

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS**



**CRECIMIENTO DE *Rosmarinus officinalis* L. Y ACUMULACIÓN DE  
METABOLITOS SECUNDARIOS EN CONDICIONES DE ALTA SALINIDAD Y  
AMBIENTES PROTEGIDOS**

ANDREA BECERRA GUDIÑO

Tesis presentada como requisito parcial para la obtención del grado de:  
Maestría En Ciencias Biológico Agropecuarias con opción terminal en Ciencias Agrícolas

Xalisco, Nayarit, Septiembre de 2018

Xalisco, Nayarit., 17 de septiembre de 2018

**DR. J. DIEGO GARCÍA PAREDES**  
**COORDINADOR DEL POSGRADO (CBAP)**  
**P R E S E N T E**

Los suscritos integrantes del Cuerpo Tutorial para asesorar la Tesis titulada: Crecimiento de *Rosmarinus officinalis* L. y acumulación de metabolitos secundarios en condiciones de alta salinidad y ambientes protegidos, que presenta el C. Andrea Becerra Gudiño para obtener el Grado de Maestro en Ciencias con opción terminal en Ciencias Agrícolas, damos nuestra aprobación para que continúe con los trámites correspondientes para la obtención de su grado.

Sin otro asunto que tratar, reciba un cordial saludo.

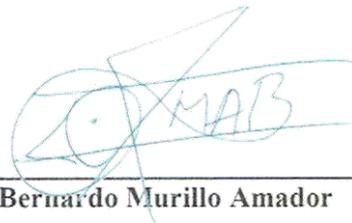
**A T E N T A M E N T E**



**Dra. Cecilia Rocío Juárez Rosete**  
**Directora**



**Dr. Rubén Bugarín Montoya**  
**Asesor**



**Dr. Bernardo Murillo Amador**  
**Asesor**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS**

CBAP/173/18.

Xalisco, Nayarit; 24 de septiembre de 2018.

**ING. JOSÉ ERNESTO VILLANUEVA TREJO**  
**DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR**  
**P R E S E N T E.**

Con base al oficio de fecha 17 de septiembre del presente enviado por los **CC. Dra. Cecilia Rocío Juárez Rosete, Dr. Rubén Bugarín Montoya y Dr. Bernardo Murillo Amador**, donde se indica que el trabajo de tesis cumple con lo establecido en forma y contenido, por tanto se autoriza su impresión, y debido a que ha finalizado con los demás requisitos que establece nuestra institución, se autoriza la **C. Ing. Andrea Becerra Gudiño**, continúe con los trámites necesarios para la presentación del examen de grado del Programa de Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias en el Área de Ciencias Agrícolas.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente  
"Por lo Nuestro a lo Universal"

Dr. J. Diego García Paredes  
Coordinador del Posgrado



C.c.p.- Expediente

&mefm

## DEDICATORIA

A Jehová, mi Dios, porque “Digno eres tú, Jehová, nuestro Dios mismo, de recibir la gloria y la honra y el poder, porque tú creaste todas las cosas, y a causa de tu voluntad existieron y fueron creadas” (Revelación 4:11); “[T]us cualidades invisibles se ven claramente desde la creación del mundo en adelante, porque se perciben por medio de las cosas hechas, hasta su poder sempiterno y Divinidad.” (Romanos 1:20). Tu creación es el objeto de estudio de la investigación y es asombroso lo mucho que nos queda por aprender, ¡Cuántas son tus obras, oh Jehová! Con sabiduría las has hecho todas. La tierra está llena de tus producciones” (Salmo 104:24).

¿Qué sería de mí sin ti, oh Jah? Aprendí mucho durante la realización de este trabajo, aunque las cosas no salieron como esperaba, no hay nadie que ponga su confianza en ti, que sea defraudado (Salmo 25:2,3). Siempre me has proveído lo mejor de lo mejor y has encontrado el modo de sorprenderme; si hay algo encomiable en lo que he hecho, que sea para ti Jehová, el único Dios verdadero (Romanos 14:8,9)...

*Andrea Becerra*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento otorgado para realizar mis estudios de posgrado y estancia de investigación.

Al Programa de Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Nayarit por la aceptarme en el programa y asesoramiento.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., por la capacitación y facilidades otorgadas durante mi estancia.

A la Oregon State University (OSU), por todo el apoyo brindado para la realización de mi estancia de Investigación; en especial al Dr. David Hackleman por su extraordinaria paciencia y hospitalidad así como al equipo del Mass Spectrometry Center.

A mi Comité Tutorial, la Dra. Cecilia Rocío Juárez Rosete, Dr. Rubén Bugarín Montoya y al Dr. Bernardo Murillo Amador, por su apoyo durante la investigación y escritura de tesis.

Al Dr. Raúl Medina Torres, por su amistad, el incomparable apoyo brindado y por compartirme generosamente sus conocimientos.

A quienes participaron directa o indirectamente en la realización de este trabajo y no me dejaron caer las manos, no lo habría logrado sin ustedes.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	vi
ÍNDICE DE CUADROS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS E HIPÓTEISIS.....	2
2.1. Objetivo general.....	2
2.2. Objetivos particulares.....	2
2.3. Hipótesis.....	2
3. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
3.1. Salinidad como problema en la agricultura.....	3
3.2. Aprovechamiento de la salinidad.....	4
3.3. Generalidades del cultivo de romero.....	4
3.4. La salinidad como condición de estrés en las plantas.....	6
3.4.1. Ajuste osmótico.....	6
3.4.2. Metabolismo en plantas sometidas a estrés salino.....	7
3.4.3. Metabolismo secundario en plantas sometidas a estrés salino.....	8
3.5. Mejoramiento de la calidad vegetal en ambientes controlados.....	10
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
4.1. Ubicación del experimento.....	12
4.2. Material genético.....	12
4.3. Tratamientos.....	12
4.4. Diseño experimental.....	12
4.5. Manejo del cultivo.....	13
4.6. Variables evaluadas.....	14
4.6.1. Altura de planta.....	14
4.6.2. Número de ramas.....	14

4.6.3. Contenido de humedad.....	14
4.6.4. Acumulación de materia seca en vástago y raíz.....	15
4.6.5. Determinación de prolina.....	15
4.6.6. Contenido total de fenoles.....	16
4.6.7. Índice de actividad antioxidante.....	17
4.6.8. Extracción y composición de aceites esenciales.....	17
4.7. Análisis estadísticos.....	18
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
5.1. Condiciones del cultivo.....	19
5.2. Análisis estadístico.....	19
5.3. Contenido de humedad en vástago y raíz.....	22
5.4. Acumulación de materia seca.....	23
5.5. Altura de planta.....	24
5.6. Número de ramas.....	27
5.7. Contenido de prolina.....	28
5.8. Contenido total de fenoles.....	30
5.9. Índice de actividad antioxidante.....	32
5.10. Composición de aceites esenciales.....	35
6. CONCLUSIONES.....	37
7. LITERATURA CITADA.....	38
APÉNDICE.....	48

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Página</b>
Cuadro 1. Soluciones nutritivas utilizadas en el cultivo de <i>Rosmarinus officinalis</i> en casa sombra e invernadero.....	13
Cuadro 2. Composición química de la solución nutritiva Steiner (1984).....	13
Cuadro 3. Concentraciones de micronutrientes en la solución nutritiva Steiner (1984).....	14
Cuadro 4. Temperaturas, humedad relativa e intensidad luminosa registradas en dos ambientes de producción de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	19
Cuadro 5. Análisis de varianza de las variables evaluadas en <i>Rosmarinus officinalis</i> L. cultivado en dos ambientes protegidos y diferentes soluciones nutritivas.....	21
Cuadro 6. Contenido de humedad en vástago y raíz de romero cultivado en dos ambientes de producción.....	22
Cuadro 7. Acumulación de materia seca (%) de romero cultivado en dos ambientes de producción.....	23
Cuadro 8. Comparación de medias para la variable altura de planta de romero por efecto del ambiente de producción y de las soluciones nutritivas.....	25
Cuadro 9. Comparación de medias para número de ramas en romero por efecto del ambiente de producción y de las soluciones nutritivas.....	27
Cuadro 10. Comparación de medias para prolina en romero por efecto del ambiente de producción y de las soluciones nutritivas.....	29
Cuadro 11. Comparación de medias para la variable contenido total de fenoles en romero por efecto del ambiente de producción y de las soluciones nutritivas.....	31
Cuadro 12. Comparación de medias para la variable de índice de actividad antioxidante por efecto del ambiente de producción y de las soluciones nutritivas evaluadas.....	33

## ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE

	<b>Página</b>
Cuadro A1. Contrastes ortogonales para las variables de crecimiento, prolina, fenoles y actividad antioxidante de <i>Rosmarinus officinalis</i> por efecto de la interacción ambiente de producción por solución nutritiva.....	49
Cuadro A2. Efecto de la interacción ambiente de producción por solución nutritiva para la variable altura de planta de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	50
Cuadro A3. Efecto de la interacción ambiente de producción por solución nutritiva para la variable número de ramas por planta de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	51
Cuadro A4. Efecto de la interacción ambiente de producción por solución nutritiva para la variable prolina de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	52
Cuadro A5. Efecto de la interacción ambiente de producción por solución nutritiva para la variable contenido total de fenoles en <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	53
Cuadro A6. Efecto de la interacción ambiente de producción por solución nutritiva para la variable índice de actividad antioxidante de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

		<b>Página</b>
Figura 1.	Hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> afectadas por exceso de sales.....	26
Figura 2.	Estimación de la variación de compuestos identificados en aceite esencial de romero producido en ambiente casa sombra e invernadero.....	36

## ÍNDICE DE FIGURAS DEL APÉNDICE

Figura A1.	Contenido de eucaliptol identificado en <i>Rosmarinus officinalis</i> cultivado en dos ambientes de producción.....	55
Figura A2.	Contenido de linalol identificado en <i>Rosmarinus officinalis</i> cultivado en dos ambientes de producción.....	55
Figura A3.	Contenido de camfor identificado en <i>Rosmarinus officinalis</i> cultivado en dos ambientes de producción.....	56
Figura A4.	Contenido de borneol identificado en <i>Rosmarinus officinalis</i> cultivado en dos ambientes de producción.....	56
Figura A5.	Contenido de 4-terpineol identificado en <i>Rosmarinus officinalis</i> cultivado en dos ambientes de producción.....	57
Figura A6.	Contenido de terpineol identificado en <i>Rosmarinus officinalis</i> cultivado en dos ambientes de producción.....	57
Figura A7.	Contenido acetato de bornilo identificado en <i>Rosmarinus officinalis</i> cultivado en dos ambientes de producción. ....	58
Figura A8.	Contenido de timol identificado en <i>Rosmarinus officinalis</i> cultivado en dos ambientes de producción.....	58
Figura A9.	Contenido de metil eugenol identificado en <i>Rosmarinus officinalis</i> cultivado en dos ambientes de producción.....	59
Figura A10.	Contenido de cariofileno identificado en <i>Rosmarinus officinalis</i> cultivado en dos ambientes de producción.....	59
Figura A11.	Contenido de $\alpha$ -cariofileno identificado en <i>Rosmarinus officinalis</i> cultivado en dos ambientes de producción.....	60

Figura A12.	Contenido de spathulenol identificado en <i>Rosmarinus officinalis</i> cultivado en dos ambientes de producción.....	60
Figura A13.	Contenido de óxido de cariofileno identificado en <i>Rosmarinus officinalis</i> cultivado en dos ambientes de producción.....	61
Figura A14.	Contenido de Tau-cadinol identificado en <i>Rosmarinus officinalis</i> cultivado en dos ambientes de producción.....	61
Figura A15.	Contenido de delta cadinose identificado en <i>Rosmarinus officinalis</i> cultivado en dos ambientes de producción. ....	62

## RESUMEN

La salinidad impacta el desarrollo de los cultivos e induce cambios en el metabolismo secundario de plantas aromáticas y medicinales. El romero *Rosmarinus officinalis* es una planta de la familia Lamiaceae con compuestos químicos de importante actividad biológica cuya producción puede ser inducida. El objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento vegetativo y producción de metabolitos secundarios en romero cultivado en casa sombra e invernadero, con diferentes concentraciones salinas en el medio de cultivo. El experimento se realizó en dos ambientes de producción, casa sombra e invernadero, con sistema hidropónico usando concentraciones de la solución nutritiva de Steiner del 75, 100, 640 y 870 %, además de la solución nutritiva de Steiner al 75 % adicionada con 75, 100 y 125 mM de NaCl, con cosechas a los 18, 36 y 56 días después del trasplante. Los resultados indican que los ambientes de producción y la composición de la solución nutritiva impactaron sobre la producción de los metabolitos secundarios en romero. Los ambientes de producción no influenciaron parámetros de crecimiento del romero. Sin embargo, la acumulación de prolina, el contenido de fenoles totales y su índice de actividad antioxidante fueron mayores en plantas cultivadas en invernadero. La estimación de la composición de aceite esencial de romero fue diferente entre ambientes de producción. La composición de la solución nutritiva tuvo efecto sobre el crecimiento de romero, así como la acumulación de prolina, el contenido total de fenoles y el índice de actividad antioxidante.

**Palabras clave:** *Rosmarinus officinalis*, salinidad, ambientes protegidos, prolina, fenoles.

## ABSTRACT

Salinity impacts the development of crops and induces changes over secondary metabolism of aromatic and medicinal plants. Rosemary *Rosmarinus officinalis* is a Lamiaceae plant with chemical compounds that have an important biological activity and which production may be induced. The objective of this research was to evaluate vegetative growth and production of secondary metabolites in rosemary cultivated under shade-enclosure and greenhouse, and different concentrations of the nutritive solution in the growing media. This experiment was conducted under two production systems, shade-enclosure and greenhouse, with hydroponic system at both places and the usage of Steiner's nutritive solution at 75, 100, 640 and 870 % concentration, additionally Steiner's nutritive solution at 75 % added with 75, 100 and 125 mM de NaCl, plants were harvested at 18, 36 and 56 days after transplant. The results indicated that production systems and the composition of the nutritive solution impacted over the production of secondary metabolites in rosemary. The environment did not influence the growing parameters measured in rosemary. But, proline accumulation, total phenolic content and its antioxidant activity index were higher in plants grown under greenhouse. The essential oil composition estimated was different among production systems. Nutritive solution composition influenced rosemary growth and proline accumulation besides total phenolic content and antioxidant activity index.

**Palabras clave:** *Rosmarinus officinalis*, salinity, production systems, proline, phenols.

## 1. INTRODUCCIÓN

La salinización genera pérdidas millonarias anuales y se estima que cerca de un tercio de las tierras irrigadas a nivel mundial han sido afectadas por este problema (Schwabe *et al.*, 2006; Shabala, 2013). La producción agrícola tiende a ser difícil en zonas con conductividades eléctricas superiores a  $4 \text{ dS m}^{-1}$ , porque varias especies cultivadas son sensibles a la salinidad (Jenks y Hasegawa, 2005; Duarte *et al.*, 2013).

Las plantas aromáticas y medicinales producen compuestos bioactivos de alto valor comercial y con beneficios para la salud humana, que derivan principalmente de su metabolismo secundario, dichos compuestos constituyen una fuente única de productos farmacéuticos, aditivos alimentarios, saborizantes, aromas, entre otros; con propiedades antioxidantes, antivirales, antibacteriales y anticancerígenas (Ramakrishna y Ravishankar, 2011). *Rosmarinus officinalis* se distingue por ser una especie bien adaptada a ambientes salinos, clasificada como una planta moderadamente tolerante a la salinidad, cuya producción y comercialización está en aumento por su importancia económica como especie aromática para uso en fresco y seco, condimento, esencia y por su contenido de principios activos (Westervelt, 2003; Miyamoto, 2008).

Algunos factores abióticos como la salinidad impactan en la producción de metabolitos secundarios así como en su acumulación. Aunque la salinidad en los suelos no se debe exclusivamente a NaCl, las investigaciones sobre el efecto de distintas fuentes de iones en el desarrollo de plantas aromáticas, así como su efecto en el metabolismo secundario son escasas. Adicionalmente, en muchos de los casos, el material vegetal en el que se han determinado las propiedades biológicas de los extractos de *Rosmarinus officinalis* ha sido en poblaciones de las que poco se menciona el manejo agronómico que reciben, y dada la importancia de estos compuestos tanto en la industria como por sus efectos benéficos en la salud humana, resulta importante comprender la respuesta de la acumulación de estos compuestos en condiciones controladas que puedan favorecer su producción.

Por lo anteriormente expuesto, se propuso la presente investigación con los siguientes objetivos e hipótesis:

## 2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 2.1. Objetivo general

Evaluar el crecimiento vegetativo y producción de metabolitos secundarios en *Rosmarinus officinalis* cultivado en dos ambientes protegidos y diferentes concentraciones salinas en la solución nutritiva.

### 2.2. Objetivos particulares

- Evaluar el crecimiento de *Rosmarinus officinalis* en función del ambiente de producción y de la concentración salina de la solución nutritiva.
- Determinar el contenido de prolina, fenoles totales y el índice de actividad antioxidante en función del ambiente de producción y la solución nutritiva.
- Identificar las diferencias cualitativas del aceite esencial de romero cultivado en diferentes ambientes de producción.

### 2.3. Hipótesis

El ambiente de crecimiento y el nivel de salinidad inducido por NaCl o concentración de la solución nutritiva podría modificar el contenido de prolina, de fenoles totales y su índice de actividad antioxidante así como la composición del aceite esencial en la biomasa aérea de *Rosmarinus officinalis*.

### 3. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1. Salinidad como problema en la agricultura

De acuerdo con Schwabe *et al.* (2006) cerca de un tercio de las tierras irrigadas a nivel mundial están afectadas por la salinización. Este es un problema importante para la producción agrícola en muchas partes del mundo, particularmente en regiones áridas y semiáridas y en áreas como los trópicos seco y templado seco donde el clima presenta una variación alta en la precipitación anual y temperaturas altas, lo que impide abastecer apropiadamente de agua. Esta condición ocasiona pérdidas globales anuales que superan los doce mil millones de dólares (Shabala, 2013).

