



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

**Caracterización de la semilla, composición química del aceite
esencial y efecto de la fertilización nitrogenada en *Agastache
mexicana* ssp. mexicana**

T E S I S

(Idónea comunicación de resultados para obtener el grado de Maestría
en Ciencias Agropecuarias)

Ing. Agrónoma Guadalupe Torres Díaz

Comité tutorial:

Dr. Fernando de León González

Dr. Antonio Flores Macías

La Maestría en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UAM-X), pertenece al padrón de Posgrados de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

El autor fue Becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con número de registro 689762

El jurado designado por la comisión Académica de la Maestría en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, para aprobación de la tesis titulada: **Caracterización de la semilla, composición química del aceite esencial y efecto de la fertilización nitrogenada en *Agastache mexicana* ssp. Mexicana**, que presentó:

Ing. Agrónoma Guadalupe Torres Díaz

El día 25 de Julio de 2019

JURADO DE EXAMEN

Presidenta

Dra. Alma Amparo Pyñeiro Nelson

Secretario

Dr. Juan Esteban Barranco Florido

Vocal

M.C. Guadalupe Ramos Espinosa

“Ich bin dankbar für alle die nein zu mir gesagt haben. Ihretwegen habe Ich selbst gemacht”

Albert Einstein

Dedicatoria

A mi abuela Adelaida Aguilar, por su ejemplo para afrontar la vida como una mujer digna y fuerte en medio de las mayores dificultades.

A mis hermanas Mary y Diose, por creer siempre en mí, por compartir conmigo los buenos tiempos y animarme en los tiempos difíciles.

A mi otras familias, Bertoldo, Adriana, Moni, Pamela, Wendy por abrazarme como parte de la suya, por su amor y dulzura.

A mis amigas Ana y Eli por acompañarme y ayudarme en todo este camino, por todas los momentos dulces y alegres que me han agregado.

A mis amigos y compañeros, los de antes y los de ahora, por la energía y buena vibra que me dio impulso para terminar este proyecto.

A todos los agricultores y pueblos originarios que han conservado y desarrollado ésta y otras especies a través de la historia.

Agradecimientos

A los doctores Antonio Flores Macías y Fernando de León González, miembros de mi comité tutorial, por su apoyo académico para la realización de esta investigación.

A Armando, guardian de la especie *Agastache mexicana mexicana* en Milpa Alta por toda su solidaridad para encontrar la especie y por su disposición para ayudarme de diferentes maneras.

A la Dra. Susana Ramírez por su ayuda en el estudio de las semillas.

A Manuel Cossio de Rancho San Martín por poner sus instalaciones a mi disposición en la destilación de las plantas.

Al centro de educación ambiental Acuexcomatl por facilitar su invernadero para el cultivo de la especie.

A Martine Renz de la Oficina de estudiantes extranjeros de la Universidad de Hohenheim, Alemania por todo el apoyo recibido durante mi estancia en dicha institución.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por proporcionarme el financiamiento para la realización de este trabajo.

A la Beca ERASMUS (European Community Action Scheme for mobility of University Students) y DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst) por la beca para mi estancia en Alemania.

A mi Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco por todo lo que significa pertenecer a ella.

A todas las personas que de innumerables formas estuvieron en este tiempo para ayudarme.

Contenido

1. Introducción General.....	1
2. Objetivos.....	2
2.1 Objetivo general	2
2.2 Objetivos particulares.....	2
3 Hipótesis	3
4. Marco teórico.....	3
4.1 <i>Agastache mexicana</i> ssp. <i>mexicana</i>	3
4.1.1 Descripción y distribución.....	3
4.1.2 Descripción botánica.....	4
4.1.3 Usos de <i>A. mexicana</i> ssp. <i>mexicana</i>	4
4.1.4 Recolección, cultivo y comercio de <i>A mexicana</i> ssp. <i>mexicana</i> y otras aromáticas en México.....	4
4.2 Aceites esenciales	7
4.2.1 Biosíntesis de metabolitos presentes en aceites esenciales.....	8
Fuente: Ávalos y Pérez (2009).....	10
Fuente: Ávalos y Pérez (2009).....	11
4.2.2 Composición química del aceite esencial y extractos de <i>A mexicana</i> ssp. <i>mexicana</i>	12
4.2.3 Principios activos y uso potencial	13
4.3 Factores bióticos y abióticos que afecta la síntesis de aceites esenciales.....	14
4.4 Fertilización nitrogenada en el rendimiento de plantas aromáticas	16
4.5 Semillas como unidad de reproducción	20
4.5.1 Caracterización de semillas	21
4.5.2 Viabilidad	22
4.5.3 Germinación	23
4.5.4 Dormancia física	24
Capítulo I. Composición química del aceite esencial de <i>A mexicana</i> ssp. <i>mexicana</i>	26
1.1 Introducción	26
1.2 Materiales y métodos	27
1.2.1 Colecta	27
1.2.2 Biomasa húmeda y seca	27

1.2.4 Extracción del aceite esencial	28
1.2.5 Composición química del aceite esencial.....	28
1.3 Resultados y discusión	28
1.3.1 Composición química del aceite esencial.....	28
1.4 Conclusiones	34
Capítulo II. Indicadores de crecimiento y rendimiento en función de la fertilización nitrogenada.....	35
2.1 Introducción	35
2.2 Materiales y métodos	36
2.2.1 Localización.....	36
2.2.2 Diseño experimental	36
2.2.3 Material vegetal y aplicación de tratamientos	36
2.2.4 Manejo fitosanitario	37
2.2.5 Cosecha y postcosecha	37
2.2.6 Variables estudiadas y análisis estadístico	37
2.3 Resultados y discusión	38
2.3.1 Altura de planta.....	38
2.3.2.....	38
2.3.4 Peso húmedo y peso seco de inflorescencias.....	38
2.3.5 Área foliar.....	39
2.3.6 Periodo de desarrollo de inflorescencias.....	39
2.4 Conclusiones	43
Capítulo III. Aportación a la Morfoanatomía, viabilidad y germinación de semillas silvestres de <i>Agastache mexicana ssp. mexicana</i>	44
3.1 Introducción	44
3.2 Materiales y método	45
3.2.1 Recolecta de semillas	45
3.2.2 Caracterización morfoanatómica de las semillas.	45
3.2.3 Viabilidad	45
3.2.4 Germinación	46
3.2.5 Análisis de datos.....	46
3.3 Resultados y discusión	47
3.3.1 Caracterización morfoanatómica de la semilla	47
3.3.2 Prueba de Viabilidad	48

3.3.3 Germinación	48
3.4 Discusión	49
3.5 Conclusiones	52
4. Bibliografía.....	53

Índice de Figuras

Figura 1 Rutas de biosíntesis de terpenos.....	10
Figura 2 Ruta del ácido sikimico	11
Figura 3 Distribución de las plantas en bloques al azar, agrupadas por vigorosidad.	36
Figura 4 Registro fotográfico del crecimiento de inflorescencias de <i>A. mexicana</i> ssp. mexicana. a) Aparición del primer primordio floral, b) día 4, c) día 7, d) día 10, e) día 13, f) día 15, g) día 17.....	40
Figura 5 Testa (a), tegmen (b) y semilla desnuda (c) de <i>Agastache mexicana</i> ssp. mexicana.....	48
Figura 6 Curva de germinación acumulada y germinación media diaria de <i>A. mexicana</i> ssp. mexicana	49

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Componentes mayoritarios del aceite esencial de <i>A mexicana</i> ssp. <i>xolocotziana</i>	13
Cuadro 2 Componentes químicos y proporción del aceite esencial de <i>Agastache mexicana</i> ssp. mexicana silvestre, procedente de la zona montañosa del sur de la Ciudad de México.	29
Cuadro 3 Valores promedio de indicadores de crecimiento <i>A. mexicana mexicana</i> en función de la aportación de nitrógeno.	40

Caracterización de la semilla, composición química del aceite esencial y efecto de la fertilización nitrogenada en *Agastache mexicana* ssp. *mexicana*

1. Introducción General

Se les conoce como *Agastache* a un grupo de 22 especies y subespecies de la familia *Lamiaceae*, originarias principalmente de México y Estados Unidos; entre las características que las diferencian destacan el color de las inflorescencias (rosa, morado, blanco y amarillo) y el quimiotipo de su aceite esencial (Zielinska and Matkowski, 2014).

Algunas especies, principalmente nativas de Estados Unidos y Asia, se cultivan con múltiples propósitos: como ornamentales por la belleza de sus inflorescencias, como planta seca para tisanas y para la extracción de su aceite esencial (Omidbaigi, Kabudani and Khorang, 2008) siendo éste último el propósito de mayor relevancia económica, ya que los componentes activos presentes en este aceite muestran efectos farmacéuticos de diversa índole: antidepresivo, espasmolítico, antiinflamatorio y anticonceptivo (González-Ramírez *et al.*, 2012; Hernández-Abreu *et al.*, 2013; Verano *et al.*, 2013; Estrada-Reyes *et al.*, 2014; González-Trujano *et al.*, 2015)

Es una subespecie nativa de México conocida comúnmente como toronjil morado; además de su importancia farmacéutica, tiene gran relevancia cultural en el país, ya que se utiliza desde la época prehispánica en diversos padecimientos (Estrada-Reyes *et al.*, 2014). Aunque se comercializa ampliamente como planta seca en México, alrededor del 85% proviene de recolecta de sus poblaciones silvestres, ya que no se cultiva a escala comercial (Santillán-Ramírez *et al.*, 2008; Juárez-Rosete *et al.*, 2013). Esta actividad ha contribuido con la disminución de las poblaciones naturales, poniendo en peligro la riqueza biológica, médica y económica de la especie, provocando que sea declarada especie amenazada (SEMARNAT 1993).

La composición química de la especie se ha estudiado sin separar las inflorescencias de los tallos con hojas. De su cultivo y su reproducción la información es escasa o nula.

El presente reporte de tesis está compuesto de tres capítulos:

- I. Composición química del aceite esencial de *A. mexicana ssp. mexicana* silvestre, de la zona montañosa de la Ciudad de México.
- II. Cultivo y rendimiento de *A. mexicana ssp. mexicana*, en función de la fertilización nitrogenada.
- III. Aportación de información sobre la morfoanatomía, viabilidad y germinación de semillas silvestres de *Agastache mexicana ssp. mexicana*.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Determinar la composición química y rendimiento del aceite esencial de *Agastache mexicana ssp. mexicana*, silvestre, su cultivo bajo fertilización nitrogenada y caracterización de su semilla.

2.2 Objetivos particulares

- a. Realizar la caracterización química del aceite esencial de *A. mexicana ssp. mexicana* silvestre, procedente de la zona montañosa de sur de la Ciudad de México.
- b. Establecer bajo condiciones de invernadero, el cultivo de *A mexicana ssp. mexicana*, para determinar el efecto de cuatro dosis de fertilización nitrogenada sobre el rendimiento de la especie.
- c. Realizar la caracterización morfoanatómica de semillas de *A mexicana ssp. mexicana*; determinar su viabilidad, porcentaje y velocidad de germinación.

3 Hipótesis

- a) Los metabolitos secundarios presentes en este aceite esencial son en su mayoría terpenos y fenoles, presentes en especies pertenecientes a la misma familia botánica.
- b) La dosis más elevada de fertilización nitrogenada, tiene efecto positivo en el rendimiento de flores, tallos y hojas.
- c) La características morfoanatómicas de la semilla de *A mexicana ssp. mexicana* son similares a las de especies aromáticas de la misma familia y presentan algún tipo de dormancia, además de heterogeneidad en la velocidad de germinación.

4. Marco teórico

4.1 *Agastache mexicana ssp. mexicana*

4.1.1 Descripción y distribución

Se les conoce como *Agastache mexicana* a un grupo de especies y subespecies que se diferencian por el color de sus inflorescencias y su composición química, lo que les confiere efectos farmacéuticos y aromas distintos (Estrada-Reyes *et al.* 2014). Son especies nativas del México que se conocen comúnmente como toronjil blanco, toronjil de casa, toronjil de monte, toronjil morado, toronjil rojo, pinkil o tama; pertenecen a la familia *Lamiaceae*; es una de las familias botánicas más diversas en México, con 500 especies aproximadamente, que son conocidas ampliamente por sus propiedades aromáticas y sus aceites esenciales (Domínguez-Vázquez and Castro-Ramírez, 2002).

Se distribuyen en una amplio rango de altitudes en México, que abarcan desde 600 hasta 3900 metros sobre el nivel del mar, por lo que están presentes en bosques tropicales caducifolios, subcaducifolios y perennifolios, bosque espinoso, mesófilo de montaña, de encino, de pino y mixto de encino-pino (BDMTM, 2015); así como

semidomesticadas en los huertos familiares de las comunidades indígenas Otomíes y Mestizos de Temoaya Estado de México (Santillán-Ramírez *et al.*, 2008). Se distribuye en los estados de Durango, Ciudad de México, Estado de México, Hidalgo, Oaxaca, Jalisco, Morelos, Guerrero, Querétaro, Sinaloa y Veracruz (Arizaga, 2007).

4.1.2 Descripción botánica

A mexicana ssp. mexicana es una hierba aromática perenne, con altura de 50 a 150 cm, tallos cuadrangulares, erguidos, con vellosidades. Sus hojas son simples, opuestas, enteras, en forma de lanza, con punta aguda y bordes aserrados. Sus flores son rojizas-violetas, con longitud de 2 a 3 cm y dispuestas en espigas terminales; presentan un aroma agradable anisado; con tricomas glandulares en tallos, hojas y flores, donde se almacena la mayor proporción de aceite esencial de la planta; además de una gran cantidad de contenidos esféricos en el mesófilo de la hoja que probablemente también contienen aceite esencial (Santillán-Ramírez *et al.*, 2008).

4.1.3 Usos de *A. mexicana ssp. mexicana*

El uso de esta especie es muy común entre la población, se ha documentado que se utilizaba desde la época prehispánica como antiespasmódica y para el tratamiento de enfermedades del corazón (Estrada-Reyes, 2014). Según la BDMTM (2015), Martín de la Cruz la reporta como antiséptica, astringente y para las quemaduras. Tiene un amplio uso para el “susto”, en comunidades indígenas Otomíes en el Estado de México, donde además se le utiliza para el dolor de estómago, tos, bilis, “enfriamiento”, vómito y “nervios”; se prepara ya sea molido en el metate, mezclado con pulque y ajeno, en té o hervido con agua para baños a los enfermos de “susto” (Santillán-Ramírez *et al.*, 2008).

4.1.4 Recolección, cultivo y comercio de *A mexicana ssp. mexicana* y otras aromáticas en México

El uso tradicional y la importancia cultural que tienen las especies aromáticas y medicinales en nuestro país se reflejan en su amplio comercio, principalmente como planta seca y fresca, en mercados locales. Diariamente se comercializan 116 toneladas de diversas plantas medicinales y aromáticas; 85% de estas provienen de recolección silvestre según señala Juárez-Rosete *et al.* (2013).

México no produce la mayoría de las plantas aromáticas que comercializa; aunque posee alrededor de 5000 especies nativas; sólo se dedican 8,351 hectáreas a su cultivo, de las cuales el 71 % corresponde a cilantro, seguido de manzanilla y albahaca con un 10 y 5 % respectivamente, el resto del área cultivada corresponde a perejil, zacate limón, menta y comino. Estos dos últimos con el valor comercial más alto, 22,000 y 32,685 pesos por tonelada, respectivamente. Sin embargo, especies nativas de gran importancia como valeriana, tila o toronjil no se cultivan, sino que se extraen de su hábitat (Juárez-Rosete, 2013). La extracción se ha practicado desde la antigüedad y ha causado la sobreexplotación de muchas especies aromáticas y medicinales (Torres-Martínez *et al.*, 2013), poniendo en peligro la diversidad biológica del hábitat; por otro lado se ha estado perdiendo el conocimiento ancestral, uso y aplicación de estos recursos fitoterapéuticos que son de gran importancia en países en desarrollo como México, donde el 80% de los medicamentos lo constituyen las plantas aromáticas y medicinales (Gattuso *et al.*, 2004).

En el país, no hay un estudio formal reciente que especifique las especies, los lugares y el porcentaje de su recolección; sin embargo, algunos estudios dan cuenta de estas prácticas; como el realizado en la Mixteca Poblana por Gómez-Calderón, (2010), donde se destaca que en las comunidades rurales se hacen colectas en el monte, para domesticar, cultivar, utilizar y comercializar a nivel local algunas plantas nativas.

La extracción se ha intensificado como respuesta a la demanda de estas plantas y sus aceites esenciales en los últimos años, ya que su comercio es muy rentable

para los recolectores, por ser especies exóticas que son escasas en el mercado y que sólo se consiguen en su centro de origen (Juárez-Rosete, 2013). Adicionalmente, la demanda mundial de aceites esenciales y subproductos de plantas aromáticas ha llevado a la recolección indiscriminada de especies nativas de sus hábitats naturales (70-90%), generando la extinción de alrededor de 75 especies entre los años 1600 y 1900 y el mismo número entre 1900 y 1970 en el mundo, evidenciando que la pérdida se está acelerando. Si continúa la misma tendencia, se cree que alrededor de 60,000 especies se extinguirán en el mundo en este siglo (Rao and Sastry, 2006).

A. mexicana ssp. *mexicana* es ampliamente demandada por la población y se comercializa en todo el territorio (González-Trujano *et al.*, 2015); en su mayoría es extraída de su hábitat silvestre para cubrir la demanda en el mercado. A pesar del inminente peligro y la pérdida biológica, cultural y económica de este recurso, no se ha establecido ningún esquema de protección, domesticación, rescate o cultivo. En el informe más reciente de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT, 2010), la especie ya no se catalogó como amenazada, pero su recolección se sigue practicando. En zonas de alta montaña como Milpa Alta en la Ciudad de México, hay más de 60 recolectores, según informan familias de recolectores de plantas medicinales del Volcán Cuauhtzin ubicado en Milpa Alta.

