



ARTÍCULO / ARTICLE

## EFFECTO DE LA FERTILIZACIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN *Satureja macrostema* (Benth) Briq.

## EFFECT OF FERTILIZATION ON GROWTH AND THE CONTENT OF VOLATILE COMPOUNDS OF *Satureja macrostema* (Benth) Briq.

Rafael Torres-Martínez<sup>1</sup>, Miguel Ángel Bello-González<sup>2</sup>, Jorge Molina-Torres<sup>3</sup>, Enrique Ramírez-Chávez<sup>3</sup>, Yolanda García-Rodríguez<sup>4</sup>, Rodolfo Fulgencio-Negrete<sup>1</sup>, Alejandra García-Hernández<sup>1</sup>, Rodolfo López-Gómez<sup>1</sup>, Mauro Manuel Martínez-Pacheco<sup>1</sup>, Blanca Nieves Lara Chávez<sup>2</sup> y Rafael Salgado-García<sup>1</sup>

### RESUMEN

El nurié, *Satureja macrostema*, tiene gran importancia en la medicina tradicional mexicana. El presente trabajo evaluó el crecimiento y contenido de compuestos volátiles en la parte aérea de esta especie. El efecto de la fertilización mineral N - P - K se analizó en plantas micropropagadas (clones), cultivadas por 90 días en invernadero. Se aplicaron tres niveles de N - P - K mensualmente, de la siguiente manera: T2: 10 - 10 - 10; T3: 17 - 17 - 17 y T4: 20 - 20 - 20, además de un tratamiento testigo, T1: 1 g kg<sup>-1</sup> de sustrato. Las plantas del T4 tuvieron el mayor tamaño, con 50.33 cm de altura, 227.1 hojas por individuo, 9.52 cm<sup>2</sup> de área foliar y 24.94 g de peso fresco (4.72 g de peso seco). Los volátiles fueron examinados por cromatografía de gases y espectrometría de masas. Se registraron con más abundancia: pulegona, limoneno, linalol, mentona y verbenona. Se determinaron cantidades superiores a las del testigo conforme fueron más altas las concentraciones de fertilizante; así, se extrajeron para el T4: 45.95 µg g<sup>-1</sup> de pulegona, 2.17 µg g<sup>-1</sup> de limoneno, 10.79 µg g<sup>-1</sup> de linalol y 3.06 µg g<sup>-1</sup> de mentona, excepto la verbenona que fue más cuantiosa en el T1. La fertilización con T4 resultó positiva, tanto para el crecimiento de la planta, como para la abundancia de volátiles, en comparación con las plantas no fertilizadas.

**Palabras clave:** Compuestos volátiles, fertilización mineral, planta medicinal, *Satureja macrostema* (Benth) Briq, terpenos, variación.

### ABSTRACT

This study evaluated the growth and content of volatile compounds (terpenes) of the aerial parts (leaves and stems) of nurié, *Satureja macrostema*, a plant used in Mexican traditional medicine. The effect of mineral fertilization (N - P - K) was analyzed in micropropagated plants (clones), cultivated in a greenhouse during 90 days. Three levels of N - P - K were applied every month in the following way: T2: 10 - 10 - 10; T3: 17 - 17 - 17 and T4: 20 - 20 - 20, besides a control T1: 1 g kg<sup>-1</sup> of substrate. The plants fertilized with 20 - 20 - 20 (T4) attained the largest size, with 50.33 cm of height, 227.1 leaves per individual, 9.52 cm<sup>2</sup> of leaf area and 24.94 g of fresh weight (4.72 g of dry weight). The volatile compounds were examined by means of gas chromatography and mass spectrometry; the most abundant were pulegone, limonene, linalool, menthone and verbenone. The main volatile compounds analyzed by gas chromatography and mass spectrometry, were pulegone, limonene, linalool, menthone and verbenone. Many of these were obtained with treatment T4, in the following quantities: 45.95 µg g<sup>-1</sup> (fresh weight) of pulegone, 2.17 µg g<sup>-1</sup> of limonene, 10.79 µg g<sup>-1</sup> of linalool and 3.06 µg g<sup>-1</sup> of menthone; a reduced content of verbenone was found, compared to untreated plants. Fertilization with N-P-K (T4, 20-20-20) has a positive effect on growth and the content of volatile compounds of nurié (*S. macrostema*) plants compared to unfertilized plants.

**Key words:** Volatile compounds, mineral fertilization, medicinal plant, *Satureja macrostema* (Benth) Briq, terpenes, variation.

Fecha de recepción/date of receipt: 18 de junio de 2013; Fecha de aceptación/date of acceptance: 11 de diciembre de 2013.

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

<sup>2</sup> Facultad de Agrobiología Presidente Juárez, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Correo-e: mabellog2@hotmail.com

<sup>3</sup> Laboratorio de Fitobioquímica, Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Guanajuato.

<sup>4</sup> Laboratorio de Ecología Química, Centro de Investigaciones en Ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México

## INTRODUCCIÓN

Desde tiempos remotos las plantas aromáticas y medicinales se han obtenido mediante la recolección de flora silvestre (Craker, 1999); costumbre que aún se practica para algunas de ellas (Cases, 2007) y conlleva a la sobreexplotación de sus poblaciones naturales. Derivado de esta problemática surge la necesidad de implementar formas de producción eficientes para lograr la sostenibilidad, como la domesticación (Zengin *et al.*, 2008); al mismo tiempo que genera un efecto positivo al conseguirse un aumento en la calidad de la materia prima que permite estandarizar la concentración de principios activos a través de individuos homogéneos para su obtención y procesamiento (Davies, 2004).

En México, la mayoría de los cultivos con fines terapéuticos provienen de especies introducidas: manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.), lavanda (*Lavandula officinalis* Chaix), albahaca (*Ocimum basilicum* L.), menta (*Mentha x piperita* L. (pro. sp.)), tomillo (*Thymus vulgaris* L.) y orégano (*Origanum vulgare* L.). A pesar de la alta demanda que tienen algunas silvestres nativas, no existen suficientes estudios que aborden las condiciones agronómicas que influyen en sus características cualitativas y cuantitativas. Diversas investigaciones demuestran que el abono mineral, especialmente mediante la aplicación de nitrógeno (Zheljzakov *et al.*, 2009), fósforo (Zhu *et al.*, 2008) y potasio (Pavlovic *et al.*, 2006) favorece la generación de biomasa y la composición de metabolitos secundarios de interés económico, como algunos volátiles. Es fundamental conocer los factores que determinan estas diferencias para incrementar su rendimiento (Estrada, 2002). En *Origanum dayi* Post., *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. y *Zea mays* L., las variaciones entre ellos provienen del efecto que tiene la fertilización mineral completa N - P - K (Nitrógeno - Fósforo - Potasio), ya que origina cambios en la proporción de algunos monoterpenos: geranyl acetato,  $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -bisaboleno y nerolidol (Gouinguéné y Turlings, 2002; Amzallag *et al.*, 2005; Antolinez-González *et al.*, 2008).

*Satureja macrostema* (Benth.) Briq., conocida como nurité, pertenece a la familia Lamiaceae y tiene gran importancia en la medicina tradicional de los pueblos purépechas (Michoacán), quienes la consideran un símbolo de fertilidad; además de ser un remedio ante diversos padecimientos (Rzedowski y Rzedowski, 1985; Martínez, 1986; Bello, 1993). En la literatura se documenta que contiene una mezcla de compuestos químicos denominados flavonoides, los cuales fueron estudiados de manera extensa en los últimos años, sobre todo por su efecto antioxidante (Catapano, 1997; Pérez-Gutiérrez y Gallardo-Navarro, 2010); entre aquellos que se han extraído de sus hojas se citan a la naringenina, y ciertos terpenos: limoneno, pulegona, carvacrol y timol, considerados antimicrobianos (Bello, 2006).



## INTRODUCTION

From remote times, medicinal and aromatic plants have been obtained by harvesting the wild flora (Craker, 1999), a custom that is still practiced for some of them (Cases, 2007) and which involves the exploitation of their natural populations. A by-product of this situation is the need to implement efficient production forms in order to achieve sustainability, such as domestication (Zengin *et al.* 2008), and, at the same time, to generate a positive effect by increasing the quality of the commodity, making it possible to standardize the concentration of the active principles through homogeneous individuals for their extraction and processing (Davies, 2004).