La salinidad se refiere a la elevada cantidad de sales solubles acumuladas en la solución del suelo. La conductividad eléctrica (CE) es una propiedad fisicoquímica inerte de las soluciones que mide la facilidad de transmitir electricidad en un medio acuoso y se relaciona directamente con la concentración de sales; se expresa en deciSiemens por metro ( $\text{dS m}^{-1}$ ). Un suelo es catalogado como salino cuando su CE es de  $4 \text{ dS m}^{-1}$  ( $40 \text{ mM NaCl}$ ) o mayor; el NaCl es de las sales más frecuentes y la más soluble, pero también pueden encontrarse otras combinaciones de sales como cloruros y los sulfatos de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  (Jenks y Hasegawa, 2005; Sandoval *et al.*, 2008; Munns y Tester, 2008).

La mayoría de las zonas salinas deben su origen a causas naturales como la topografía del lugar, la cercanía y altura al nivel del mar, la precipitación, la intemperización, la presencia de sales, las propiedades físico-químicas del suelo, entre otras. Sin embargo, también son el resultado de prácticas agrícolas incorrectas como el uso desmedido de fertilizantes, la calidad reducida del agua de riego y su manejo inadecuado. La salinidad no solo degrada la estructura del suelo, también modifica las propiedades físicas y químicas del mismo, haciéndolas desfavorables para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Jenks y Hasegawa, 2005; Álvarez *et al.*, 2008).

La producción agrícola en estas zonas tiende a ser difícil ya que una gran cantidad de cultivos son sensibles a la salinidad y cuando se cultivan en esta condición se obtienen rendimientos bajos. Esta situación impone desafíos nuevos para los agricultores quienes tienen que desenvolverse en ecosistemas que varían en tipo y calidad de suelo así como en disponibilidad y calidad de recursos hídricos (Lamz y González, 2013). Además, la salinidad

constituye uno de los factores ambientales que perturba todos o algunos de los procesos bioquímicos en las plantas, lo que consecuentemente limita la productividad y la calidad de los cultivos agrícolas en todo el mundo (Duarte *et al.*, 2013).

### **3.2. Aprovechamiento de la salinidad**

Flowers y Colmer (2008) sugieren como alternativa para diversificar la producción y aprovechar zonas agrícolas afectadas por este problema el cultivo de plantas tolerantes a la salinidad (halófitas). Estas plantas que representan como máximo el 2 % de las especies terrestres, han adaptado diferentes estrategias fisiológicas, bioquímicas y moleculares asociadas a su desempeño en medios salinos que les permiten sobrevivir y crecer con normalidad aun cuando en su rizosfera existan concentraciones altas de sales, entre 5 y 20 dS m<sup>-1</sup> (Parida y Das, 2005).

El interés por las plantas aromáticas y medicinales ha incrementado en los últimos años porque de su metabolismo se obtienen compuestos que constituyen una fuente única de productos farmacéuticos, aditivos alimentarios, saborizantes, aromas, entre otros; con propiedades antioxidantes, antivirales, antibacteriales y anticancerígenas (Ramakrishna y Ravishankar, 2011).

Actualmente, diversas especies de la familia Lamiaceae son de gran interés para los profesionales de la salud, investigadores, consumidores y diversas industrias por sus propiedades y una gran variedad de compuestos bioactivos a los que se les atribuyen beneficios a la salud y que las convierte a nivel mundial en cultivos de valor comercial alto (Ávila *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2015). Ksouri *et al.* (2011) reportaron varias especies halófitas con potencial para ser fuente de biomoléculas y cuyo cultivo es económicamente rentable; entre ellas mencionan algunas de la familia Lamiaceae. *Rosmarinus officinalis* es un arbusto perenne, bien adaptado a ambientes salinos; Miyamoto (2008) lo clasifica como una planta moderadamente tolerante a la salinidad (6 a 8 dS m<sup>-1</sup>), y sugiere que entre los diversos cultivares es posible encontrar diferencias en su nivel de tolerancia.

### **3.3. Generalidades del cultivo de romero**

Debido a sus diferentes usos como especie aromática, condimento y como esencia, la producción y comercialización del romero está en aumento a consecuencia de la demanda y

los canales de exportación principalmente a Estados Unidos y en menor medida a Europa (Westervelt, 2003). En México, durante el año 2017 a nivel comercial, la superficie sembrada fue de 55.35 ha, en las que se obtuvo un rendimiento de 348.13 t, siendo Baja California Sur, la Entidad Federativa productora principal, seguido por el Estado de México (SIAP, 2017). Esta especie aromática es de importancia económica por la producción de hojas frescas para la extracción de aceites esenciales, elaboración de cosméticos y condimentos.

El romero pertenece a la división Angiosperma, clase Dicotiledónea (Magnoliopsida). Subclase Asteridae, orden Solanales (Tubiflorae), suborden Verbeninae, familia Labiatae (Lamiaceae) género *Rosmarinus* y especie *Rosmarinus officinalis* Linn (Muñoz, 2000). Es una especie aromática arbustiva de tallos leñosos y ramificados, posee ramas pardas con hojas lineares, delgadas y pequeñas de 15 a 40 mm de longitud, opuestas, coriáceas y con forma de espigas de color verde brillante con márgenes revolutos (Sardans *et al.*, 2005). La altura varía de 0.5 a 1 m, florece dos veces al año, en primavera y otoño, las flores se caracterizan por estar agrupadas en racimos y son de color azul claro con pequeñas manchas violetas; el fruto es un tetraquenio (Bareño, 2006).

Respecto a su cultivo, el romero se desarrolla entre los 1500 y 2500 msnm, con temperaturas de 9 a 30°C durante el día, aunque tolera temperaturas de hasta -5 ° C. Esta especie requiere protección contra vientos y heladas (Fernández, 1996), tiene un fotoperiodo nocturno neutro. Tiene buen desarrollo en suelos ligeros con buen drenaje y una profundidad mínima de 20 cm. El rango de pH va de 6 a 7.5 con una tolerancia entre 4.5 a 8.7 (González, 2013).

Aunque tiene requerimientos bajos de agua y una capacidad alta de soportar sequías, si éstas son prolongadas limita su desarrollo normal. La cantidad de agua estará en función del tipo de suelo donde se cultiva, las condiciones climáticas de la zona y la época del año en que se siembra (González, 2013; Bernal, 2014). Son pocos los trabajos debidamente documentados que reportan respecto a la fertilización de las hierbas aromáticas, pero en general se sugiere proveer la cantidad adecuada de los nutrientes, principalmente los macronutrientes (Martinetti *et al.*, 2006).

### **3.4. La salinidad como condición de estrés en plantas**

La respuesta de los cultivos al estrés salino depende de su sensibilidad o habilidad para tolerar dicho estrés. La mayoría de las especies vegetales son susceptibles a la salinidad (Munns y Tester, 2008); los efectos perjudiciales de la salinidad en el crecimiento vegetal se asocian principalmente a los factores osmótico o iónico.

El factor osmótico o estrés osmótico, resulta de la dificultad de las plantas para compensar los valores negativos que el potencial hídrico puede alcanzar en el suelo salino (Azcón y Talón, 2000). La reducción de la capacidad de la planta para absorber agua debido a la sal en la solución de crecimiento se denomina estrés osmótico (Munns *et al.*, 2006). De manera que, la reducción del potencial osmótico en la solución del suelo reduce la cantidad de agua disponible para la planta. Para contrarrestar este problema, las plantas deben mantener un potencial osmótico interno menor para evitar la salida del agua desde las raíces hacia el suelo, de lo contrario ocurriría una desecación fisiológica.

El factor iónico o estrés iónico, consiste en la toxicidad que puede ocasionar el exceso de estos iones en las células. Su presencia en la zona radicular, puede afectar la absorción y transporte de nutrimentos, lo que en un segundo plano podría inducir desbalances y deficiencias nutrimentales (Zhu, 2003). Debido a que las sales son compuestos iónicos formados por igual número de aniones y cationes que son fácilmente solubles en agua, en suelos salinos se encuentran iones disueltos como el cloruro ( $\text{Cl}^-$ ), sodio ( $\text{Na}^+$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) y el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) (Rath y Rousk, 2014). A medida que la concentración de sales aumenta en el suelo su potencial hídrico se vuelve más negativo. Para mantener el gradiente y permitir la absorción de agua, es necesario que la planta disminuya su potencial osmótico.

#### **3.4.1. Ajuste osmótico**

La deshidratación celular causa estrés osmótico, debido a la remoción del agua del citoplasma a los espacios extracelulares; el volumen vacuolar y del citosol se reducen (Munns, 2002), lo que limita la absorción del agua del medio de crecimiento. Cada vez que la célula se hidrata o deshidrata, se incrementa o disminuye la concentración externa de solutos, ocurren cambios en la concentración de solutos en el citosol que la célula controla.

A esta respuesta se le denomina ajuste osmótico; la acumulación de estos solutos en el tejido vegetal constituye una estrategia para combatir la salinidad (Kishor *et al.*, 2005). Está documentado que parte de esa estrategia incluye cambios en el crecimiento, incremento en los niveles de ácido abscísico, acumulación de solutos compatibles y proteínas protectoras, ajuste en el transporte iónico e incrementos en los niveles de antioxidantes (Hasegawa *et al.*, 2000; Xiong y Zhu, 2002).

Este ajuste permite el mantenimiento del contenido de agua en la célula mediante la sobreproducción de diferentes tipos de solutos orgánicos compatibles de peso molecular bajo, altamente solubles que generalmente no son tóxicos aunque se encuentren en concentraciones altas. Los osmolitos compatibles generalmente son metabolitos hidrofílicos, entre los que se encuentran azúcares (sacarosa y fructosa), aminoácidos (prolina y betaína), glicerol, manitol y otros solutos de peso molecular bajo (Chen y Murata, 2002). Estos solutos participan en la activación de las enzimas de alivio y evitan la pérdida de la integridad de la membrana debido a la falta de agua lo que permite a la planta incrementar su tolerancia a la deshidratación de las hojas y acelerar su desarrollo (Schwab y Gaff, 1990; Sahar *et al.*, 2011). Dada la dificultad que implica el abastecimiento de agua en la célula y su importancia en metabolismo primario, es común que la exposición a condiciones de salinidad genere reacciones comunes, principalmente detrimentos en la tasa fotosintética lo que consecuentemente ocasiona clorosis y muerte celular.

### **3.4.2. Metabolismo en plantas sometidas a estrés salino**

Diversas investigaciones reportan reducción en el crecimiento como resultado del estrés salino. Kasrati *et al.* (2014) evaluaron *Mentha suaveolens* subsp. *timija* en diferentes concentraciones de NaCl en condiciones de casa sombra y encontraron que a 50 mM de NaCl el peso fresco y seco disminuían entre 14.16 % y 60.45 %, respectivamente; y que la tendencia se mantenía conforme se incrementó la salinidad hasta 150 mM, donde las reducciones llegaron hasta 47.5 % y 69.3 %, en comparación con el control. Resultados similares se reportaron en *Mentha pulegium* (Oueslati *et al.*, 2010).

En el caso de *Salvia officinalis* concentraciones de 25 mM de NaCl ocasionaron una disminución del 7% en la producción de biomasa, mientras que a 100 mM la reducción fue de 65% (Taarit *et al.*, 2009). Kiarostami *et al.* (2010) estudiaron la respuesta de *Rosmarinus*

*officinalis* con aumentos graduales de NaCl en el agua de riego y observaron que el crecimiento se redujo conforme las concentraciones de NaCl aumentaron.

Reyes *et al.* (2014) evaluaron 20 variedades de *Ocimum basilium* L. con tratamientos de 0, 50 y 100 mM de NaCl. Las variedades presentaron diferentes longitudes de tallo y raíz, cantidad de materia fresca y seca así como de área foliar, lo que sugiere que el grado de afectación y tolerancia a la salinidad depende de la variedad cultivada.

Por lo tanto, la salinidad provoca síntomas relacionados con la inhibición irreversible del crecimiento puesto que este se vuelve lento y no llega a completarse, como consecuencia el área foliar, la altura de la planta y la acumulación de materias seca son menores (Campos *et al.*, 2011). Se reporta que el estrés salino inhibe directa o indirectamente la división celular y/o la elongación de las células de los órganos radicales, tallos y hojas (Zidan *et al.* 1990). La reducción de biomasa se atribuye, principalmente, a que el estrés salino repercute en la tasa fotosintética debido a un potencial bajo en la solución del suelo, toxicidad por iones y/o desbalances nutrimentales (Munns, 2002).

### **3.4.3. Metabolismo secundario en plantas sometidas a estrés salino**

Los metabolitos secundarios pueden ser únicos en especies o géneros particulares. Son un grupo de moléculas que desempeñan un rol fundamental en la adaptación de las plantas a su medio pero que no son indispensables en las rutas bioquímicas destinadas al crecimiento, la respiración y la reproducción celular. La síntesis y acumulación de estos metabolitos generalmente es una respuesta inducida por un estímulo específico del medio ambiente (Makkar *et al.*, 2007).

De acuerdo a Figueiredo *et al.* (2008), estos compuestos se caracterizan por (a) no tener una implicación directa en el crecimiento y desarrollo de las plantas; (b) generalmente son sintetizados a partir de metabolitos primarios; (c) su distribución se restringe a un género o especie; (d) usualmente se acumulan en altas concentraciones (1-3 % peso fresco); entre otros aspectos.

Estas sustancias son volátiles y representan la “esencia” o los constituyentes odoríficos de estas plantas y son una mezcla compleja de compuestos químicos, con propiedades físicas y químicas particulares que en combinación con sus proporciones

diferentes, les da características distintivas. De acuerdo a su ruta de síntesis, estos compuestos se clasifican en terpenoides (mono-, sesqui- y di-terpenos) altamente apreciados como los aceites esenciales. Los fenoles son moléculas envueltas en la síntesis de lignina, por lo que se encuentran ampliamente distribuidos en plantas superiores (ácidos fenólicos, flavonoides y taninos). Los alcaloides, son menos comunes y propios de especies y géneros específicos (Bourgau *et al.*, 2001; Marcano y Hasegawa, 2002; Figueiredo *et al.*, 2008).

El metabolismo secundario de las plantas medicinales y aromáticas ha sido ampliamente estudiado a través de los años. Se ha observado que factores diversos impactan en su síntesis (Munns, 2002). Las investigaciones de Beretta *et al.* (2011), Chauhan *et al.* (2012), Porres *et al.* (2012), Jordán *et al.* (2013a) y Zaouali *et al.* (2013) demuestran que la fenología de las especies genera cambios en la composición y acumulación de aceites esenciales y compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos y su índice de actividad antioxidante también son de interés a la comunidad científica. Esto se debe, por una parte, a que su consumo aporta beneficios a la salud de quien los consume, lo cual se fundamenta en que previenen el daño oxidativo celular por su capacidad de neutralizar las especies reactivas al oxígeno (antioxidante); y a que, se prefiere el consumo de antioxidantes de origen natural, porque antioxidantes sintéticos como Butilhidroxitolueno, Butilhidroxianisol o Butilhidroxiquinona Terciaria, que se adicionan a los alimentos susceptibles a la oxidación lipídica poseen efectos citotóxicos a determinadas concentraciones (Graciano, 2012; Mercado *et al.*, 2013). El ácido rosmarínico es uno de los compuestos fenólicos principales encontrado en los tejidos de especies de la familia Lamiaceae por lo que se consideran una fuente valiosa de estos compuestos; en general todos sus extractos tienen una actividad antioxidante significativa (Trivellini *et al.*, 2016).

Factores externos como la salinidad impactan en la producción de metabolitos secundarios y su acumulación en los órganos vegetales. Por ejemplo, en *Salvia officinalis* cultivada en hidroponía, el rendimiento de aceites esenciales disminuyó a consecuencia de los tratamientos salinos, concentraciones moderadas (50 y 75 mM NaCl) favorecieron la producción; sin embargo, con 100 mM NaCl disminuyó la producción de estos compuestos (Taarit *et al.*, 2009).

La variabilidad en términos de composición y rendimiento se atribuye a parámetros intrínsecos como la especie, el órgano cosechado y la madurez de la planta, los métodos y épocas de cosecha así como a las interacciones con el medio ambiente y a parámetros extrínsecos asociados a los métodos de extracción, almacenamiento y empaquetado de los aceites esenciales, así como el tiempo de procesamiento (Munns, 2002; Li *et al.*, 2014). Por ejemplo, Jordán *et al.* (2013b) solo consideraron la etapa de floración y fructificación de cultivos silvestres de *Rosmarinus officinalis* L. para determinar el efecto de la etapa fenológica en la composición química y las propiedades antimicrobiales y antioxidantes de sus extractos; y encontraron que el rendimiento de aceites esenciales y su actividad microbiana fue mayor durante la etapa de fructificación.

Aunque la salinidad en los suelos no se debe exclusivamente al NaCl, las investigaciones sobre el efecto de distintas fuentes de iones en el desarrollo de plantas aromáticas y su efecto en el metabolismo secundario son escasas. Tounekti *et al.* (2011), utilizaron sales diferentes, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> y FeCl, en conjunto con 100 mM NaCl con la finalidad de incrementar la eficiencia de romero. Encontraron que estas sales tienen un efecto evidente en la producción y proporción de compuestos fenólicos y en la composición de aceites esenciales a razón de las diferentes dosis utilizadas, lo que indica el profundo impacto de la composición iónica del medio de cultivo sobre la producción de metabolitos secundarios.

Los metabolitos secundarios en plantas son usados ampliamente por su actividad biológica en la medicina tradicional y actualmente, son compuestos prometedores usados en la industria perfumera, cosmética, farmacéutica, agrícola y alimenticia (Li *et al.* 2014). Sin embargo, en muchos de los casos, el material vegetal usado para determinar sus propiedades biológicas se ha recolectado de plantas aisladas o en su defecto de poblaciones en las que poco se dice sobre el manejo agronómico que han recibido.