Es necesario y urgente fomentar el cultivo de plantas aromáticas y medicinales que se están recolectando, para lograr un mejor aprovechamiento económico y al mismo tiempo implementar una mayor protección en sus hábitats. Su cultivo requiere de información sobre las condiciones agroclimáticas de su hábitat, así como sobre las prácticas de manejo agronómico particulares para su cultivo. En el país son escasas las investigaciones al respecto, siendo dos de las contribuciones más importantes la de Guerrero-Lagunes (2010) con una investigación para la producción de aceite esencial de lavandín y, la de Juárez-Rosete (2010), con una publicación para la producción de aceite esencial de manzanilla, menta y tomillo.

4.2 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son mezclas complejas y únicas de diversos compuestos provenientes del metabolismo secundario de plantas, se extraen de tallos, hojas, flores, raíces o en el caso de los cítricos, del epicarpio del fruto a partir de un proceso de hidrodestilación o destilación por arrastre con vapor de agua (Dudareva and Negre, 2005).

Los componentes de los aceites esenciales son metabolitos secundarios, también llamados, productos naturales o compuestos volátiles; su nombre se debe a que, a diferencia de los metabolitos primarios, no tienen una función directa en la fotosíntesis, respiración, asimilación de nutrientes, transporte de solutos, síntesis de proteínas, carbohidratos ni lípidos y se les ha considerado como productos de desecho o secundarios (Ávalos-García and Pérez-Urrutia, 2009). Los metabolitos secundarios están presentes sólo en algunas especies llamadas plantas aromáticas, que se caracterizan por contar con estructuras especializadas donde almacenan estos metabolitos; las más importantes llamados tricomas glandulares están localizados en hojas, tallos, flores y raíces. Son estructuras características de diversas plantas de las familias aromáticas más importantes (*Lamiaceae*, *Asteraceae* y *Geranieacea*). En los plastidios de los tricomas se llevan a cabo los primeros pasos de la biosíntesis de metabolitos secundarios; aunque otras cavidades y conductos secretores presentes en las familias *Pinaceae*, *Myrtaceae*, *Asteraceae* principalmente, también almacenan aceites esenciales que utilizan como defensa ante patógenos (Maffei, 2010).

Algunas especies, presentan células secretoras que acumulan aceites esenciales dentro de sus vacuolas, como vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) en la primera capa cortical fuera de las raíces. Otras células secretoras se encuentran solitarias o en la epidermis de flores y son las responsables de su aroma (Maffei, 2010).

Los metabolitos secundarios más importantes en los aceites esenciales son los terpenoides, ya que son los más abundantes, constutiyen hasta el 90 % de su

composición. Metabolitos como los fenólicos también son importantes en plantas aromáticas (Sell, 2010).

Los terpenos son compuestos insolubles en agua, insaponificables y por lo tanto volátiles; provienen de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de C) y se clasifican según el número de unidades: los terpenoides de 10 C contienen dos unidades C5 y se llaman monoterpenos; los de 15 C tienen tres unidades de isopreno y se denominan sesquiterpenos, y los de 20 C tienen cuatro unidades C5 y son los diterpenos. Los triterpenos tienen 30 C, los tetraterpenos tienen 40 C y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno (Ávalos-García y Pérez-Urrutia, 2009).

Los compuestos fenólicos provienen de aminoácidos aromáticos y reciben su nombre ya que se derivan del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo. Son un grupo diverso que comprende desde moléculas sencillas hasta polímeros complejos como los taninos, la lignina y los pigmentos flavonoides que participan en interacciones ecológicas entre plantas e insectos (Ávalos y Pérez, 2009).

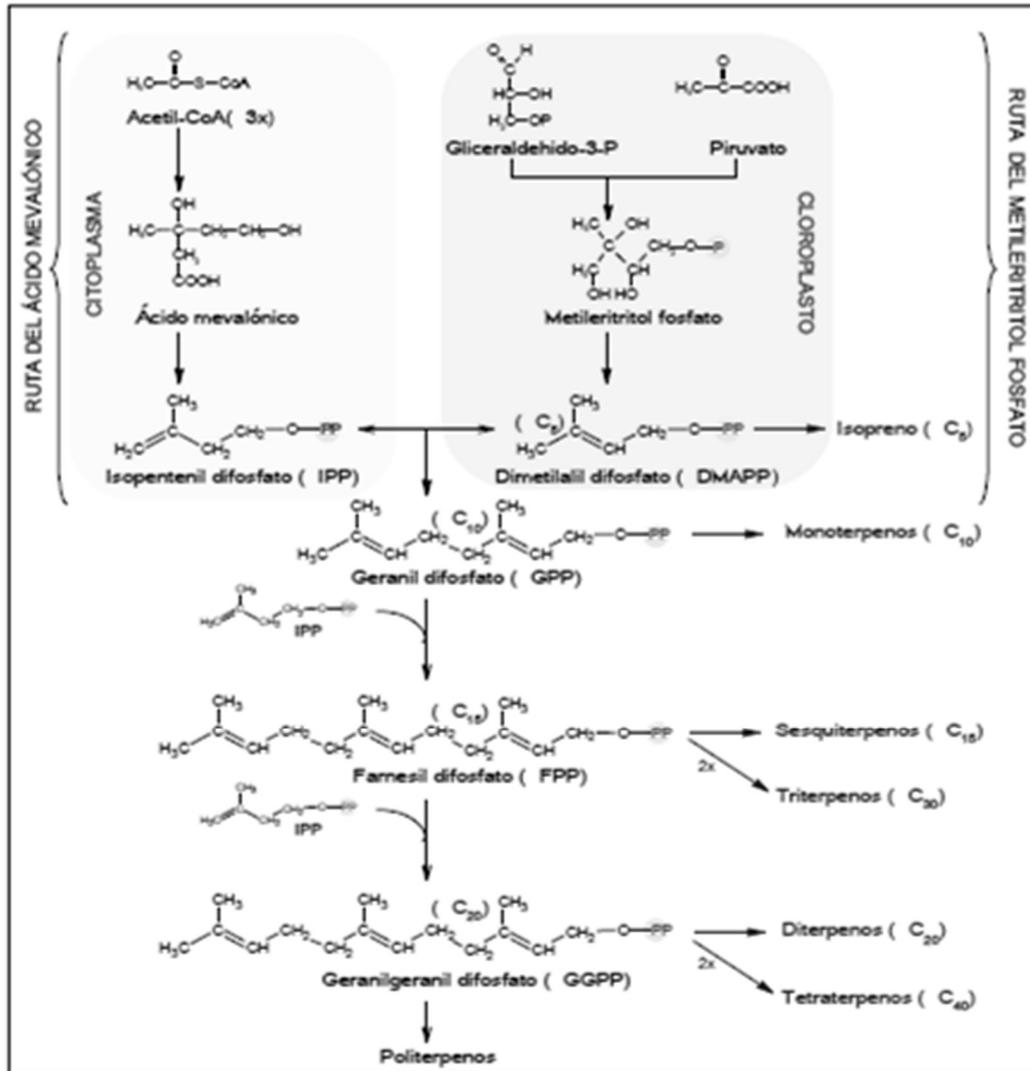
Aunque estos compuestos han sido utilizados por el hombre en diversas aplicaciones a través de la historia, fue hasta el siglo pasado que comenzó su estudio. De acuerdo con Bourgaud y colaboradores (2001), en los últimos 50 años, se han intensificado las investigaciones para producir y comprender la síntesis de aceites esenciales desde diferentes ángulos. La creciente demanda de estos compuestos para industrias tan influyentes como la farmacéutica, cosmética y alimentaria ha sido en gran parte la motivación para su estudio (Lubbe & Verpoorte 2011; Tripathi *et al.*, 2009).

4.2.1 Biosíntesis de metabolitos presentes en aceites esenciales

Las rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario; a través de la fotosíntesis, las plantas convierten el dióxido de carbono (CO₂) y agua en glucosa; la ruptura de la glucosa produce fosfoenolpiruvato que al descarboxilarse produce una unidad de dos carbonos del acetato y esta es esterificada con coenzima A para dar acetil CoA, que es el punto de partida para la

síntesis de ácido mevalónico que es el precursor en la formación de los terpenos. El proceso se lleva a cabo en el citosol, en donde tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico que reacciona hasta formar isopentenil difosfato (IPP), o bien la ruta del metileritritol fosfato (MEP) que funciona en cloroplastos y genera también IPP (Sell, 2010).

El isopentenil difosfato y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP) son los precursores activados en la biosíntesis de terpenos (Figura 1), en reacciones de condensación catalizadas por prenil transferasas para dar lugar a prenil bifosfatos como geranil. difosfato (GPP), precursor de monoterpenos, farnesil difosfato (FPP) precursor de sesquiterpenos y geranilgeranil difosfato (GGPP) precursor de diterpenos (Ávalos y Pérez, 2009).



Fuente: Ávalos y Pérez (2009)

Figura 1 Rutas de biosíntesis de terpenos.

En lo que respecta a los compuestos fenólicos, existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis: la ruta del ácido sikímico y la ruta del ácido malónico; aunque esta última es muy común en hongos y bacterias, pero no en plantas.

A través de la ruta del ácido sikímico (Figura 2), se sintetizan la mayoría de los compuestos fenólicos en plantas a partir de eritrosa-4-P y de ácido fosfoenolpirúvico, que dan inicio a una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis de ácido sikímico y, derivados de éste, aminoácidos aromáticos

(fenilalanina, triptófano y tirosina). La mayoría de los compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina (Sell, 2010).

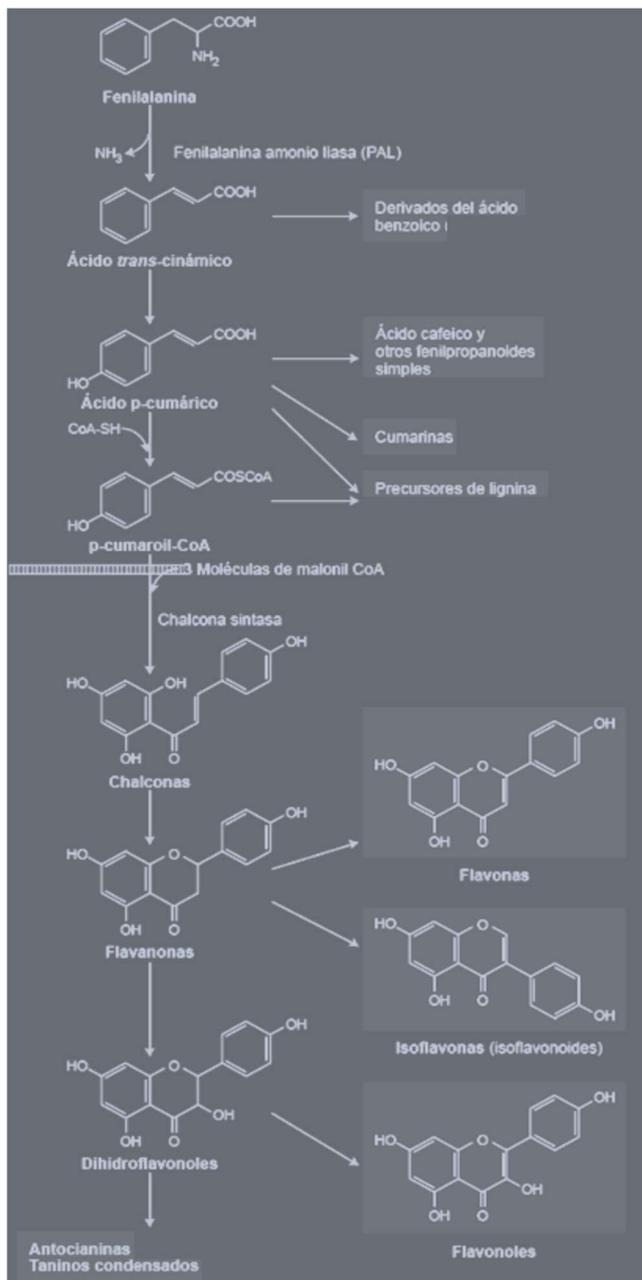
La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) cataliza la formación de ácido cinámico por eliminación de una molécula de amonio de la fenilalanina. Esta enzima está situada en un punto de ramificación entre el metabolismo primario y secundario por

lo que la reacción que cataliza es una importante etapa reguladora en la formación de muchos compuestos fenólicos (Figura 17). Las reacciones posteriores a la catalizada por PAL son básicamente adiciones de más grupos hidroxilo y otros sustituyentes.

Los ácidos trans-cinámico y p-cumárico se metabolizan para formar ácido ferúlico y ácido caféico (Figura 18), cuya principal función es ser precursores de otros derivados más complejos (Figura 2) con las cumarinas, ligninas, taninos, flavonoides e isoflavonoides (Ávalos y Pérez, 2009)

Aunque las aportaciones al conocimiento del metabolismo secundario han aportado información valiosa para su

comprensión, aún no se pueden explicar muchos de los procesos



Fuente: Ávalos y Pérez

Figura 2 Ruta del ácido shikímico

relacionados con su síntesis, hasta ahora sólo se han descrito el 5 % de los genes involucrados y se sabe que múltiples familias de genes intervienen para la síntesis de un solo metabolito; hasta ahora no se han podido manipular ni predecir desde la ingeniería genética, la biosíntesis de aceites esenciales (Sangwan *et al.*, 2001; Franz, 2010).

4.2.2 Composición química del aceite esencial y extractos de *A mexicana* ssp. *mexicana*

Forma parte de las plantas aromáticas y medicinales más importantes de México, debido a la composición química de su aceite esencial y extractos, que tienen efectos farmacéuticos de diversa índole (González-Trujano *et al.*, 2015).

Se ha descrito la composición química de los extractos con metanol (González-Trujano *et al.*, 2012, 2015), hexano y etanol (Verano *et al.*, 2013) y se ha reportado la presencia de talianín y ácido ursólico; sin embargo, en la mayoría de los ensayos, la especie se ha estudiado sin distinguir entre subespecies. Estrada-Reyes *et al.* (2014) documentaron recientemente la composición química de los extractos acuosos de las subespecies *xolocotziana* (toronjil blanco) y *mexicana* (toronjil morado), encontrando diferencias importantes tanto en componentes como en la proporción de estos. Los componentes mayoritarios presentes en ambas subespecies se encuentran en proporciones diferentes: Diosmetín 7-O- β -D-(6"-O-malonil)-glucósido en 13.95 y 32.9 %, Acacetín, 7-O- β -glucósido en 24.49 y 22.42 %, Acacetín 7-O- β -D-(6"-O-malonyl)-glucósido en 34.47 y 2.21 %, respectivamente. Otros componentes como ácido málico, Luteolina 7-O- β -D-glucósido, Luteolina 7-O- β -D-(6"-O-malonil)-glucósido sólo están presentes en la subespecie *mexicana*, siendo ésta la que presenta mayor abundancia de metabolitos secundarios en comparación con *xolocotziana*.

También se ha documentado la composición química del aceite esencial de *A mexicana* ssp. *Xolocotziana* (Cuadro 1), que está constituido por compuestos

fenólicos (metil eugenol y estragol) y terpénicos (linalol, mentona, pulegona, limoneno) (Juárez *et al.*, 2015); pero no se conoce la composición de la subespecie *mexicana*. Cabe destacar que en todos los casos, tanto en extractos como aceite esencial, las determinaciones se han realizado utilizando en conjunto tallos, hojas y flores de la planta; hasta ahora no se conoce la composición por separado de estas estructuras en ninguna de sus subespecies.

No se ha encontrado información en la que se hayan definido los quimiotipos de las distintas regiones en las que se encuentra distribuida la especie; que, al proveerle condiciones ambientales diferentes, supone una composición química particular en cada lugar.

Cuadro 1 Componentes mayoritarios del aceite esencial de A mexicana ssp. xolocotziana

Especie	Componente	Abundancia (%)
<i>A. mexicana</i> <i>ssp.</i> <i>xolocotziana</i>	Metil eugenol	36.41
	Estragol	27.92
	Linalool	10.66
	Mentona	10.29
	Pulegona	6.46
	Limoneno	5.70

Fuente: Juárez *et al.* (2015).

4.2.3 Principios activos y uso potencial

Los usos tradicionales de esta especie, han impulsado recientemente su investigación; destacan los estudios farmacológicos que han confirmado diversos efectos atribuidos a esta especie, evidenciando valiosos componentes del aceite esencial y extractos de esta aromática. González-Trujano *et al.* (2012, 2015) aislaron de *A. mexicana* ssp. el compuesto tilianín y demostraron su efecto antidepresivo, espasmolítico y anticonceptivo; además, Estrada-Reyes *et al.* (2014)

y Molina-Hernández *et al.* (2000) confirmaron el efecto sedante, ansiolítico y depresor del sistema nervioso, atribuyendo estos efectos a los compuestos acacetin y diosmetin. Verano *et al.*, (2013) y González-Ramírez *et al.* (2012) también probaron el efecto anticonceptivo del ácido ursólico de *A. mexicana* ssp.. y Hernández-Abreu *et al.* (2009, 2011, 2013) mostraron el efecto antihipertensivo y vasodilatador de tailianin.

Desde el enfoque agronómico, son escasos los estudios realizados de la especie; sin embargo, destaca el de Juárez y colaboradores (2015), quienes reportaron la efectividad del aceite esencial de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* en el combate de hongos postcosecha en trigo, atribuyéndole este efecto al metil eugenol y estragol, que previamente se habían reportado en el combate de los hongos fitopatógenos *Fusarium spp.*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* y *Rhizoctonia solani*.