In Mexico, most crops cultivated for therapeutic purposes come from introduced species: chamomile (*Matricaria chamomilla* L.), lavender (*Lavandula officinalis* Chaix), basil (*Ocimum basilicum* L.), mint (*Mentha x piperita* L. (pro. sp.)), thyme (*Thymus vulgaris* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.). In spite of the high demand for certain native wild species, there are not enough studies on the agronomic conditions that influence their qualitative and quantitative characteristics. Various researches show that mineral fertilizer, especially nitrogen (Zheljzakov *et al.*, 2009), phosphorus (Zhu *et al.*, 2008) and potassium (Pavlovic *et al.*, 2006) favors the generation of biomass and the composition of secondary metabolites of economic interest, like certain volatile compounds. It is essential to know the factors that determine these differences in order to increase their yield (Estrada, 2002). The variations between *Origanum dayi* Post., *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. and *Zea mays* L. are derived from the effect of complete mineral fertilization with N - P - K (Nitrogen - Phosphorus - Potassium), since this produces changes in the proportion of certain monoterpenes: geranyl acetate,  $\beta$ -caryophyllene,  $\beta$ -bisabolene and nerolidole (Gouinguéné and Turlings, 2002; Amzallag *et al.*, 2005; Antolinez-González *et al.*, 2008).

*Satureja macrostema* (Benth.) Briq., known as nurité, belongs to the family of Lamiaceae and has great importance in the traditional medicine of the Purepecha peoples (of Michoacán), for whom it is a symbol of fertility, besides being a remedy for various diseases (Rzedowski and Rzedowski, 1985; Martínez, 1986; Bello, 1993). According to literature, it contains a mixture of chemical compounds known as flavonoids, which have been extensively studied in recent years, especially for their anti-oxidant effect (Catapano, 1997; Pérez-Gutiérrez and Gallardo-Navarro, 2010); among the compounds drawn from its leaves are naringine and certain terpenes -limonene, pulegone, carvacrol and thymol-, considered to be antimicrobial (Bello, 2006).

There is a high demand of nurité in México (Bello, 2006), and although its extraction from wild specimens entails a strong threat to diversity, there are still no programs for its domestication. The purpose of this paper was to determine

El nunité tiene una amplia demanda en México (Bello, 2006) y a pesar de que la extracción de ejemplares silvestres supone una fuerte amenaza para la biodiversidad, aún no existen programas para su domesticación. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la fertilización mineral completa (N - P - K) sobre el contenido de compuestos volátiles en clones de *S. macrostema* durante su crecimiento en invernadero, con el fin de fomentar su producción agrícola.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Plántulas de nunité y condiciones de cultivo

Se utilizaron individuos de *S. macrostema* con treinta días de edad, mantenidas *in vitro* en medio nutritivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 8 g L<sup>-1</sup> de agar bacteriológico adicionado con 0.1 mg L<sup>-1</sup> de ácido indolbutírico. En el momento de su trasplante, y para su aclimatación en invernadero, presentaron una altura de 4.5 cm, 2 a 3 pares de hojas y 3 a 4 raíces de hasta 4.5 cm de longitud. Se conservaron durante treinta días en una maceta con capacidad para 1 kg de sustrato, el cual consistió en una mezcla 1:1 de turba comercial (peat - moss) y agrolita bajo condiciones de alta humedad relativa (HR) ( $\geq 70$  %). Las plantas permanecieron con HR ambiental (50 a 60 %) y se regaron por pulverización cada tres días con agua corriente, sin permitir la desecación del sustrato (100 mL / maceta), la fertilización se realizó de forma mensual. Las dimensiones del invernadero son de 4 x 9 m. No existieron condiciones testigo respecto a temperatura e intensidad lumínica. La investigación se llevó a cabo de agosto a noviembre de 2012 en el campo universitario de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en Morelia, Michoacán.

### Tratamientos de fertilización completa (N - P - K)

Se aplicaron un tratamiento testigo (T1) sin fertilizante y tres niveles de fertilización (T2: 10 - 10 - 10; T3: 17 - 17 - 17; y T4: 20 - 20 - 20), con Nutrigarden Excelso®, denominado TRIPLE por su contenido de nitrógeno, fósforo y potasio (N - P - K). La concentración se expresó en porcentaje de cada macronutriente por kilogramo de fertilizante. En T2, T3 y T4 se adicionó 1 g por individuo (1 g por maceta) sobre el sustrato, cada treinta días, para un total de tres fertilizaciones en los noventa días de experimentación.

### Determinación de variables de crecimiento

Para cada tratamiento (T1 a T4) se evaluaron: altura (cm), número de hojas y área foliar (cm<sup>2</sup>) a los 0, 30, 60 y 90 días. La altura se midió considerando la longitud desde la base del tallo hasta la yema apical; el número de hojas se determinó por conteo total en ramas; y el área foliar se obtuvo mediante el método de estimación, a partir de ecuaciones matemáticas que

the effect of complete mineral fertilization (N - P - K) on the content of volatile compounds in *S. macrostema* clones during their period of growth in the greenhouse, in order to promote the agricultural production of this species.

## MATERIALS AND METHODS

### Nunité seedlings and cultivation conditions

30-day old individuals of *S. macrostema* were utilized and kept *in vitro* in a MS (Murashige and Skoog, 1962) nutritional medium with 30 g L<sup>-1</sup> of saccharose and 8 g L<sup>-1</sup> of bacteriological agar added with 0.1 mg L<sup>-1</sup> of indolbutyric acid (Villa - Patricio, 2012). In order to favor the acclimatization of the seedlings in the greenhouse, at the time of the transplant their height was 4.5 cm; they had 2 to 3 pairs of leaves and 3 to 4 roots up to 4.5 cm in length. They were kept for 30 days in a flowerpot with capacity for 1 kg of substrate, which consisted of a mixture of 1:1 peat-moss and agrolite under conditions of a high relative humidity (RH) ( $\geq 70$  %). The plants were kept with environmental RH (50 to 60 %); they were sprayed every three days with ordinary water (100 mL/pot) in order to prevent the substrate from drying, and fertilized once a month. The dimensions of the greenhouse are 4 x 9 m. There were no controlled conditions as to temperature and light intensity. The research was carried out from August to November, 2012, in the campus of Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo in Morelia, Michoacan state.

### Complete (N - P - K) fertilization treatments

A witness treatment (T1) without fertilizer and three fertilization levels (T2: 10 - 10 - 10; T3: 17 - 17 - 17; y T4: 20 - 20 - 20) were applied, with Nutrigarden Excelso®, named TRIPLE because of its content of nitrogen, phosphorus and potassium (N - P - K). The concentration was expressed as percentages of each macronutrient per kilogram of fertilizer. In T2, T3 and T4, the substrate was added with 1 g for each individual (1 g per pot) every 30 days, up to a total of three fertilizations in the ninety days of the experiment.

### Determining growth variables

The height (cm), number of leaves and leaf area (cm<sup>2</sup>) were assessed for each treatment (T1 to T4) at 0, 30, 60 and 90 days. The height was measured considering the length from the base of the stem to the apical bud; the number of leaves was determined by the total branch leaf count, and the leaf area was calculated with the estimation method based on mathematical equations involving the length and breadth of the leaves (Robbins and Pharr, 1987). The biomass (g) was compiled for both fresh weight (directly) and dry weight; the latter was obtained only at the end of the experiment, after

involucran largo y ancho de las hojas (Robbins y Pharr, 1987). La biomasa (g) se recabó tanto para peso fresco (de manera directa), como para peso seco, este último únicamente se obtuvo al final del experimento, posterior a un secado a 60 °C por 18 h. Los datos fueron tomados antes de hacer el corte de material vegetal para analizar los compuestos presentes.

### Análisis y cuantificación de volátiles

Se recolectó 1 g (peso fresco) de la parte aérea apical (hojas y tallo) de los ejemplares correspondientes a los cuatro tratamientos, a los 0, 30, 60 y 90 días. Para los extractos, se maceró el material de cada planta con 10 mL de hexano y 500 mL del compuesto estándar tetradecano ( $C_{14}H_{30}$ , 0.05 mg mL<sup>-1</sup>) durante 5 días a 4 °C, después se decantaron y llevaron a sequedad con gas nitrógeno para remover el hexano y posteriormente se resuspendieron en 1 mL de hexano y permanecieron en refrigeración a 4 °C hasta su análisis.

La identificación y cuantificación de los compuestos volátiles se llevó a cabo por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-EM). Se inyectó 1 µL de muestra en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies (7 890A) equipado con un detector de masas (Agilent 5 975C), que operó utilizando helio como gas acarreador, con un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>, con inyección dividida (split 50:1), a una temperatura de 250 °C en una columna capilar no polar HP 5MS (30 m x 0.25 mm I.D. x 0.25 µm Film), con las siguientes condiciones: temperatura inicial de 50 °C, seguida por una rampa de 5 °C min<sup>-1</sup> para alcanzar 280 °C por 1 min, otra rampa de 25 °C min<sup>-1</sup> para llegar a 380 °C, hasta 3 min. El tiempo de corrida fue de 50 minutos. El espectrómetro de masas funcionó a una velocidad de flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>, con un voltaje de ionización a 70 eV, a una temperatura de la interfase de 250 °C, en modo SCAN y en un intervalo de masas de 50 - 500 m z<sup>-1</sup>.