### **3.5 Mejoramiento de la calidad vegetal en ambientes controlados**

Ante la necesidad de garantizar tanto la calidad como la cantidad para abastecer la demanda cada vez mayor de productos frescos y listos para consumo, la producción de plantas aromáticas y medicinales en ambientes controlados ha tenido gran auge (Juárez *et al.*,

2013). Estudios recientes han demostrado que las condiciones medioambientales pueden modificar la composición química de las plantas así como su contenido antioxidante, particularmente por la viabilidad de producir en diferentes estaciones del año y por la influencia de las condiciones lumínicas en el metabolismo vegetal (Ghasemzadeh *et al.* 2010, Moncayo *et al.*, 2015; Necleous y Ntatsi, 2018).

En campo abierto las plantas reciben mayor luz solar que la que pueden realmente utilizar para la fotosíntesis, mientras que en condiciones controladas ciertos factores pueden ser manipulados; la luz es uno de los factores más importantes que inciden en la productividad de la planta además de la temperatura, la humedad relativa y la concentración de CO<sub>2</sub>. Otras investigaciones han demostrado variación en la respuesta de las plantas que crecen en ambientes protegidos y a campo abierto, atribuibles a las diferencias del microclima (Ghasemzadeh *et al.*, 2010; Cortés *et al.*, 2013; Murillo *et al.*, 2013). En ambientes protegidos es posible incrementar considerablemente el rendimiento de los cultivos así como manipular la composición química del producto final (Rouphael *et al.*, 2018).

No obstante, el romero es generalmente cultivado a campo abierto, lo que tiende a producir gran variabilidad tanto en la producción de biomasa como en el contenido de principios activos. Dada la importancia económica e industrial de este cultivo se requieren estudios que permitan una mejor comprensión de la acumulación de estos compuestos en condiciones controladas con la finalidad de maximizar la producción objetivo.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Ubicación del experimento**

La presente investigación se desarrolló durante el periodo de abril a junio de 2016 en la Unidad Académica de Agricultura de la Universidad Autónoma de Nayarit, localizada a 21° 25' 36" latitud N y 104° 53' 28" longitud O, a 922 msnm, en un invernadero tipo gótico cenital de una nave cubierto con plástico lechoso con 30 % de sombra y en una casa sombra tipo macrotúnel cubierto con malla de 35 % de sombra.

### **4.2. Material genético**

Se utilizaron plántulas de romero de la variedad "Arp" obtenidas en la empresa Floraplant (México). Las plantas de tres meses de edad se trasplantaron a bolsas de polietileno negro de 20 × 20 cm con tezontle de 3-6 mm de diámetro como sustrato, posteriormente se trasladaron a los sitios experimentales respectivos, casa sombra e invernadero.

### **4.3. Tratamientos**

Los factores evaluados fueron dos ambientes de producción y siete niveles de salinidad de la solución nutritiva, generándose un total de 14 tratamientos (Cuadro 1).

### **4.4. Diseño experimental**

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 2×7. El primer factor, ambiente experimental, se estimó en dos niveles: casa sombra e invernadero. El segundo factor consistió en siete soluciones nutritivas de concentración iónica diferente, en cada sitio experimental (Cuadro 1). Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento. La unidad experimental consistió de una planta en un contenedor de plástico flexible de 20 x 20 cm.

Cuadro 1. Soluciones nutritivas utilizadas en el cultivo de *Rosmarinus officinalis* en casa sombra e invernadero.

Tratamientos	Descripción	Conductividad eléctrica (CE/dS m <sup>-1</sup> )
1	SN 75 % (Control , C)	1.80
2	SN 100 %	2.36
3	SN 640 %	10.90
4	SN 870 %	14.25
5	C + 75 mM de NaCl	8.49
6	C + 100 mM de NaCl	10.56
7	C + 125 mM de NaCl	11.80

SN: Solución Nutritiva de Steiner (1984).

#### 4.5. Manejo del cultivo

Se realizó un análisis de calidad de agua previo a la preparación de las soluciones nutritivas para determinar su composición iónica total y ajustar la solución al momento de realizar la formulación final; los niveles de NaCl se agregaron a la solución nutritiva universal de Steiner (1984) de acuerdo a lo propuesto por García *et al.* (2011) (Cuadro 2 y 3). Todas las soluciones fueron ajustadas a un pH de 5.5 usando ácido sulfúrico. La aplicación de las soluciones nutritivas inicio 10 días después del trasplante, cada planta fue irrigada manualmente con 250 ml cada tres días. La cosecha de material vegetativo se realizó por la mañana (entre 9 y 11 a.m.) a los 18, 36 y 56 días después del inicio de la aplicación de las soluciones nutritivas.

Cuadro 2. Composición química de la solución nutritiva Steiner (1984).

Ca <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	NO <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
meq·L <sup>-1</sup>					
9	7	4	12	1	7

meq L<sup>-1</sup>=miliequivalentes por litro.

Cuadro 3. Concentraciones de micronutrientes en la solución nutritiva Steiner (1984).

Elemento	$\mu\text{mol L}^{-1}$	$\text{mg L}^{-1}$
Fe	9-36	0.5-2.0
Mn	4.36	0.2-2.0
Zn	1.5-9	0.1-0.6
B	19-56	0.2-0.6
Cu	0.2-1	0.01-0.06
Mo	0.4-0.6	0.04-0.06

#### 4.6 Variables evaluadas

##### 4.6.1. Altura de planta

La altura de planta se determinó a los 18, 36 y 56 días después del trasplante (DDT), para ello se midieron cinco plantas con una regla graduada en centímetros, desde la base del cuello de la raíz hasta el ápice del meristemo.

##### 4.6.2. Número de ramas

Se contabilizaron el número de ramas por planta desde la base del tallo hasta el meristemo apical a los 18, 36 y 56 DDT.

##### 4.6.3. Contenido de humedad

Para estimar el contenido de humedad se cosechó material vegetal a los 18, 36 y 56 DDT. El peso fresco de vástago (PFV) y raíz (PFR) fueron medidos inmediatamente después del corte con una balanza digital (Ohaus® CS200, China). El contenido de humedad se expresa en porcentaje, en base a la ecuación propuesta por Cordovilla *et al.* (2014):

$$\text{Contenido de humedad (\%)} = \left( \frac{PFV - PSV}{PFV} \right) \times 100$$

Donde PFV es el peso fresco del vástago y PSV es el peso seco del vástago.

Para determinar el peso seco de la parte aérea y de la raíz se colocaron en bolsas de papel y se secaron en una estufa de aire forzado a 70 °C, hasta obtener peso constante.

#### 4.6.4. Acumulación de materia seca en vástago y raíz

Antes de la aplicación de los tratamientos en ambos ambientes, se pesaron plantas enteras de romero para obtener peso fresco y seco que fueron tomados como referencia (100 % de masa seca). El material se secó en una estufa de aire forzado a 40 °C hasta alcanzar peso constante para determinar el peso en seco del vástago y raíz (PSV y PSR), las mismas variables se midieron a los 18, 36 y 56 DDT. La acumulación de materia seca se expresa en porcentaje en base a la siguiente ecuación:

$$\text{Acumulación de materia seca} = \left( \frac{PSf - PSi}{PSi} \right) \times 100$$

Dónde: PSf es el peso seco al final del experimento y PSi es el peso seco al inicio del experimento (Cordovilla *et al.*, 2014).

#### 4.6.5. Determinación de prolina

Para determinar el contenido de prolina, de cada fecha de corte se tomaron hojas de romero que se almacenaron en congelación durante 24 h a -18 °C y se liofilizaron en un equipo Labconco (Modelo Free zone 2.5, EUA), las muestras fueron molidas hasta obtener polvo parecido a harina y fueron almacenadas a temperatura ambiente hasta su análisis.

Para la determinación de prolina se utilizó como referencia la metodología de Bates *et al.* (1973), para la cual se utilizaron 0.5 g de muestra que se maceraron en mortero frío con 5 mL de ácido sulfosalicílico al 3%; el extracto se filtró y después se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min. Se midió una alícuota de 2 mL del sobrenadante, que fueron dispuestos en un tubo de ensaye, a los cuales se les agregó 2 mL de ninhidrina ácida y 2 mL de ácido acético glacial. El blanco se preparó con 2 mL de ácido sulfosalicílico, 2 mL de ninhidrina ácida y 2 mL de ácido acético glacial. La curva estándar se preparó con diferentes concentraciones de solución estándar de prolina (20  $\mu\text{moles mL}^{-1}$ ); de esta solución se midió una alícuota de 1 mL que se depositó en un matraz y se aforó a 50 mL con ácido sulfosalicílico al 3 %, dicha dilución equivale a 400 nmoles  $\text{mL}^{-1}$ .

Cada tubo se agitó en vortex hasta obtener una emulsión, se taparon y se colocaron a baño María durante 60 minutos, al terminar se sumergieron en agua fría durante 10 minutos. A cada tubo se le agregaron 4 mL de tolueno y se agitó en vortex. La fase superior se colocó

en un tubo nuevo y se realizó la lectura de absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific (Modelo Spectronic 200, Massachusetts, USA).

El contenido de prolina se expresa en  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  de prolina, en base a la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Abs extracto} - \text{blanco}}{\text{Pendiente}} * \frac{\text{Vol extracto}}{\text{Vol alícuota}} * 1/\text{PF}$$

Donde: Abs extracto es la absorbancia obtenida del extracto, blanco (expresado en absorbancia) y pendiente (expresada como absorbancia.nmol<sup>-1</sup>) determinadas por regresión lineal, Vol extract es el total del volumen del extracto, Vol alícuota es el volumen usado en el ensayo, PF (expresado en mg) es la cantidad de material vegetal en la que se realizó la extracción. Se asume que la Abs extracto está dentro del rango lineal.

#### **4.6.6. Contenido total de fenoles**

El contenido total de fenoles y el índice de actividad antioxidante se evaluaron en material fresco. Las muestras se prepararon de acuerdo con el procedimiento de Chizzola *et al.* (2008) y Nourhene *et al.* (2009); se utilizó metanol al 60 % (v/v), 2 g de material fresco se trataron con 15 mL de solvente y la extracción se realizó a 4 °C por 24 h. Después el extracto se filtró para separar las partículas de material vegetal y se refrigeró a 4 °C hasta su análisis. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

El contenido total de fenoles se determinó con el método Folin-Ciocalteu, de acuerdo con Chizzola *et al.* (2008) con algunas modificaciones propuestas por Juárez *et al.* (2011). Los reactivos utilizados fueron: ácido cafeico, reactivo Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio y etanol. Se midieron alícuotas de 0.5 mL de extracto etanólico, 1 mL de etanol 95 % (v/v) a los que se agregaron 5 mL de agua destilada, y 0.5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu diluido en agua destilada 1:10. Después de 5 min, se agregó 1 mL de solución de carbonato de sodio en agua (5 %, v/v). Las muestras se agitaron y se mantuvieron 30 min en oscuridad, después se midió la absorbancia a 725 nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific (Modelo Spectronic 200, Massachusetts, USA). El blanco se preparó siguiendo el mismo procedimiento con etanol. Para la curva de calibración se usaron concentraciones diferentes de ácido cafeico en etanol. El contenido total de compuestos fenólicos del extracto se expresó en  $\mu\text{g}$  de equivalentes de ácido cafeico (CAE) por 100 g de material vegetal fresco (FPM).

#### 4.6.7. Índice de actividad antioxidante

El índice de actividad antioxidante se determinó con el método DPPH descrito por Chizzola *et al.* (2008) y Scherer y Texeira (2009). Por cada muestra, se midió una alícuota de 400  $\mu\text{L}$  del extracto y se ajustó a 1 mL con metanol al 50 %, posteriormente se agregó 1 mL de DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidracilo) ( $2.43 \times 10^{-4}$  M). Las muestras se colocaron en oscuridad por 30 min a temperatura ambiente; la absorbancia contra un blanco fue medida a 517 nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific (Modelo Spectronic 200, Massachusetts, USA). El blanco consistió en 500  $\mu\text{L}$  de Trolox, 500  $\mu\text{L}$  de metanol y 1 mL del reactivo DPPH para obtener una decoloración total del radical. Como sustancia de referencia para la curva de calibración se midieron 2.5 mM de Trolox (ácido 6-hidroxi- 2,5,8-tetrametil-chromano-2-carboxílico) en metanol; las concentraciones para la curva fueron de 0.1 a 2 mM de trolox en 1 mL de metanol. La solución estándar de Trolox se preparó bajo las mismas condiciones. Los resultados se expresan en porcentaje de inhibición de DPPH, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% DPPH = \left( \frac{Absc - Absm}{Absc} \right) * 100$$

Donde Absc es el valor de absorbancia del control, Absm es el valor de absorbancia de la muestra.

#### 4.6.8. Extracción y composición de aceites esenciales

La extracción de aceites esenciales se realizó con la técnica de destilación simple por arrastre de vapor; para la cual se tomaron 50 g de material vegetal fresco y se colocaron en la columna de extracción del equipo; después de dos horas de ebullición se colectó el destilado y se almacenó en frascos tipo vial de 5mL y se conservaron en refrigeración hasta su análisis.

El análisis cuantitativo de los componentes mayoritarios se realizó siguiendo la metodología sugerida por Salido *et al.* (2003), con la técnica de cromatografía de gases con un equipo Hewlett Packard 6890 acoplado con un espectrofotómetro de masas Jeol The MSRoute JMS-600H. Se usó una columna de capilaridad HP-5MS (30  $\times$  0.25 mm). Con las siguientes condiciones de operación: la temperatura inicial fue de 60  $^{\circ}\text{C}$  aumentando 5  $^{\circ}\text{C}$

$\text{min}^{-1}$ ; la temperatura final fue de  $250^{\circ}\text{C}$ , el puerto de inyección se encontraba a  $280^{\circ}\text{C}$ , el flujo de gas helio fue de  $0.9 \text{ mL min}^{-1}$ . La muestra ( $1 \mu\text{L}$ ) fue inyectada en modo Split proporción 1:10.

Los compuestos más abundantes en los aceites esenciales se identificaron con base a su tiempo de retención. La identificación individual se realizó mediante la comparación de su espectro de masas con la biblioteca de referencia interna del equipo (TSSPRO 3.0), con la base de datos disponible en massbank.jp y con los reportados en la literatura. El porcentaje de composición se basó en el área del pico.

#### **4.7 Análisis estadísticos**

Se realizaron análisis de varianza de cada factor y variable. La comparación de medias fue mediante la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ), adicionalmente se realizó una comparación de medias por contrastes ortogonales para evaluar diferencias entre tratamientos. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SAS (SAS, Inst., 2007).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Condiciones de cultivo

Durante el período experimental se registraron temperaturas medias, similares en los ambientes casa sombra e invernadero. La temperatura máxima se registró en el invernadero, con una diferencia de 5 °C en comparación con la casa sombra (Cuadro 4). Las temperaturas medias y la humedad relativa registrada durante este experimento coinciden con las que Muñoz (2000) recomienda para el cultivo de romero.

Cuadro 4. Temperaturas, humedad relativa e intensidad luminosa registradas en dos ambientes de producción de *Rosmarinus officinalis*.

	Casa Sombra	Invernadero
Temperatura (°C)		
Máxima	36.6	41.8
Media	24.1	27.8
Mínima	14.3	15.1
Humedad relativa (%)		
Máxima	74.5	89.1
Media	57.0	55.9
Mínima	29.3	28.1
Intensidad luminosa (nmoles/m <sup>2</sup> )	746.87	455.83

### 5.2. Análisis estadístico

Como se observa en el Cuadro 5, el análisis de varianza indicó diferencias significativas a los 18 días después del trasplante (DDT) por efecto del ambiente sobre la altura de la planta y diferencias altamente significativas en el número de ramas por planta. También se obtuvieron diferencias significativas en las variables prolina, fenoles totales e índice de actividad antioxidante por efecto del ambiente de producción, la solución nutritiva y la interacción entre éstos.

El análisis de varianza a 36 DDT no indicó diferencias significativas en las variables de crecimiento evaluadas, excepto para la altura de planta por efecto de la interacción

ambiente por solución nutritiva. Sin embargo, en todas las variables fisiológicas evaluadas se encontraron diferencias altamente significativas por efecto del ambiente, la solución nutritiva y por la interacción ambiente por solución nutritiva (Cuadro 2).

El análisis de varianza a los 56 DDT indicó diferencias significativas en la altura de planta y número de ramas por efecto de la solución nutritiva. Mientras que en las variables prolina, fenoles totales y el índice de actividad antioxidante se encontraron diferencias altamente significativas por efecto del ambiente, la solución nutritiva y la interacción entre estos (Cuadro 5).

La combinación lineal obtenida por contrastes ortogonales no señaló diferencia significativa entre los tratamientos para la variable altura de planta y número de ramas. Sin embargo, mostró con mayor precisión la influencia de los ambientes en la producción de prolina y contenido total de fenoles así como en el índice de actividad antioxidante, encontrándose diferencias significativas entre las soluciones nutritivas aplicadas en casa sombra e invernadero (Cuadro A1, Apéndice).

Cuadro 5. Análisis de varianza de las variables evaluadas en *Rosmarinus officinalis* L. cultivado en dos ambientes protegidos y diferentes soluciones nutritivas.