4.3 Factores bióticos y abióticos que afecta la síntesis de aceites esenciales

La síntesis de aceites esenciales también está influenciada por factores externos que pueden ser bióticos y abióticos. En lo que respecta a los primeros, han sido ampliamente estudiados y se conocen algunas de sus funciones, que más que fisiológicas, tienen importancia ecológica. La biosíntesis de estos compuestos se lleva a cabo ante situaciones de peligro y/o estrés para la planta; por mencionar algunos ejemplos, las plantas producen metabolitos secundarios como defensa ante patógeno e insectos. Friedman *et al.* (2002) confirmaron su efecto bactericida al probar 93 aceites esenciales contra cuatro bacterias (*Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica*), encontrando que los aceites esenciales más efectivos contra *C. jejuni* fueron caléndula, jengibre, jazmín, pachulí, gardenia, madera de cedro, semilla de zanahoria, semillas de apio, artemisa, nardo, y aceites de naranja amarga; los más activos contra *E. coli* fueron orégano, tomillo, canela, palmarosa, laurel, clavo, hierba de limón, pimienta de Jamaica y contra *L. monocytogenes*, los más eficientes fueron los aceites esenciales de gardenia, madera de cedro, laurel, clavo, orégano, canela, pimienta

de jamaica, tomillo, y pachulí; así como tomillo, orégano, canela, clavo, pimienta, laurel, palmarosa y mejorana contra *S. enterica*.

Hammer *et al.* (2003) probaron la efectividad de los componentes terpinen-4-ol, alfa-terpineol, linalol, alfa-pineno, beta-pineno, 1,8 cineol, del aceite esencial de árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) contra diferentes hongos, obteniendo resultados significativos en el combate de éstos, pero particularmente contra *Candida albicans*.

Recientemente Pichersky & Gershenzon (2002) y Maffei (2010) sugirieron que los metabolitos de plantas funcionan como un “lenguaje” para las plantas y la defensa ante plagas, así como para atraer polinizadores y asegurar la floración y supervivencia de la especie, ya que muchos compuestos volátiles son emitidos en mayor proporción justo antes de la polinización o son liberados con el rompimiento de las estructuras que los contienen, ante el ataque de plagas, sintetizando además compuestos que atraen enemigos de estos herbívoros.

Las diversas interacciones ecológicas en las que participan los metabolitos secundarios, respondiendo ante estímulos del medio ambiente que las rodea, evidencia la importancia ecológica de estos compuestos, al intervenir en el equilibrio de los hábitats.

En lo que respecta a los factores abióticos, diversos estudios en campo han reportado que la temperatura, calidad de luz, sequía y exceso de riego, aplicación de nutrientes, densidad de plantas, momento de cosecha y manejo postcosecha son claves en la síntesis de estos compuestos (Starmans and Nijhuis, 1996; Salomon, 2007; Figueiredo *et al.*, 2008; Franz, 2010). En poblaciones naturales, donde estos factores no son controlados, existe una gran variabilidad en cuanto a proporción, tipo, momento y emisión de los compuestos volátiles, lo que resulta en una gran heterogeneidad en el rendimiento y quimiotipo de aceites esenciales (Dudareva and Negre, 2005; Franz, 2010; Isman *et al.*, 2011).

Por lo anterior, es necesario determinar las condiciones de manejo en cada especie y lugar en particular; lo que puede ayudar a disminuir la heterogeneidad en el rendimiento y la composición química. De entre los factores de manejo, la aplicación

de nitrógeno (N) ha incidido en el rendimiento y composición química de aceites esenciales (Ávalos-García y Pérez-Urrutia, 2009; Schmidt, 2010).

4.4 Fertilización nitrogenada en el rendimiento de plantas aromáticas

Ha sido ampliamente documentado el papel del nitrógeno en las plantas y su relación con el rendimiento en biomasa; sin embargo en el caso específico de las especies aromáticas el efecto de este elemento tiene apenas algunas décadas de estudio, es aún incipiente y muestra que estas especies presentan un comportamiento diferente en lo que se refiere a la relación entre el N y el rendimiento de biomasa y aceite esencial (Ávalos-García y Pérez-Urrutia, 2009; Schmidt, 2010).

Algunos estudios aportan evidencias de que el N juega un papel importante en el metabolismo secundario de las especies aromáticas, en comparación con otros nutrientes como fósforo, magnesio, calcio, azufre y algunos microelementos con los que no se han conseguido efectos significativos en su rendimiento (Zheljzakov *et al.*, 2006; Dordas, 2009; Prasad *et al.*, 2011).

La relevancia de este macronutriente se debe a que es esencial para la construcción de diversos compuestos orgánicos: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y enzimas, estas últimas juegan un papel clave en la biosíntesis de numerosos compuestos que son constituyentes de estos volátiles (Koeduka *et al.*, 2006).

Como una explicación al papel de los nutrientes en la síntesis de aceites esenciales, De La Fuente *et al.* (2003) sugieren que, cuando elementos como el N son limitados, la planta puede acumular carbono (C) y moléculas complejas a base de C, y los pueden derivar para incrementar la síntesis de metabolitos secundarios, lo cual ocurre bajo condiciones de estrés (Arimura *et al.*, 2009). En el campo de la fisiología, la relación C:N falta estudiarse más, debido a que los resultados en diversas plantas aromáticas han mostrado efectos contrarios, especialmente con respecto al N, el cual si es deficitario puede disminuir el rendimiento en biomasa, aceite esencial y compuestos específicos (Gerhezon, 1984) como en el caso de variedades de romero (Martinetti, 2006; Puttanna *et al.*, 2010) patchouli (Singh y Rao, 2009), albahaca (Sifola & Barbieri, 2006; Taie y Salama, 2010), melisa

(Abbaszadeh *et al.*, 2009), hinojo (Hellal and Mahfouz, 2011) y perifolio (El Gendy *et al.*, 2015) .

Sifola y Barbieri (2006) aplicaron altas dosis de N (300 kg ha^{-1}) a las variedades de albahaca “Mostruoso mammoth” (MM), “Genovese profumatissimo” (GP) y “Napoletano a foglia di lattuga”(NFL), reportando un incremento en biomasa fresca mayor al 100% con respecto al testigo, así como 13.8 kg ha^{-1} más de aceite esencial en comparación con el testigo, donde se consiguieron 3.4 kg ha^{-1} ; demostrando que al incrementarse el número de hojas por planta se aumentó el rendimiento así como la calidad de aceite esencial, al presentar un quimiotipo linalol-eugenol (56-17% y 49 -21%) en las variedades MM y GP; aceite esencial que muestra propiedades bactericidas y fungicidas. En el caso de la variedad NFL se obtuvo un quimiotipo chavicol metil-linalol (39-37%) que muestra un perfil que le confiere un sabor delicado, demandado por la industria alimenticia y clasificado como el de mayor calidad de la especie; así como cantidades significativas de limoneno (13, 17 y 17%). Adicionalmente, mostraron que aplicaciones de N mayores a la ideal, provocaron disminución en todos los indicadores de la planta y su aceite esencial; lo puede atribuirse a que una aplicación excesiva de fertilizante ($> 300 \text{ kg ha}^{-1}$), aumenta la acidez del suelo (franco-arcilloso) provocando cambios importantes en la absorción de nutrientes y por lo tanto en el metabolismo primario y secundario, lo que pone de manifiesto que debe determinarse la dosis de fertilización nitrogenada para cada sistema de producción en particular.

Gendy *et al.* (2015), encontraron una r^2 de 0.998 y 0.975 entre el N y el rendimiento de materia húmeda y seca de perifolio, respectivamente; así como el rendimiento más alto de materia húmeda y seca con las dosis más altas de 120 y 180 kg ha^{-1} . El rendimiento de aceite esencial con una dosis media de N (120 kg ha^{-1}), combinada con la menor dosis de potasio (60 kg ha^{-1}) incrementó en dos cortes realizados un 196 y 162.5 % el rendimiento, con respecto al testigo. Ellos atribuyeron al N el mayor contenido de estragol (26.43 %) y 2-alil-1,4-dimetoxibenceno (9.48%) en comparación con el resto de los tratamientos, siendo

además estos compuestos, dos de los cuatro que constituyen en mayor proporción a este aceite.

Abbaszadeh *et al.* (2009) aplicaron dosis de 0, 60, 90, 120, 150 y 180 kg ha⁻¹ de N (urea) al cultivo de melisa, reportando un incremento significativo del rendimiento en biomasa y el mayor rendimiento de aceite esencial (kg ha⁻¹) con la dosis media, 60 kg ha⁻¹.

De forma similar, Puttanna *et al.* (2010) encontraron que la tasa de N aplicada en combinación con potasio, aumentó el rendimiento en materia fresca y seca de la primera a la segunda cosecha de romero de 5.21 a 10.18 kg ha⁻¹ y de 1.74 a 3.23 kg ha⁻¹, respectivamente con la dosis más alta probada (300 kg ha⁻¹). El N también influyó en el rendimiento de aceite esencial al obtener 350 L ha⁻¹ con respecto al testigo (150 L ha⁻¹), con la dosis media probada (150 y 100 kg ha⁻¹ de N-K).

En ninguno de los casos mencionados anteriormente, se reportaron efectos en la composición química de estos aceites esenciales y destacable el comportamiento de romero al duplicar el rendimiento hasta la segunda cosecha; lo cual puede deberse a las condiciones agroclimáticas proporcionadas a cada cultivo, pues mientras Sifola y Barbieri, y Gendy establecieron el cultivo de albahaca y perifolio en condiciones climáticas similares a las de su origen obteniendo cambios positivos en la composición química y el rendimiento de planta desde la primera cosecha; los cultivos de melisa y romero que son originarios del Mediterráneo, se establecieron en Irán e India, donde las condiciones climáticas difieren sustantivamente del clima mediterráneo, lo que sugiere que si bien, el rendimiento de planta y aceite esencial está fuertemente correlacionado con la fertilización nitrogenada, la composición química de los aceites esenciales y la respuesta de estas especies es dependiente de las condiciones climáticas típicas del centro de origen geográfico de la especie, en combinación con la fertilización nitrogenada óptima.

Azizi *et al.* (2009) aplicaron dos niveles de fertilización nitrogenada (0.5 g y 2.0 g de N por maceta de 6 L.) en tres variedades de orégano, encontrando que la dosis más alta aumentó el rendimiento de materia seca y aceite esencial (45 y 1.5 g por maceta, respectivamente) con respecto a la dosis más baja (39 y 1.2 g por maceta), además de aumentar el contenido de carvacrol, que tiene gran relevancia para determinar una mejor calidad y precio de este aceite esencial.

Hellal y Mahfouz (2011) aplicaron siete dosis de N en combinación con una mezcla de diferentes cepas de bacterias fijadoras de N al cultivo de hinojo; encontrando que una de esas dosis incremento el rendimiento de la biomasa húmeda y seca en 63.6 y 21.8 g. por planta en la primera cosecha y 68.6 y 22.6 g. en la segunda cosecha respectivamente. En lo que respecta al aceite esencial, el T2 (100 kg de sulfato de amonio, 66.6 kg de sulfato de calcio y 16.6 kg d sulfato de potasio) fue el más eficiente con 73.5 y 74.17 L ha⁻¹, en comparación con el control que produjo 30.19 y 32.09 L ha⁻¹. La composición química también presentó cambios, aunque no fueron significativos para los componentes principales.

Con aplicaciones de N vía foliar o al suelo (50 kg ha⁻¹ foliar o 50 kg ha⁻¹ al suelo) se obtuvieron rendimientos de materia seca de tomillo de 2488.4 y 1544 Kg ha⁻¹. Respectivamente, mientras que con el tratamiento testigo (sin aplicación de N) sólo se obtuvieron 1130.2 kg ha⁻¹. El mayor rendimiento de aceite esencial se obtuvo con la aplicación de N vía foliar con 29.08 L ha⁻¹ en comparación con el tratamiento testigo , que sólo produjo 20.39 L ha⁻¹; así como cambios en las proporciones de timol (19.56 y 5.09 kg ha⁻¹), carvacrol (0.53 y 0.39 kg ha⁻¹) y p-cimeno (1.18 y 1.19 kg ha⁻¹) del mismo tratamiento en comparación con el testigo, respectivamente (Jabbari *et al.*, 2011). Singh y Ganesh Rao, (2009) relacionaron el incremento de biomasa (271.2%) y aceite esencial de patchouli (316.6 %) a la dosis más alta de N (200 Kg ha⁻¹) con respecto al tratamiento control (0 kg N).

Singh *et al.* (2014) al aplicar 40, 80, 120 y 160 kg ha⁻¹, encontraron los valores más altos en rendimiento de aceite esencial (3%) y materia seca de jengibre con la dosis

media (120 kg ha⁻¹) proporcionada al cultivo, en comparación con 2.6% en el tratamiento control (0 Kg N). Sin embargo, otros ensayos muestran que la fertilización nitrogenada no afecta el rendimiento ni la composición química de los aceites esenciales en las variedades de hinojo “Grecia”, “Bulgaria” y “Turquía” (Chatzopoulou *et al.*, 2006).

Con base en la revisión bibliográfica, pareciera que es posible incrementar el rendimiento de aceite esencial de especies aromáticas e incluso la proporción de algunos metabolitos secundarios con la aplicación de N. Sin embargo, es importante subrayar que la influencia de este nutriente sobre las diversas especies de plantas aromáticas, ha generado resultados contradictorios y de ahí la necesidad de realizar ensayos para cada caso en particular. Pues si bien los resultados son positivos en general, en algunos casos donde las condiciones climáticas bajo las que se cultiva la especie son sustancialmente diferentes a las del lugar de origen de la especie, la producción de aceites no siempre se incrementa.

Estas investigaciones sugieren que es posible mejorar el rendimiento de estas especies al aplicar N en cantidades óptimas, pero sólo cuando se les proporcionan las condiciones geográficas típicas de su centro de origen.

4.5 Semillas como unidad de reproducción

Desde la perspectiva botánica, las semillas son el resultado de la reproducción sexual de las plantas, es decir, del óvulo fertilizado. Besnier (1989), las conceptualiza como la unidad de reproducción y diseminación; lo que tiene un sentido más amplio, integrando por lo tanto a tubérculos y bulbos, entre otros.

Aunque las características morfoanatómicas y fisiológicas de las semillas son muy variables y específicas, todas las semillas de angiospermas están compuestas básicamente por un embrión, un endospermo o reserva nutritiva, y una o varias cubiertas seminales. En el embrión se encuentra el eje embrionario y los cotiledones que tienen origen a partir de la fusión de los núcleos espermáticos del tubo polínico,

con dos o más núcleos polares del saco embrionario. Es en un extremo del embrión donde se originará el tallo de la planta, al que se le conoce como epicótilo (Niembro 1989). El endospermo, es una reserva de nutrientes que servirán para cubrir las necesidades del embrión hasta su germinación. Las cubiertas (testa y tegmen) generalmente cubren el embrión, protegiéndolo de daños del exterior. Sobre la testa se encuentra el hilio y el micrópilo; el primero es la cicatriz que queda cuando el funículo se inserta en el óvulo; el segundo es una perforación que permite el paso de agua y oxígeno al interior de la semilla (Gil y Miranda, 2005).

La reproducción por semilla, tiene ventajas sobre la reproducción asexual, pues se conserva la diversidad genética de las especies, lo que provee de características únicas, que pueden aprovecharse en beneficio de la humanidad. En el caso específico de plantas aromáticas y medicinales, la composición química específica pueden proporcionar componentes con importancia farmacéutica y cosmética principalmente (Rajjou *et al.*, 2012). En especies nativas, de las que se desconocen la mayoría de los aspectos agronómicos, resulta esencial la generación de este conocimiento para su reproducción y producción.

4.5.1 Caracterización de semillas

La caracterización de semillas puede hacerse desde el punto de vista botánico, agronómico, filogenético o químico; por lo tanto, tiene diversos usos y aporta información valiosa en campos de estudio diversos; su importancia se evidencia en las más de 25,000 publicaciones al respecto (Yang, 2008), aunque cabe señalar que estas investigaciones se limitan a grupos de plantas de interés alimentario, industrial y ornamental (Victoria, 2006).

Las descripciones botánicas y agronómicas, son la primera etapa ser para ser documentadas y se presentan con amplias descripciones de la anatomía y morfología, acompañadas de esquemas simplificados y fotografías bajo microscopio óptico y electrónico (di Sapia *et al.*, 2012). Una de las referencias más

importantes, que ha sido guía para diversos trabajos aún en la actualidad, es la caracterización de un gran número de semillas de Estados Unidos, realizada por Martin y Barkley (1961), quienes presentaron fotografías desde diferentes perspectivas con cortes transversales y longitudinales, así como textos descriptivos y esquemas.

En México, Centro y Sudamérica las aportaciones realizadas por Niembro (1989), son una referencia obligada en cuanto al tema se refiere, debido a la amplia y diversa investigación realizada por este autor, quien además ha aportado terminología para la descripción de semillas. En lo que se refiere a la caracterización comercial de las semillas, además de la descripción botánica se requiere conocer la pureza, peso de la semilla, contenido de humedad, viabilidad y características de germinación. Para esta caracterización, la norma internacional ISTA (Internacional Seed Testing Association) estableció una serie de requisitos que se pueden consultar ampliamente en dicha asociación. El caso particular de plantas aromáticas y medicinales, son escasas las publicaciones al respecto e inexistentes en la mayoría de especies aromáticas y medicinales nativas, como la especie *A. mexicana ssp. mexicana* objeto de esta investigación.

4.5.2 Viabilidad

El término viabilidad en semillas, engloba distintos conceptos, pero se refiere estrictamente a las semillas vivas; es decir, semillas que presentan un embrión vivo capaz de desarrollarse (Camacho-Morfín, 2011). Es importante señalar que la viabilidad de una semilla, no está necesariamente asociada a la germinación y desarrollo de la planta, ya que la semilla puede tener algún tipo de dormancia, que le impida germinar (Serri *et al.*, 2011).