Los compuestos volátiles se identificaron al realizar una comparación entre los tiempos de retención y espectros de masas de cada compuesto, y los de la biblioteca *National Institute of Standards and Technology* (NIST08) y se cuantificaron por relación directa con el estándar interno Tetradecano (Sigma Aldrich®). Las concentraciones de los volátiles están expresadas en microgramos por gramo de peso fresco de la muestra (µg g<sup>-1</sup> peso fresco).

### Análisis estadístico

Los datos de cada uno de los experimentos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA,  $p \leq 0.05$ ), mediante la prueba de diferenciación de medias Tukey, se analizó un número variable de muestras (n) según cada experimento. Se utilizó el programa estadístico JMP 8.

drying the plants at 60 °C during 18 hours. The data were taken before cutting the vegetable material in order to analyze the present compounds.

### Analysis and quantification of volatile compounds

1 g (fresh weight) of the apical aerial part (leaves and stem) of the specimens corresponding to the four treatments was collected at 0, 30, 60 and 90 days.

For extracts, the material of each plant was soaked in 10 mL of hexane and 500 mL of the standard compound tetradecane ( $C_{14}H_{30}$ , 0.05 mg mL<sup>-1</sup>) during 5 days at 4 °C; they were then decanted and dried with nitrogen gas in order to remove the hexane. They were subsequently resuspended in 1 mL of hexane and remained in refrigeration at 4 °C until they were analyzed.

The identification and quantification of the volatile compounds was carried out using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). 1 µL of the sample was injected into an Agilent Technologies (7 890A) gas chromatograph equipped with a mass detector (Agilent 5 975C), which operated using helium as a carrying gas, with a flow of 1 mL min<sup>-1</sup>, with a split injection (split 50:1) at a temperature of 250 °C in an HP 5MS non-polar capillary column (30 m x 0.25 mm I.D. x 0.25 µm Film), under the following conditions: initial temperature of 50 °C, followed by a 5 °C min<sup>-1</sup> ramp in order to attain a temperature of 280 °C during 1 min; another 25 °C min<sup>-1</sup> ramp in order to raise the temperature to 380 °C, during up to 3 min. The runtime was 50 min. The mass spectrometer operated at a flow speed of 1 mL min<sup>-1</sup>, with a ionization voltage of 70 eV, at an interface temperature of 250 °C, in a SCAN mode and at a mass interval of 50 - 500 m z<sup>-1</sup>.

The volatile compounds were identified when a comparison was made between the retention time and mass spectrum of each compound and those of the Library of the National Institute of Standards and Technology (NIST08) and were quantified via a direct relationship with the inner standard Tetradecane (Sigma Aldrich®). The concentrations of the volatile compounds are expressed in micrograms per gram of fresh weight of the sample (µg g<sup>-1</sup> fresh weight).

### Statistical analysis

The data of each of the experiments were subjected to a variance analysis (ANOVA,  $p \leq 0.05$ ), through the Tukey mean difference test; a variable number of samples (n) was analyzed for each experiment. The statistical software JMP 8 was utilized.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto de la fertilización N-P-K sobre el crecimiento

A los treinta días de cultivo se establece el tiempo de inicio del experimento (día 0). En esa fecha se registró una longitud en las plantas de nurié de 12.08 a 13.66 cm, en este punto aquellas correspondientes a T1 (sin fertilización) alcanzaron menor altura, respecto a los demás tratamientos, sin diferencias significativas entre ellos (Figura 1A). De los 60 a los 90 días se evidenció un comportamiento similar, con individuos de T1 más pequeños; sin embargo, se observaron diferencias significativas con los tres tratamientos de fertilizante. A los 90 días la altura en T3 ( $46.83 \pm 1.81$  cm) y T4 se incrementó ( $50.33 \pm 2.33$  cm), en comparación con la de T1 ( $27.5 \pm 1.87$  cm) y T2 ( $40.83 \pm 2.56$  cm) (Figura 1A), ya que aumentaron 253.4 % y 313.9 %, respectivamente, en relación con T1.

En un principio se contabilizaron, en promedio, 12.83 hojas por ejemplar, número que se intensificó a los 30 días, especialmente en individuos de T2, T3 y T4, lo que se mantuvo a los 60 y 90 días de cultivo. En todo momento para T4 se inventariaron más hojas con diferencias significativas ( $57.66 \pm 2.86$  hojas), al final del experimento la cantidad fue 7.4 veces mayor que T1 (227.1 hojas) (Figura 1B).

A partir del día 30, los especímenes fertilizados (T2, T3 y T4) mostraron más desarrollo del área foliar, en particular, T4, con  $4.97$  cm<sup>2</sup> y no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos. En los días 60 y 90, el área foliar del T4 ( $7.58$  y  $9.52$  cm<sup>2</sup>, respectivamente), fue más grande que en los otros tratamientos y 2.07 veces, en comparación con T1 (Figura 1C).

A los 90 días se determinó la biomasa (peso fresco y seco). Las plantas no fertilizadas (T1) generaron menos biomasa, y existió un aumento gradual en las tratadas con T2, T3 y T4 (Figura 2). T4 presentó diferencias significativas, con 5.9 y 7.04 veces más en peso fresco y seco, respectivamente, en comparación con T1; además de que obtuvo un peso máximo de  $24.94 \pm 1.51$  g (peso fresco) y  $4.72 \pm 1.2$  g (peso seco) (Figura 2).

A pesar de que *S. macrostema* no se cultiva ni se maneja en invernadero, se esperaba una respuesta positiva a la aplicación de fertilizante mineral, ya que algunos estudios indican que la fertilización favorece la producción de biomasa en diversos cultivos (Mohamed y Abdum, 2004; Nagdhi-Badi *et al.*, 2004; Pavlovic *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2008; Zheljazkov *et al.*, 2009).

La biomasa en las plantas de nurié aumentó en proporción a la concentración de fertilizante (N - P - K) añadida, lo que concuerda con los resultados de Juárez-Rosete (2010), quien indica que la fertilización mineral promueve el desarrollo en altura y biomasa (peso fresco y seco) en *Matricaria recutita* L. Este efecto también ha sido demostrado en otras especies con

## RESULTS AND DISCUSSION

### Effects of N-P-K fertilization on growth

The starting time of the experiment (day 0) was established at thirty days of cultivation. On that date a length of 12.08 to 13.66 cm of the nurié plants was recorded; at that point, the unfertilized plants (T1) plants had reached a lower height than the fertilized plants, without significant differences between treatments (Figure 1A). Between day 60 and day 90 a similar behavior was observed, with smaller T1 individuals; however, significant differences were observed with the three treatments with fertilizers. At 90 days, T3 ( $46.83 \pm 1.81$  cm) and T4 ( $50.33 \pm 2.33$  cm) individuals reached a greater height than T1 ( $27.5 \pm 1.87$  cm) and T2 individuals ( $40.83 \pm 2.56$  cm) (Figure 1A), with an increase of 253.4 % and 313.9 %, respectively, compared with T1.