DDT	Fuente de variación	Altura de planta (cm)		No. de ramas (planta <sup>-1</sup> )		Prolina (μmol/g)		Fenoles (μg CAE/100 g)		Actividad Antioxidante (% de inhibición de DPPH)	
		GL	Pr>F	GL	Pr>F	GL	Pr>F	GL	Pr>F	GL	Pr>F
18	Ambiente	1	0.0014*	1	0.0001**	1	0.0001**	1	0.0385*	1	0.5930 <sup>ns</sup>
	SN	6	0.3474 <sup>ns</sup>	6	0.6948 <sup>ns</sup>	6	0.0001**	6	0.0197*	6	0.0001**
	Amb*SN	6	0.9315 <sup>ns</sup>	6	0.9131 <sup>ns</sup>	6	0.0001**	6	0.0190*	6	0.0012*
		CME	C.V.	CME	C.V.	CME	C.V.	CME	C.V.	CME	C.V.
		12.96	11.42	28.16	15.50	0.07	13.30	51.16	4.06	52.33	14.26
36	Ambiente	1	0.9587 <sup>ns</sup>	1	0.0955 <sup>ns</sup>	1	0.0400*	1	0.0287*	1	0.0001**
	SN	6	0.6038 <sup>ns</sup>	6	0.7317 <sup>ns</sup>	6	0.0001**	6	0.0001**	6	0.0001**
	Amb*SN	6	0.0185*	6	0.3647 <sup>ns</sup>	6	0.0067*	6	0.0001**	6	0.0001**
		CME	C.V.	CME	C.V.	CME	C.V.	CME	C.V.	CME	C.V.
		11.89	10.40	19.09	11.31	0.19	22.39	6.69	1.58	14.24	6.04
56	Ambiente	1	0.5446 <sup>ns</sup>	1	0.2160 <sup>ns</sup>	1	0.0001**	1	0.0152*	1	0.0001**
	SN	6	0.0001**	6	0.0019*	6	0.0001**	4	0.0022*	4	0.0001**
	Amb*SN	6	0.7178 <sup>ns</sup>	6	0.8747 <sup>ns</sup>	6	0.0001**	4	0.0001**	4	0.0001**
		CME	C.V.	CME	C.V.	CME	C.V.	CME	C.V.	CME	C.V.
		15.37	10.98	21.90	10.68	0.06	23.03	37.93	3.56	16.44	5.46

DDT: Días después del trasplante, SN: Solución Nutritiva, Amb\*SN: Interacción Ambiente por Solución Nutritiva, GL: Grados de libertad, CME: Cuadrado medio del error, <sup>ns</sup> No significativo a  $P \leq 0.05$ . \*Significativo a  $P \leq 0.05$ , \*\*Altamente significativo a  $P \leq 0.01$ , C.V.: Coeficiente de variación (%).

### 5.3. Contenido de humedad del vástago y raíz

No hubo diferencias significativas en el contenido de humedad del vástago en ambos ambientes de producción de romero. Sin embargo, se observó una disminución gradual en el contenido de humedad de las plantas de romero cultivado en ambos ambientes de producción durante el tiempo que duró el experimento (Cuadro 6).

Cuadro 6. Contenido de humedad en vástago y raíz de romero cultivado en dos ambientes de producción.

DDT	Vástago (%)		Raíz (%)	
	Casa Sombra	Invernadero	Casa Sombra	Invernadero
18	69.9 a, A	67.6 a, A	40.9 a, A	27.9 b, B
36	66.6 a, B	65.7 a, A	43.7 a, A	38.4 a, AB
56	40.3 a, C	37.8 a, B	34.6 a, A	44.0 a, A

DDT: Días después del trasplante. Letras minúsculas en la misma fila denota diferencias significativas entre ambientes, letras mayúsculas en la misma columna denota diferencias significativas entre fechas de corte (Tukey  $\alpha = 0.05$ ).

La falta de material vegetal impidió que se realizaran los análisis estadísticos correspondientes para determinar el efecto de la solución nutritiva sobre esta variable, en otras plantas medicinales como tomillo (*Thymus vulgaris*) y lavanda (*Lavandula angustifolia*) se ha observado una tendencia global similar a la de este trabajo cuando se cultivaron en ambientes protegidos acompañados de concentraciones graduales de salinidad en la solución nutritiva (Cordovilla *et al.*, 2014). Una respuesta similar ha sido reportado para *Puccinellia tenuiflora* y *Halogeton glomeratus*, especies halófitas, lo que sugiere que estos cambios en el contenido de humedad contribuyen a la reducción del potencial osmótico de las células lo que les permite conservar la turgencia (Yu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2015).

Respecto al contenido de humedad en la raíz, se encontraron diferencias entre ambientes de cultivo del romero a los 18 DDT donde los mayores valores se encontraron en las raíces de las plantas cultivadas en casa sombra (40.9 %) sin encontrarse diferencias estadísticas entre fechas de corte.

En plantas de salvia (*Salvia officinalis*), Taarit *et al.* (2012) reportaron una reducción en el contenido de humedad de la raíz al incrementar la concentración salina del medio de cultivo, contrario a lo esperado, en este trabajo se observó un incremento gradual en el

contenido de humedad de las raíces de las plantas de romero cultivadas en invernadero (Cuadro 6). Dado que el agua entra en las raíces en respuesta al gradiente de potencial hídrico establecido por la transpiración, es posible que estos resultados hayan sido influenciados por la diferencia de temperatura en los ambientes de producción, las condiciones en el invernadero pudieron haber inducido una serie de adaptaciones en las raíces con la finalidad de mantener el gradiente de potencial necesario para la absorción de agua y evitar la desecación (Sánchez y Aguirreolea, 2000; Ferrández, 2004).

#### 5.4. Acumulación de materia seca

A los 18 DDT se observó que en el ambiente invernadero, la acumulación de materia seca se incrementó hasta 102.67 %, mientras que en casa sombra el incremento fue de 45.83 %. La acumulación de materia seca a los 36 y 56 DDT en ambos ambientes, casa sombra e invernadero, resultaron similares estadísticamente (Cuadro 7).

Cuadro 7. Acumulación de materia seca (%) de romero cultivado en dos ambientes de producción.

DDT	Vástago (%)		Raíz (%)	
	Casa Sombra	Invernadero	Casa Sombra	Invernadero
18	45.83 b, C	102.67 a, C	33.75 a, A	33.75 a, A
36	120.54 a, B	126.49 a, B	94.08 a, A	108.31 a, A
56	439.58 a, A	416.67 a, A	103.98 a, A	65.74 a, A

DDT: Días después del trasplante. Letras minúsculas en la misma fila denota diferencias significativas entre ambientes, letras mayúsculas en la misma columna denota diferencias significativas entre fechas de corte (Tukey  $\alpha = 0.05$ ).

Respecto a lo anterior, este hecho podría atribuirse a que las condiciones de temperatura, luminosidad y humedad relativa en ambos ambientes de producción favorecieron la acumulación de fotoasimilados y a que las plantas de romero utilizadas en este ensayo se encontraban en estado vegetativo, período durante el cual la absorción nutrimental suele ser mayor debido a la formación de nuevos tejidos vegetales (Azcón y Talón, 2000; Silber y Bar-Tal, 2008). La acumulación de materia seca aumentó con la edad de la planta, aunque las plantas de romero cosechadas a los 56 DDT tuvieron un período mayor para crecer, González (2013) indica que este cultivo en campo está listo para la

cosecha 10 meses después del trasplante, aunque lo ideal es esperar hasta el pleno desarrollo del cultivo dos o tres años después de su establecimiento.

No se encontraron diferencias estadísticas en la acumulación de materia seca de la raíz en ninguno de los ambientes de producción, ni entre fechas de corte. Debido a falta de material vegetal no se realizaron los análisis correspondientes para determinar el efecto de la salinidad en esta variable.

### **5.5. Altura de planta**

En el Cuadro 8 se observa que por efecto de los ambientes de producción, la altura de planta de romero resultó diferente a los 18 DDT, encontrándose los mayores promedios en las plantas cultivadas en invernadero; al respecto, es posible que la intensidad luminosa inicial percibida en ese ambiente haya estimulado una acumulación mayor de carbohidratos (Lambers *et al.*, 2008). Sin embargo, el cultivo siguió un mismo ritmo de crecimiento el tiempo de duración del experimento en ambos ambientes de producción.

Al considerar el efecto de la solución nutritiva sobre la altura, el análisis de varianza permite observar un crecimiento homogéneo a los 18 y 36 DDT, observándose diferencias hasta los 56 DDT en donde la altura mayor de planta de romero se obtuvo con el tratamiento 1, sin diferencias estadísticas con los tratamientos 2, 5 y 7, los promedios oscilaron entre 41.04 y 35.98 cm (Cuadro 5). Resultados similares se reportaron en *Myrthus communis* cultivado con CE de 4 y 8 dS m<sup>-1</sup> cuando se usó NaCl (Acosta *et al.*, 2015).

Al analizar la interacción ambiente × solución nutritiva, se pudo observar homogeneidad en la altura de plantas de romero cultivadas en invernadero, mientras que en el ambiente casa sombra se encontraron diferencias altamente significativas atribuibles al efecto de la solución nutritiva, observándose que las plantas más altas se obtuvieron en el tratamiento 1 (42.92 cm) y las de menor altura en los tratamientos 3 y 4 (31.44 y 31.48 cm) (Cuadro A2, Apéndice).

La tendencia observada en esta variable coincide con lo reportado por Kiarostami *et al.* (2010) aunque las alturas de planta que reportaron cuando usaron NaCl fueron menores, 19.58 a 23.66 cm, en comparación con las de este trabajo, estas diferencias podrían atribuirse

a la concentración subóptima de algunos nutrientes que acompañaron a los tratamientos con NaCl en este ensayo (Sonneveld, 2004).

Cuadro 8. Comparación de medias para la variable altura de planta de romero por efecto del ambiente de producción y de las soluciones nutritivas.

Fuente de variación	Altura de planta (cm)		
	18 DDT	36 DDT	56 DDT
Ambiente			
Casa Sombra	30.066 b <sup>z</sup>	33.129 a	35.980 a
Invernadero	32.949 a	33.171 a	35.409 a
Solución Nutritiva			
1. SN 75% (Control)	31.950 a	35.050 a	41.040 a
2. SN 100%	33.000 a	33.340 a	38.140 ab
3. SN 640%	33.150 a	32.220 a	31.150 c
4. SN 870%	31.200 a	32.930 a	32.430 c
5. Control + 75 mM de NaCl	30.120 a	32.280 a	35.980 abc
6. Control + 100 mM de NaCl	30.600 a	33.350 a	34.820 bc
7. Control + 125 mM de NaCl	30.530 a	32.880 a	36.300 abc

DDT: Días después del trasplante, <sup>z</sup> Promedios con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey  $\alpha = 0.05$ ), SN: Solución nutritiva de Steiner (1984).

Por su parte, Alarcón *et al.* (2006) reportaron detrimentos en la altura de plantas de romero conforme se incrementó la concentración de NaCl hasta 70 mM en la solución nutritiva en plantas de más edad, esta condición pudo haber sido influenciada por el cultivar y la edad de la planta. Sin embargo, en vista de los cambios medioambientales futuros un adecuado manejo del agua de riego con altas conductividades podría ser una alternativa para el uso eficiente de recursos en etapas tempranas del cultivo que no comprometerían su ganancia de altura.

Aparentemente la adición de diferentes sales a la solución nutritiva, NaCl o todos los nutrientes, tuvieron efectos desiguales sobre el crecimiento vegetativo, lo cual fue observable en el análisis del efecto de la interacción ambiente  $\times$  solución nutritiva donde la solución nutritiva mostró diferencias en las plantas de romero cultivadas en ambiente casa sombra

(Cuadro A2, Apéndice). Los tratamientos 3 y 4 presentaron alturas estadísticamente menores al resto de los tratamientos con NaCl (32.28-32.93 cm) (Cuadro 8), lo que indica que el incremento de la salinidad en el medio de cultivo con sobredosis de nutrientes genera un detrimento mayor en el crecimiento de romero, este fenómeno también se ha observado en menta (*Mentha piperita*) y verbena (*Lipia citriodora*) (Tabatabaie y Nazari, 2007).

La restricción registrada al final del experimento en la altura de planta en los tratamientos 3 y 4 posiblemente se debió a una acumulación excesiva de sales en el sustrato, lo que generó una conductividad eléctrica tan alta que rebasó el umbral fisiológico de tolerancia a la salinidad del romero y eventualmente provocó la desecación osmótica de la planta (Sonneveld, 2004; Sánchez y Aguirreolea, 2000); inicialmente se observó la excreción de sales en las hojas basales y el necrosamiento de ramas y del meristemo apical (Figura 1).



Figura 1. Hojas de *Rosmarinus officinalis* afectadas por exceso de sales.

En este trabajo se demuestra parcialmente que *Rosmarinus officinalis* es una planta moderadamente tolerante a la salinidad como lo indican Miyamoto (2008) y Tounekti *et al.*, (2008), ya que el estrés salino promovido por soluciones nutritivas adicionadas con NaCl con alta CE por 56 días de tratamiento no redujeron el crecimiento.

## 5.6. Número de ramas

En el Cuadro 9 se observa que el número de ramas por planta fue diferente entre ambientes de producción a los 18 DDT, los valores más altos se encontraron en las plantas cultivadas en casa sombra; no obstante, a los 36 y 56 DDT no se observaron diferencias por efecto del ambiente. La diferencia inicial observada pudo haber sido influenciada por las condiciones de luz permitida por la cubierta de la casa sombra y su efecto sobre la tasa de crecimiento, ya que la formación de nuevas hojas permite interceptar un mayor porcentaje de radiación (Silber y Bar-Tal, 2008).

Cuadro 9. Comparación de medias para número de ramas en romero por efecto del ambiente de producción y de las soluciones nutritivas.

Fuente de variación	No. de ramas (planta <sup>-1</sup> )		
	18 DDT	36 DDT	56 DDT
Ambiente			
Casa Sombra	36.914 a <sup>z</sup>	37.743 a	44.514 a
Invernadero	31.571 b	39.514 a	43.114 a
Solución Nutritiva			
1. SN 75% (Control)	34.300 a	39.900 a	47.600 a
2. SN 100%	35.900 a	38.700 a	46.900 a
3. SN 640%	35.800 a	36.800 a	39.500 c
4. SN 870%	32.700 a	38.400 a	40.300 bc
5. Control + 75 mM de NaCl	34.900 a	37.900 a	43.400 abc
6. Control + 100 mM de NaCl	33.200 a	39.000 a	44.900 abc
7. Control + 125 mM de NaCl	32.900 a	39.700 a	44.800 abc

DDT: Días después del trasplante, <sup>z</sup> Promedios con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey ( $\alpha = 0.05$ ), SN: Solución nutritiva de Steiner (1984).

Las diferencias en el número de ramas planta<sup>-1</sup> por efecto de la solución nutritiva se manifestaron hasta los 56 DDT, donde los tratamientos 3 y 4 registraron los valores menores, 39.5 y 40.3 ramas·planta<sup>-1</sup>, el resto de los tratamientos resultaron con valores estadísticamente similares que fluctuaron entre 43.4 a 47.6 ramas·planta<sup>-1</sup> (Cuadro 9). La exposición prolongada a la salinidad gradualmente reduce la respiración como parte de la disminución

en la asimilación de carbono por lo que en estas condiciones todos los procesos metabólicos asociados con el crecimiento se desaceleran (Lambers *et al.*, 2008).

En la interacción ambiente × solución nutritiva, las plantas de romero cultivadas en el ambiente casa sombra mostraron diferencias en el número de ramas atribuibles al efecto de la solución nutritiva observándose que el incremento de la concentración en el medio de cultivo disminuyó la formación de brotes (Cuadro A3, Apéndice). Los resultados de esta variable fueron parecidos a la tendencia observada para la variable altura de planta.

### **5.7. Contenido de prolina**

El contenido de prolina resultó diferente en las tres fechas de muestreo en ambos ambientes de producción. Las plantas de romero cultivado en invernadero registraron el mayor contenido de prolina a los 36 y 56 DDT con 2.067  $\mu\text{mol/g}$  y 1.313  $\mu\text{mol/g}$ , respectivamente (Cuadro 10). Aunque estos valores difieren de los reportados en *Thymus vulgaris* donde el contenido de prolina incrementó en condiciones de campo en comparación con las condiciones de malla sombra, lo cual sugiere que las condiciones en el invernadero de alguna manera aseveraron el estrés inducido y estimularon una mayor síntesis de este metabolito (Zrig *et al.*, 2016). Además de actuar como osmolito, en diversas condiciones de estrés abiótico, la prolina funciona como un chaperón molecular que conserva la integridad de proteínas y membranas, estabiliza el pH del citosol y neutraliza especies reactivas al oxígeno (Kishor *et al.*, 2005; Hayat *et al.*, 2012).

Respecto al contenido de prolina por efecto de la solución nutritiva se observaron diferencias estadísticas a los 18, 36 y 56 DDT. Durante el tiempo del experimento, los valores menores en contenido de prolina se obtuvieron en el tratamiento 1 mientras que los valores mayores se encontraron en el tratamiento 3, sin embargo, no difirió estadísticamente de lo obtenido en el tratamiento 4 a los 36 y 56 DDT (Cuadro 10).

La interacción ambiente × solución nutritiva mostró que en ambos ambientes la acumulación de prolina incrementó considerablemente en concentraciones superiores al 640% de la solución nutritiva de Steiner (1984) (Cuadro A4, Apéndice).

Lo anterior indica que el efecto osmótico que puede ocasionar el NaCl es diferente del originado por una concentración excesiva de todos los nutrientes. Aunque la tendencia

observada de la prolina a incrementarse a medida que la salinidad aumentó coincidió con otras especies medicinales cuando se trabajó con altas concentraciones de NaCl; los valores de prolina obtenidos en esta investigación son superiores a los reportados en *Mentha piperita*, pero inferiores a los de *Satureja hortensis* y *Matricaria chamomilla* (Roodbari *et al.*, 2013; Akbari *et al.*, 2013; Afzali *et al.*, 2009).

Cuadro 10. Comparación de medias para contenido de prolina en romero por efecto del ambiente de producción y de las soluciones nutritivas.

Fuente de variación	Prolina ( $\mu\text{mol/g}$ )		
	18 DDT	36 DDT	56 DDT
Ambiente			
Casa Sombra	2.495 a <sup>z</sup>	1.810 b	0.748 b
Invernadero	1.567 b	2.068 a	1.313 a
Solución Nutritiva			
1. SN 75% (Control)	0.183 d	0.590 d	0.078 d
2. SN 100%	0.858 c	1.060 cd	0.105 d
3. SN 640%	3.143 a	3.305 a	2.846 a
4. SN 870%	2.440 b	3.305 a	2.953 a
5. Control + 75 mM de NaCl	2.290 b	1.510 cd	0.372 cd
6. Control + 100 mM de NaCl	2.603 b	1.432 bc	0.938 b
7. Control + 125 mM de NaCl	2.680 b	1.997 b	0.690 bc

DDT: Días después del trasplante, <sup>z</sup> Promedios con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey  $\alpha = 0.05$ ), SN: Solución nutritiva de Steiner (1984).