La determinación de la viabilidad puede hacerse por diversos métodos, uno de los más simples y disponibles es la inmersión de semillas en agua o solventes orgánicos; mediante éstos se determina el porcentaje de semillas llenas y vacías,

siendo las semillas llenas las que se hunden y las vanas las que flotan (Damelash *et al.*, 2003). Otras técnicas como los rayos X (estereorradiografía y tomografía), son más precisas, ya que permiten observar el interior de las semillas para saber si son vanas, con insectos u hongos, incompletas, con embrión, etc. (Alzugaray *et al.*, 2006). La prueba más utilizada y ampliamente reconocida por su precisión para determinar la viabilidad en semillas, es la prueba de tinción con tetrazolio (cloruro de 2, 3, 5, - trifenil-tetrazolio); esta sal presenta una coloración roja al tomar el hidrógeno liberado por las enzimas deshidrogenasas, durante los procesos de reducción en la respiración celular; por lo tanto, las semillas que no están vivas o no son viables, no se colorean. De esta forma se puede cuantificar el número de semillas viables y muertas de manera precisa (ISTA, 1999). El uso de esta técnica requiere de gran precisión y tiempo, sobre todo en semillas pequeñas, donde se dificulta la tinción. Autores como Victoria (2006), sugieren la adaptación de esta técnica cuando se tratan de especies aromáticas y medicinales, ya que las semillas son pequeñas, presentan dificultades para su tinción y requieren condiciones específicas de tiempo, temperatura y observación.

4.5.3 Germinación

La germinación es el proceso mediante el cual, la planta emerge de la semilla o nace, esta definición se fundamenta en el crecimiento del embrión y su desarrollo, con lo que la planta puede romper la testa y salir al exterior, para pasar de ser heterótrofa a autótrofa (Rajjou *et al.*, 2012).

Desde Evenari (1984), el proceso de germinación se ha dividido en tres etapas principales (Imbibición, elongación celular y división celular). Sin embargo, una división más completa es la que presenta y resume Camacho-Morfín (2011) en cinco etapas. La primera etapa es la imbibición en la que ocurre la entrada de agua y la absorción de ésta, a través de los tejidos, lo que pone a vacuolas y células turgentes y permite la activación del metabolismo. Los tiempos de hidratación son diversos y por ende el proceso de activación de la germinación no puede generalizarse. En la

segunda etapa ocurre la activación de los sistemas de información y síntesis y en ella tiene lugar la utilización de las reservas de la semilla, en la que se lleva a cabo la diseminación de los aminoácidos del eje embrionario, la utilización de los monómeros de los aminoácidos en la glicólisis y la reducción y oxidación de los nucleótidos de piridina. La digestión de los compuestos complejos de las reservas es la tercera etapa, en la que dependiendo de las reservas de la semilla (azúcares, grasas, proteínas, aminoácidos, almidones), los compuestos complejos se transforman en azúcares sencillos y aminoácidos. Las auxinas inducen la asimilación de monómeros para la elongación celular y mediante giberelinas se induce la hidrólisis de los polímeros presentes en los tejidos nutritivos. En la cuarta etapa se da la movilización de compuestos y se lleva a cabo la translocación de los monómeros de los tejidos nutritivos al eje embrionario; para su ocurrencia aumenta la actividad en el ciclo de Krebs, la transcripción del ADN en el embrión y la síntesis de nuevas proteínas. Finalmente, en la quinta etapa se da el crecimiento del embrión en el que mediante las citocininas, se induce la replicación del ADN y la división celular en el embrión. La respiración y la síntesis de nuevas proteínas en el embrión tienen lugar, con lo que la raíz aumenta su tamaño y emerge de la testa de la semilla

La ISTA (1999), establece que el proceso de germinación se puede dar por ocurrido con la emergencia de la radícula en la mayoría de las semillas, a partir de ello, se hacen mediciones del vigor de la planta, hasta la emisión de las primeras hojas verdaderas.

4.5.4 Dormancia física

Cuando las semillas no germinan o presentan proporciones de germinación menores al 50%, aun siendo viables y bajo las condiciones ambientales ideales, se les considera durmientes (Serri *et al.*, 2011).

De acuerdo con Silvertown (1999), a excepción de las especies originarias de selvas tropicales, la mayoría de las especies de otros hábitats presentan algún tipo de dormancia, la cual se clasifica en exógena (dormancia física, química y mecánica)

y endógena (dormancia fisiológica, morfológica y la combinación de ambas). Entre los tipos de dormancia exógena, la física es considerada la más evolucionada de dormición, ya que su ocurrencia está limitada a unas cuantas familias de plantas, exclusivamente de angiospermas y la mayoría dicotiledóneas (Baskin and Baskin, 1985).

Las semillas con este tipo de dormición, son altamente tolerantes al secado, por lo que tienen un contenido de humedad bajo; lo que está relacionado con la impermeabilidad de la semilla, al mantener compactadas y apretadas las células de la testa para obstruir el paso del agua. La mayoría presenta dos cubiertas, la testa que generalmente es dura y el tegmen, siendo ambas o una de ellas impermeables, dependiendo de la semilla (Camacho-Morfín, 2011). Esta condición en las semillas, preserva la viabilidad en especies que están expuestas a condiciones ambientales extremas o riesgosas para su sobrevivencia tales como la sequía o temperaturas extremas (Baskin y Baskin, 1985). En este sentido debe ampliarse la perspectiva desde la que se estudian las semillas, extendiéndola a la comprensión de sus funciones ecológicas y las ventajas de ello para el hombre, antes de la domesticación y el intento de homogeneizar la reproducción.

Las técnicas para eliminar la dormancia física son simples, ya que se buscan que el agua permeé en la semilla para que se lleve a cabo la imbibición y por ende la germinación; una de las más utilizadas es romper o realizar un orificio en la semilla, que permita la entrada del agua (Camacho-Morfín, 2011).

Capítulo I. Composición química del aceite esencial de *A mexicana* ssp. *mexicana*

1.1 Introducción

Agastache mexicana ssp. *mexicana* es una de las plantas aromáticas y medicinales más importantes en México, ya que es ampliamente utilizada entre la población por sus diversos usos medicinales y a la tradición que tiene en el país (Estrada-Reyes *et al.*, 2014). Estudios recientes han confirmado la efectividad de la especie en el tratamiento de diversos padecimientos como la ansiedad, depresión o como antiinflamatorio y espasmódico (Molina-Hernández *et al.*, 2000; Hernández-Abreu *et al.*, 2009, 2011, 2103; González-Trujano *et al.*, 2012, 2015; González-Ramírez *et al.*, 2012; Verano *et al.*, 2013; Estrada-Reyes *et al.*, 2014; Juárez *et al.*, 2015).

REPETIDO

Estas investigaciones han evidenciado el valor de sus componentes químicos y el potencial de la especie para producir aceite esencial, ya que también se ha documentado que la planta presenta tricomas glandulares en hojas, tallos y flores donde se almacenan los metabolitos secundarios (Santillán-Ramírez, 2008). Sólo se conoce el aceite esencial de la subespecie *xolocotziana*, que está constituido por compuestos fenólicos (metil eugenol y estragol) y terpénicos (linalol, mentona, pulegona, limoneno). Cabe destacar que en todos los casos, tanto en extractos como aceite esencial, las determinaciones se han realizado utilizando en conjunto tallos, hojas y flores de la planta; hasta ahora no se ha descrito la composición por separado de estas estructuras en ninguna de sus subespecies (Juárez *et al.*, 2015).

Debido a su popularidad, esta especie se comercializa ampliamente en el país como planta seca para la preparación de infusiones; 85 % de la cual proviene de recolección silvestre (Juárez-Rossete, 2013). Esta actividad ha provocado la disminución de sus poblaciones naturales y su clasificación como especie amenazada (SEMARNAT, 1993), poniendo en peligro la diversidad biológica, la riqueza cultural, económica y el conocimiento de su uso y aplicación fitoterapéutica,

que es relevante en nuestro país, donde el 80% de los medicamentos provienen plantas aromáticas y medicinales (Torres-Martínez, 2013; Gattuso *et al.*, 2004).

Con base en la información anterior, la presente investigación tuvo como finalidad el obtener material vegetal de la especie que se desarrolla de manera natural en la zona montañosa del sur de la Ciudad de México, realizar la extracción de su aceite y caracterizarlo químicamente.

1.2 Materiales y métodos

1.2.1 Colecta

El 26 de diciembre del 2015 se llevó a cabo la colecta en Santa Ana Tlacotenco en la alcaldía de Milpa Alta, Ciudad de México a una longitud -99.011, latitud 19.153, altitud 2922 msnm; que presenta un clima templado húmedo con vegetación de bosque pino-encino. La toma de las muestras de semillas y material vegetal en plena floración se realizó mediante un muestreo dirigido, seleccionando plantas con altura promedio de 10 cm, medidos desde la base del cuello de la planta hasta el ápice.

Se determinó la cantidad de aceite esencial extraído por unidad de biomasa vegetal, para posteriormente realizar un análisis cualitativo y cuantitativo de sus componentes químicos.

1.2.2 Biomasa húmeda y seca

El material vegetal recolectado se separó, juntando tallos con hojas y por otro lado se separaron flores, en ambos casos se cuantificó la biomasa húmeda. Posteriormente, la planta se secó a temperatura ambiente, en condiciones de oscuridad por un periodo de 72 horas (Guerrero-Lagunes, 2010). Con ambos pesos, se determinó el rendimiento de biomasa seca con respecto al de biomasa húmeda (%).

1.2.4 Extracción del aceite esencial

El material vegetal seco fue cortado pequeños para su introducción en el destilador y el aceite esencial se extrajo mediante la técnica de arrastre con vapor de agua tradicional. El aceite esencial extraído con agua floral se separó por decantación y se determinó el porcentaje extraído con referencia al peso de la planta destilada. (Schmidt, 2010).

1.2.5 Composición química del aceite esencial

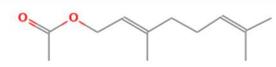
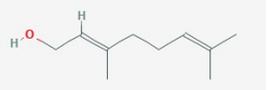
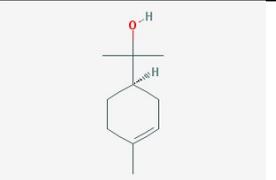
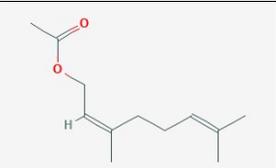
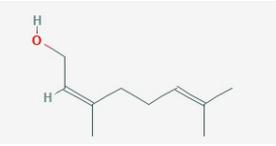
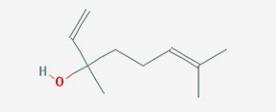
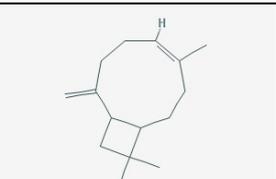
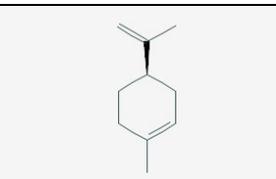
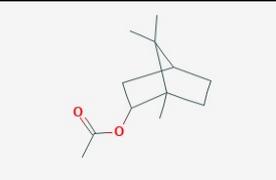
La composición química se determinó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (Kubeczka, 2010). Se empleó un cromatógrafo de gases Agilent 7890 y espectrómetro de masas Ber Microflex con MALDI-Tiempo de vuelo. La fase móvil fue de gas helio a una presión de 1.1 ml min⁻¹ y una fase estacionaria líquida de fenilmetilpolisiloxano al 5 % (0.25 µm) en columna capilar de 30 m x .25 mm Se inyectó 1 µL de aceite esencial a una temperatura de inyector de 310°C y la separación se realizó a una temperatura inicial de 40° C incrementando 8 ° C cada minuto hasta alcanzar 310 ° C. El espectrómetro de masas fué operado a 70 eV (Kubeczka, 2010). Los compuestos se identificaron por comparación de espectros de masas y los tiempos de retención, con los datos reportados en la literatura (NIST-MS, versión 2.0, 2010).

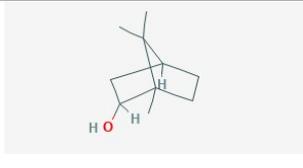
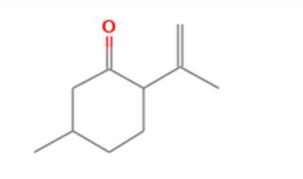
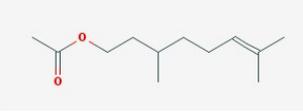
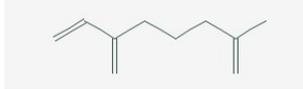
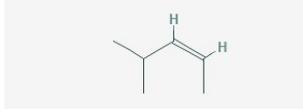
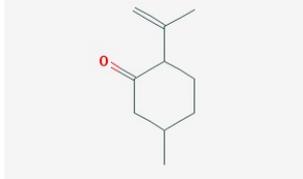
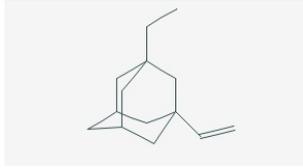
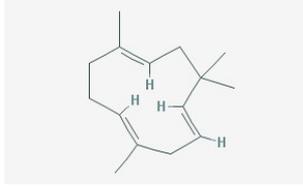
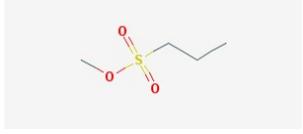
1.3 Resultados y discusión

1.3.1 Composición química del aceite esencial

El aceite esencial de *A. mexicana* ssp. *mexicana*, está constituido por 19 metabolitos secundarios (Cuadro 4), de los cuales el 78% lo forman el acetato de geranilo (31.12 %), geraniol (18.39 %), alfa terpineol (13.11 %), acetato de nerilo (6.17 %) y nerol (5.19%) Los componentes, linalool, cariofileno, D limoneno, acetato de bornilo, borneol, canfeno y p-ment-8-en-3-one se encuentran en concentraciones menores al 5 %; los componentes, acetato de citronelilo, acetato de mirceno, cis-4-methyl-2-pentene, isopulegol, 1-ethyl-3-vinyl-adamantane, 1-propanesulfinic acid, methyl ester y alfa cariofileno presentaron porcentajes menores al 1% (Cuadro 2).

Cuadro 2 Componentes químicos y proporción del aceite esencial de *Agastache mexicana* ssp. *mexicana* silvestre, procedente de la zona montañosa del sur de la Ciudad de México.

Componente	Proporción %	Estructura química
Acetato de geranilo	31.12	
Geraniol	18.39	
Alfa Terpineol	13.11	
Acetato de Nerilo	6.17	
Nerol	5.09	
Linalool	4.79	
Cariofileno	4.62	
D- Limoneno	4.64	
Acetato de Bornilo	3.04	

Componente	Proporción %	Estructura química
Borneol	2.17	
Canfeno	1.18	
p-Ment-8-en-3-one	1,26	
Acetato de Citronelilo	0.86	
Alfa Mirceno	0.75	
cis-4-Methyl-2-pentene	0.59	
Isopulegol	0.54	
1-Ethyl-3-vinyl-adamantan	0.43	
Alfa cariofileno	0.41	
1-Propanesulfinic acid, methyl ester	0,3	

Los componentes químicos presentes en el AE de *A. mexicana* ssp. *mexicana*, no coinciden con los reportados anteriormente en extractos acuosos de ésta especie (Estrada-Reyes 2014). Este resultado se debe a la naturaleza lipídica de los componentes y a las técnicas de extracción; ya que mediante la técnica utilizada por Estrada-Reyes (2014) donde se somete a la planta a cocción; los componentes secundarios se volatilizan y se pierden, debido a las altas temperaturas y a que se omite la condensación de éstos; por el contrario, la técnica de arrastre por vapor de agua, utilizada en esta investigación, extrae los metabolitos secundarios mediante la condensación de éstos, recuperando sólo los componentes volátiles, es decir el aceite esencial de la planta (Schmidt, 2010).

Los estudios más recientes del aceite esencial de la subespecie *xolocotziana*, son coincidentes con la subespecie *mexicana* en sólo dos componentes: linalool que está presente en proporción del 10.66% y 4.79% y D limoneno en proporción del 5.70 y 4.64 %, respectivamente.

Ha sido reportado que los componentes aislados de extractos de la subespecie *xolocotziana*, tampoco coinciden con los componentes de la subespecie *mexicana* (González-Truján *et al.*, 2015).

En lo que respecta a los componentes mayoritarios del AE de la subespecie *mexicana*, como acetato de geranilo, se ha encontrado en los aceites esenciales de especies de la misma familia botánica, como *Salvia officinalis*, aunque en proporciones menores (2.5 %) (Schmidt, 2010) y de la especie *Stachys Iberica Stenostachya* en 9.2% (Kaya *et al.*, 2001). En otras especies como *Thapsia minor* y *Cymbopogon flexuosus* este componente se encontró en proporciones del 83 % y del 3 al 59% respectivamente (Coelho *et al.*, 2012; Ganjewala & Luthra, 2009).

De acuerdo con la literatura consultada, una de las actividades biológicas más importantes de este componente, es la de anticonceptivo, evidenciada recientemente por Quintans-Júnior *et al.* (2013), quienes mostraron la eficacia anticonceptiva del acetato de geranilo y (+) – canfeno en dosis de 200 mg kg⁻¹ en

experimentos con ratas. En el mismo sentido, Verano *et al.* (2013) demostraron el efecto anticonceptivo de los extractos de *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana*, aunque en este caso el efecto fue atribuido al componente ácido ursólico.

El segundo componente mayoritario del aceite esencial de la subespecie *mexicana*; geraniol, es considerado uno de los fungicidas naturales más ampliamente conocidos en diversas aplicaciones (University Of Hertfordshire, 2015) y es constituyente de los aceites esenciales de especies como *Cymbopogon winteranus* Jowitt en proporciones del 12 al 25 % y en *Citrus sp.* en proporciones menores al 12% (Zellner *et al.*, 2006). Por su olor característico a rosas, es ampliamente utilizado en la industria cosmética, especialmente para la elaboración de perfumes (Fahlbusch, 2003).