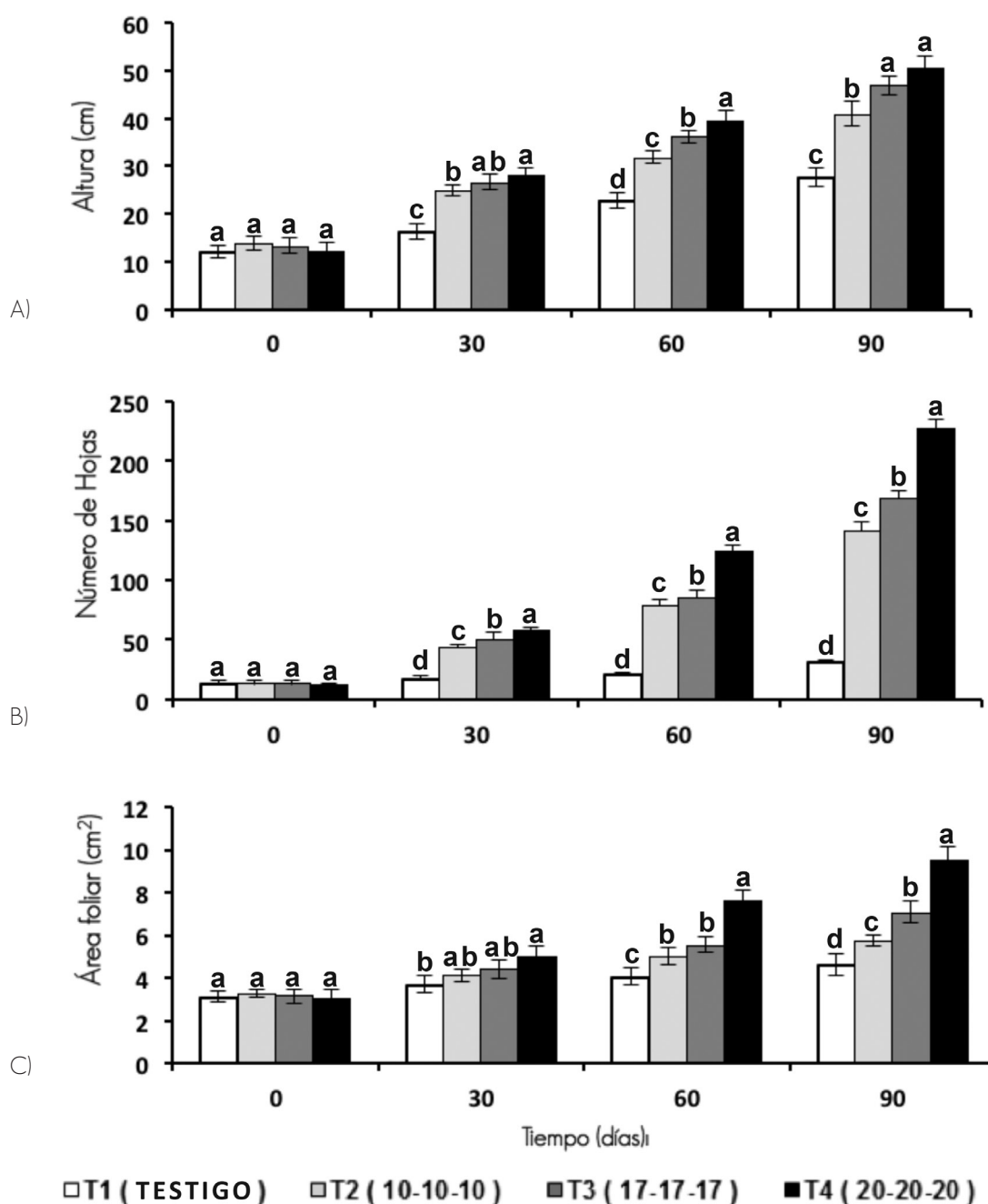
An average of 12.83 leaves were originally counted for each specimen; this figure increased at 30 days, especially in T2, T3 and T4 individuals, a situation that was maintained at 60 and 90 days of cultivation. More leaves were inventoried at all times for T4, with significant differences ( $57.66 \pm 2.86$  leaves); at the end of the experiment, the amount was 7.4 times larger than for T1 individuals (227.1 leaves) (Figure 1B).

After day 30, the fertilized specimens (T2, T3 and T4) showed a greater development of the leaf area, particularly T4, with  $4.97$  cm<sup>2</sup>, and no significant differences between treatments were obtained. On days 60 and 90, the leaf area of T4 ( $7.58$  and  $9.52$  cm<sup>2</sup>, respectively) was larger than those of the other treatments and 2.7 times larger than that of T1 (Figure 1C).

At 90 days the biomass (fresh and dry weight) was determined. The unfertilized plants (T1) generated less biomass, and there was a gradual increase in the plants treated with T2, T3 and T4 (Figure 2). T4 presented significant differences, with 5.9 and 7.04 times more fresh and dry weight, respectively, compared to T1; as well as it obtained a maximum weight of  $24.94 \pm 1.51$  g (fresh weight) and  $4.72 \pm 1.2$  g (dry weight) (Figure 2).

Although *S. macrostema* is not cultivated or handled in a greenhouse, a positive response to the application of mineral fertilizer was expected, as certain studies indicate that fertilization favors the production of biomass in various crops (Mohamed y Abdum, 2004; Nagdhi-Badi *et al.*, 2004; Pavlovic *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2008; Zheljazkov *et al.*, 2009).

The biomass in the nurié plants increased proportionally to the concentration of fertilizer (N - P - K) added; this agrees with the findings of Juárez-Rosete (2010), who points out that mineral fertilization promotes development in terms of height and biomass (fresh and dry weight) in *Matricaria recutita* L. This effect has also been demonstrated in other medicinal species: *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (Soto *et al.*, 2002),



<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

<sup>2</sup>Facultad de Agrobiología Presidente Juárez, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. \*Correo-e: mabellog2@hotmail.com.

<sup>3</sup>Laboratorio de Fitobioquímica, Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Guanajuato.

<sup>4</sup>Laboratorio de Ecología Química, Centro de Investigaciones en Ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México

Letras diferentes indican diferencia significativa en cada bloque de tiempo  $\pm$  desviación estándar ( $p \leq 0.05$ ,  $n=10$ , Tukey).

A) altura, B) número de hojas y C) área foliar; tratamiento sin fertilizante (T1); y tratadas con tres niveles de fertilización (N - P - K):

T2 (10 - 10 - 10), T3 (17 - 17 - 17) y T4 (20 - 20 - 20).

Different letters indicate significant differences in each time block  $\pm$  standard deviation ( $p \leq 0.05$ ,  $n=10$ , Tukey).

A) height, B) number of leaves and C) leaf area; treatment without fertilizer (T1); and treated with three levels of (N - P - K) fertilization:

T2 (10 - 10 - 10), T3 (17 - 17 - 17) y T4 (20 - 20 - 20).

Figure 1. Growth parameters in *Satureja macrostema* (Benth.) Briq. cultivated in a greenhouse during 90 days.

Figura 1. Parámetros de crecimiento en *Satureja macrostema* (Benth.) Briq. cultivada en invernadero durante 90 días.

efectos medicinales: *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (Soto *et al.*, 2002), *Thymus vulgaris* (Omidbaigi y Arjmandi, 2002) y *Echinacea angustifolia* DC. (Berti *et al.*, 2002).

### Efecto de la fertilización N - P - K sobre el contenido de compuestos volátiles

Se identificaron y cuantificaron los principales constituyentes del extracto hexánico de la parte aérea de nurié por CG - EM. Los terpenos limoneno, linalol, mentona, pulegona y verbenona fueron los más abundantes a los treinta días de cultivo, y su presencia se mantuvo durante los noventa días de experimentación, se determinó variación en el contenido entre los tratamientos. Los tiempos de retención por compuesto, los índices Kovats que confirman la identidad de cada terpeno y su cantidad se muestran en el Cuadro 1.

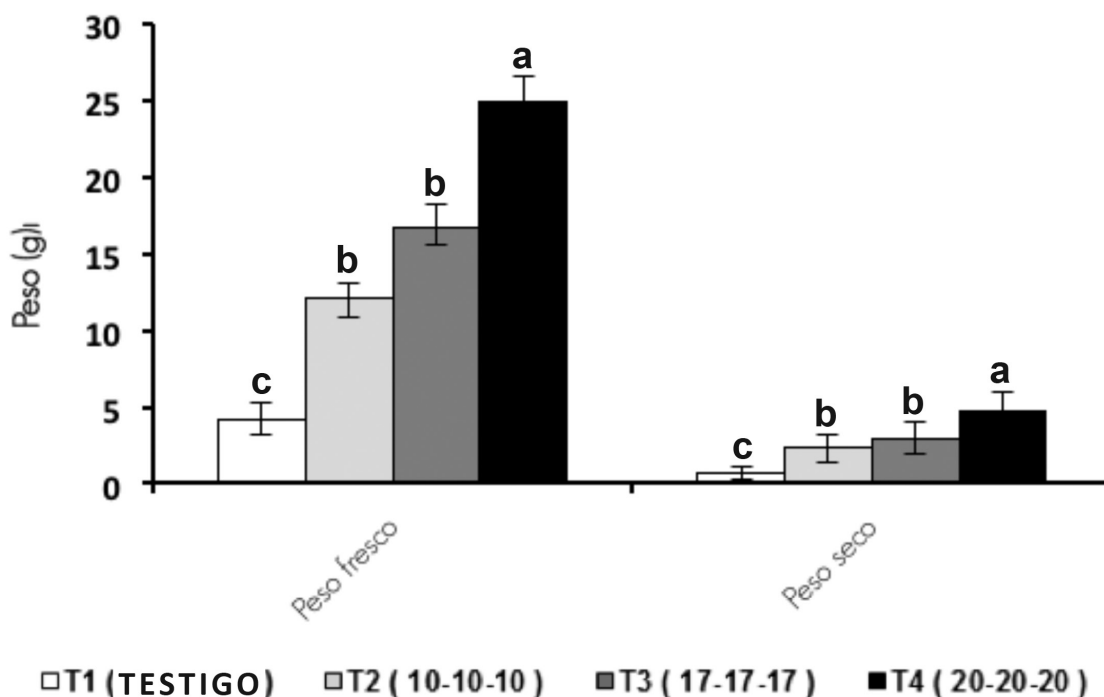
En el cromatograma proveniente de hojas y tallos se observan los compuestos terpénicos identificados, así como la presencia del tetradecano (estándar interno) (Figura 3). Su presencia se manifestó durante todo el experimento, aunque existió variación entre los tratamientos. En todos los casos la pulegona fue el más abundante.