La revisión de Hayat *et al.* (2012) permite comprender la relación entre la acumulación de prolina con el estrés salino en plantas. En condiciones de salinidad las plantas necesitan estrategias para sobrevivir en ambientes hostiles, uno de los mecanismos fisiológicos más eficientes para sobrevivir a condiciones de estrés, es el ajuste osmótico en el que los tejidos reducen su potencial osmótico mediante la acumulación una variedad de metabolitos de tal manera que éstos les ayuden a conservar la turgencia (Wu *et al.*, 2013; Zrig *et al.*, 2016). Al inicio del experimento se observó un incremento progresivo del contenido de prolina conforme la concentración de la solución nutritiva aumentó, adicionalmente, la disminución observada a través del tiempo permite inferir que la edad de

la planta influye en su capacidad de sintetizar y regular la concentración de este aminoácido durante el tiempo que dura el estrés (Xu *et al.*, 2014).

### 5.8. Contenido total de fenoles

Cabe señalar que los métodos de aislamiento de los compuestos fenólicos se fundamentan en sus propiedades ácidas y polaridad; debido a la metodología y sustancias de referencia usadas es posible que el contenido de fenoles se muestre diferente. En la mayor parte de las investigaciones, el equivalente usado es el ácido gálico (GAE) con base en el cual se consideran niveles bajos valores inferiores a 12 mg g<sup>-1</sup> (Kahkonen *et al.*, 1999). En el presente estudio, el estándar de equivalencia fue el ácido cafeico (CAE), del que deriva el ácido rosmarínico, producto natural reconocido de *Rosmarinus officinalis* y de otras Lamiaceae con importantes propiedades biológicas (Park *et al.*, 2008).

En el Cuadro 11 se observa que el contenido de fenoles totales resultó diferente entre los ambientes de producción, donde las plantas de romero cultivadas en invernadero obtuvieron los mayores valores en los tres muestreos (163.996 – 178.244 µg CAE/100 g). Estos valores difieren de los de Zrig *et al.* (2016), quienes reportaron 6.46 mg ácido gálico g<sup>-1</sup> PF (promedio) de fenoles totales en *Thymus vulgaris* cultivado en casa sombra, con un aporte de 500-700 mM m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> PAR, éstas últimas condiciones de luminosidad son similares a las registradas en invernadero en este trabajo (Cuadro 4), lo que sugiere que el contenido de fenoles totales podría ser sensible a la luz. Al respecto, Ghasemzadeh *et al.* (2010) observaron que la variación de los niveles de radiación influyen en la acumulación y distribución de fenoles en *Zingiber officinale* en el que se obtuvieron resultados mayores con 460 – 790 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (34.16 - 39.06 mg ácido gálico g<sup>-1</sup> PS).

Con respecto al efecto de la solución nutritiva en el contenido total de fenoles en plantas de romero no se observaron diferencias significativas al inicio del experimento. Las diferencias se encontraron a partir de los 36 DDT, donde el valor máximo se reportó en el tratamiento 1 (173.789 µg CAE/100 g) y el mínimo en el tratamiento 2 (157.605 µg CAE/100 g); las plantas de romero de los tratamientos 3 y 4 murieron debido a las altas concentraciones de la solución nutritiva, por lo que no fueron considerados en los análisis de varianza posteriores (Cuadro 11).

Cuadro 11. Comparación de medias para la variable contenido total de fenoles en romero por efecto del ambiente de producción y de las soluciones nutritivas.

Fuente de variación	Fenoles Totales ( $\mu\text{g CAE}/100 \text{ g}$ )		
	18 DDT	36 DDT	56 DDT
Ambiente			
Casa Sombra	173.451 b <sup>z</sup>	162.154 b	169.632 b
Invernadero	178.244 a	163.996 a	175.605 a
Solución Nutritiva			
1. SN 75% (Control)	169.908 a	173.789 a	179.382 a
2. SN 100%	176.947 a	157.605 d	173.724 a
3. SN 640%	174.645 a	167.079 b	- <sup>y</sup>
4. SN 870%	169.908 a	163.000 bc	-
5. Control + 75 mM de NaCl	174.974 a	158.987 cd	171.158 ab
6. Control + 100 mM de NaCl	182.474 a	161.092 cd	162.868 b
7. Control + 125 mM de NaCl	182.079 a	159.974 cd	175.961 a

DDT: Días después del trasplante, <sup>z</sup> Promedios con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey  $\alpha = 0.05$ ), SN: Solución nutritiva de Steiner (1984), <sup>y</sup>: Datos no recolectados por muerte de plantas.

A los 56 DDT el valor más bajo se reportó en el tratamiento 6 (162.868  $\mu\text{g CAE}/100 \text{ g}$ ) mientras que los valores máximos se registraron en los tratamientos 1, 2, 5 y 7, con valores de 179.382 a 171.158  $\mu\text{g CAE}/100 \text{ g}$ , pero sin diferencias estadísticas entre ellos (Cuadro 11).

El análisis de interacción ambiente  $\times$  solución nutritiva, mostró que en el ambiente casa sombra, el mayor contenido de fenoles totales se obtuvo con el tratamiento 7 mientras que en el ambiente invernadero fue con el tratamiento 1 (187.47 y 187.08  $\mu\text{g CAE}/100\text{g}$ , respectivamente) (Cuadro A5, Apéndice).

Los valores registrados en este trabajo son mayores a los de Chizzola *et al.* (2008) y Juárez *et al.* (2011) quienes reportaron valores que oscilaron entre 65.1 y 68.05  $\mu\text{g CAE}/100 \text{ g}$  en *Thymus vulgaris* cultivado en diferentes condiciones agronómicas; lo cual sugiere que el cultivo de romero es una especie con una importante producción de compuestos fenólicos.

Kiarostami *et al.* (2010) trabajaron el cultivo de romero sin la utilización de una solución nutritiva complementaria y reportaron que el contenido mayor de fenoles totales se obtuvo con 100 mM NaCl (4.22 mg de ácido gálico/g<sup>-1</sup>) mientras que con 150 mM NaCl observaron una disminución (3.47 mg de ácido gálico/g<sup>-1</sup>). En la presente investigación, la adición de NaCl no afectó significativamente el contenido total de fenoles en extractos de romero con respecto a las plantas control con excepción del tratamiento 6 (100 mM NaCl) a los 56 DDT, es posible que esta respuesta fuera influenciada por el estado nutricional de la planta, aunque se requerirá mayor experimentación para corroborarlo.

En investigaciones realizadas en otras especies de la familia Lamiaceae los resultados en el contenido total de fenoles son contradictorios. Por su parte, Taarit *et al.* (2012) observaron que el contenido de fenoles totales disminuyó en proporción a los niveles altos de salinidad en *Salvia officinalis*, con 75 mM NaCl registró 40.66 mg GAE g<sup>-1</sup> PS, pero con 100 mM NaCl disminuyó a 27.78 mg GAE g<sup>-1</sup> PS. Mientras que Zrig *et al.* (2016) observaron en *Thymus vulgaris* que dos semanas de tratamiento con concentraciones de 50 y 150 mM NaCl incrementaron el contenido de fenoles en plantas cultivadas a campo abierto.

Tounekti *et al.* (2011) identificaron y cuantificaron en extractos de romero la concentración de los diterpenos fenólicos, sus resultados mostraron que la concentración de estos compuestos no se modificó con 100 mM NaCl en comparación con el control. En este estudio el contenido mayor de fenoles totales se registró en el tratamiento 1 a los 18, 36 y 56 DDT, lo que permite sugerir que no es necesaria la manipulación de la solución nutritiva con exceso de sales para obtener un contenido mayor de fenoles totales en romero.

### **5.9. Índice de actividad antioxidante**

Respecto al índice de actividad antioxidante (AAO) no se encontraron diferencias estadísticas en el porcentaje de inhibición de DPPH por efecto del ambiente de cultivo en esta variable a los 18 DDT; las diferencias se observaron a los 36 y 56 DDT donde las plantas de romero cultivado en ambiente invernadero registraron la AAO mayor (Cuadro 12). Es posible que tal respuesta está en función de la radiación fotosintéticamente activa recibida en el ambiente. Esta tendencia es contraria a la reportada por Ghasemzadeh *et al.* (2010) en extractos de *Zingiber officinale* donde se observó una disminución de la actividad antioxidante al aumentar la intensidad luminosa, dada la importancia biológica de este tipo

de compuestos y su papel como antioxidantes en la nutrición humana, debe considerarse el uso de diferentes ambientes controlados para su producción.

Por efecto de la solución nutritiva se observaron diferencias estadísticas sobre el índice de actividad antioxidante de plantas de romero durante el tiempo que duró el experimento. A los 36 DDT se presentaron diferencias estadísticamente significativas para los tratamientos 3 y 4 con respecto a los demás tratamientos, lo cuales obtuvieron los valores menores (44.9 y 41.4 %) (Cuadro 12). Al respecto, se sabe que la salinidad genera estrés oxidativo, lo que significa que acelera la oxidación de un sistema biológico, los antioxidantes disminuyen los efectos adversos de las especies reactivas al oxígeno. Es posible que estos valores se encontraran debido al estrés oxidativo inducido por las concentraciones altas de todos los nutrientes presentes en la solución del sustrato que estimularon una producción mayor de especies reactivas de oxígeno (Miller *et al.*, 2010).

Cuadro 12. Comparación de medias para la variable de índice de actividad antioxidante por efecto del ambiente de producción y de las soluciones nutritivas.

Fuente de variación	Actividad Antioxidante (% de inhibición de DPPH)		
	18 DDT	36 DDT	56 DDT
Ambiente			
Casa Sombra	51.221 a <sup>z</sup>	57.932 b	69.645 b
Invernadero	50.180 a	67.029 a	78.790 a
Solución Nutritiva			
1. SN 75% (Control)	63.296 a	67.181 a	90.915 a
2. SN 100%	51.724 b	70.888 a	76.613 b
3. SN 640%	37.868 c	44.944 b	- <sup>y</sup>
4. SN 870%	49.380 b	41.476 b	-
5. Control + 75 mM de NaCl	50.124 b	70.563 a	74.166 b
6. Control + 100 mM de NaCl	52.525 ab	71.970 a	64.390 c
7. Control + 125 mM de NaCl	49.986 b	70.340 a	65.001 c

DDT: Días después del trasplante, <sup>z</sup> Promedios con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey  $\alpha = 0.05$ ), SN: Solución nutritiva de Steiner (1984), <sup>y</sup>: Datos no recolectados por muerte de plantas.

En este ensayo la severidad y duración del estrés rebasaron la habilidad del tejido para aclimatarse y las plantas de los tratamientos 3 y 4 murieron en ambos ambientes de producción; razón por la cual no se consideraron en el análisis de varianza subsecuente.

La interacción ambiente  $\times$  solución nutritiva mostró que con la solución nutritiva de Steiner al 75 % obtuvo el mayor índice de actividad antioxidante en ambos ambientes, observándose mayores porcentajes de inhibición de DPPH en el extracto fenólico de las plantas de romero cultivadas en el ambiente invernadero (94.05 %). Tanto en ambiente casa sombra como en invernadero el índice de actividad antioxidante disminuyó conforme incrementó la concentración de la solución nutritiva. (Cuadro A6, Apéndice).

El índice de actividad antioxidante tiende a cambiar de manera significativa a medida que incrementa la concentración de la solución nutritiva y tiene una respuesta diferencial en cuanto a la sal que la ocasiona, el tratamiento 1 se mantuvo con los mayores porcentajes de inhibición el cual fue una condición sin estrés, mientras que los valores menores se registraron en los tratamientos 6 y 7 con 64.39 y 65.00 %, los cuales en su formulación contenían 100 mM y 125 mM de NaCl, respectivamente.(Cuadro 12 y A6, Apéndice).

En esta investigación, *Rosmarinus officinalis* mostró una disminución en el índice de actividad antioxidante conforme incrementó la salinidad del medio de cultivo, tendencia parecida a la observada por Kiarostami *et al.* (2010) y Oueslati *et al.* (2010). Sin embargo, los porcentajes de inhibición del DPPH observados en este experimento son superiores a los reportados por Chizzola *et al.* (2008) (22-55%) y Juárez *et al.* (2011) (43.88 %) en *Thymus vulgaris*.

Debido a sus propiedades y estructura, los compuestos fenólicos son extractos complejos que presentan una alta actividad antioxidante, la cual está dada por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes, de la interacción entre ellos y del ambiente en el que se encuentran, eventualmente pueden producirse efectos potenciadores o inhibidores (Frankel y Meyer, 2000). Los resultados obtenidos permiten sugerir que no es recomendable inducir el estrés salino en plantas de romero para producir compuestos antioxidantes de origen natural.

## 5.10. Composición de aceites esenciales

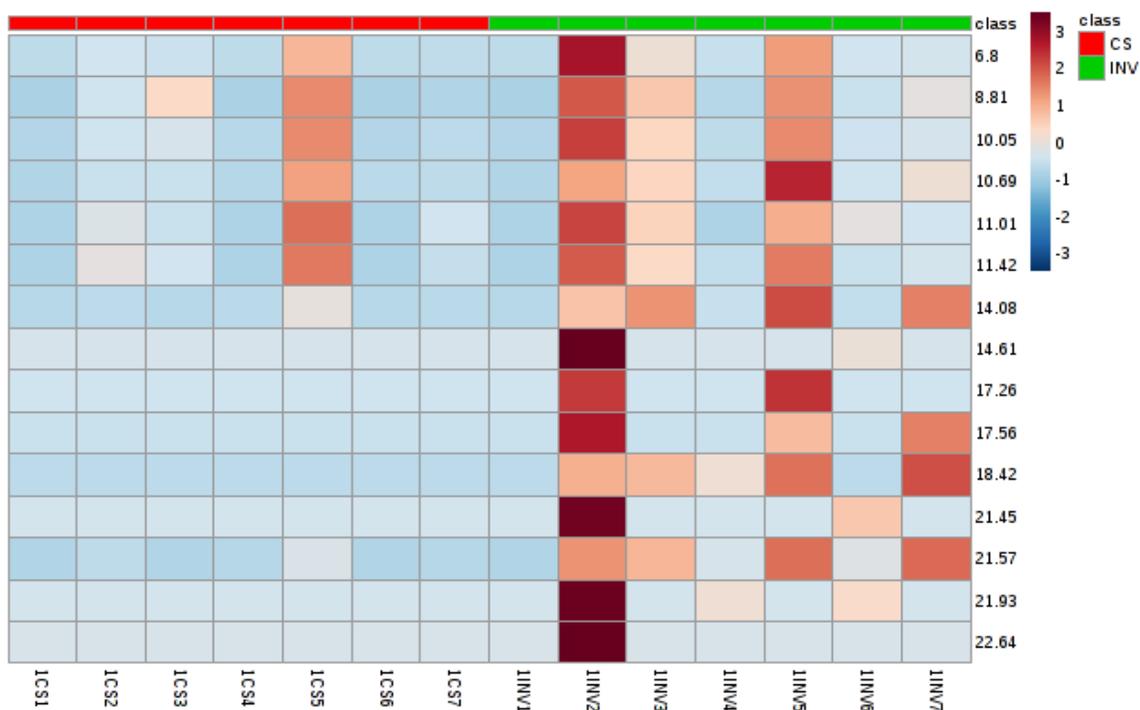
El aceite esencial de romero obtenido no pudo ser completamente separado de la fase acuosa, por lo que no fue posible determinar el rendimiento y por tal motivo no se realizaron sus respectivos análisis estadísticos.

El análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas detectó los componentes más abundantes del aceite esencial de romero, los cuales fueron, eucaliptol (Tr 6.8), linalol (Tr 8.81), camfor (Tr 10.05), borneol (Tr 10.69), 4-terpineol (Tr 11.01), acetato de bornilo (Tr 11.42), timol (Tr 14.08), metil eugenol (Tr 14.61), cariofileno (Tr 17.56)  $\alpha$ -cariofileno (Tr 18.42), spathulenol (Tr 21.45), óxido de cariofileno (Tr 21.57), Tau-cadinol (Tr 21.93) y delta cadinense (Tr 22.64). Dichos compuestos coinciden en parte con los reportados en aceite esencial de romero originario de Brasil, Egipto, Irán, Italia y Túnez (Angioni *et al.*, 2004; Leithy *et al.*, 2006; Langroudi *et al.*, 2013; Frescura *et al.*, 2018; Tounekti *et al.*, 2008).

La cromatografía de gases mostró que el número de iones para timol, metil eugenol, cariofileno,  $\alpha$ -cariofileno, spathulenol, Tau-cadinol y delta cadinense fue de cero en todos los tratamientos incluido testigo en el ambiente casa sombra (Figuras A8-A12, A14 y A15, Apéndice). Sin embargo, los mismos compuestos mostraron diferencias en concentración en el ambiente invernadero (Figura 2). Lo que sugiere que las condiciones en invernadero, especialmente la radiación solar y la temperatura, promovieron cambios en las rutas metabólicas para la producción de aceite esencial (Morais, 2009).

Tanto en ambiente casa sombra como en invernadero los compuestos identificados por cromatografía de gases se mostraron inconsistentes debido a que no mostraron ninguna tendencia lineal, exponencial, etc.; dichos compuestos fueron eucaliptol, linalol, camfor, borneol, 4-terpineol, terpineol, acetato de bornilo y oxido de cariofileno, aunque resultaron en mayor contenido que el testigo (Figuras A1-A7 y A13). Por su parte, Tounekti *et al.* (2011) encontraron que la acumulación de compuestos de aceite esencial como camfor,  $\alpha$ -terpineol y borneol mostró diferencias de acuerdo a la composición de la solución nutritiva utilizadas en el medio de cultivo y que no respondió positivamente en todos los casos. Adicionalmente, la concentración de algunos compuestos como 1-8 cineol (eucaliptol) puede ser influenciada, entre otras cosas, por la duración del tratamiento salino y la edad de la planta. Dado que la

concentración de compuestos varía de acuerdo al tiempo de la cosecha, se ha de observar el compuesto de interés y llevar un control muy riguroso de la concentración nutrimental de las hojas para obtener un perfil determinado de aceite esencial (Tounekti *et al.*, 2008; Frescura *et al.*, 2018).



