originadas por prolina. La estrecha relación entre la producción de aceites esenciales y la acumulación de prolina en los ambientes evaluados indica un efecto probable del metabolismo intermedio de la planta que promueve la acumulación de este osmolito como respuesta al estrés oxidativo, y en consecuencia la biosíntesis de aceite esencial (Paleg et al., 1984). Estos autores informaron que la mayor biosíntesis de aceite esencial por estrés inducido con salinidad y iones metálicos, probablemente derivó en una actividad enzimática antioxidante que condujo a mayor acumulación de metabolitos secundarios (Lattanzio et al., 2009). Los efectos de los ambientes estresantes evaluados indujeron cambios en el metabolismo de las plantas que derivaron en una mayor biosíntesis de aceites esenciales, y consecuentemente en una mayor cantidad de timol y carvacrol.

REFERENCIAS

- Adams, R.P. (1995). Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corp., Carol Stream, IL.
- Ahmed, Ch.B., B.B Rouna, S. Sensoy, M. Boukhriss y F.B. Abdullah (2009). Saline water irrigation effects on antioxidant defense system and proline accumulation in leaves and roots of field-grown olive. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 11484–11490.
- Ahmed, C.B, B.B Rouna, S. Sensoy, M. Boukhriss y F.B. Abdullah (2010). Exogenous proline effects on photosynthetic performance antioxidant defense system of Young Olive Tree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 4216–4222.
- Alia-Pardha y P. Saradhi (1991). Proline accumulation under heavy metal stress. *Journal of Plant Physiology* 138: 554–558.
- AOAC (1990). Official Methods of the AOAC. International. 15th Ed. Association Official Agricultural Chemists, Arlington, Va., U.S.A.
- Arzila-Lozano, C.C, G. Loarca- Piña, S. Lecona-Uribe y E. Gonzales (2004). El Orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 54: 100-111.
- Aziz, E.E., Al- Amir y J.e. Craker (2008). Influence of salt stress on growth and essential oil production in peppermint pennyroyal and apple mint. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* 14: 77-87.
- Aziz, E. E., A. A. El Din, E, E.A. Omer, (2010). Influence of Zinc and Iron on plant growth and chemical constituents of *Cymbopogon citratus* L. grown in newly reclaimed land. *International Journal of Academic Research* vol. 2.no. 4.
- Bates, L., R.P. Waldren y I.D. Teare (1973). Rapid determination of free proline of water stress studies. *Plant Soil* 39: 205-207.
- Benavides, M.A., R.H. Ramirez, T.V. Robledo, R. Mati, O.E. Cornejo, D.J. Hernandez, R.A. Sandoval, V.R. Mendoza, C.E. Samaniego, M.J.G. Ramirez, E. Bacopulos Tellez, C.A. Aguilera y L.O. Fuentes (2002). Ecofisiología y bioquímica del estrés en plantas. Primera ed. Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila.
- Chartzoulakis, K., M. Loupassaki, M. Bertaki y I. Androulakis (2002). Effects of NaCl salinity on growth, in content and CO₂ assimilation rate of six olive cultivars. *Scientia Horticulturae* 96: 235–247.
- Da Silva, E.C., F. De Araújo, F. De Melo y A. De Azevedo (2008). Physiological responses to salt stress in young umbu plants. *Environmental and Experimental Botany* 63: 147-157.
- De Vos, C.H.R. y H. Schat (1981). Free radicals and heavy metal tolerance. En: J. Rozema y J. Verkleij (eds.). Ecological response to environmental stress. Kluwer Publishers, The Netherlands. pp. 22-30.
- El-Hendaway, S.E., Y. Hu, G.M. Yakout, A.M. Awad, S.E. Hafizand y U. Schmidhalter (2005). Evaluating salt tolerance of wheat genotypes using the multiple parameters. *European Journal of Agronomy* 22: 243-253.
- Gantet, P., y J. Memelink (2002). Transcription factors: tools to engineer the production of pharmacologically active plant metabolites. *Trends in Pharmacological Science* 23: 563-569.
- Gurudatt, P.S., V.S. Pruti, B.T. Shwetasa, Ramesha, G. Ravikanth y R.Vasudeva (2010). Changes in the essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. during annual growth from Kumaon Himalaya. *Current Science* 98: 8- 25.
- Kavi-Kishor, P.B, S. Sangami, R.N. Amarutha, P. Sri Laximi, K.R.S. Naidu, S.Ra, K.J Reddy, P. Theriappan y N. Sreenivasulu (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and a biotic stress tolerance. *Current Science* 88: NO. 3
- Kessmann, H., C. Hofmann, T. Maetzke, J. Herzog, E. Ward, S. Theo, S. Uknes y J. Ryals (1994). Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annual Review of Phytopathology* 32: 439-459.