*Thymus vulgaris* (Omidbaigi y Arjmandi, 2002) and *Echinacea angustifolia* DC. (Berti *et al.*, 2002).

### Effect of N - P - K fertilization on the content of volatile compounds

The main constituents of the hexanic extract of the aerial part of nurié were identified and quantified through GC - MS. The terpenes limonene, linalool, menthone, pulegone and verbenone were the most abundant at thirty days of cultivation, and their presence was ongoing during the ninety days of the experiment; a variation in the content between the treatments was determined. The retention times for each compound, the Kovats indices confirming the identity of each terpene and their quantity are shown in Table 1.

The terpene compounds identified and the presence of tetradecane (inner standard) may be observed in the chromatogram from the leaves and stems (Figure 3). Their presence was manifest throughout the experiment, although there were variations between the treatments. In all cases, pulegone was most abundant.



Peso fresco = Fresh weight; Peso seco = Dry weight

Letras diferentes indican diferencia significativa en cada bloque de peso  $\pm$  desviación estándar ( $p \leq 0.05$ ,  $n=10$ , Tukey).

Different letters indicate significant differences in each weight block  $\pm$  standard deviation ( $p \leq 0.05$ ,  $n=10$ , Tukey).

Figura 2. Biomasa determinada en peso fresco y seco en *Satureja macrostema* (Benth.) Briq. a los 90 días del cultivo en invernadero.

Figure 2. Biomass determined in terms of fresh and dry weight in *Satureja macrostema* (Benth.) Briq. at 90 days of cultivation in the greenhouse.

Cuadro 1. Compuestos volátiles (terpenos) del extracto hexánico de la parte aérea de *Satureja macrostema* (Benth.) Briq. cultivada por 30 días en invernadero.

Table 1. Volatile compounds (terpenes) of the hexanic extract of the aerial part of *Satureja macrostema* (Benth.) Briq. cultivated in the greenhouse during 30 day

Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Índices Kovats	Contenido ( $\mu\text{g g}^{-1}$ peso fresco)
Limoneno	10.19	1028	$4.05 \pm 1.03$
Linalol	12.17	1101	$3.70 \pm 1.36$
Mentona	14.14	1169	$5.10 \pm 1.86$
Pulegona	16.18	1244	$34.05 \pm 4.52$
Verbenona	18.97	1345	$5.40 \pm 2.27$

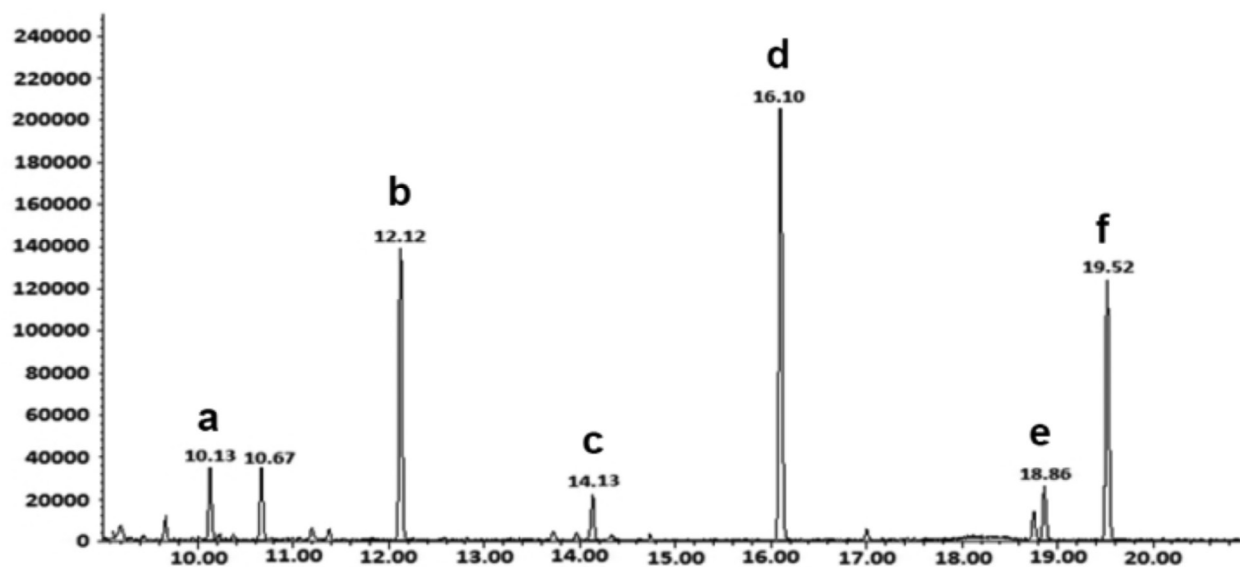


Figura 3. Cromatograma representativo de extractos hexánicos de *Satureja macrostema* (Benth.) Briq. cultivada por 30 días en invernadero: limoneno (a), linalol (b), mentona (c), pulegona (d), verbenona (e) y tetradecano (f).

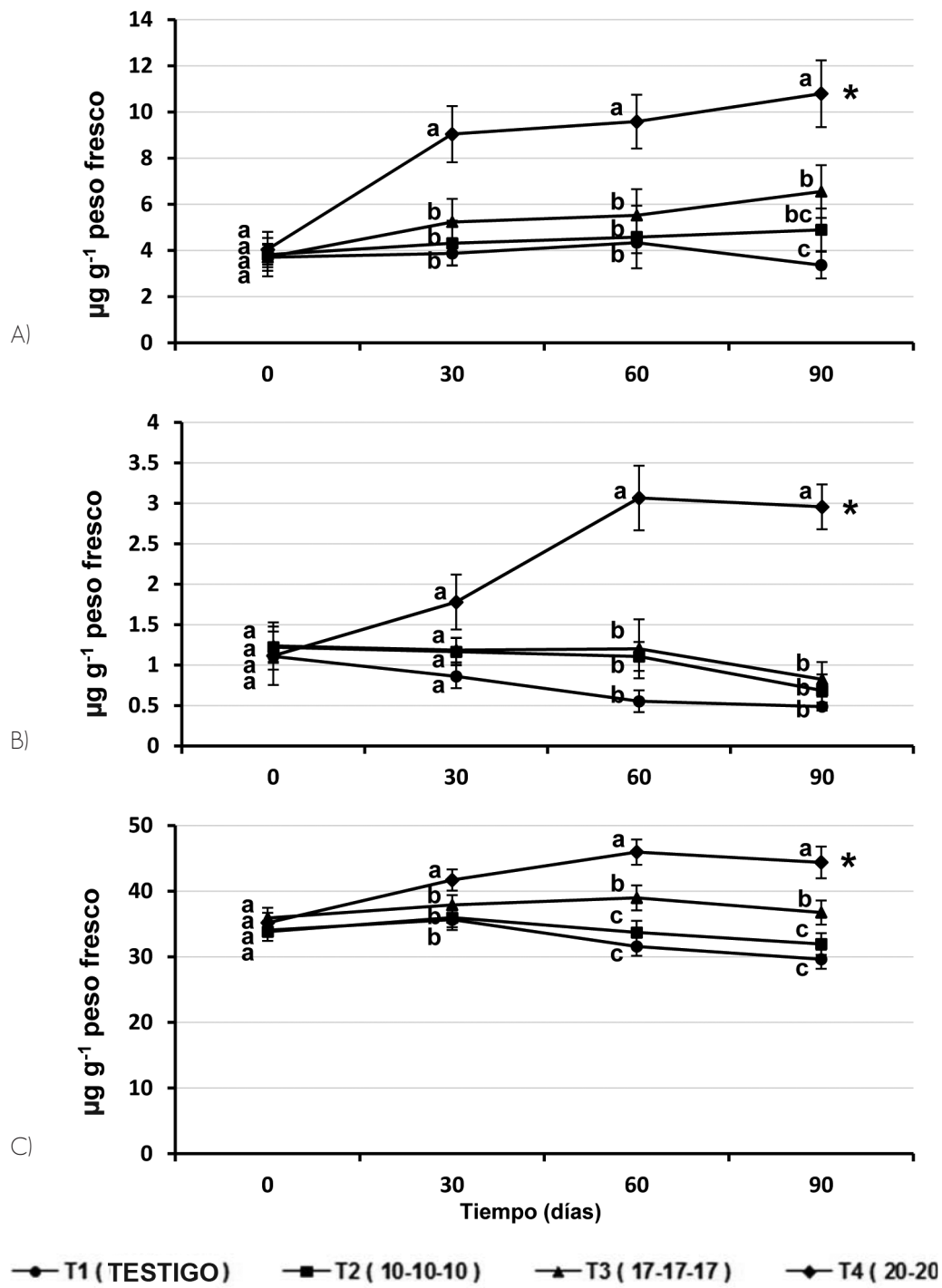
Figure 3. Chromatogram representative of hexanic extracts of *Satureja macrostema* (Benth.) Briq. cultivated in the greenhouse during 30 days: limonene (a), linalool (b), menthone (c), pulegone (d), verbenone (e) and tetradecane (f).