Class: Ambiente de producción, CS: Casa sombra, INV: Invernadero.

Figura 2. Estimación de la variación de compuestos identificados en aceite esencial de romero producido en ambiente casa sombra e invernadero. Los valores se codificaron en color para representar la concentración relativa de cada compuesto.

## 6. CONCLUSIONES

Con base a los objetivos e hipótesis planteados en esta tesis, se llegó a las siguientes conclusiones:

Las condiciones de cultivo, en casa sombra e invernadero, no tuvieron efecto en el contenido de humedad o acumulación de materia seca del vástago y la raíz, ni en la altura de planta y número de ramas de romero.

La acumulación de prolina en romero así como el contenido total de fenoles y su índice de actividad antioxidante fueron altamente influenciados por el ambiente de cultivo, los promedios mayores se encontraron en las plantas de romero cultivadas en invernadero.

Las soluciones nutritivas adicionadas con NaCl no afectaron la altura de planta y número de ramas de romero. Sin embargo, concentraciones altas de la solución nutritiva de Steiner (640 y 870 %) redujeron sobre la altura de planta y número de ramas de romero.

La acumulación de prolina estuvo influenciada por la composición de la solución nutritiva, los valores mayores se obtuvieron con la solución nutritiva de Steiner al 640 y 870 %.

El contenido total de fenoles y el índice de actividad antioxidante estuvo afectado por la composición de la solución nutritiva, el cual fue mayor con solución nutritiva de Steiner al 75 %.

La composición de aceite esencial de romero fue diferente entre ambientes de crecimiento. En casa sombra se identificaron eucaliptol, linalol, camfor, borneol, 4-terpineol, acetato de bornilo y oxido de cariofileno. Mientras que en invernadero adicionalmente se identificaron timol, metil eugenol, cariofileno,  $\alpha$ -cariofileno, spathulenol, Tau-cadinol y delta cadinense.

## 7. LITERATURA CITADA

- Acosta, M. U. R., Díaz, V. P., Álvarez, S. Fernández, G. N. Sánchez, B. M. J. and Hernández, J. A. 2015. NaCl-Induced physiological and biochemical adaptative mechanisms in the ornamental *Myrtus communis* L. plants. *Journal of Plant Physiology*. 183:41-51.
- Afzali, S. F., Shariatmadari, H. and Hajabbasi, M. A. 2009. Sodium chloride effects on seed germination, growth and ion concentration in Chamomile (*Matricaria chamomilla*). *Iran Agricultural Research*. 8(2): 107-118.
- Akbari, S., Kordi, S., Fatahi, S. and Ghanbari, F. 2013. Physiological responses of summer savory (*Satureja hortensis* L.) under salinity stress. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. 5(15): 1702-1708.
- Alarcón, J. J., Morales, M. A., Ferrández, T. and Sánchez, B. M. J. 2006. Effects of water and salt stresses on growth, water relations and gas exchange in *Rosmarinus officinalis*. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 81(5): 845-853.
- Álvarez, A., Baños, R. y Otero, L. 2008. Salinidad y uso de aguas salinas para la irrigación de cultivos y forrajes en Cuba. *Ciencia y Tecnología Ganadera*. 2(1): 1-12.
- Angioni, A., Barra, A., Cereti, E., Barile, D., Coisson, J. D., Arlorio, M., Dessi, S., Coroneo, V. and Cabras, P. 2004. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antigungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 3530-3535.
- Ávila, S.R., Navarro, C. A. R., Vera, L. O., Dávila, M. R. M., Melgoza, P. N. y Meza, P. R. 2011. Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): una revisión de sus usos no culinarios. *Ciencia y Mar*, XV. 43: 23-36.
- Azcón, B. J. y Talón, M. 2000. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Ed. Interamericana-McGraw-Hill. Madrid, España. 522 p.
- Bareño, P. 2006. El cultivo de Romero (*Rosmarinus officinalis*). En: Últimas tendencias en hierbas aromáticas culinarias para exportación en fresco. *Memorias Curso de Extensión*. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Bogotá. pp. 102,103.
- Bates, L. E., Waldern, R. P. and Teare, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*. 39:205-207.
- Beretta, G., Artali, R., Facino M. R. and Gelmini, F. 2011. An analytical and theoretical approach for the profiling of the antioxidant activity of essential oils. The case of

*Rosmarinus officinalis* L. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 55: 1255-1264.

- Bernal, R., A.M. 2014. Evaluación del enraizamiento de esquejes de dos cultivares de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) Crespo e Israelí. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, Colombia. 106 p.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier E. 2001. Review Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science. 161: 839–851.
- Campos, G., García, M., Pérez, D. y Ramis, C. 2011. Respuesta de 20 variedades de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) ante el estrés por NaCl durante la germinación y fase plantular. Bioagro. 23: 215-224.
- Chauhan, R. K., Anwar, M., Chand, S. and Patra, D. D. 2012. Influence of different dates of planting on growth, herb, oil yield and quality of essential oil of menthol mint (*Mentha arvensis*) in the North Indian Plain. Archives of Agronomy and Soil Science. 58(2): 223-232.
- Chen, T. H. H. and Murata, N. 2002. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. Current Opinion in Plant Biology. 5: 250-257.
- Chizzola, R., Michitsch, H. and Franz, C. 2008. Antioxidative properties of *Thymus vulgaris* leaves: Comparison of different extracts and essential oil chemotypes. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56: 6897-6904.
- Cordovilla, M. P., Bueno, M., Aparicio, C. and Urrestarazu, M. 2014. Effects of salinity and the interaction between *Thymus vulgaris* and *Lavandula angustifolia* on growth, ethylene production and essential oil content. Journal of Plant Nutrition 37(6): 875-888.
- Cortés, R. M. E., Cañón, A. F. A., Rodríguez, C. D. y Pérez, T. M. M. 2013. Efecto de la densidad de siembra y el ambiente de cultivo sobre el rendimiento y la calidad de tallos de los cultivares de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) Crespo e Israelí. Revista facultad de Ciencias Básicas. 9 (2): 186-199.
- Duarte, B., Santos, D., Marques, J.C. and Caçador, I. 2013. Ecophysiological adaptations of two halophytes to salt stress: photosynthesis, PS II photochemistry and antioxidant feedback e Implications for resilience in climate change. Plant Physiology Biochemistry. 67: 178-188.

- Fernández, P.J. 1996. Cultivo de plantas medicinales, aromáticas y condimentarias. Ediciones Omega. Barcelona, pp. 32-35, 218-221.
- Ferrández, T. 2004. Estudio ecofisiológico del romero (*Rosmarinus officinalis* L.) en ambientes semiáridos: Aplicaciones agronómicas y paisajísticas. Ph. D. Thesis. Universidad de Murcia, Murcia, España. 225 p.
- Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G. and Scheffer, J. C. J. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oil. *Flavor and Fragrance Journal*. 23: 213-226.
- Flowers, T. J. and Colmer, T. D. 2008. Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist*. 179(4): 945-963.
- Frankel, E. and Meyer, A. 2000. The problems of using one dimensional methods to evaluate multidimensional food and biological antioxidants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 80: 1925-1941.
- Frescura, V. D. S., Boligon, A. A., Barbosa, F. M., De-Souza, J. M., Lerner, M. A., Laughinghouse, I. V. H. D., Da-Silva. C. D. B., Andriolo, J. L. Lopes, S. J. and Tedesco, S. B. 2018. Nutrient solution concentration and collection time in phytomass production, content, yield and chemical composition of essential oil of rosemary. *Journal of Plant Nutrition*. 41(10): 1293-1302.
- García, M. S., Trejo, T. L. I., Gómez, M. F. C., Espinosa, V. D., Herrera, C. E. B., Tavitas, F. L. and Hernández, A. L. 2011. Physiological response of rice plants growing under osmotic stress in hydroponics. *Acta Horticulturae*. 947: 401-408.
- Ghasemzadeh, A., Jaafer, H. Z. E., Rahmat, A., Wahab, P. E. M. and Halim M. P. A. 2010. Effect of different light intensities on total phenolic and flavonoids synthesis and anti-oxidant activities in young ginger varieties (*Zingiber officinale* Roscoe). *International Journal of Molecular Sciences*. 11: 3885-3897.
- González, M. A. 2013. Guía técnica del cultivo de romero (*Rosmarinus officinalis* L.). Edit. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur, México. 72 p.
- Graciano, C. M. J. 2012. Caracterización de la actividad antioxidante de los jugos de pulpa de mango (*Manguifera indica* L.) provenientes de tres municipios de mayor producción en el estado de Nayarit. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nayarit. pp. 13, 24, 25.

- Hasegawa, P. M., Bressan, R., Zhu, J. K. and Bohnert, H. J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 51: 463-499.
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J. and Ahmad, A. 2012. Role of proline under changing environments: A review. *Plant Signaling & Behaviour*. 7(11): 1-11.
- Jenks, M. A. and Hasegawa, P. M. 2005. *Plant Abiotic Stress*. India. Blackwell Publishing Ltd. 270 p.
- Jordán, J. M., Lax, V., Rota, C. M., Lorán, S. and Sotomayor, J. A. 2013. Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. *Food Control*. 30: 463-468.
- Jordán, M. J., Lax, V., Rota, M. C., Lorán, S. and Sotomayor, J. A. 2013. Effect of the phenological stage on the chemical composition and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and its polyphenolic extract. *Industrial Crops and Products*. 48: 144-152.
- Juárez, R. C. R., Craker, L. E., Rodríguez, M. M. N. and Aguilar, C. J. A. 2011. Humic substances and moisture content in the production of biomass and bioactive constituents of *Thymus vulgaris* L. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 34 (3): 183-188.
- Juárez, R. C., Aguilar, C. J., Juárez, R. M., Bugarín, M. R., Juárez, L. P. y Cruz, E. 2013. Hierbas aromáticas y medicinales en México: tradición e innovación. *Revista Bio Ciencias*. 2:119-129.
- Kahkonen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kulaja, T. S. and Heinonen, M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 47(10): 3954-3962.
- Kasrati, A., Alaoui, J. C., Bekkouche, K., Wohlmuth, H., Leach, D. and Abbad, A. 2014. Plant growth, mineral nutrition and volatile oil composition of *Mentha suaveolens* subsp. *timija* (Briq.) Harley cultivated under salt stress conditions. *Industrial Crops and Products*. 59: 80-84.
- Kiarostami, K., Mohseni, R., Saboora, A. 2010. Biochemical changes of *Rosmarinus officinalis* under salt stress. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. 6(3): 114-122.
- Kishor, K. P. B., Sangam, S., Amrutha, R. N., Laxmi, P. S., Naidu, K. R., Rao, K. R. S. S., Rao, S., Reddy, K. J., Theriappan P. and Sreenivasulu, N. 2005. Regulation of proline

- biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*. 8(3): 424-438.
- Ksouri, R., Ksouri, W. M., Jallali, I., Debez, A., Magné, C., Hiroko, I. and Abdelly, C. 2011. Review Article: Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 1–38.
- Lambers, H. Chapin, III F. S., and Pons, T. L. 2008. *Plant physiological ecology*. Second Edition. Springer. Australia, USA, The Netherlands. 604 p.
- Lamz, P. A. y González, C. M. C. 2013. La salinidad como problema en la agricultura: La mejora vegetal una solución inmediata. *Cultivos Tropicales* 34 (4): 31-42.
- Langroudi, M. E., Sedaghatoor, S. and Bidarigh, S. 2013. Effect of different salinity levels on the composition of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*. 13(1): 68-71.
- Leithy, S., El-Meseiry, T. A. and Adballah, E. F. 2006. Effect of biofertilizer, cell stabilizer and irrigation regime on rosemary herbage oil yield and quality. *Journal of Applied Sciences Research*. 2(10): 773-779.
- Li, Y.; Fabiano, T. A. S. and Chemat, F. 2014. *Essential oils as reagents in green chemistry*. Springer. 71 p.
- Makkar, P. S. H.; Siddhuraju, P. and Becker, K. 2007. *Plant secondary metabolites. Methods in molecular biology* 393. Humana Press. 130 p.
- Marcano, D. y Hasegawa, M. 2002. *Fitoquímica Orgánica*. Segunda Edición. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Universidad Central de Venezuela. 593 p.
- Martinetti, L., Quarttrini, E., Bononi, M. and Tateo, F. 2006. Effect of the mineral fertilization on the yield and the oil content of two cultivars of rosemary. *Acta Horticulturae*. ISHS. 723: 399-404.
- Mercado, M. G., Carrillo, R. L. Wall-Medrano, A., López, D. J. A. y Álvarez-Padilla, E. 2013. Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de especies típicas consumidas en México. Revisión. *Nutrición Hospitalaria*. 28 (1): 36-46.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci, Y. S. and Mitter, R. 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environment*. 33: 453-467.

- Miyamoto, S. 2008. Salt tolerance of landscape plants common to the Southwest. Texas Water Resources Institute. Consultada el 13 de junio de 2018, en: <http://hdl.handle.net/1969.1/86110>.
- Moncayo, L. M. R., Álvarez, R. V. P., González, C. G., Salas, P. L. y Chávez, S. J. A. 2015. Producción orgánica de albahaca en invernadero en la Comarca Lagunera. *Terra Latinoamericana*. 33(1): 69-77.
- Morais, L. A. S. 2009. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira*. 27: 4050-4063.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*. 25: 239-250.
- Munns, R., James, R. A. and Läuchli, A. 2006. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany*. 57:1025-1043.
- Munns, R. and Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*. 59: 651-681.
- Muñoz, F. 2000. Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado. Madrid ediciones Mundi- Prensa. España. 266 p.
- Murillo, A. B., Nieto, G. A., López, A. R. Troyo, D. E., Rueda, P. E. O., Flores, H. A. and Ruiz, E. F. H. 2013. Physiological, morphometric characteristics and yield of *Origanum vulgare* L. and *Thymus vulgaris* L. exposed to open-field and shade-enclosure. *Industrial Crops and Products*. 49: 659-667.
- Neocleous, D. and Ntatsi, G. 2018. Seasonal variations of antioxidants and other agronomic features in soilless production of selected fresh aromatic herbs. *Scientia Horticulturae*. 234: 290-299.
- Nourhene, B., Bahloul, N., Slimen, I. B. and Kechaou, N. 2009. Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial Crops and Products*. 29: 412-419.
- Oueslati, S., Karray-Bouraoui, N., Attia, H., Rabhi, M., Ksouri, R. and Lachaal, M. 2010. Physiological and antioxidant responses of *Mentha pulegium* (Pennyroyal) to salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 32: 289-296.
- Parida, A. K. and Das, A. B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 60: 324-349.

- Park, U. S., Uddin, M. R., Xu, H., Kim, Y. K. and Lee, S. Y. 2008. Biotechnological applications for rosmarinic acid production in plant: Review. *African Journal of Biotechnology*. 7(25): 4959-4965.
- Porres, M. M., González, B. E., Carretero, M. E. and Gómez, M. P. 2014. Influence of phenological stage on chemical composition and antioxidant activity of *Salvia lavandulifolia* Vahl. essential oils. *Industrial Crops and Products*. 53: 71– 77.
- Ramakrishna, A. and Ravishankar, G. A. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*. 6(11): 1720-1731.
- Rath, K. M. and Rousk, J. 2014. Salt effects on the soil microbial decomposer community and their role in organic carbon cycling: A review. *Soil Biology and Biochemistry*. 81: 108–123.
- Reyes, P. J. J., Murillo, A. B., Nieto, G. A., Troyo, D. E., Reynaldo, E. I. M., Rueda, P. E. O. y Cuervo, A. J. L. 2014. Crecimiento y desarrollo de variedades de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) en condiciones de salinidad. *Terra Latinoamericana*. 32(1): 35-45.
- Ribeiro, S. R., Carvalho, C. D., Cavaleiro, C., Costa, S. H., Gonçalves, A. T., Conceição, C. M., Ramos, F., Melo, R. N. and Sanches, S. A. 2015. A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Trends in Food Science & Technology*. 45: 355-368.
- Roodbari, N., Roodbari, S., Ganjali, A., Sabeghi, N. F. and Ansarifard, M. 2013. The effect of salinity stress on growth parameters and essential oil percentage of peppermint (*Mentha piperita* L.). *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*. 1(9): 1009-1015.
- Rouphael, Y., Kyriacou, M. C., Petropoulos, S. A., De Pascale, S., and Colla, G. 2018. Review: Improving vegetable quality in controlled environments. *Scientia Horticulturae*. 234: 275-289.
- Sahar, K., Amin, B. and Taher, N. M. 2011. The salicylic acid effect on the *Salvia officinalis* L. sugar, protein and proline contents under salinity (NaCl) stress. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. 7(4): 80-87.
- Salido, S., Altarejos, J., Nogueras, M. and Sánchez, A. 2003. Chemical composition and seasonal variations of rosemary oil from southern Spain. *Journal of Essential Oil Research*. 15:10-14.

- Sánchez, D. M. y Aguirreolea, J. 2000. Transporte en floema. In: Fundamentos de Fisiología Vegetal. McGraw-Hill Interamericana y Edicions Universitat de Barcelona, España. pp. 45-64.
- Sandoval, V. M., Sánchez, G. P. y Alcántar, G. G. 2008. Principios de la hidroponía y del fertirriego. In: Alcántar, G. G. y Trejo-Téllez, L. I. (eds). Nutrición de Cultivos. Colegio de Postgraduados. Mundi-Prensa. México. pp. 373-438.
- Sardans, J., Roda, F. y Peñuelas, J. 2005. Effects of water and nutrient pulse supply on *Rosmarinus officinalis* growth, nutrient content and flowering in the field. *Environmental and Experimental Botany*. 53(1): 1-11.
- SAS Institute. 2007. Statistical Analysis System. Release 9.2. Cary NC. USA.
- Scherer, R. and Texeira H.G. 2009. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*. 112:654-658.
- Schwab, K. B. and Gaff, D. F. 1990. Influence of compatible solutes on soluble enzymes from desiccation-tolerant *Sporobolus stapfianus* and desiccation-sensitive *Sporobolus pyramidalis*. *Journal of Plant Physiology*. 137: 208-215.
- Schwabe, K. A., Kan, I. and Knapp, K. C. 2006. Drain water management for salinity mitigation in irrigated agriculture. *American Journal of Agricultural Economics*. 88(1): 135-149.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2017. Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera. Consultada el 04 de junio de 2018, en: <http://www.siap.gob.mx/>
- Shabala, S. 2013. Review: Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. *Annals of Botany*. 112: 1209–1221.
- Silber, A. and Bar-Tal, A. 2008. Nutrition of substrate-grown plants in soilless culture: Theory and Practice. Elsevier. London, UK. pp 291-342.
- Sonneveld, C. 2004. La nutrición mineral y salinidad en los cultivos sin suelo: su manejo. In: Tratado de cultivos sin suelo. 3ra Edición. Ediciones Mundi-Prensa. España. pp. 305-367.
- Steiner, A. A. 1984. The universal nutrient solution. Proceeding Sixth International Congress on Soilless Culture. Wageningen. The Netherlands. P. 633-650.