Alfa terpineol, el tercer metabolito secundario más abundante en el aceite esencial de la subespecie *mexicana*; está presente en el aceite esencial de *Cinnamomum camphora* (L.) Presl, en proporciones del 3,8% y se le atribuye efecto insecticida contra *Tribolium castaneum* y *Lasioderma serricorne*, insectos-plaga de productos almacenados como harinas de trigo y salvado (Guo *et al.*, 2016).

A diferencia de otros componentes químicos que están en la mayoría de los aceites esenciales de plantas aromáticas, alfa terpineol se encuentra en pocas especies aromáticas; la *Salvia libanotica* es otra de las especies que lo contiene en proporción del 1.7% y su efecto como inhibidor de células tumorales ha sido evidenciado; colocando a este componente químico como un potencial agente anticancerígeno (Hassan *et al.*, 2010).

El resto de los metabolitos secundarios de la subespecie *mexicana*, presentes en proporciones menores al 10%, tienen efectos de diversa índole, tanto en especies de la misma familia botánica, como en otras familias de plantas aromáticas y medicinales. Entre esos metabolitos están:

Acetato de nerilo, está presente en *Helichrysum italicum* G. Don ssp. *microphyllum* (Willd.) Nym en proporción del 17.6 al 35.6% (Usai *et al.*, 2010). En hojas de *Murraya koenigii* se reportó en cantidad del 6.18 %; su efecto antibacterial se ha

probado contra *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Rajendran *et al.*, 2014).

a) Nerol y linalool se encuentra en especies como rosa, palmarosa, citronela y en salvia, orégano, mejorana, tomillo y lavanda, en proporciones que van del 10 al 15% en el caso de nerol y hasta el 58% de linalool. Poseen efecto bactericida y repelente contra diversos insectos (Cantrell *et al.*, 2001; Franz, 2010; Guerrero-Lagunes, 2010).

b) Cariofileno es componente importante de los aceites esenciales de *Oregano* spp. y *Eugenia dysenterica*, representa el 11.3 y 14% de éstos aceites esenciales. Destaca su efecto antibacterial contra *Salmonella enterica*, *Helicobacter pylori* y *Staphylococcus aureus* (Duarte *et al.*, 2010; Mahdian *et al.*, 2017).

c) D-Limoneno es uno de los metabolitos secundarios más comunes y en mayor proporción en aceites esenciales de cítricos como naranja, lima, limón; entre sus múltiples efectos farmacéuticos, destaca como anticancerígeno y ha sido estudiado y confirmado desde la década de los noventa (Jäger, 2010).

d) Acetato de bornilo, se encuentra en el aceite esencial de *Valeriana officinalis* en proporciones del 3 al 33% (Bos *et al.*, 1997), y en diversas especies coníferas como *Larix decidua*; de donde proviene su olor característico de pino, que se utiliza en productos de limpieza y fragancias aromatizantes (García *et al.*, 2017).

e) Borneol está presente en extracto de abeto rojo y pino silvestre, presenta un efecto repelente contra garrapatas *Ixodes ricinus* que ha sido probado recientemente por Schubert *et al.* (2017), también destaca su efecto como analgésico tópico (Wang *et al.*, 2017).

En lo que respecta a los componentes p-ment-8-en-3-ono, acetato de citronelilo, A. mirceno, cis-4-methyl-2-pentene, isopulegol, 1-ethyl-3-vinyl-adamantane, 1-propanesulfinic acid, methyl ester y alfa cariofileno, se encontraron en proporciones menores al 2%.

1.4 Conclusiones

El presente estudio parece ser el primer reporte de la composición química del aceite esencial de la subespecie *mexicana*. Los metabolitos secundarios encontrados son 19, su concentración (determinada mediante arrastre de vapores y sin cocción) se distribuye de la siguiente forma: Acetato de geranilo (31.12 %), geraniol (18.39 %), alfa terpineol (13.11 %), Acetato de Nerilo (6.17 %) y Nerol (5.19 %) constituyen el 73.88 % . Los componentes, Linalool, Cariofileno, D Limoneno, Acetato de bornilo, Borneol, Canfeno y p-Ment-8-en-3-one se encuentran en concentraciones menores al 5 % y los componentes, Acetato de Citronelilo, A. mirceno, cis-4-Methyl-2-pentene, Isopulegol, 1-Ethyl-3-vinyl-adamantane, 1-Propanesulfinic acid, methyl ester y Alfa cariofileno presentaron porcentajes menores al 1 %.

Los efectos biológicos de éstos componentes, encontrados en investigaciones previas, son de diversa índole; destacan el efecto anticonceptivo del acetato de geraniol, el efecto fungicida del geraniol, el efecto insecticida de alfa terpineol, el efecto antitumoral D limoneno y alfa terpineol, el efecto antibacterial de acetato de nerilo, nerol, linalool y cariofileno.

Aunque las dos subespecies de *Agastache*, *mexicana* y *xocolotziana*, han sido utilizadas tradicionalmente sin distinción, el presente estudio evidencia las diferencias en cuanto a la composición química de sus aceites esenciales y por ende en sus aplicaciones farmacéuticas, por lo que la divulgación de esta información resulta especialmente importante entre las comunidades, si se considera que es una de las plantas medicinales más utilizadas en la medicina tradicional mexicana.

La naturaleza de sus metabolitos secundarios y las diversas aplicaciones farmacéuticas y comerciales de éstos, colocan a la subespecie *mexicana* como un cultivo de gran potencial para las comunidades que han extraído la especie silvestre.

Capítulo II. Indicadores de crecimiento y rendimiento en función de la fertilización nitrogenada.

2.1 Introducción

Se han reportado 22 especies y subespecies de *Agastache*, con origen en Estados Unidos, Asia y México, de las cuales se cultivan y se han estudiado las nativas de Estados Unidos y Asia para usos diversos; como ornamentales por la belleza de sus inflorescencias, como planta seca para tisanas y para la extracción de su aceite esencial (Omidbaigi *et al.*, 2008). Éste último es el propósito de mayor relevancia económica, ya que los componentes activos presentes en este aceite esencial muestran efectos farmacéuticos de diversa índole: antidepresivo, espasmolítico, antiinflamatorio y anticonceptivo (González-Ramírez *et al.*, 2012; Hernández-Abreu *et al.*, 2013; Verano *et al.*, 2013; Estrada-Reyes *et al.*, 2014; González-Trujano *et al.*, 2015); por lo que su cultivo es de gran importancia económica y farmacéutica.

En México, se encuentra el centro de origen de *Agastache mexicana ssp. mexicana*, una subespecie nativa del país, conocida comúnmente como toronjil morado, que se comercializa ampliamente en el país como planta seca, para la preparación de infusiones; aunque no se extrae su aceite esencial ni se cultiva a escala comercial. El 85 % proviene de recolecta de sus poblaciones silvestres (Santillán-Ramírez *et al.*, 2008; Juárez-Rosete *et al.*, 2013), lo que ha disminuido las poblaciones naturales, contribuyendo con su clasificación como especie amenazada (SEMARNAT 1993).

Aunque es una especie con relevancia farmacéutica, cultural y agronómica, no existe información para su cultivo, ni sobre la composición química de su aceite esencial: En este sentido, se ha documentado que diversos factores de manejo como la fertilización nitrogenada tiene un papel relevante en el rendimiento de la planta y la composición de aceite esencial de especies de la misma familia (Franz, 2010; Figueiredo *et al.*, 2008; Starmans y Nijhuis, 1996; Puttanna *et al.*, 2010; Taie *et al.*, 2010). Bajo este contexto, el objetivo de esta investigación fue establecer bajo condiciones de invernadero el cultivo de *A. mexicana ssp. mexicana*, para

determinar el efecto de cuatro dosis de fertilización nitrogenada, sobre los parámetros de crecimiento de flores y de tallos con hojas.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Localización

El cultivo se realizó en el Centro de Educación Ambiental Acuexcomatl ubicado en San Luis Tlaxialtemalco Xochimilco, Ciudad de México, bajo un túnel con cubierta plástica, donde se monitorearon la temperatura media diaria y la humedad relativa media diaria con un termohigómetro digital Steren.

2.2.2 Diseño experimental

Se evaluaron cuatro tratamientos (6, 12, 18 y 24 meq L⁻¹ de nitrógeno), en un arreglo experimental de bloques al azar con cuatro repeticiones y seis plantas por unidad experimental, siendo el factor de bloque la vigorosidad, debido a la heterogeneidad de las plantas Figura 3.

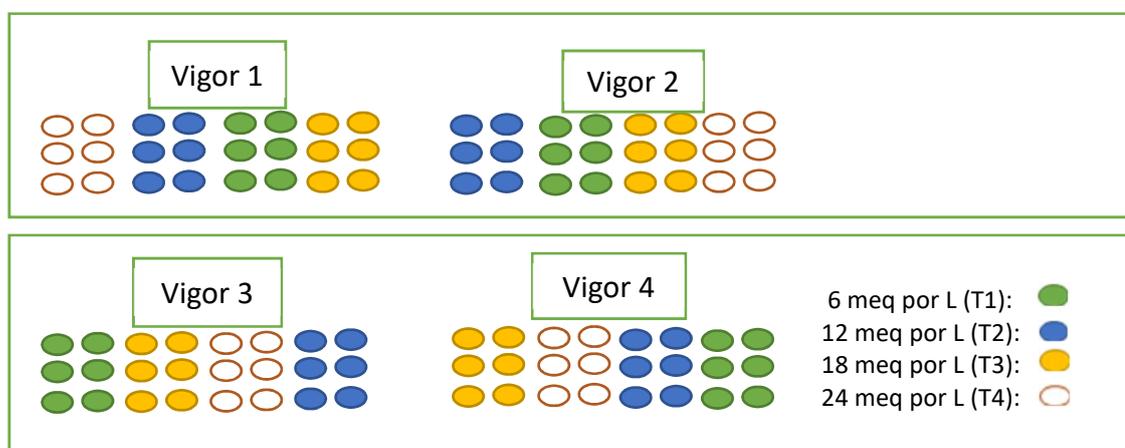


Figura 3 Distribución de las plantas en bloques al azar, agrupadas por vigorosidad.

2.2.3 Material vegetal y aplicación de tratamientos

Las plantas provinieron de la zona montañosa de Milpa Alta, Ciudad de México, donde previamente se mantuvo en condiciones de temporal y sin adición de

nutrientes sintéticos durante tres años. Las plantas fueron trasplantadas a bolsas plásticas de polietileno negro calibre 700 con capacidad de 5 L, en una mezcla de agrolita y turba negra en proporción 1:1. Posterior al trasplante, se aplicó riego a saturación con Raizal^{MR} de acuerdo con la recomendación del fabricante. El cultivo se estableció el tres de mayo del 2016.

La nutrición se realizó con base en la propuesta por Steiner (1961), ajustándola a los niveles de nitrógeno a evaluar; las fuentes utilizadas fueron fosfato de potasio (KH_2PO_4), nitrato de potasio (KNO_3), nitrato de calcio ($\text{Ca}[\text{NO}_3]_2$), sulfato de magnesio (MgSO_4), sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), ácido bórico (H_3BO_3), sulfato de magnesio (MnSO_4), sulfato de hierro (FeSO_4), sulfato de zinc (ZnSO_4), sulfato de cobre (CuSO_4).

Las soluciones nutritivas se aplicaron a través del riego, manteniendo el sustrato a capacidad de campo, mismo que fue monitoreado una vez por semana mediante un medidor de humedad para suelo Spectrum^{MR}.

2.2.4 Manejo fitosanitario

Se aplicó mediante aspersión un fungicida orgánico de sulfocálcico, cada 15 días, a una concentración del 2 % con la finalidad de prevenir enfermedades de manera preventiva.

2.2.5 Cosecha y postcosecha

La cosecha se realizó cortando la planta con tijeras, cuando la mitad de las espigas florales se encontraban abiertas, durante las primeras horas del día. Se hicieron ramos de las inflorescencias poco densos, los cuales se secaron a temperatura ambiente y en oscuridad, de acuerdo a las recomendaciones de Guerrero-Lagunes (2012).

2.2.6 Variables estudiadas y análisis estadístico

Las variables dependientes evaluadas fueron: a) Altura de planta (AP), medida cada 20 días en cuatro ocasiones, con una cinta métrica (precisión de 1 mm) desde el cuello de la planta hasta el ápice más alto, b) peso húmedo (PHTH) y

peso seco (PSTH), de hojas con tallos; c) peso húmedo (PHF) y peso seco (PSF) de inflorescencias; d) área foliar por planta y área foliar total (cm²), determinadas con un medidor de área foliar marca Licor, modelo 3100; e) periodo de desarrollo de inflorescencias, para lo que se realizó un registro fotográfico del desarrollo de la inflorescencia cada dos días y se cuantificó el periodo de floración completo de 48 plantas; se determinó la media del periodo total de floración desde la aparición del primordio floral hasta la apertura total de las flores.

Los datos recogidos fueron sometidos a un análisis de varianza y comparación de medias por Tukey, ($P \leq 0.05$) mediante el paquete estadístico JMP V. 12

2.3 Resultados y discusión

El periodo de cultivo desde el trasplante hasta la cosecha fue de 122 días, en el que se registró una temperatura media máxima de 38.95 °C, mínima de 11.2 °C y humedad relativa máxima de 95%, con mínima de 10%.

2.3.1 Altura de planta

La mayor altura promedio fue de 74.66 cm, registrada en el tratamiento de 24 meq L⁻¹ de nitrógeno; sin embargo, el análisis estadístico no muestra diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos. La literatura reporta una altura de 150 cm en esta especie silvestre (BDMTM 2015).

2.3.2 Peso húmedo y peso seco de tallos con hojas

El mayor rendimiento de PHTH y PSTH obtuvo con el tratamiento de 24 meq L⁻¹ de nitrógeno (478.25 y 174.1 g, respectivamente), en comparación con el tratamiento de 6 meq L⁻¹ (429.50 y 156.32 g), el análisis estadístico no mostró diferencias entre los tratamientos.

2.3.4 Peso húmedo y peso seco de inflorescencias

El mayor rendimiento en el peso de inflorescencias húmedas y secas (PHI y PSI), se obtuvo con la dosis 24 meq L⁻¹ de nitrógeno (39.12 y 14.25 g, respectivamente),

mientras que en la dosis de 6 meq L⁻¹ de nitrógeno se obtuvieron (35.23 y 12.75 g, respectivamente), pero sin diferencias estadísticas entre los tratamientos.

2.3.5 Área foliar

No se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos. El área foliar tanto por planta como por tratamiento, presentó valores similares (Cuadro 3).

2.3.6 Periodo de desarrollo de inflorescencias

Los primeros primordios florales se presentaron 77 días después de establecido el cultivo y el periodo de floración tuvo una duración promedio de 25.55 ± 1.57 días. En la Figura 4 se aprecia el desarrollo de las inflorescencias a través del tiempo en lapsos de tres días. Esta información resulta de vital importancia en esta especie, no sólo por la escasez de información sobre su crecimiento y desarrollo, sino debido a que la producción de flores en las plantas aromáticas; es el principal objetivo de producción comercial para determinar el momento ideal de la cosecha (Guerrero-Lagunes, 2010).

Cuadro 3 Valores promedio de indicadores de crecimiento A. mexicana mexicana en función de la aportación de nitrógeno.

Tratamiento. mEq L ⁻¹	AP cm	PHTH g	PSTH g	PHI g.	PSI g	AFP cm ²	AFT cm ²
6	70.95 a	429.50 a	156.32 a	35.23 a	12.75 a	455.95 a	2724.28
12	73.66 a	486.75 a	177.10 a	33.86 a	12.29 a	428.43 a	2576.41
18	68.53 a	477.75 a	173.90 a	34.43 a	12.51 a	236.35 a	421.60
24	74.66 a	478.25 a	174.10 a	39.02 a	14.25 a	431.73 a	2565.50

AP: Altura de planta, PHTH: biomasa húmeda de tallos con hojas, PSTH: biomasa seca de tallos con hojas, PHI: biomasa húmeda de inflorescencias, PSI: biomasa seca de inflorescencias, AFT: área foliar total.

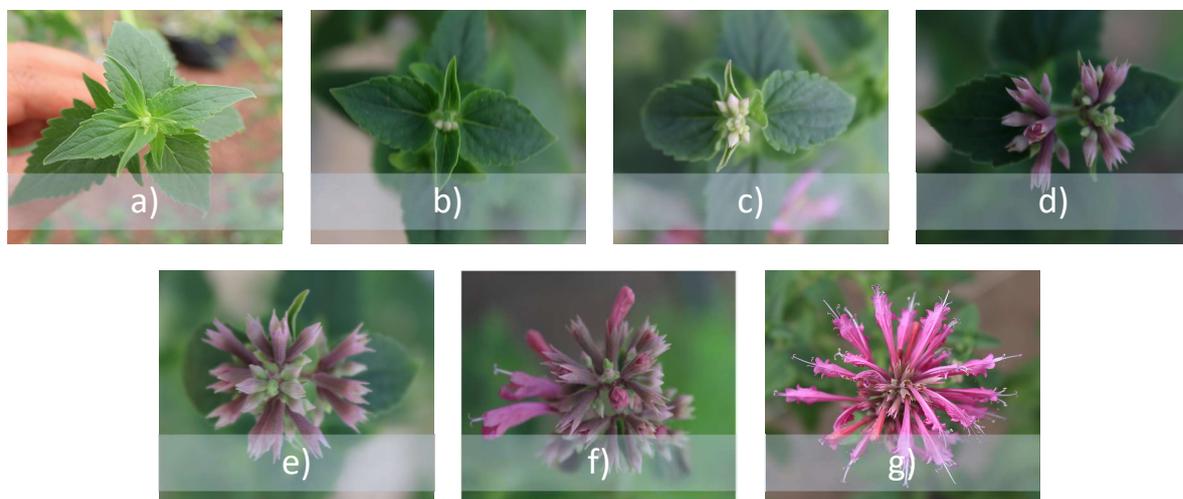


Figura 4 Registro fotográfico del crecimiento de inflorescencias de A. mexicana ssp. mexicana. a) Aparición del primer primordio floral, b) día 4, c) día 7, d) día 10, e) día 13, f) día 15, g) día 17.