El contenido de linalol, mentona y pulegona aumentó con el tiempo de cultivo en individuos tratados (T2, T3 y T4), por lo que fue mayor a los noventa días ( $10.79 \mu\text{g g}^{-1}$  peso fresco de linalol,  $3.06 \mu\text{g g}^{-1}$  de mentona y  $45.95 \mu\text{g g}^{-1}$  de pulegona), cuando las plantas tratadas con 20 - 20 - 20 (T4) mostraron diferencias significativas respecto a los demás tratamientos (Figura 4). Las plantas no tratadas con fertilizante (T1) presentaron disminución en el contenido de estos compuestos (Figura 4). Al final del experimento, el material correspondiente a T4 registró un incremento de 3.2 veces de linalol, (Figura 4A), 5.5 de mentona (Figura 4B) y 1.49 de pulegona (Figura 4C), en comparación con el testigo.

The linalool, menthone and pulegone content increased with the cultivation period in treated individuals (T2, T3 and T4); therefore, it was higher at ninety days ( $10.79 \mu\text{g g}^{-1}$  dry weight of linalool,  $3.06 \mu\text{g g}^{-1}$  of menthone and  $45.95 \mu\text{g g}^{-1}$  of pulegone), when the plants treated with 20 - 20 - 20 (T4) showed significant differences with respect to the other treatments (Figure 4A), 5.5 of menthone (Figure 4B) and 1.49 of pulegone (Figure 4C), compared to the witness.

Pulegone turned out to be the most abundant terpene in *S. macrostema*, and also, according to recent research, in *Hedeoma multiflorum* Benth (Fernández *et al.*, 2007), *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling. (Cariddi *et al.*,





Letras diferentes indican diferencia significativa en cada tiempo de muestreo para cada compuesto ± desviación estándar. \*Diferencia significativa entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ ,  $n=9$ , Tukey).

Different letters indicate significant difference in each sampling time for each compound ± standard deviation. \*Significant difference between treatments ( $p \leq 0.05$ ,  $n=9$ , Tukey).

a) linalol; b) mentona; c) pulegona

a) linalool; b) menthone; c) pulegone

Figura 4. Contenido de volátiles determinado en *Satureja macrostema* (Benth.) Briq. cultivada en invernadero durante 90 días.

Figure 4. Volatile compound content determined in *Satureja macrostema* (Benth.) Briq. cultivated in a greenhouse during 90 days.

La pulegona resultó ser el terpeno más abundante en *S. macrostema*, lo que coincide con investigaciones recientes que indican que es el más cuantioso en: *Hedeoma multiflorum* Benth (Fernández *et al.*, 2007), *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling. (Cariddi *et al.*, 2007), *Minthostachys mollis* (Kunth.) Griseb. (Cano *et al.*, 2008), *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling. (Chaquilla-Quilca *et al.*, 2011) y algunas especies de *Satureja*, como *S. parvifolia* (Phil.) Epling. (Juárez *et al.*, 2000) y *S. odora* (Gris.) Epl. (Molina *et al.*, 2002).

Para nuriite, el rendimiento del contenido de volátiles crece con la madurez de las hojas y los diferentes niveles de fertilización, lo que promovió la acumulación de pulegona, linalol y mentona (Figura 4) y la disminución de limoneno y verbenona (Figura 5). Rohloff *et al.* (2005) señalan que la presencia de monoterpenos se eleva con la edad de las hojas, pero a las tres semanas de edad puede declinar. También se ha documentado que el rendimiento de los aceites esenciales depende del desarrollo en el área foliar y de tricomas glandulares (Jeliazkova *et al.*, 1999).

El aumento de linalol durante la fertilización en ejemplares de T4 concuerda con los resultados de Gouinguené y Turlings (2002) en *Zea mays*, quienes mencionan que la aplicación de fertilizante completo logró escalar los niveles de dicho compuesto respecto a las plantas no fertilizadas.

La reducción de pulegona a partir de los 60 días (Figura 4C) se explica por la caída en los niveles de mentona (Figura 4B). Este comportamiento ha sido citado en *Mentha arvensis* auct. non L. (Nassiff *et al.*, 2002), *Mentha X piperita* L. (pro. sp.) (Arzani *et al.*, 2007), *Mentha pulegium* L. (Nassiff *et al.*, 2004), *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling. (Cariddi *et al.*, 2007) y *Minthostachys mollis* (Cano *et al.*, 2008); y confirma que la pulegona es el intermediario central en la biosíntesis de mentona, por lo que presumiblemente, la eventual caída de pulegona se relaciona con la subida de mentona.

El limoneno disminuyó en todos los tratamientos, en el caso de T4, a los 30 días se obtuvo el mayor contenido ( $2.17 \mu\text{g g}^{-1}$ ), tras lo cual, comenzó a declinar. A pesar de ello, en T4 se determinó significancia estadística (Figura 5A).

Algunos estudios consignan que en especies de la familia Lamiaceae, ciertos compuestos volátiles se biosintetizan a partir del limoneno (Soheil y Rodney, 2003), uno de ellos es la pulegona; aunque existe muy poca información acerca de la reversibilidad de la reacción (Bohlmann *et al.*, 1998; Muruyama *et al.*, 2002), pero esto explicaría el decrecimiento de limoneno durante los noventa días de experimentación, mientras que la concentración de pulegona tuvo un comportamiento contrario. Un resultado similar se documentó en *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex Britton *et P.* Wilson, con un contenido de limoneno bajo (4.7 %); en tanto que, el de la carvona (un intermediario de la síntesis de pulegona) sube (23.6 %) (Parra-Garcés *et al.*, 2010).

2007), *Minthostachys mollis* (Kunth.) Griseb. (Cano *et al.*, 2008), *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling. (Chaquilla - Quilca *et al.*, 2011) and in certain species of *Satureja*, such as *S. parvifolia* (Phil.) Epling. (Juárez *et al.*, 2000) and *S. odora* (Gris.) Epl. (Molina *et al.*, 2002).

For nuriite, the yield of the volatile compound content grows as the leaves mature and fertilization levels increase; this promoted the accumulation of pulegone, linalool and menthone (Figure 4) and the reduction of limonene and verbenone (Figure 5). Rohloff *et al.* (2005) point out that the presence of monoterpenes increases with the age of the leaves, but may decline after three weeks. Furthermore, the yield of essential oils depends upon the development of the leaf area and of glandular trichomas (Jeliazkova *et al.*, 1999).