- Khorasaninejad, S., A. Mousav, H. Soltanlo, K. Hemmati y A. Khalighi (2010). The effect of salinity stress on growth parameters, essential oil yield and constituent of peppermint (*Mentha piperita* L.) *World Applied Sciences Journal* 11: 1403-1407.
- Kirbag, F.Z. y S. Kirbag (2007). Effects of copper on chlorophyll, proline, protein and abscisic acid level of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings. *Journal of Environmental Biology* 28: 561-566.
- Khurana, N., M.V. Singh y C. Chatterjee (2006). Copper stress alters physiology and deteriorates seed quality of rapeseed. *Journal of Plant Nutrition* 29: 93-101.
- Lattanzio V., A. Crdinali, Ruta C. y F. Morone.(2009). Relationship of secondary metabolism to growth in oregano (*Origanum vulgare* L.) shoot cultures under nutritional stress. *Experimental and Environmental Botany* 65: 54-62.
- Maggio A., S. Miyasaki, P. Veronese, T. Fujitas, J.A. Ibeas, B. Damsz, M.L., Narasimhan P.M Hasegawa, R.J Joly y R.A Bressan (2002). Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? *The Plant Journal* 31: 699-712.
- Martins, L.L., y P.Mourato (2006). Effect of Excess Copper on Tomato Plants: Growth Parameters, Enzyme Activities, Chlorophyll, and Mineral Content. *Journal of Plant Nutrition* 29: 2179-2198.
- McLafferty, F.W. (1989). Wiley Registry of Mass Spectral Data, 5a ed.; Wiley: New York.
- Mangel, K. y E.A. Kirkby (2001). Principles of plant nutrition. 5th ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 849 p.
- Munns, R. y M. Tester (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review Plant Biology* 59: 651-681.
- Naghdi-Badi, H., D. Yazdani, A.S. Mohammad y F. Nazari (2004). Effects of spacing and harvesting on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crop Production* 19: 231-236.
- Olivares, S.E. (1989). Paquete de diseños experimentales FAUNL. Versión 1.4. Facultad de Agronomía UANL. Marín, N.L. México. Autónoma de Nuevo León Facultad de Ciencias Biológicas. San Nicolás de los Garza, N.L., México. 77 p.
- Panou-Filotheou, H., A.M. Bosabalidis y S. Karataglis (2001). Effects of copper toxicity on leaves of oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*). *Annals of Botany* 88: 207-214.
- Pardossi, A., F. Malorgio, D. Oriolo, R. Gucci, G. Serra y F. Tognoni (1998). Water relations and osmotic adjustment in *Apium graveolens* during long-term NaCl stress and subsequent relief. *Physiologia plantarum* 102: 369-376.
- Paleg, L.G., G.R. Steward, y J.W. Bradbeer (1984). Proline and glycine betaine influence protein solvation. *Plant Physiology* 75: 974-978.
- Psarras, G., M. Bertaki y K. Chartzoulakis (2008). Response of greenhouse tomato to salt stress and K⁺ supplement. *Plant Biosystems* 142: 149-153.
- Russo, M, G.C. Galletti, P. Bocchini y A. Carnacini (1998). Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inflorescences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 3741-3746.
- Said-Al Ahl, H.A.H. y E.A. Omer (2009). Effect of spraying with zinc and / or iron on growth and chemical composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) harvested at three stages of development. *Journal Medicinal Food Plants* 1: 30-46.
- Said-Al Ahl, H.A.H. y A.A. Mhamoud (2010). Effect of zinc and / or iron foliar application on growth and essential oil of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) under salt stress. *Ozean Journal of Applied Sciences* 3: 97-110.
- Said-Al Ahl, H.A.H. y M.S. Hussein (2010). Effect of water stress and potassium humate on the productivity of oregano plant using saline and fresh water irrigation *Ozean Journal of Applied Sciences* 3: 125-141.
- Stohs, S.J. y D. Bagchi (1995). Oxidative Mechanisms in the Toxicity of Metal Ions. *Free Radical Biology and Medicine* 18: 321-336.
- Singh-Sangwan, N., A.H.A. Farooqif y R. Singh- Sangawan (1994). Effect of drought stress on growth and essential oil metabolism in lemongrasses. *New Phytologist* 123: 173- 179.
- Sivropoulou, A., E. Papanikolaou, C. Nikolaou, S. Kokkini, T. Lanaras y M. Arsenakis (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 1202-1205.
- Xing, W., H Wenming y G Liu (2010). Effect of excess iron and copper on physiology of aquatic plant *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid. *Environmental Toxicology* 25: 103-112.
- Zhang, C-S., Q. Lu y D.P.S. Verma (1997). Characterization of D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene promoter in transgenic *Arabidopsis thaliana* subjected to water stress. *Plant Science* 129: 81-89.