Los resultados obtenidos en este ensayo experimental, muestran resultados similares a los reportados en otras especies de la misma familia como lavanda (Guerrero-Lagunes, 2010), donde, tras aplicarse diferentes dosis de fertilización nitrogenada, no se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos en la primera cosecha. De acuerdo con los mismos autores es a partir del segundo y tercer año de cultivo, cuando se aprecia la influencia del nitrógeno tanto en flores como en tallos y hojas.

Aunque ha sido ampliamente documentado el efecto del N sobre el rendimiento de diversas plantas aromáticas, entre las que destaca la albahaca, con un periodo de producción de aproximadamente 110 días; en otro estudio realizado por Taie *et al.* (2010) se apreciaron cambios importantes en el rendimiento hasta la segunda cosecha. En este estudio, para la primera, el rendimiento medio de materia fresca y seca de 13.4 y 2.8 g. por planta y para la segunda cosecha de 34.0 y 6.7 g. por planta respectivamente, es decir, que a partir de la segunda cosecha, se puede duplicar o triplicar el rendimiento en todos los valores de la planta (Taie *et al.*, 2010).

En otras especies como *Salvia officinalis*, se reportaron rendimientos de hojas y tallos en peso fresco y seco, considerados bajos durante el primer año de cosecha; pero que se duplican y triplican a partir del segundo año; mostrando además, que el rendimiento va en decremento a partir del tercer y hasta el sexto año de cultivo (More *et al.*, 2009).

Zambrano *et al.*, (2013), realizaron un ensayo aplicando dos dosis de N (50 y 100 kg ha⁻¹) a la especie *Lippia Alba* y *Lippia organoides*, encontrando efectos heterogéneos, pues mientras con la primera especie no se observaron efectos significativos en el rendimiento de planta, con la segunda especie se encontró el mayor rendimiento de peso seco de planta con la dosis de 100 kg ha⁻¹. Este efecto es el resultado del proceso de adaptación que llevan a cabo ambas especies, pues son recolectadas en regiones climáticas diferentes y luego introducidas al cultivo,

bajo las mismas condiciones agroclimáticas, por lo tanto, las diferencias pueden deberse a que, mientras *L. origanoides* se cultiva en condiciones similares a las de su hábitat natural, *L. alba* es sometida a condiciones distintas a las de su centro de origen y requiere por lo tanto un periodo de adaptación.

En especies más cercanas a la subespecie *mexicana*, como *Melissa officinalis*, se ha encontrado que mientras en el primer año de cultivo, sólo se consiguen de 3-4 t ha⁻¹ de planta fresca, a partir del segundo año el rendimiento puede duplicarse o triplicarse (Fanlo 2009). La misma situación puede identificarse en el caso de la subespecie *Agastache rugosa*, pues tampoco se encontraron diferencias significativas en rendimiento de materia seca y flores durante el primer año de cultivo con 18 y 24 kg ha⁻¹.

Si bien, el efecto positivo del N sobre el rendimiento de plantas aromáticas como romero (Martinetti, 2006; Puttanna *et al.* 2010) patchouli (Singh y Rao, 2009), albahaca (Sifola & Barbieri, 2006; Taie y Salama, 2010), melisa (Abbaszadeh *et al.*, 2009), hinojo (Hellal and Mahfouz, 2011), perifolio (El Gendy *et al.*, 2015) ha sido ampliamente demostrados, resulta indispensable señalar que en estos casos, las plantas se han cultivado bajo condiciones similares a las de su centro de origen, o bien estuvieron durante un periodo considerable en las condiciones agroclimáticas de cultivo, previo a la experimentación.

Estos estudios sugieren que las especies aromáticas que son cultivadas bajo condiciones agroclimáticas diferentes a las de su lugar de origen, requieren de un periodo de adaptación que puede durar uno o dos años dependiendo de la especie, tras este periodo, se pueden conseguir efectos positivos en el rendimiento de todos los valores de la planta, ya que sólo se encuentran diferencias estadísticamente significativas, a partir de la segunda cosecha o periodo anual. En este sentido debe considerarse que la especie estudiada en la presente investigación, es una planta silvestre, que ha sido sometida a condiciones agroclimáticas diferentes a las de su estado natural, siendo las de mayor importancia la altitud y la temperatura; ya que

se cultivó a una altitud de 2200 msnm y con temperaturas medias máximas de 38.95 °C, mínimas de 11.2 °C; mientras que en su hábitat natural se encuentra a 2920 msnm con temperaturas medias máximas de 33 ° C y mínimas de 13 ° C, en el mes más caluroso (mayo).

Al respecto, varios autores (Dudareva and Negre, 2005; Franz, 2010; Isman *et al.*, 2011) sugieren, que en poblaciones silvestres se presenta gran heterogeneidad en cuanto a los valores de rendimiento, ya que las condiciones agroclimáticas son poco controladas en el hábitat, requiriendo por lo tanto condiciones de nutrición estrictas y condiciones agroclimáticas similares a las del centro de origen, para obtener resultados positivos, o bien un periodo de adaptación, como se ha reportado en las especies descritas anteriormente.

2.4 Conclusiones

No se encontraron diferencias estadísticas entre las diferentes dosis de fertilización nitrogenada, en ninguna de las variables medidas. La literatura consultada sugiere que este resultado se debe a que la especie estudiada fue sometida a condiciones agroclimáticas de temperatura, altitud y humedad relativa, diferentes a las de su hábitat silvestre y requiere, por lo tanto, un periodo de adaptación de al menos un ciclo vegetativo completo. Se requiere generar más información experimental para determinar la influencia del N sobre los valores de rendimiento de la especie bajo estudio.

El rendimiento de materia seca para esta especie es del 36.4 %, presenta un periodo promedio de floración de 25.55 ± 1.57 días, que inicia a los 77 días después del trasplante. El presente estudio, es el primero para el cultivo de esta especie.

Capítulo III. Aportación a la Morfoanatomía, viabilidad y germinación de semillas silvestres de *Agastache mexicana ssp. mexicana*

3.1 Introducción

Se les conoce como *Agastache* a un grupo de 22 especies y subespecies de la familia *Lamiaceae*, originarias principalmente en México y Estados Unidos; entre las características que las diferencian destacan el color de las inflorescencias (rosa, morado, blanco y amarillo) y el quimiotipo de su aceite esencial (Zielinska y Matkowski 2014).

Algunas especies, principalmente nativas de Estados Unidos y Asia, se cultivan con múltiples propósitos: como ornamentales por la belleza de sus inflorescencias, como planta seca para tisanas y para la extracción de su aceite esencial (Omidbaigi *et al.*, 2008). Este último, es el propósito de mayor relevancia económica, ya que los componentes activos presentes en este aceite esencial muestran efectos farmacéuticos de diversa índole: antidepresivo, espasmolítico, antiinflamatorio y anticonceptivo (González-Ramírez *et al.*, 2012; Hernández-Abreu *et al.*, 2013; Verano *et al.*, 2013; Estrada-Reyes *et al.*, 2014; González-Trujano *et al.*, 2015).

Agastache mexicana ssp. mexicana es una subespecie nativa de México conocida comúnmente como toronjil morado; además de su importancia farmacéutica, tiene gran relevancia cultural en el país, ya que se utiliza desde la época prehispánica en diversos padecimientos, como antiespasmódico, para el tratamiento de enfermedades del corazón y para el “susto”, “enfriamiento” y “nervios”; en comunidades indígenas (Estrada-Reyes *et al.*, 2014). Aunque se comercializa ampliamente como planta seca, alrededor del 85% proviene de recolecta de sus poblaciones silvestres, ya que no se cultiva a escala comercial (Juárez-Rosete *et al.*, 2013; Santillán-Ramírez *et al.*, 2008).

Pese a ello, la especie no ha sido suficientemente estudiado en lo que respecta a su reproducción y cultivo, por lo que falta por conocer sus características morfológicas, anatómicas ni los procesos para su reproducción mediante semilla. En este sentido, la presente investigación tiene como objetivo realizar la

caracterización morfoanatómica de semillas de *A mexicana* ssp. *Mexicana*, determinar su viabilidad, germinación y vigor para con ello, contribuir al conocimiento de la especie.

3.2 Materiales y método

Las pruebas de germinación y viabilidad se realizaron en el Laboratorio de Fisiología y Tecnología de Cultivos de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

3.2.1 Recolecta de semillas

Las semillas se obtuvieron a partir de una colecta dirigida de inflorescencias silvestres, el 26 de diciembre del 2015, en la zona montañosa de Santa Ana Milpa Alta, Ciudad de México, ubicada a una altitud de 2960 msnm; donde predomina un clima templado húmedo con vegetación de bosque de pino-encino (ws). Las semillas fueron almacenadas en sobres de papel a temperatura ambiente y en oscuridad hasta su uso.

3.2.2 Caracterización morfoanatómica de las semillas.

Para la caracterización morfoanatómica de las semillas, se realizaron secciones de forma longitudinal y transversal para ser observadas bajo microscopio óptico y se tomaron fotografías digitales para la documentación. Para la descripción se utilizó la terminología propuesta por Niembro (1989). El peso de semillas se realizó de acuerdo a las recomendaciones del ISTA (1999) en una balanza analítica.

3.2.3 Viabilidad

Para conocer la viabilidad, las semillas se mantuvieron en remojo durante 24 horas, se les retiraron la testa y el tegmen para permitir la tinción, debido a la impermeabilidad de éstas estructuras. Fueron sumergidas en una solución de tetrazolio al 1% y se mantuvieron durante tres horas a 30°C, en estufa (ISTA, 1999). Las semillas fueron analizadas bajo microscopio óptico y se cuantificaron como

viables las que presentaron tinción completa en el embrión, y como no viables las que presentaron tinción incompleta o pálida.

3.2.4 Germinación

Para realizar la prueba de germinación, las semillas fueron colocadas en cajas plásticas con algodón estéril y fueron humedecidas con agua destilada cada dos días. Las cajas se mantuvieron durante 28 días en una estufa en oscuridad, a 25°C (ISTA, 1999). Debido al tamaño de la semilla y la radícula, se observaron cada 48 horas bajo microscopio óptico y se consideraron como germinadas las que emitieron radícula de 1 mm.

La germinación fue graficada en una curva típica de germinación acumulada y germinación media diaria. Adicionalmente, se calcularon los siguientes índices:

- a) Uniformidad germinativa. Con esta variable se obtienen la magnitud entre los tiempos de respuesta de la germinación. Para describirla se utilizó:
- b) Periodo germinativo: diferencia entre el inicio de la germinación y el final de esta (al 100%).
- c) Valor germinativo o índice de Maguire: Se refiere a la máxima germinación media diaria y es un parámetro que describe la calidad de germinación. Para su cálculo se utilizó el valor germinativo de Maguire (1962) mediante la fórmula:

$$IVG=P1/T1+P2/T2+P3/T3...Pn/Tn$$

Dónde: P1, P2, P3..., Pn = número de plántulas normales, germinadas y completas en el primer, segundo, tercer y último conteo de la evaluación.

T1, T2, T3,..., Tn = tiempo en días para cada germinación.

3.2.5 Análisis de datos

Los resultados de micrometría y viabilidad de semillas, se analizaron mediante pruebas estadísticas descriptivas en el software JMP V 12.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Caracterización morfoanatómica de la semilla

Cada flor contiene cuatro lóculos, cada uno con cuatro semillas; éstas se desarrollan en el interior de frutos aquenios, presentan una forma obovada, se clasifican en el grupo de tamaño pequeño (de 1.0 a 5.0 mm de largo); el peso de 1000 semillas fue de 373 mg. Se encuentran desnudas y presentan una cubierta seminal con coloración de castaño oscuro a negra, con reflejabilidad mate, de consistencia papirácea, superficie corrugada; sin ala (Figura 5). El hilo es conspicuo, en posición basal, de forma lineal, con coloración negra. El micrópilo es conspicuo. El endospermo es abundante con forma uniforme, coloración blanquecina y consistencia carnosa. Se encuentra rodeando completamente el embrión.

Las semillas no presentan gametofito femenino y presentan un embrión basal ancho, de coloración blanquecina, con dos cotiledones de apariencia gruesa y carnosa, con forma ovada, superficie lisa, margen entero, ápice apiculado, de base redondeada. Se encuentran separados entre sí y son de igual tamaño, con vernación conduplicada. La radícula se encuentra totalmente saliente, es inferior, presenta una superficie glabra y se encuentra dirigida hacía el hilo.

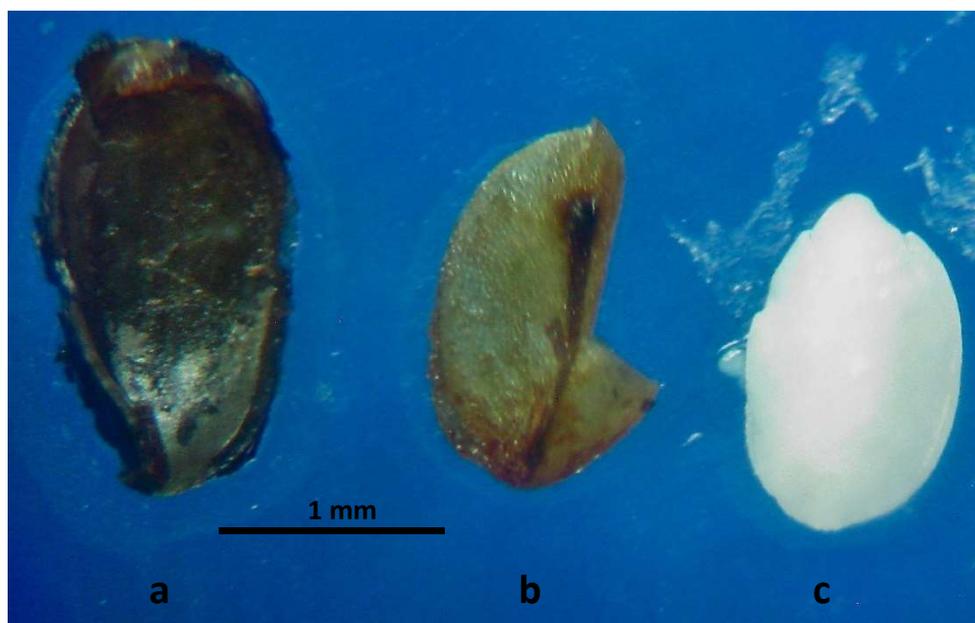


Figura 5 Testa (a), tegmen (b) y semilla desnuda (c) de Agastache mexicana ssp. mexicana.

3.3.2 Prueba de Viabilidad

Tanto la testa como el tegmen de las semillas son impermeables, por lo que esta semilla presenta dormancia exógena, del tipo física; por ende, estas estructuras fueron retiradas para el análisis de viabilidad.

De acuerdo con el análisis estadístico se encontró un porcentaje promedio de semillas viables del 71 ± 26.80 y un porcentaje promedio de semillas no viables del 29 ± 26.8 .

3.3.3 Germinación

3.3.3.1 *Test de germinación*

La germinación de las semillas comenzó el día seis; el día siete se presentó el primer incremento constante de la germinación, alcanzando un 12 % acumulada. Es hasta el día 11, donde se reanuda la germinación alcanzando el 20 % de germinación acumulada y a partir del día 13, es cuando se mantiene un incremento constante que alcanza el 39 % acumulado hasta término de la evaluación.

En lo que respecta a la germinación media diaria, se observaron valores constantes y por debajo del 1 % de germinación, a excepción del día siete, donde se aprecia la máxima media diaria de germinación de 1.57 % (Figura 6).

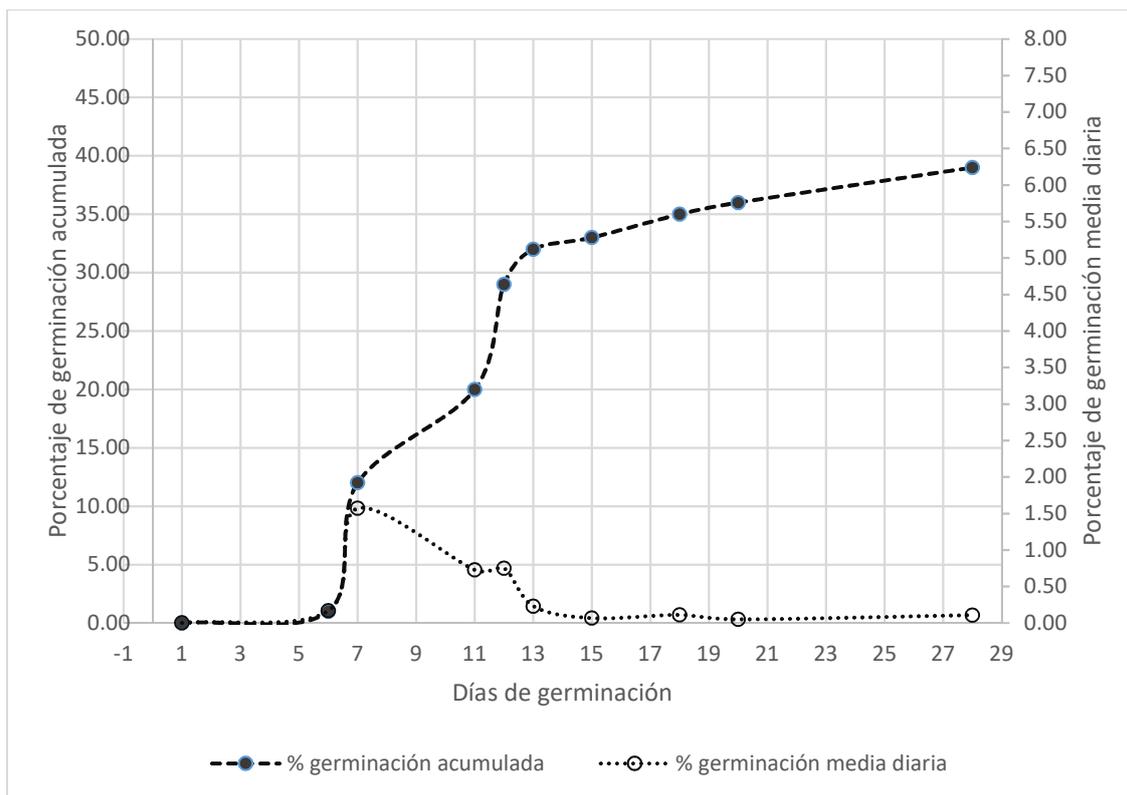


Figura 6 Curva de germinación acumulada y germinación media diaria de *A. mexicana ssp. mexicana*

El periodo germinativo fue de 22 días, este valor hace referencia a la magnitud de las diferencias en el tiempo de germinación. En lo referente al **valor** germinativo o índice de Maguire, se encontró que fue de 0.42; es decir la máxima germinación media diaria, que es un parámetro que describe la calidad de germinación.