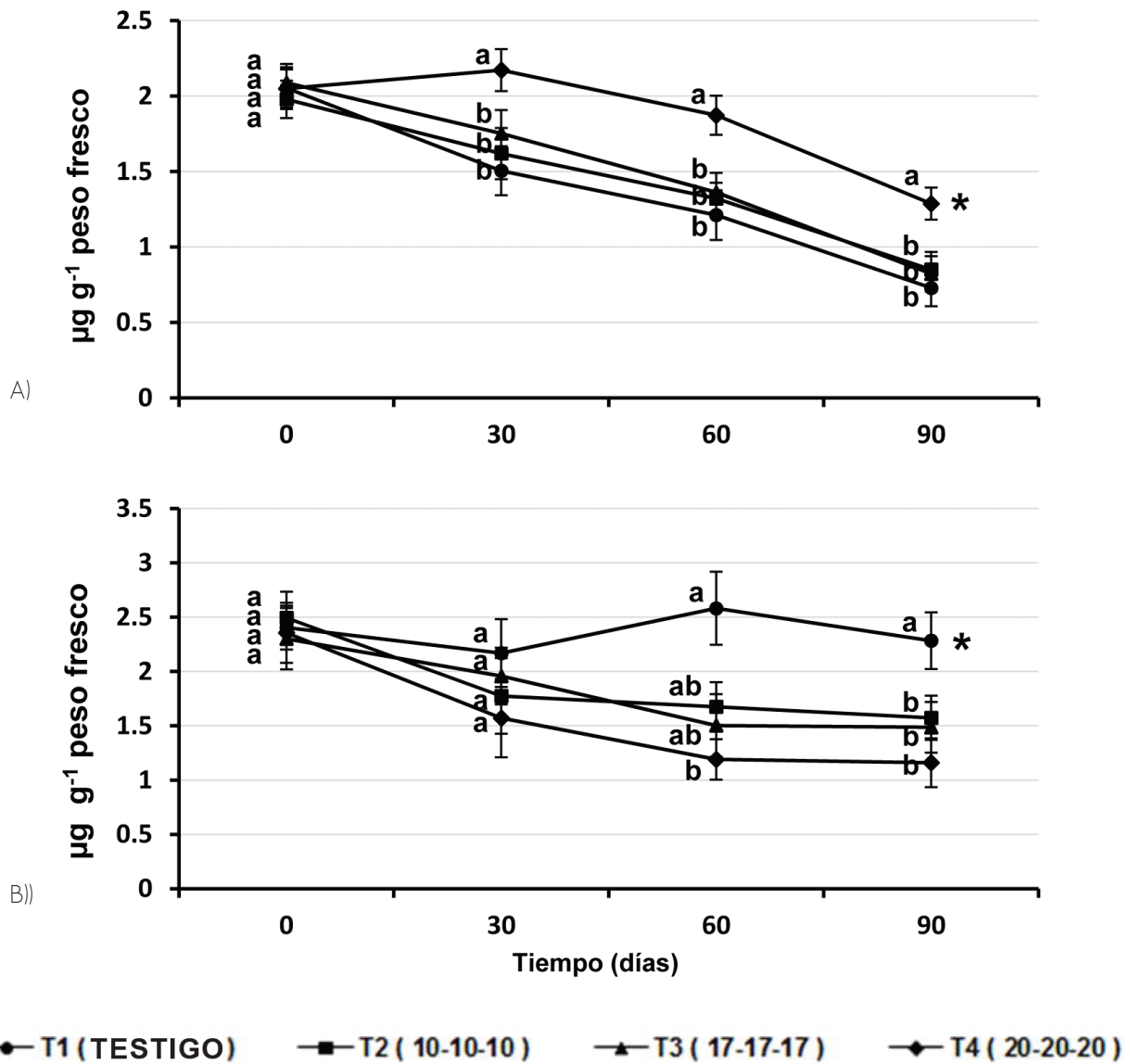
The increase of linalool during fertilization with T4 specimens agrees with the findings of Gouinguené and Turlings (2002) in *Zea mays*, according to whom the application of a complete fertilizer succeeded in escalating the levels of the said compound in contrast to unfertilized plants.

The reduction of pulegone after day 60 (Figure 4C) is accounted for by the rise in menthone levels (Figure 4B). This behavior has been cited for *Mentha arvensis* auct. non L. (Nassiff *et al.*, 2002), *Mentha X piperita* L. (pro. sp.) (Arzani *et al.*, 2007), *Mentha pulegium* L. (Nassiff *et al.*, 2004), *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling. (Cariddi *et al.*, 2007) and *Minthostachys mollis* (Cano *et al.*, 2008). Also, it confirms that pulegone is the central intermediary in the biosynthesis of menthone; thus, the eventual decrease of pulegone is presumably related to the increase of menthone.

The content of limonene diminished in all treatments, being highest for T4 plants at 30 days ( $2.17 \mu\text{g g}^{-1}$ ), after which time it began to decrease. However, statistical significance was determined for T4 (Figure 5A).

According to some studies, certain volatile compounds are biosynthesized from limonene in species of the Lamiaceae family (Soheil and Rodney, 2003); one of these compounds is pulegone. There is nevertheless very little information about the reversibility of the reaction (Bohlmann *et al.*, 1998; Muruyama *et al.*, 2002), but this would account for the decrease in limonene content during the ninety days of the experiment, while the pulegone concentration increased. A similar result was documented in *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex Britton *et P.* Wilson, with a low limonene content (4.7 %), whereas the content of carvone (an intermediary of the synthesis of pulegone) increased (23.6 %) (Parra-Garcés *et al.*, 2010).

In T1 plants verbenone had no significant changes and maintained a similar content between each sampling (Figure 5B). However, in plants treated with the three fertilization levels (T2,



Letras diferentes indican diferencia significativa en cada tiempo de muestreo para cada compuesto  $\pm$  desviación estándar.

\*Diferencia significativa entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ ,  $n=9$ , Tukey).

Different letters indicate significant difference in each sampling time for each compound  $\pm$  standard deviation.

\*Significant difference between treatments ( $p \leq 0.05$ ,  $n=9$ , Tukey).

A) limoneno; B) verbenona.

a) limonene; b) verbenone.

Figura 5. Contenido de volátiles determinado en plantas de *Satureja macrostema* (Benth.) Briq. cultivadas en invernadero durante 90 días.

Figure 5. Content of volatile compounds determined in *Satureja macrostema* (Benth.) Briq. plants cultivated in the greenhouse during 90 days.



En el material del T1 la verbenona no presentó mayores cambios y mantuvo un contenido similar entre cada muestreo (Figura 5B). Sin embargo, en las plantas tratadas con los tres niveles de fertilización (T2, T3 y T4) se observó un decremento en el contenido de verbenona desde los 30 y hasta los 90 días, momento en el que los valores, incluso, resultaron menores a los de T1. El contenido entre tratamientos con fertilizante no tuvo diferencias significativas, pero sí con el testigo ( $2.58 \mu\text{g g}^{-1}$ ) (Figura 5B). La disminución de verbenona por efecto de la fertilización mineral se observó en plantas de maíz por Gouinguéné y Turlings (2002), quienes argumentan que la tasa de fertilización completa causa cambios en las proporciones de los volátiles, cuya estructura se constituye por un doble ciclo (10 carbonos), como en el caso de la verbenona. Además se ha documentado que la fertilización afecta la reacción de dos moléculas de mirceno para formar al terpeno  $\alpha$ -pineno, un intermediario para su biosíntesis (Barrera *et al.*, 2008).

Los resultados de la presente investigación reflejan que bajo condiciones de invernadero y mediante la utilización de fertilizantes con diferentes niveles de N - P - K, se puede favorecer el aumento y rendimiento de compuestos volátiles (Golmakani y Rezaei, 2008), hecho que está estrechamente relacionado con el incremento de biomasa en las plantas tratadas.

## CONCLUSIONES

La fertilización mineral a base de N - P - K (20 - 20 -20) en *S. macrostema* cultivada en invernadero registró un efecto positivo en el crecimiento de las plantas y en el contenido de los compuestos volátiles mayoritarios como el linalol, limoneno, mentona y pulegona. El principal componente volátil de nurite es el terpeno pulegona.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero para su publicación a través del proyecto PIFI / 2012 -16MSU 0014T - 04 - 01

## REFERENCIAS

- Amzallag, G. N., O. Larkov, H. M. Ben and N. Dudai. 2005. Soil microvariations as a source of variability in the wild: The case of secondary metabolism in *Origanum dayi* Post. Journal of Chemical Ecology. 31(6):1235-1255.
- Antolínez-González, J. C., N. G. de Colmenares, A. Usubillaga, E. Darghan y S. Linares. 2008. Evaluación de variables agronómicas en el cultivo de limonaria (*Cymbopogon citratus* Stapf) para la producción de aceite esencial. *Interciencia*. 33 (9):693-699.
- Arzani, A., H. Zeinadi and K. Razmjo. 2007. Iron and magnesium concentrations of mint accessions (*Mentha* spp.). *Plant Physiol. Bioch.* 45: 323-329.
- Barrera R., J., E. A. Alarcón, L. M. González, A. L. Villa y C. C. Montes. 2008. Síntesis de carveol, carvona, verbenol y verbenona. *Ingeniería y Competitividad*. 10 (1): 43-63.
- Bello G., M. A. 1993. Plantas útiles no maderables de la Sierra Purépecha, Michoacán, México, INIFAP. México, D.F., México. Folleto Técnico No. 10. 115 p.

T3 and T4), the verbenone content was observed to decrease between day 30 and day 90, when the values were even lower than those of T1 plants. There was a significant difference in content in relation to the witness, but none between treatments ( $2.58 \mu\text{g g}^{-1}$ ) (Figure 5B). A reduction of the verbenone content due to mineral fertilization was observed in corn plants by Gouinguéné and Turlings (2002), who claim that the complete fertilization rate causes changes in the proportions of volatile compounds with a structure consisting of a double cycle (10 carbons), as in the case of verbenone. Furthermore, it has been documented that fertilization affects the reaction of two myrcene molecules by forming  $\alpha$ -pinene terpene, an intermediary in the biosynthesis of this compound (Barrera *et al.*, 2008).

The results of the present research suggest that the content and yield of volatile compounds may be enhanced through cultivation in a greenhouse and the use of fertilizers with various levels of N - P - K (Golmakani y Rezaei, 2008), a fact that is closely related to the increase in the biomass of the treated plants.