- Taarit, B. M. K., Msaada, K., Hosni, K., Hammami, M., Kchouk, E. and Marzouk, B. 2009. Plant growth, essential oil yield and composition of sage (*Salvia officinalis* L.) fruits cultivated under salt stress conditions. *Industrial Crops and Products*. 30 (3): 333–337.
- Taarit, B. M., Msaada, K., Hosni, K. and Marzouk, B. 2012. Physiological changes, phenolic content and antioxidant activity of *Salvia officinalis* L. grown under saline conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92: 1614-1619.
- Tabatabaie, S. J. and Nazari, J. 2007. Influence of nutrient concentrations and NaCl salinity on the growth, photosynthesis and essential oil content of peppermint and lemon verbena. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 31: 245-253.
- Tounekti, T., Vadel, A M., Bedoui, A. and Khemira, H. 2008. NaCl stress affects growth and essential oil composition in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 83(2): 267-273.
- Tounekti, T., Vadel, A. M., Ennajeh, M., Khemira, H. and Munné-Bosch, S. 2011. Ionic interactions and salinity affect monoterpene and phenolic diterpene composition in Rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 174: 504-514.
- Trivellini, A., Lucchesini, A., Maggini, R., Mosadegh, H., Villamarin, T. S. S., Vernieri, P., Mensuali-Sodi, A. and Pardossi, A. 2016. *Lamiaceae* phenols as multifaceted compounds: bioactivity, industrial prospects and role of “positive-stress”. *Industrial Crops and Products*. 83: 241-254.
- Wang, J., Meng, Y., Li, B., Ma, X., Lai, Y., Si, E., Yang, K., Xu, X., Shang, X., Wang, H. and Wang, D. 2015. Physiological and proteomic analyses of salt stress response in the halophyte *Halogeton glomeratus*. *Plant Cell and Environment*. 38: 655-669.
- Westervelt, P. 2003. Effect of growing medium and irrigation rate on growth of *Rosmarinus officinalis*. M.Sc. Thesis. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia. 51 p.
- Wu, D., Cai, S., Chen, M., Ye, L., Chen, Z., Zhang, H., Dai, F., Wu, F. and Zhang, G. 2013. Tissue metabolic responses to salt stress in wild and cultivated Barley. *Plos One*. 8(1): 1-11.
- Xiong, L. and Zhu, J. K. 2002. Molecular and genetic aspect of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment*. 25: 131-139.

- Xu, H. M., Tam, N. F. Y., Zan, Q. J., Bai, M., Shin, P. K. S., Vrijmoed, L. L. P., Cheung, S. E. and Liao, W. B. 2014. Effect of the anatomical features and physiology of a semi-mangrove plant *Myoporum bontioides*. *Marine Pollution Bulletin*. 85: 738-746.
- Yu, J., Chen, S., Zhao, Q., Wang, T., Yang, C., Díaz, C., Sun, G. and Dai, S. 2011. Physiological and proteomic analysis of salinity tolerance in *Puccinellia tenuiflora*. *Journal of Proteome Research*. 10: 3852-3870.
- Zaouali, Y., Chograni, H., Trimech, R. and Boussaid, M. 2013. Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var. *typicus* Batt. organs during growth and incidence on the antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*. 43: 412– 419.
- Zhu, J. K. 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology*. 6(5): 441-445.
- Zidan, I., Azaizeh, H. and Newman, P.M. 1990. Does salinity reduce growth in maize root epidermal cells by inhibiting their capacity for cell wall acidification. *Plant Physiology*. 93: 7–11.
- Zrig, A., Tounekti, T., AbdElgaward, H. Hegab, M. M., Ali, S. O. and Khemira, H. 2016. Essential oils, amino acids and polyphenols changes in salt-stressed *Thymus vulgaris* exposed to open-field and shade enclosure. *Industrial Crops and Products*. 91: 223-230.

## **APÉNDICE**

Cuadro A1. Contrastes ortogonales para las variables de crecimiento, prolina, fenoles y actividad antioxidante de *Rosmarinus officinalis* por efecto de la interacción ambiente de producción por solución nutritiva.

Tratamientos	Altura (cm)	No. de Ramas (planta <sup>-1</sup> )	Prolina ( $\mu\text{mol/g}$ )	Fenoles ( $\mu\text{g CAE/100 g}$ )	Actividad Antioxidante (% de inhibición de DPPH)
CS SN1 vs. INV SN1	0.1540 <sup>NS</sup>	0.2989 <sup>NS</sup>	0.0037**	0.0013**	0.0289*
CS SN2 vs. INV SN2	0.9872 <sup>NS</sup>	0.7420 <sup>NS</sup>	0.4033 <sup>NS</sup>	0.3502 <sup>NS</sup>	0.0104**
CS SN3 vs. INV SN3	0.6039 <sup>NS</sup>	0.7353 <sup>NS</sup>	0.0001**	0.3351 <sup>NS</sup>	0.0001**
CS SN4 vs. INV SN4	0.4683 <sup>NS</sup>	0.8448 <sup>NS</sup>	0.0332**	0.5855 <sup>NS</sup>	0.1069 <sup>NS</sup>
CS SN5 vs. INV SN5	0.6139 <sup>NS</sup>	0.1214 <sup>NS</sup>	0.2413 <sup>NS</sup>	0.0180*	0.0001**
CS SN6 vs. INV SN6	0.6032 <sup>NS</sup>	0.8448 <sup>NS</sup>	0.0001**	0.0001**	0.0001**
CS SN7 vs. INV SN7	0.9390 <sup>NS</sup>	0.8962 <sup>NS</sup>	0.0012**	0.0005**	0.6336 <sup>NS</sup>

CS: Casa sombra, INV: Invernadero, SN: Solución nutritiva, <sup>NS</sup> No significativo a  $P \leq 0.05$ , \* Significativo a  $P \leq 0.05$ , \*\* Altamente significativo a  $P \leq 0.01$ , <sup>y</sup> Datos no recolectados debido a muerte de plantas.

Cuadro A2. Efecto de la interacción ambiente de producción por solución nutritiva para la variable altura de planta de *Rosmarinus officinalis*.

Tratamiento	Altura de planta (cm)		
	18 DDT	36 DDT	56 DDT
<b>Ambiente Casa Sombra</b>			
1. SN 75% (Control, C)	29.80 a <sup>z</sup>	37.06 a	42.92 a
2. SN 100%	31.00 a	31.76 a	39.04 ab
3. SN 640%	32.20 a	31.72 a	31.44 c
4. SN 870%	29.40 a	35.49 a	31.48 c
5. C + 75 mM de NaCl	28.50 a	31.00 a	36.64 abc
6. C + 100 mM de NaCl	30.20 a	33.12 a	34.14 bc
7. C + 125 mM de NaCl	29.36 a	31.30 a	36.20 abc
Pr > F	0.7379	0.068	0.0001**
<b>Ambiente Invernadero</b>			
1. SN 75%	34.10 a	33.04 a	39.16 a
2. SN 100%	35.00 a	34.92 a	37.24 a
3. SN 640%	34.10 a	32.72 a	30.86 a
4. SN 870%	33.00 a	29.92 a	33.38 a
5. C + 75 mM de NaCl	31.74 a	33.56 a	35.32 a
6. C + 100 mM de NaCl	31.00 a	33.58 a	35.50 a
7. C + 125 mM de NaCl	31.70 a	34.46 a	36.40 a
Pr > F	0.5359	0.323	0.1227

SN: Solución nutritiva de Steiner (1984), DDT: Días después del trasplante, <sup>z</sup> Promedios con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey ( $\alpha = 0.05$ ), \*\* Altamente significativo a  $P \leq 0.01$ ).

Cuadro A3. Efecto de la interacción ambiente de producción por solución nutritiva para la variable número de ramas por planta de *Rosmarinus officinalis*.

Tratamiento	Número de ramas (planta <sup>-1</sup> )		
	18 DDT	36 DDT	56 DDT
Ambiente Casa Sombra			
1. SN 75% (Control, C)	30.00 a <sup>z</sup>	39.80 a	49.20 a
2. SN 100%	33.40 a	36.60 a	46.60 ab
3. SN 640%	33.60 a	34.80 a	39.60 b
4. SN 870%	30.80 a	40.40 a	40.60 b
5. C + 75 mM de NaCl	31.20 a	36.00 a	45.80 ab
6. C + 100 mM de NaCl	31.60 a	37.80 a	45.20 ab
7. C + 125 mM de NaCl	30.40 a	38.80 a	44.60 ab
Pr > F	0.9579	0.385	0.0077*
Ambiente Invernadero			
1. SN 75%	38.60 a	40.00 a	46.00 a
2. SN 100%	38.40 a	40.80 a	45.80 a
3. SN 640%	38.00 a	38.80 a	39.40 a
4. SN 870%	34.60 a	36.40 a	40.00 a
5. C + 75 mM de NaCl	38.60 a	39.80 a	41.00 a
6. C + 100 mM de NaCl	34.80 a	40.20 a	44.60 a
7. C + 125 mM de NaCl	35.40 a	40.60 a	45.00 a
Pr > F	0.353	0.722	0.235

SN: Solución nutritiva de Steiner (1984), DDT: Días después del trasplante, <sup>z</sup>Promedios con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey ( $\alpha = 0.05$ ), \* Significativo a  $P \leq 0.05$ ).

Cuadro A4. Efecto de la interacción ambiente de producción por solución nutritiva para la variable prolina de *Rosmarinus officinalis*.

Tratamiento	Prolina ( $\mu\text{mol/g}$ )		
	18 DDT	36 DDT	56 DDT
Ambiente Casa Sombra			
1. SN 75% (Control, C)	0.27 c <sup>z</sup>	0.58 c	-
2. SN 100%	1.60 b	- <sup>y</sup>	0.17 b
3. SN 640%	3.23 a	3.31 a	2.50 a
4. SN 870%	3.23 a	3.31 a	-
5. C + 75 mM de NaCl	2.99 a	1.39 b	0.47 b
6. C + 100 mM de NaCl	2.93 a	0.72 c	0.19 b
7. C + 125 mM de NaCl	3.23 a	1.54 b	0.41 b
Pr > F	0.0001**	0.0001**	0.0001**
Ambiente Invernadero			
1. SN 75%	0.10 c	0.60 d	0.08 d
2. SN 100%	0.15 c	1.06 cd	0.04 d
3. SN 640%	3.06 a	3.30 a	3.19 a
4. SN 870%	1.65 b	3.30 a	2.95 a
5. C + 75 mM de NaCl	1.59 b	1.62 bcd	0.27 d
6. C + 100 mM de NaCl	2.28 b	2.14 abc	1.68 b
7. C + 125 mM de NaCl	2.13 b	2.45 ab	0.97 c
Pr > F	0.0001**	0.0001**	0.0001**

SN: Solución nutritiva de Steiner (1984), DDT: Días después del trasplante, <sup>z</sup> Promedios con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey ( $\alpha = 0.05$ )), \*\* Altamente significativo a  $P \leq 0.01$ , <sup>y</sup> Datos no recolectados debido a muerte de plantas.

Cuadro A5. Efecto de la interacción ambiente de producción por solución nutritiva para la variable contenido total de fenoles en *Rosmarinus officinalis*.

Tratamiento	Contenido total de fenoles ( $\mu\text{g CAE}/100\text{g}$ )		
	18 DDT	36 DDT	56 DDT
Ambiente Casa Sombra			
1. SN 75% (Control, C)	170.24 a	181.81 a	171.68 ab
2. SN 100%	165.50 a	148.92 e	175.76 ab
3. SN 640%	174.45 a	169.18 b	- <sup>y</sup>
4. SN 870%	163.26 a	161.81 c	-
5. C + 75 mM de NaCl	179.18 a	157.87 cd	165.76 bc
6. C + 100 mM de NaCl	180.50 a	161.81 c	150.50 c
7. C + 125 mM de NaCl	181.03 a	153.66 de	184.45 a
Pr > F	0.039*	0.0001**	0.0011*
Ambiente Invernadero			
1. SN 75%	169.58 a	165.76 a	187.08 a
2. SN 100%	188.40 a	166.29 a	171.68 b
3. SN 640%	174.84 a	164.18 a	-
4. SN 870%	176.55 a	164.18 a	-
5. C + 75 mM de NaCl	170.76 a	160.10 a	176.55 ab
6. C + 100 mM de NaCl	184.44 a	160.37 a	175.24 ab
7. C + 125 mM de NaCl	183.13 a	166.29 a	167.47 b
Pr > F	0.038*	0.060	0.017*

SN: Solución nutritiva de Steiner (1984), DDT: Días después del trasplante, <sup>z</sup> Promedios con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey ( $\alpha = 0.05$ )), \* Significativo a  $P \leq 0.05$ , \*\* Altamente significativo a  $P \leq 0.01$ , <sup>y</sup> Datos no recolectados debido a muerte de plantas.

Cuadro A6. Efecto de la interacción ambiente de producción por solución nutritiva para la variable índice de actividad antioxidante de *Rosmarinus officinalis*.

Tratamiento	Índice de actividad antioxidante (% de inhibición de DPPH)		
	18 DDT	36 DDT	56 DDT
<b>Ambiente Casa Sombra</b>			
1. SN 75% (Control, C)	71.46 a	69.63 a	87.77 a
2. SN 100%	43.54 b	77.73 a	80.33 b
3. SN 640%	41.46 b	37.11 c	- <sup>y</sup>
4. SN 870%	47.24 b	39.19 c	-
5. C + 75 mM de NaCl	52.34 ab	71.15 a	62.11 c
6. C + 100 mM de NaCl	56.04 ab	55.19 b	53.66 d
7. C + 125 mM de NaCl	46.46 b	55.51 b	67.33 c
Pr > F	0.0053**	0.0001**	0.0001**
<b>Ambiente Invernadero</b>			
1. SN 75%	55.13 ab	64.73 b	94.05 a
2. SN 100%	59.90 a	64.05 ab	72.89 b
3. SN 640%	34.27 d	52.78 c	-
4. SN 870%	51.52 bc	43.76 d	-
5. C + 75 mM de NaCl	47.90 c	69.97 b	86.22 a
6. C + 100 mM de NaCl	49.01 bc	88.74 a	75.11 b
7. C + 125 mM de NaCl	59.90 a	85.17 a	65.67 b
Pr > F	0.0001**	0.0001**	0.0001**

SN: Solución nutritiva de Steiner (1984), DDT: Días después del trasplante, <sup>z</sup> Promedios con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey ( $\alpha = 0.05$ ), \*\* Altamente significativo a  $P \leq 0.01$ , <sup>y</sup> Datos no recolectados debido a muerte de plantas.

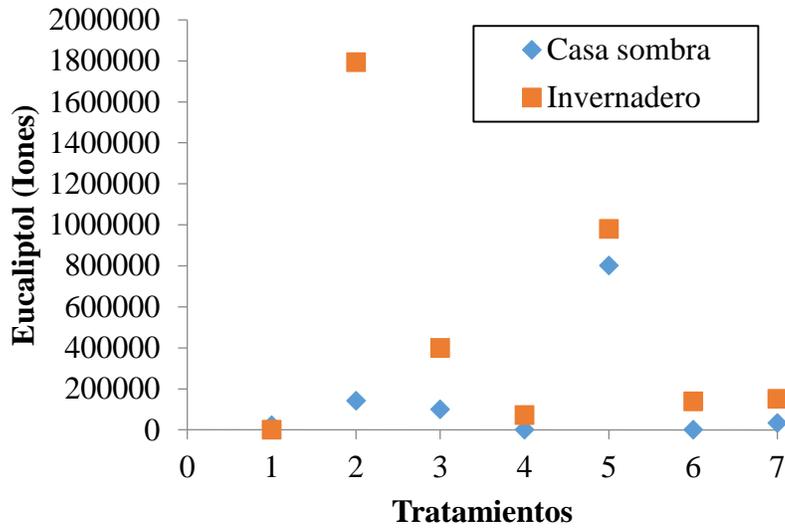


Figura A1. Contenido de eucaliptol identificado en *Rosmarinus officinalis* cultivado en dos ambientes de producción.

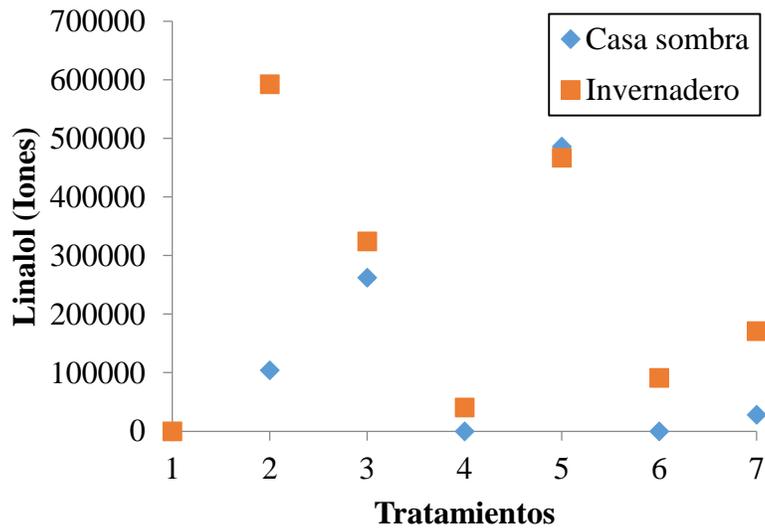


Figura A2. Contenido de linalol identificado en *Rosmarinus officinalis* cultivado en dos ambientes de producción.