3.4 Discusión

Aparentemente, el presente estudio representa el primer reporte morfométrico de las semillas de esta especie endémica de México, por lo que proporciona información puntual para el conocimiento, reproducción y conservación de la especie. Ensayos de este tipo en plantas aromáticas y medicinales, han adquirido gran importancia en el mundo, no sólo por su aportación al conocimiento biológico, sino también, por el valor económico de estas especies, que proporcionan

información valiosa para su identificación en la industria de los fitomedicamentos y aceites esenciales, lo que asegura su autenticidad y la de sus componentes químicos (Di Sapio *et al.*, 2012).

Su utilidad se extiende también a otros campos de la ciencia, como lo señala Núñez-Colín *et al.* (2011) : “La morfometría de las semillas resulta útil para el estudio de la variabilidad biológica, que es el resultado de la adaptación de la especie a las condiciones medioambientales”.

A. mexicana ssp. *mexicana*, comparte características similares de micrometría, coloración, peso, forma y consistencia con especies de la misma familia, como *Salvia hispánica* L. (di Sapio *et al.*, 2012) y *Rosmarinus officinalis* L. (Mosquero *et al.*, 2004) y características casi idénticas con *Melisa officinalis* L (Winiarczyk *et al.*, 2016).

En lo que respecta al porcentaje de viabilidad de las semillas estudiadas ($71 \pm 26.80\%$), los valores cuantificados se encuentra por encima de los de otras especies como *Calendula officinalis*, que presentó una proporción del 55 % de viabilidad en semillas sin tratamientos (Victoria, 2006) y en rangos similares a los de *Melissa officinallis* L, para los que se reportaron proporciones del 64 al 87 % de viabilidad (Winiarczyk *et al.*, 2016).

Tanto los porcentajes de viabilidad como su variabilidad son elevados en esta especie; ambas características se consideran comunes en especies silvestres, particularmente en la familia *Lamiaceae* para la cual se han reportado valores altos de variabilidad de parámetros de anatomía y fisiología en poblaciones de semillas, como también ocurre en las especies aromáticas: lavanda, orégano y tomillo (Coelho *et al.*, 2012)

Si bien, las características morfológicas de las semillas son normales y la viabilidad elevada; las semillas presentaron baja capacidad y valor germinativo durante el periodo evaluado. De acuerdo con Serri *et al.* (2011), los valores de germinación total menores al 50%, corresponden a semillas durmientes; lo cual coincide con los

resultados de este estudio, ya que la especie posee una testa y tegmen impermeables, es decir que las semillas presentan dormancia física.

Este comportamiento, se presenta en especies cercanas como *Lepechinia chamaedryoides*, una especie nativa de Chile, perteneciente a la misma familia; con la que sólo se consiguen porcentajes de germinación acumulada del 3 y 2 % aún con escarificación química (Serri *et al.*, 2011). En igual situación, las subespecies *Lavandula Stoechas*, *Luisieri* y *sampaiana*, presentan una capacidad germinativa del 50 y 26.7 % respectivamente; lo cual sólo se pudo incrementar, eliminando la testa a través de escarificación química, con lo que se logró conseguir el 83 % de germinación acumulada (Cabello *et al.*, 1998).

Las semillas con dormición física presentan baja capacidad germinativa, ya que las células de la testa y/o tegmen se encuentran compactadas y apretadas, lo que les proporciona impermeabilidad, obstruyendo el paso del agua hacia el embrión y la activación del proceso de germinación (Serri *et al.*, 2011); en esta familia de plantas, en general, la testa presenta una capa de células esclereidas empalizada (Martín-Mosquero 2006). La impermeabilidad les proporciona alta tolerancia al secado y por ende un bajo contenido de humedad que les permite mantenerse viables en condiciones ambientales extremas y de larga duración (Camacho-Morfín, 2011). En este sentido y de acuerdo con la revisión bibliográfica, el origen geográfico de la especie está relacionado con el tipo de dormancia de las semillas; siendo especies nativas y silvestres expuestas a condiciones extremas, las que pudieran presentar este comportamiento.

Entre la familia Lamiaceae, un gran número de especies, se comportan de esta manera; en tomillo y satureja, se ha documentado que las condiciones ambientales particulares del lugar de origen, limitan la germinación de las semillas, como una estrategia para su sobrevivencia (Thanos y Doussi 1995). En tomillo endémico de Portugal, un ensayo realizado por Coelho *et al.* (2012), demuestra que las condiciones geográficas inciden de forma determinante en el valor germinativo, encontrando diferencias significativas entre regiones: porcentajes del 30 ± 9.3 en

Ohio, 48 ± 5.66 en Túnez y 60 ± 2.83 en Algezira, bajo las mismas condiciones de germinación.

De acuerdo con Baskin y Baskin (1985), entre la dormancia exógena, la física es considerada uno de los tipos más evolucionados de dormición, ya que su ocurrencia está limitada a unas cuantas familias de plantas como la Lamiaceae, y se presenta sólo en angiospermas, siendo la mayoría dicotiledóneas. Es pues, una estrategia adaptativa de las plantas, ante las condiciones del medio, para mantener una reserva de semillas en el suelo e incrementar su probabilidad de sobrevivencia (Di Sapio *et al.*, 2012; Mosquero *et al.*, 2004).

3.5 Conclusiones

- a) Las características morfométricas de las semillas de *A. mexicana* ssp. *mexicana* son similares a las de especies de la misma familia como salvia, romero y melisa.
- b) *A. mexicana* ssp. *mexicana* presentó proporciones de viabilidad y variabilidad elevadas (71 ± 26.80), propios de especies silvestres de la familia Lamiaceae.
- c) Los valores germinativos fueron bajos: la capacidad germinativa fue del 39 % y el valor germinativo o índice de Maguire de 0.41 %, lo cual obedece a la dormancia física que presentan estas semillas, lo que se atribuye a que las células de la testa y/o tegmen se encuentran compactadas, proporcionando impermeabilidad y obstruyendo el paso del agua hacia el embrión y la activación del proceso de germinación.
- d) Los resultados obtenidos, son específicos de las especies muestreadas en las localidades en el sur del Valle de la Ciudad de México y no deben generalizarse para la especie y subespecie en el país, ya que ésta se encuentra distribuida en condiciones geográficas contrastantes a lo largo del país.

4. Bibliografía

Abbaszadeh B.; Farahani H.A.; Valadabadi S. A. and Darvishi H. H. (2009). 'Nitrogen fertilizer influence on quantity and quality values of balm (*Melissa officinalis* L.)', *Journal of Agricultural Extension and Rural Development*, (1), pp. 31–33.

Alzugaray, C.; Carnevale, N.; Salinas, A. and Pioli, R. (2006). *Calidad de semillas de Quebracho*. 13, pp. 26–35.

Arimura, G. I., Matsui, K. and Takabayashi, J. (2009). 'Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: Proximate factors and their ultimate functions.', *Plant and Cell Physiology*, 50(5), pp. 911–923. doi: 10.1093/pcp/pcp030.

Arizaga, S. (2007). *Estudio y Colección Viva de Plantas Medicinales Nativas y Formación de un Banco de Germoplasma del Estado de Michoacán INFORME FINAL* Dr. Santiago Arizaga. Morelia.

Ávalos-García, A. and Pérez-Urrutia, E. (2009). 'Metabolismo secundario de plantas', *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), pp. 119–145. Available at: <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/viewFile/798/814>.

Azizi, A., Yan, F. and Honermeier, B. (2009). 'Herbage yield, essential oil content and composition of three oregano (*Origanum vulgare* L.) populations as affected by soil moisture regimes and nitrogen supply', *Industrial Crops and Products*, 29, pp. 554–561. doi: 10.1016/j.indcrop.2008.11.001.

Baskin, J. M. and Baskin, C. C. (1985). 'The Annual Dormancy Cycle in Buried Weed Seeds: A Continuum', *BioScience*, 35(8), pp. 492–498. doi: 10.2307/1309817.

Besnier, R.F. (1989). *Semillas: biología y tecnología*. Ediciones Mundi- Prensa, Madrid. 489 p.

Biblioteca Digital Medicina Tradicional Mexicana. BDMTM (2015). Retrieved from http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/flora2.php?l=4&t=Toronjil&po=&id=6319&clave_region=18. Consultada Abril del 2015

Bos, R., Woerdenbag, H., Hendriks, H. and Scheffer, J. (1997). 'Composition of the essential oils from underground parts of *Valeriana officinalis* L. s.l. and several closely related taxa.', *Flavour and Fragrance Journal*, 12(5), pp. 359–370. Available at: %5C%5CRobsrsv-05%5Creferencemanager%5CArticles%5C7385.pdf.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, E. (2001). 'Production of plant secondary metabolites: A historical perspective', *Plant Science*, 161(5), pp. 839–851. doi: 10.1016/S0168-9452(01)00490-3.

Cabello, M. L., Ruíz, T. and Devesa, J. A. (1998). 'Ensayos de germinación en endemismos Ibéricos', *Acta Botánica Malacitana*, 23, pp. 59–69.

Camacho-Morfin, F. (2011). *Dormición de semillas, causas y tratamientos*. Trillas. Ciudad de México.

Cantrell, C. L., Franzblau, S. G. and Fischer, N. H. (2001). 'Antimycobacterial plant terpenoids', *Planta Medica*, pp. 685–694. doi: 10.1055/s-2001-18365.

Chatzopoulou, P.S., Koutsos, T.V., Katsiotis, S. T. (2006). 'Study of nitrogen fertilization rate of fennel cultivars for essential oil yield and composition', *Journal of Vegetable Science*, (12), pp. 85–93.

Coelho, N., Gonçalves, S., González-Benito, M.A. and Romano, A. (2012). 'Germination and cryopreservation tolerance of seeds from the rare aromatic species *Thymus lotocephalus*', *Scientia Horticulturae*, 145, pp. 84–86. doi: 10.1016/j.scienta.2012.07.031.

Damelash L., Tigabu M. and P. C. Odén. (2003). Enhancing germinability of *Schinus molle* L. seed from Ethiopia with specific gravity and techniques. *New forest*. (26) p.p 33-41

Di Sapia, O., Bueno, M., Busilacchi, H., Quiroga, M. and Severin, C. (2012). Caracterización Morfoanatómica de Hoja, Tallo, Fruto y Semilla de *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. Universidad de Santiago de Chile, Chile. 11 (3) p.p 249-268.

Domínguez-Vázquez, G. and Castro-Ramírez, A. (2002). Usos medicinales de la familia labiatae en Chiapas, México. *Etnobiología*. (2) p.p 19-31

Dordas, C. (2009). 'Foliar application of calcium and magnesium improves growth, yield, and essential oil yield of oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*)', *Industrial Crops and Products*, 29(2–3), pp. 599–608. doi: 10.1016/j.indcrop.2008.11.004.

Duarte, A., Naves, R., Santos, S., Seraphin, J. and Ferri. (2010). Genetic and Environmental Influence on Essential Oil Composition of *Eugenia dysenterica*, *J. Braz. Chem. Soc.* Available at: <http://www.scielo.br/pdf/jbchs/v21n8/08.pdf>.

Dudareva, N. and Negre, F. (2005). 'Practical applications of research into the regulation of plant volatile emission', *Current Opinion in Plant Biology*, 8(1), pp. 113–118. doi: 10.1016/j.pbi.2004.11.007.

El Gendy, A. G., El Gohary, A. E., Omer, E. A., Hendawy, S. F., Hussein, M. S., Petrova, V., & Stancheva, I. (2015). Effect of nitrogen and potassium fertilizer on herbage and oil yield of chervil plant (*anthriscuscerefolium* L.). *Industrial Crops & Products*, 69, 167-174. doi:10.1016/j.indcrop.2015.02.023

Estrada-Reyes, R., López-Rubalcava, C., Ferreyra-Cruz, O.A., Dorantes-Barrón, A.M., Heinze, G., Moreno Aguilar, J. and Martínez-Vázquez, M. (2014). 'Central nervous system effects and chemical composition of two subspecies of *Agastache mexicana*; An ethnomedicine of Mexico', *Journal of Ethnopharmacology*, 153(1), pp. 98–110. doi: 10.1016/j.jep.2013.12.057.

Evenari, M. (1984). 'Seed Physiology: Its History from antiquity to the beginning of the 20th century', *The Botanical Review*, 50(2), pp. 119–142. doi: 10.1007/BF02861090.

Fahlbusch, K.-G. (2003). 'Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry', in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, pp. 73–198. doi: 10.1002/14356007.

Fanlo, M., Melero, R., Moré, E. and Cristóbal, R. (2009). Cultivo de plantas aromáticas, medicinales y condimentarias en Cataluña. Centro Tecnológico Forestal

de Cataluña. Available at:
<http://apsb.ctfc.cat/docs/Cultivo%20de%20PAM%20en%20Cataluna%206%20anos%20de%20CDD.pdf>

Figueiredo, A., Barroso, J., Pedro, L. and Scheffer, J. (2008). 'Factors affecting secondary metabolite production in plants: Volatile components and essential oils', *Flavour and Fragrance Journal*, 23(4), pp. 213–226. doi: 10.1002/ffj.1875.

Franz, C. and Novak, J. (2010). *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Application*. 1st edn, Baser, K.H.C & Buchbauer, G. Taylor & Francis Group. 1st edn. Edited by K. Hüsnü Can Baser and G. Buchbauer. London.

Friedman, M., Henika, P. R. and Mandrell, R. E. (2002). 'Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*.' *Journal of food protection*, 65(10), pp. 1545–1560.

Ganjewala, D. and Luthra, R. (2009). 'Geranyl acetate esterase controls and regulates the level of geraniol in lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* nees ex steud.) mutant cv. GRL-1 leaves', *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 64(3–4), pp. 251–259.

Garcia, G., Garcia, A., Gibernau, M., Bighelli, A. and Tomi, F. (2017). 'Chemical compositions of essential oils of five introduced conifers in Corsica', *Natural Product Research*, 31(14), pp. 1697–1703. doi: 10.1080/14786419.2017.1285299.

Gattuso, S., Busilacchi, H., Severin, S., Gattuso, M., Giubileo, G. and Aguirre, A. (2004) 'Domesticación de especies vegetales nativas utilizadas como medicamentos fitoterópicos', *Revista Agromensajes*, 12, pp. 1–4.

Gerhezon, J. (1984) 'Changes in the levels of plants secondary metabolites under wáter and nutrient stress', *Rec. Adv. Phytochem*, (18), pp. 273-320

Gil, A.I., Miranda, D. (2005). 'Morfología de la flor y de la semilla de papaya (*Carica papaya* L.): variedad Maradol e híbrido Tainung-1', *Agronomía Colombiana*, 23(2), pp. 217–222.

Gómez-Calderón, H. A. (2010). Conocimiento tradicional en plantas Mexicanas en la Mixteca Poblana, Control. Colegio de Posgraduados, Campus Puebla. Available at:http://www.biblio.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/256/Sanchez_Borja_M_DC_Fitosanidad_2010.pdf?sequence=1.

González-Ramírez, A., González-Trujano, M., Pellicer, F. and López-Muñoz, F. (2012). 'Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of the *Agastache mexicana* extracts by using several experimental models in rodents.', *Journal of ethnopharmacology*, 142(3), pp. 700–5. doi: 10.1016/j.jep.2012.05.044.

González-Trujano, M., Ponce-Muñoz, H., Hidalgo-Figueroa, S., Navarrete-Vázquez, G. and Estrada-Soto, S. (2015). 'Depressant effects of *Agastache mexicana* methanol extract and one of major metabolites tilianin', *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8(3), pp. 185–190. doi: 10.1016/S1995-7645(14)60312-6.

González-Trujano, M., Ventura-Martínez, R., Chávez, M., Díaz-Reval, I. and Pellicer, F. (2012). 'Spasmolytic and antinociceptive activities of ursolic acid and acacetin identified in *Agastache mexicana*', *Planta Medica*, 78(8), pp. 793–799. doi: 10.1055/s-0031-1298416.

Guerrero-Lagunes y Ruíz P. (2012) El cultivo de plantas aromáticas: una alternativa agroindustrial para comunidades agrarias. Colegio de Posgraduados. México 72 p.

Guerrero-Lagunes, L. A. (2010) Efecto de la fertilización en la producción de lavanda (*Lavandula x intermedia* Emeric ex. Loisel. Var Grosso) y actividad biológica de su aceite esencial, Control. Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo. Available at:

http://www.biblio.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/256/Sanchez_Borja_M_DC_Fitosanidad_2010.pdf?sequence=1.

Guo, S., Geng, Z., Zhang, W., Liang, J., Wang, C., Deng, Z., and Du, S. (2016). 'The chemical composition of essential oils from *Cinnamomum camphora* and their insecticidal activity against the stored product pests', *International Journal of Molecular Sciences*, 17(11). doi: 10.3390/ijms17111836.