## CONCLUSIONS

Mineral fertilization with N - P - K (20 - 20 -20) in greenhouse-grown *S. macrostema* had a positive effect on the growth of the plants and on the content of the most abundant volatile compounds, such as linalool, limonene, menthone and pulegone. The main volatile component of nurite is the terpene pulegone.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to express their gratitude for the financial support received for the publication of this paper through Project PIFI / 2012 -16MSU 0014T - 04 - 01.

*End of the English version*



- Bello G., M. A. 2006. Catálogo de plantas medicinales de la comunidad Indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán. México. Libro Técnico No. 4. Campo Experimental Uruapan. CIRPAC. INIFAP. Uruapan, Mich., México. 138 p.
- Berti, M., R. Wilckens, S. Fischer and F. Hevia. 2002. Effect of harvest season, nitrogen, phosphorus and potassium on root yield, echinacoside and alkalamides in *Echinacea angustifolia*. *Acta Horticulturae* 576: 303-310.
- Bohlmann, J., G. Meyer-Gauen and R. Croteau. 1998. Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 95: 4126-4133.
- Cano, C., P. Bonilla, M. Roque y J. Ruiz. 2008. Actividad antimicótica *in vitro* y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 25 (3):298-301.
- Cariddi, L. N., M. Moser, J. Zygadlo, L. I. Sabini y A. M. Maldonado. 2007. Compuestos puros aislados del aceite esencial de *Minthostachys verticillata* (Criseb.) Epling como activadores policlonales *in vitro*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 6 (5): 236-237.
- Cases C., M. A. 2007. Las plantas aromáticas y medicinales. Descripción de las especies fundamentales y principios activos. *Jornadas Técnicas Dedicadas a las Plantas Aromáticas y Medicinales*. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Guadalajara, España. pp. 11-18.
- Catapano, A. L. 1997. Antioxidant effect of flavonoids. *Angiology*. 48 (1): 39-44.
- Chaquilla-Quilca, G., Escalante, W. D. E., Torres, M. V., Ballinas, C. M. L., Gastélum, F. M. G. y Nevárez-Moorillón, G. V. 2011. Composición química y contenido de fenoles totales en aceites esenciales de muña (*Minthostachys setosa*) Briq Epl y anís (*Pimpinella anisum*) L. *Revista ECIPEUR*. 8(2): 107- 111.
- Craker, L. E. 1999. Trends in medicinal and aromatic plant production in the United States. *Acta Horticulturae*. 502: 71-75.
- Davies, P. 2004. Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Estación experimental INIA Las Brujas. Proyecto FPTA 137. Canelones, Uruguay. pp. 7-23.
- Estrada, L. E. 2002. Cultivo de plantas medicinales, una urgencia Latinoamericana. *Lecturas para el diplomado internacional plantas medicinales de México*. Universidad Autónoma Chapingo, Edo. de Méx., México. pp. 437-440.
- Fernández E., A., E. Martínez, M. A. Juárez, M. A. Elechosa, A. M. Molina, C. M. Baren, P. van Di Leo Lira y A. L. Bandoni. 2007. Estudio del aceite esencial de *Hedeoma multiflorum* Benth. (Lamiaceae) "Peperina de las lomas" obtenido de poblaciones naturales en la provincia de San Luis. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 6 (5): 246-247.
- Golmakani, M. T. and K. Rezaei. 2008. Comparison of microwave - assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of the essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chem*. 109: 925-930.
- Gouinguéné, S. P. and T. C. J. Turlings. 2002. The Effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. *Plant Physiol*. 129: 1296-1307.
- Jeliazkova, E. A., V. D. Zheljazkov, L. E. Craker, B. Yankov and T. Georgieva. 1999. NPK fertilizer and yield of pepper mint *Mentha x piperita*. *Acta Horticulturae*. 502: 231-237.
- Juárez M., A., M. A. Elechosa, A. C. Molina, C. I. Vituro, C. Heit y M. A. López. 2000. Evaluación de aceites esenciales de *Satureja parvifolia* Phil (Epl.) y *Satureja odora* Gris. (Epl.) en colectas de Córdoba y San Luis. Variación de la composición. In: *Memorias del XIII Congreso Nacional de Recursos Naturales Aromáticos y Medicinales*. 22 al 25 de noviembre del 2000. Creso, Entre Rios, Argentina. p. 32.
- Juárez-Rosete, C. R. 2010. Fertilización orgánica e inorgánica en la producción y calidad de aceites esenciales en manzanilla, menta y tomillo. Tesis de doctorado, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de Méx., México. 107 p.
- Martínez M., S. 1986. Plantas medicinales del Jardín Botánico Michoacano "Melchor Ocampo". Serie Técnica No. 7, 3a. Comisión Forestal. Morelia, Mich., México. pp. 15-18.
- Mohamed, M. and A. A. Abdum. 2004. Growth and oil production of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill): effect of irrigation and organic fertilization. *Biol. Agric. Hortic*. 22 (1): 31-39.
- Molina, A., C. I. Vituro y E. Campos. 2002. Estudio de volátiles de *Satureja* sp. por micro extracción en fase sólida. In: *Memorias del Congreso Regional de Ciencia y Tecnología NOA 2002*. 29 y 30 de Agosto de 2002. Catamarca, Argentina. pp. 1-6.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Physiol. Plantarum* 15: 473-493.
- Muruyama, T., D. Saeki, M. Ito and G. Honda. 2002. Molecular cloning, functional expression and characterization of d-limonene synthase from *Agastache rugosa*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 25: 661-665.
- Naghd-Badi, H., D. Yazdani, A. S. Mohammad and F. Nazari. 2004. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products*. 19:231-236.
- Nassiff, A. A. E., A. M. Torres, G. A. L. Ricciardi y A. I. A. Ricciardi. 2002. Aceite esencial de *Mentha pulegium* L. In: *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. p. 2.
- Nassiff, A. A. E., G. A. L. Ricciardi, A. M. Torres y A. I. A. Ricciardi. 2004. Contenido en pulegona de la infusión de *Mentha pulegium* L. In: *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. Universidad Nacional del Noreste. p. 3.
- Omidbaigi, R. and A. Arjmandi. 2002. Effects of NP supply on growth, development, yield and active substances of garden thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Acta Horticulturae*. 576: 263-265.
- Parra-Garcés, M. I., J. F. Caroprese-Araque, D. Arrieta-Prieto y E. Stashenko. 2010. Morfología, anatomía, ontogenia y composición química de metabolitos secundarios en inflorescencias de *Lippia alba* (Verbenaceae). *Revista de Biología Tropical*. 58 (4): 1533-1548.
- Pavlovic, A., E. Masarovicová, K. Král'ová y J. Kubova. 2006. Response of chamomile plants (*Matricaria recutita* L.) to cadmium treatment. *B. Environ. Contam. Tox* 77 (5): 763-771.
- Pérez-Gutiérrez, R. M. and Y. T. Gallardo-Navarro. 2010. Antioxidant and hepatoprotective effects of the methanol extract of the leaves of *Satureja macrostema*. *Phcog. Mag*. 6 (22): 125- 131.
- Robbins, N. S. and D. M. Pharr. 1987. Leaf area prediction models for cucumber from linear measurements. *Horticultural Science* 22 (6): 1264-1266.
- Rohlfaj, J., S. Dragland, R. Mordal and T. H. Iversen. 2005. Effect of harvest time and drying method on biomass production, essential oil yield and quality of peppermint (*Mentha X piperita* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 4143-4148.
- Rzedowski, J. y G. Calderón de Rzedowski. 1985. Flora Fanerogámica del Valle de México. Volumen II. ENCB - INE. México, D.F., México. 674 p.
- Soheil, S. and B. Rodney. 2003. Menthofuran regulates essential oil biosynthesis in peppermint by testigolung a downstream monoterpene reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 100: 14481-14486.
- Soto, R., G. Vega y A. Tamajón. 2002. Instructivo técnico del cultivo de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf (Caña Santa). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 7: 1-11.
- Zengin, M., M. M. Özcan, Ü. Çetin y S. Gezgin. 2008. Mineral contents of some aromatic plants, their growth soils and infusions. *J. Sci. Food Agr*. 88: 581 - 589.
- Zheljazkov, V. D., V. Cervén, C. L. Cantrell, W. M. Ebelhar and T. Horgan. 2009. Effect of nitrogen, location and harvesting stage on peppermint productivity, oil content, and oil composition. *Horticultural Science*. 44 (5):1267-1270.
- Zhu, Z., Z. Liang, R. Han and J. Dong. 2008. Growth and saikosaponin production of the medicinal herb *Bluperum chinese* D. C. under different levels of nitrogen and phosphorus. *Industrial Crops and Products* 29 (1):96-101.