Hammer, K. A., Carson, C. F. and Riley, T. V. (2003). 'Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil', *Journal of Applied Microbiology*, 95(4), pp. 853–860. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02059.x.

Hassan, S. B., Gali-Muhtasib, H., Göransson, H. and Larsson, R. (2010). 'Alpha terpineol: A potential anticancer agent which acts through suppressing NF- κ B signalling', *Anticancer Research*, 30(6), pp. 1911–1919. doi: 30/6/1911 [pii].

Hellal, F. and Mahfouz, S. (2011). 'Partial substitution of mineral nitrogen fertilizer by bio-fertilizer on (*Anethum graveolens* L.) plant', *Agriculture and Biology Journal of North America*, 2(4), pp. 652–660. doi: 10.5251/abjna.2011.2.4.652.660.

Hernández-Abreu, O., Durán-Gómez, L., Best-Brown, R., Villalobos-Molina, R., Rivera-Leyva, J. and Estrada-Soto, S. (2011). 'Validated liquid chromatographic method and analysis of content of tilianin on several extracts obtained from *Agastache mexicana* and its correlation with vasorelaxant effect.', *Journal of ethnopharmacology*, 138(2), pp. 487–91. doi: 10.1016/j.jep.2011.09.041.

Hernández-Abreu, O., Castillo-España, P., León-Rivera, I., Ibarra-Barajas, M., Villalobos-Molina, R., González-Christen, J., Vergara-Galicia, J. and Estrada-Soto, S. (2009). 'Antihypertensive and vasorelaxant effects of tilianin isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening', *Biochemical Pharmacology*, 78(1), pp. 54–61. doi: 10.1016/j.bcp.2009.03.016.

Hernández-Abreu, O., Torres-Piedra, M., García-Jiménez, S., Ibarra-Barajas, M., Villalobos-Molina, R., Montes, S., Rembao, D. and Estrada-Soto, S. (2013). 'Dose-dependent antihypertensive determination and toxicological studies of tilianin isolated from *Agastache mexicana*', *Journal of Ethnopharmacology*, 146(1), pp. 187–191. doi: 10.1016/j.jep.2012.12.029.

Isman, M. B., Miresmailli, S. and MacHial, C. (2011). 'Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products', *Phytochemistry Reviews*, 10(2), pp. 197–204. doi: 10.1007/s11101-010-9170-4.

ISTA. (1999). ISTA Rules Full Issue, International Rules for Seed Testing. doi: 10.15258/istarules.2015.F.

Jabbari, R., Amini, M., Modares, A. and Agahi, K. (2011). 'Nitrogen and iron fertilization methods affecting essential oil and chemical composition of thyme (*Thymus vulgaris* L.) medical plant.', *Advances in Environmental Biology*, 5(2), pp. 433–438. Available at: <http://www.aensonline.com/aeb/2011/433-438.pdf>.

Jäger, W. (2010). 'Metabolism of Terpenoids in Animal Models and Humans', in Basler, K. H. C. and Buchbauer, G. (eds) *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications*. 1st edn. London, pp. 209–234.

Juárez, Z. N., Hernández, L.R., Bach, H., Sánchez-Arreola, E. and Bach, H. (2015). 'Antifungal activity of essential oils extracted from *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana* and *Porophyllum linaria* against post-harvest pathogens', *Industrial Crops and Products*, 74, pp. 178–182. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.04.058.

Juárez-Rosete, C. R. (2010). *Fertilización orgánica e inorgánica en la producción y calidad de aceites esenciales en manzanilla, menta y tomillo*. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

Juárez-Rosete, C. R., Aguilar-Castillo, J.A, Juárez-Rosete, M.E., Bugarín-Montoya, R., Juárez-López, P. and Cruz-Crespo, E. (2013). 'Herbs and Medicinal Plants in Mexico: Tradition &', *Bio Ciencias*, 2(3), pp. 119–129.

Kaya, A., Demirci, B. and Baser, K. H. C. (2001). 'The composition of the essential oil of *Stachys iberica* subsp. *Stenostachya* growing in Turkey', *Chemistry of Natural Compounds*, 37(4), pp. 326–328. doi: 10.1023/A:1013762200024.

Koeduka, T., Fridman, E., Gang, D.R., Vassão, D.G., Jackson, B.L., Kish, C.M., Orlova, I., Spassova, S.M., Lewis, N.G., Noel, J.P., Baiga, T.J., Dudareva, N. and Pichersky, E. (2006). 'Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(26), pp. 10128–10133. doi: 10.1073/pnas.0603732103.

Kubeczka, K. H. (2010). 'History and sources of essential oil research', in K. Hüsni Can Baser & G. Buchbauer, E. (ed.) Handbook of Essential Oils - Science, Technology and Applications. Baser, K.H. London, pp. 3–38.

Lubbe, A. and Verpoorte, R. (2011). 'Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials', *Industrial Crops and Products*, 34(1), pp. 785–801. doi: 10.1016/j.indcrop.2011.01.019.

Maffei, M. E. (2010). 'Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles', *South African Journal of Botany*, 76(4), pp. 612–631. doi: 10.1016/j.sajb.2010.03.003.

Maguire, J. D. (1962). Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergences and vigor. *Crop Sci.* 2:176-177

Mahdian, F., Mahboubi, M., Rahimi, E. and Moslehi-Shad, M. (2017). 'Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Echinophora platyloba* essential oil', *Infectio*, 21(3). doi: 10.22354/in.v21i3.675.

Martin A. C. y W. D. Barkley. (1961). Seed identification manual, University California Press E. U. 221 pp.

Martinetti, L., Quattrini, E., Bononi, M. and Tateo, F. (2006). 'Effect of the mineral fertilization on the yield and the oil content of two cultivars of rosemary', in *Acta Horticulturae*.

Martín-Mosquero, M.A., Rodríguez, R.J. and Pastor-Díaz, J.E. (2004). 'Observaciones morfológicas y anatómicas en núculas de *Melissa L* (Lamiaceae) en el Suroeste de España', *Lagascalía*, 24, pp. 31–38.

Martín-Mosquero, M.A., Rodríguez, R.J. and Pastor-Díaz, J.E. (2006). 'Estudio de las núculas de "Satureja" (Lamiaceae) en el suroeste de España', *Lazaroa*, 27, pp.13-20.

Molina-Hernández, M., Téllez-Alcántara, P. and Martínez, E. (2000). 'Agastache mexicana may produce anxiogenic-like actions in the male rat.', *Phytotherapy* :

international journal of phytotherapy and phytopharmacology, 7(3), pp. 199–203. doi: 10.1016/S0944-7113(00)80004-5.

More, E., Fanlo, M. and Merlero, R. (2009). Cultivo de plantas medicinales y condimentarias en Cataluña. Available at: <http://apsb.ctfc.cat/docs/Cultivo de PAM en Cataluna 6 anos de CDD.pdf>.

Niembro R. A. (1989). Semillas de árboles y arbustos, Ontogenia y estructura. Limusa México.

NIST-MS, versión 2.0, 2010 <https://webbook.nist.gov/chemistry/> Consultado Abril 2017

Núñez-Colín, C.A., Serrato-Cruz, M.A., Santos-Cortés, M.T., Luna-Morales, C., Martínez-Solís, J. and Cuevas-Sánchez, J.A. (2011). 'Caracterización de Tagetes filifolia del centro-sur de México por morfometría de los aquenios', Revista Mexicana de Biodiversidad, 82(2), pp. 539–549.

Omidbaigi, R., Kabudani, M. and Khoorang, M. (2008). 'Nitrogen Fertilizer Affecting Herb Yield, Essential Oil Content and Compositions of Agastache foeniculum Purch', Journal of Essential Oil Bearing Plants, 11(3), pp. 261–266. doi: 10.1080/0972060X.2008.10643628.

Pichersky, E. and Gershenzon, J. (2002). 'The formation and function of plant volatiles: Perfumes for pollinator attraction and defense', Current Opinion in Plant Biology, 5(3), pp. 237–243. doi: 10.1016/S1369-5266(02)00251-0.

Prasad, A., Kumar, S., Khaliq, A. and Pandey, A. (2011). 'Heavy metals and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi can alter the yield and chemical composition of volatile oil of sweet basil (Ocimum basilicum L.)', Biology and Fertility of Soils, 47, pp. 853–861. doi: 10.1007/s00374-011-0590-0.

Puttanna, K., Prakasa- Rao, E.V.S., Singh, R. and Ramesh, S. (2010). 'Influence of Nitrogen and Potassium Fertilization on Yield and Quality of Rosemary in Relation to Harvest Number', Communications in Soil Science and Plant Analysis, 41(919661628), pp. 190–198. doi: 10.1080/00103620903429984.

- Qi-He, Y., Xiao, W., Xian-Lu, Z., Wan-Hui, Y., Xiao-Juan, Y., Wang, Z.M. and Yun-Sheng, J. (2008). 'Seed biology and germination ecophysiology of *Camellia nitidissima*', *Forest Ecology and Management*, 255(1), pp. 113–118. doi: 10.1016/j.foreco.2007.08.028.
- Quintans-Júnior, L., Moreira, J.C., Pasquali, M.A., Rabie, S.M., Pires, A.S., Schröder, R., Rabelom T.K., Santos, J.P., Lima, P.S., Cavalcanti, S.C., Araújo, A.A., Quintans, J.S. and Gelain, D.P. (2013). 'Antinociceptive Activity and Redox Profile of the Monoterpenes (+)-Camphene, p-Cymene, and Geranyl Acetate in Experimental Models.', *ISRN toxicology*, 2013, p. 459530. doi: 10.1155/2013/459530.
- Rajendran, M. P., Pallaiyan, B. B. and Selvaraj, N. (2014). 'Chemical composition, antibacterial and antioxidant profile of essential oil from *Murraya koenigii* (L.) leaves.', *Avicenna journal of phytomedicine*, 4(3), pp. 200–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25050318>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4104627>.
- Rajeswara-Rao, B.R., Rajput, D.K., Kothari, S.K., Sastry, K.P. and Singh, C.P. (2006). 'Cultivation of Medicinal and Aromatic Plants - Current Scenario', *Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants Resource Centre*, in, pp. 1–18.
- Rajjou, L., Duval, M., Gallardo, K., Catusse, J., Bally, J., Job, C. and Job, D. (2012). 'Seed Germination and Vigor', *Annual Review of Plant Biology*, 63(1), pp. 507–533. doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105550.
- Salomon, I. (2007). 'Effect of the internal and external factors on yield and qualitative-quantitative characteristics of chamomile essential oil', *Acta Horticulturae*, (749), pp. 45–64.
- Sangwan, N. S., Farooqi, A.H.A., Shabih, F. and Sangwan, R.S. (2001). 'Regulation of essential oil production in plants', *Plant Growth Regulation*, 34(1), pp. 3–21. doi: 10.1023/A:1013386921596.
- Santillán-Ramírez, M.A., López-Villafranco, M.E., Aguilar-Rodríguez, S., and Aguilar-Contreras, A. (2008). 'Estudio etnobotánico, arquitectura foliar y anatomía

vegetativa de *Agastache mexicana* ssp. *mexicana* y *A. mexicana* ssp. *xolocotziana*', *Revista mexicana de biodiversidad*, 79(2), pp. 513–524. Available at: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1870-34532008000200024&lng=en&nrm=iso&tlng=en.

Schmidt E. (2010). Production of Essential Oils en : *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Application*. (K. Hüsnü Can Baser & G. Buchbauer, Eds.) Baser, K.H.C & Buchbauer, G. Taylor & Francis Group (1st ed.). London. Pág: 83-120

Schubert, F., Pålsson, K., Santangelo, E. and Borg-Karlson, A.K. (2017). 'Sulfate turpentine: a resource of tick repellent compounds', *Experimental and Applied Acarology*, 72(3), pp. 291–302. doi: 10.1007/s10493-017-0145-7.

Sell, C. (2010). 'Chemistry of essential oils', in *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications*, pp. 121–150.

SEMARNAT (1993)
http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/.../NOM_059_SEMARNAT_1993

SEMARNAT 2010 NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. <https://www.gob.mx/profepa/documentos/norma-oficial-mexicana-nom-059-semarnat-2010>

Serri, H., Urbina, A., Cabrera, A., Millán, T., Pastene, E. and Rubilar, J. (2011). 'Propagación y Descripción Morfo-Anatómica de *Salvia Chilena* (*Lepechinia chamaedryoides*)', *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(6), pp. 507–524.

Sifola, M. I. and Barbieri, G. (2006). 'Growth, yield and essential oil content of three cultivars of basil grown under different levels of nitrogen in the field', *Scientia Horticulturae*, 108(4), pp. 408–413. doi: 10.1016/j.scienta.2006.02.002.

Silvertown, J. (1999). 'Seed ecology, dormancy, and germination: a modern synthesis from Baskin and Baskin', *American Journal of Botany*, 86(6), pp. 903–905. doi: 10.2307/2656711.

Singh, M. and Ganesha Rao, R. S. (2009). 'Influence of sources and doses of N and K on herbage, oil yield and nutrient uptake of patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] in semi-arid tropics', *Industrial Crops and Products*. doi: 10.1016/j.indcrop.2008.05.005.

Singh, M., Khan, M. M. a. and Naeem, M. (2014). 'Effect of nitrogen on growth, nutrient assimilation, essential oil content, yield and quality attributes in *Zingiber officinale* Rosc.', *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, pp. 2–9. doi: 10.1016/j.jssas.2014.11.002.

Starmans, D. a. J. and Nijhuis, H. H. (1996). 'Extraction of secondary metabolites from plant material: A review', *Trends in Food Science & Technology*, 7(6), pp. 191–197. doi: 10.1016/0924-2244(96)10020-0.

Steiner, A.A. 1961. A universal method for preparing nutrient solution of a certain desired composition. *Plant Soil* 15: 134- 154.

Taie H.A.A., Salama Z.A-E.R., R. S. (2010). 'Potential activity of basil plants as a source of antioxidants and anticancer agents as affected by organic and bio-organic fertilization', *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj.*, 38(1), pp. 119–127.

Thanos, C. A. and Doussi, M. A. (1995). 'Ecophysiology of seed germination in endemic labiates of Creete', *Israel Journal of Plant Sciences*, 43(April), pp. 227–237. doi: 10.1080/07929978.1995.10676607.

Torres-Martínez, R., Bello-González, M.A., Molina-Torres, J., Ramírez-Chávez, E., García-Rodríguez, Y., Fulgencio-Negrete, R., García-Hernández, A., López-Gómez, R., Martínez-Pacheco, M.M., Lara-Chávez, B.N. and Salgado-Garciglia, R. (2013). 'Effect of fertilization on growth and the content of volatile compounds of *Satureja macrostema* (Benth) Briq .', *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 5(21), pp. 122–134.

Tripathi, A. K., Upadhyay, S., Bhuiyan, M. and Bhattacharya, P. R. (2009). 'A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management', *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 1(5), pp. 52–63. Available at: <http://www.academicjournals.org/jpp>.

University of Hertfordshire. (2015). PPDB: Pesticide Properties DataBase, A a Z Lista de Los Pesticidas Ingredientes Activos.

Usai, M., Foddai, M., Bernardini, A. F., Muselli, A., Costa, J. and Marchetti, M. (2010). 'Chemical composition and variation of the essential oil of wild sardinian *helichrysum italicum* G. Don subsp. *Microphyllum* (willd.) nym from vegetative period to post-blooming', *Journal of Essential Oil Research*, 22(5), pp. 373–380. doi: 10.1080/10412905.2010.9700350.

Verano, J., González-Trujano, M.E, Déciga-Campos, M., Ventura-Martínez, R. and Pellicer, F. (2013). 'Ursolic acid from *Agastache mexicana* aerial parts produces antinociceptive activity involving TRPV1 receptors, cGMP and a serotonergic synergism', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 110, pp. 255–264. doi: 10.1016/j.pbb.2013.07.020.

Victoria, T. J. A. (2006). 'Viabilidad en tetrazolio de semillas de caléndula y eneldo', *Acta Agronómica*, 55(1), pp. 31–41. Available at: http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/193/464.

Wang, S., Zhang, D., Hu., J., Jia, Q., Xu, W., Su, D., Song, H., Xu, Z., Cui, J., Zhou, M., Yang, J. and Xiao, J. (2017). 'A clinical and mechanistic study of topical borneol-induced analgesia', *EMBO Molecular Medicine*, 9(6), pp. 802–815. doi: 10.15252/emmm.201607300.

Winiarczyk, K., Seidler-Łożykowska, K., Gębura, J. and Bocianowski, J. (2016). 'Vitality and germination of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) seeds', *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 89(April), pp. 156–162. doi: 10.5073/JABFQ.2016.089.019.

Zambrano, E. L. M., Buitrago L.A.F., Durán, L.A.G., Sánchez, M.S.O., Bonilla, C.R.C. (2013). 'Efecto de la fertilización nitrogenada en el rendimiento y la

composición de los aceites esenciales de especies y accesiones de *Lippia*', *Acta Agronómica*, 62(2), pp. 129-135.

Zellner, B. D. A., Presti, L.M., Barata L.E., Dugo, P., Dugo, G. and Mondello, L. (2006). 'Evaluation of leaf-derived extracts as an environmentally sustainable source of essential oils by using gas chromatography-mass spectrometry and enantioselective gas chromatography-olfactometry', *Analytical Chemistry*, 78(3), pp. 883–890. doi: 10.1021/ac051337s.

Zheljaskov, V. D., Craker, L. E. and Xing, B. (2006). 'Effects of Cd, Pb, and Cu on growth and essential oil contents in dill, peppermint, and basil', *Environmental and Experimental Botany*, 58(1–3), pp. 9–16. doi: 10.1016/j.envexpbot.2005.06.008.

Zielinska, S. and Matkowski, A. (2014). 'Phytochemistry and bioactivity of aromatic and medicinal plants from the genus *Agastache* (Lamiaceae)', *Phytochemistry Reviews*, pp. 391–416. doi: 10.1007/s11101-014-9349-1.