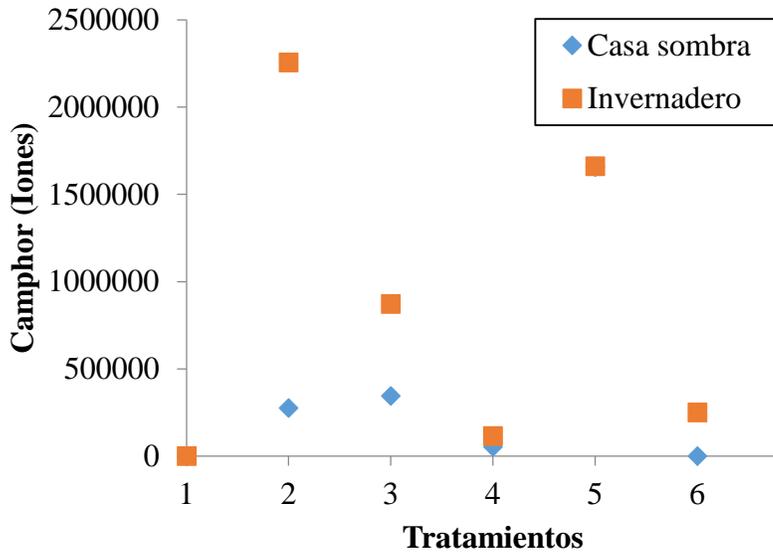


Figura A3. Contenido de camfor identificado en *Rosmarinus officinalis* cultivado en dos ambientes de producción.

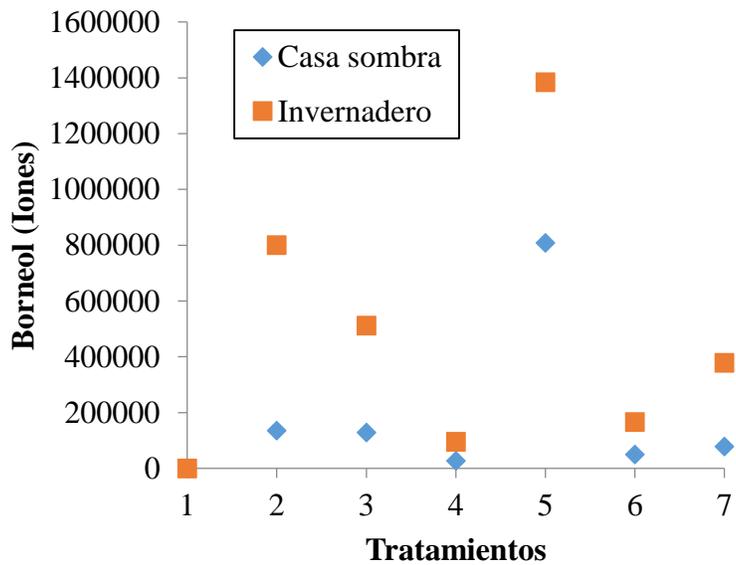


Figura A4. Contenido de borneol identificado en *Rosmarinus officinalis* cultivado en dos ambientes de producción.

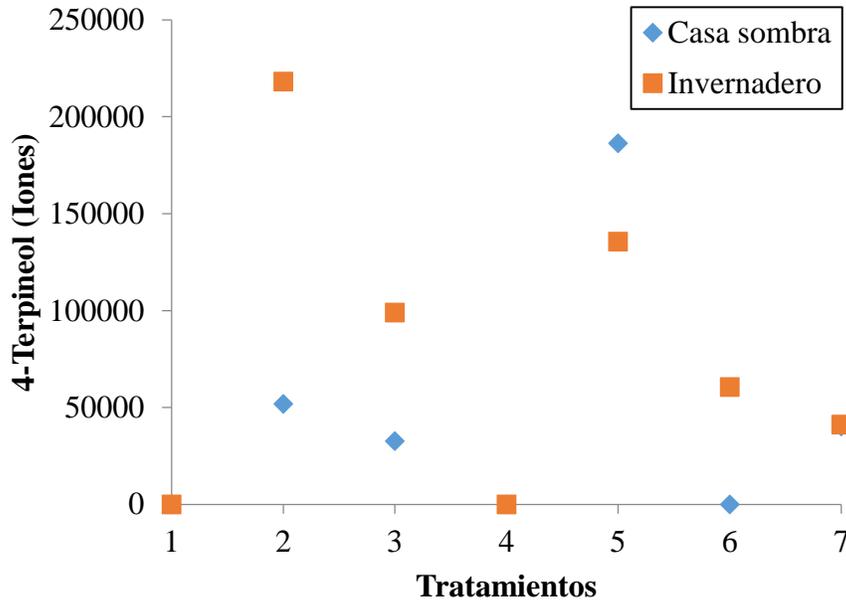


Figura A5. Contenido de 4-terpineol identificado en *Rosmarinus officinalis* cultivado en dos ambientes de producción.

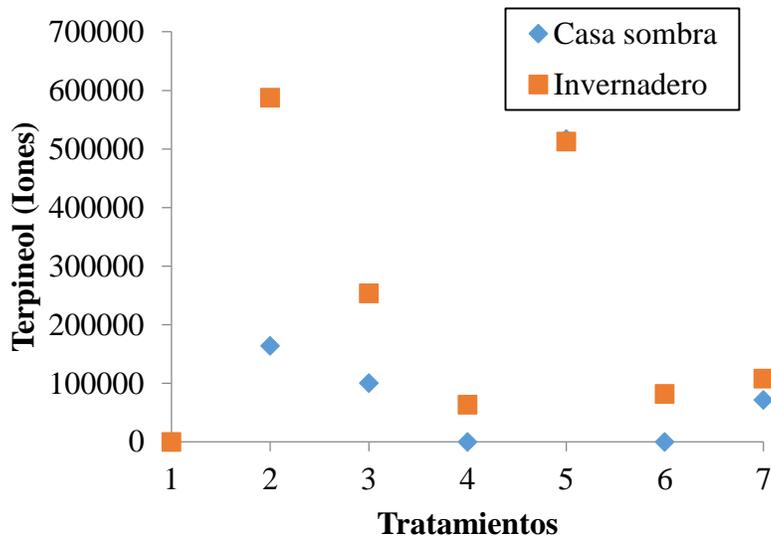


Figura A6. Contenido de terpineol identificado en *Rosmarinus officinalis* cultivado en dos ambientes de producción.

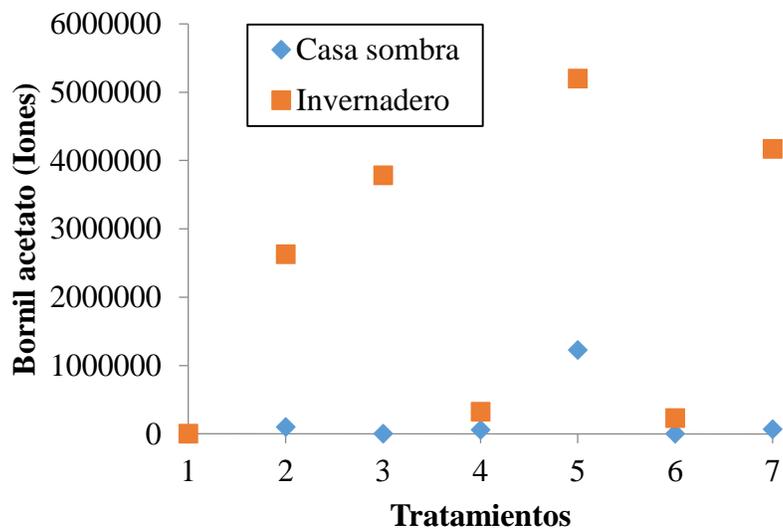


Figura A7. Contenido de acetato de bornilo identificado en *Rosmarinus officinalis* cultivado en dos ambientes de producción.

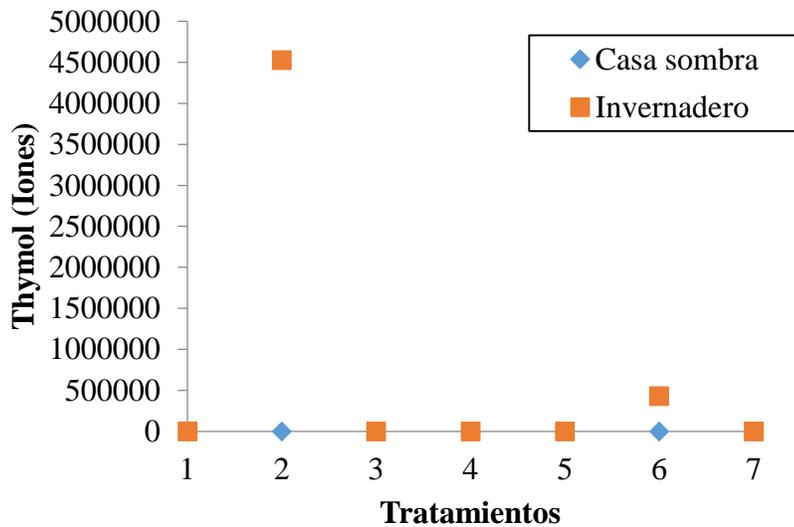


Figura A8. Contenido de timol identificado en *Rosmarinus officinalis* cultivado en dos ambientes de producción.

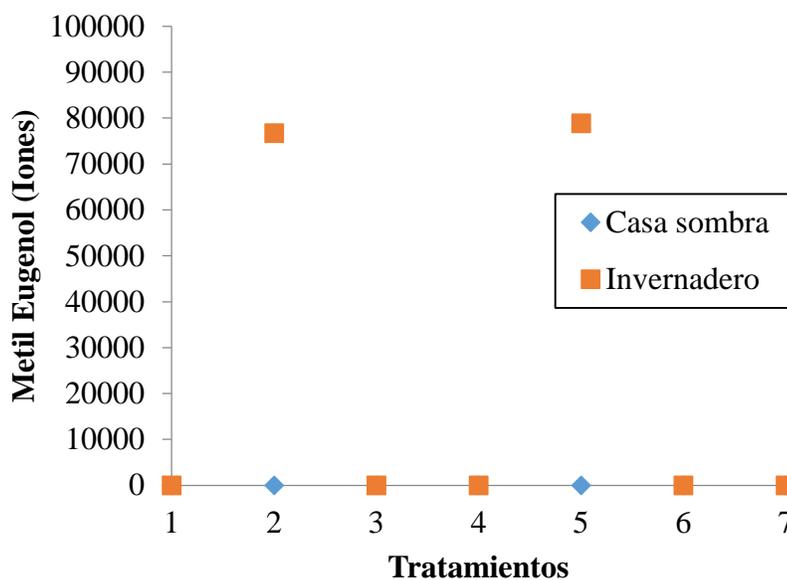


Figura A9. Contenido de metil eugenol identificado en *Rosmarinus officinalis* cultivado en dos ambientes de producción.

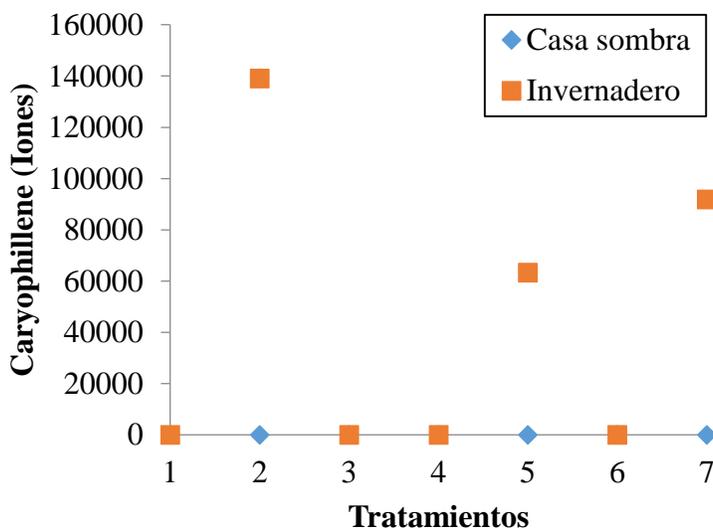


Figura A10. Contenido de cariofileno identificado en *Rosmarinus officinalis* cultivado en dos ambientes de producción.

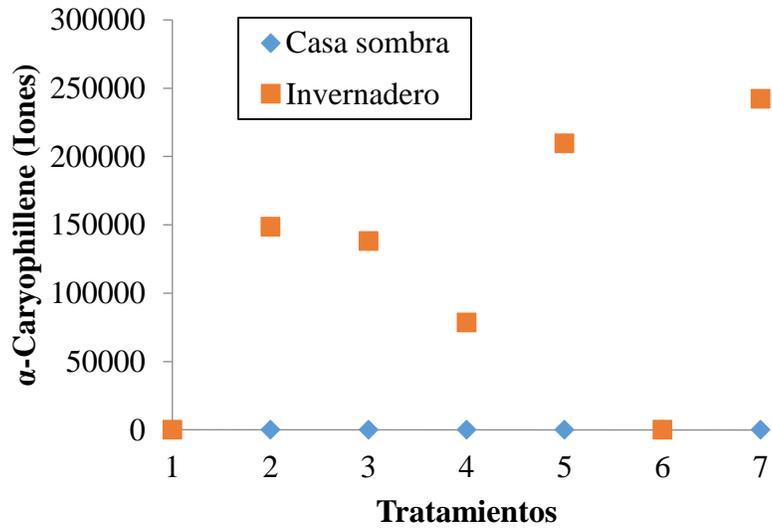


Figura A11. Contenido de  $\alpha$ -carofileno identificado en *Rosmarinus officinalis* cultivado en dos ambientes de producción.

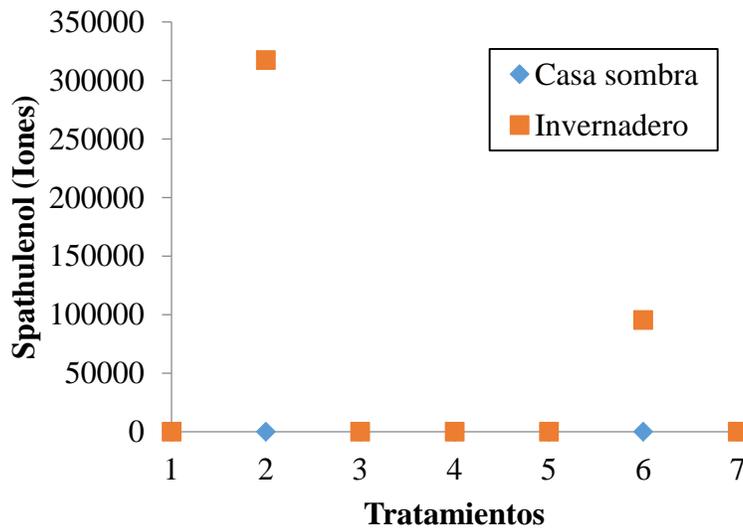


Figura A12. Contenido de spathulenol identificado en *Rosmarinus officinalis* cultivado en dos ambientes de producción.

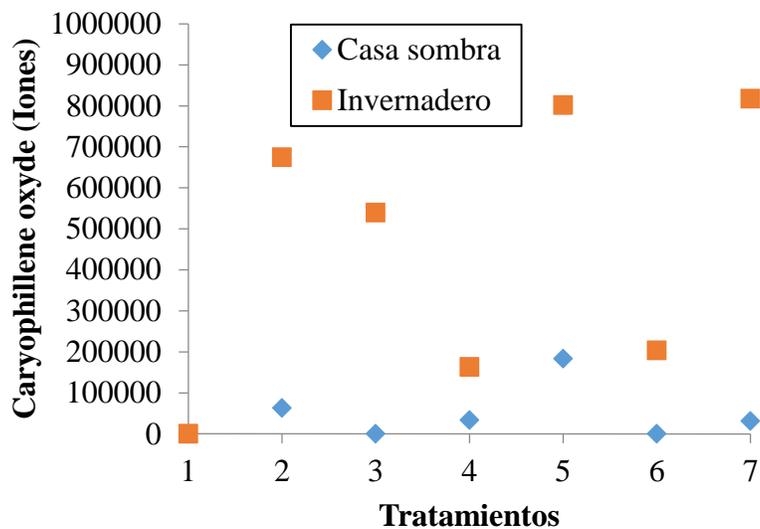


Figura A13. Contenido de óxido de cariofileno identificado en *Rosmarinus officinalis* cultivado en dos ambientes de producción.

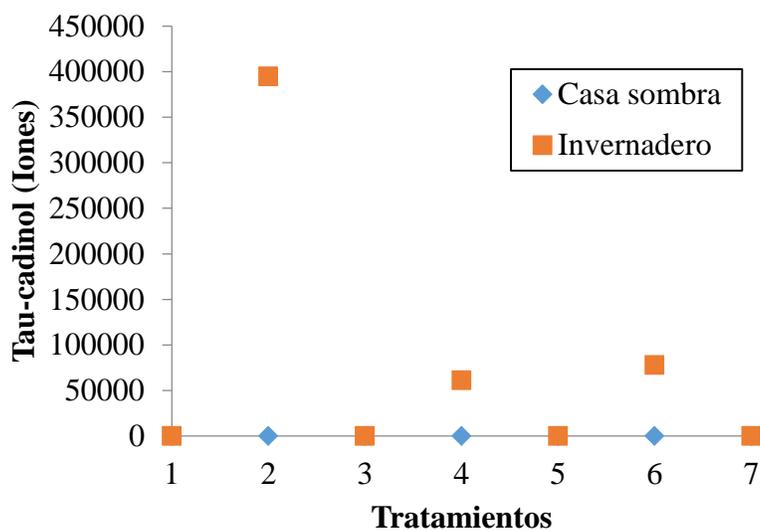


Figura A14. Contenido de Tau-cadinol identificado en *Rosmarinus officinalis* cultivado en dos ambientes de producción.

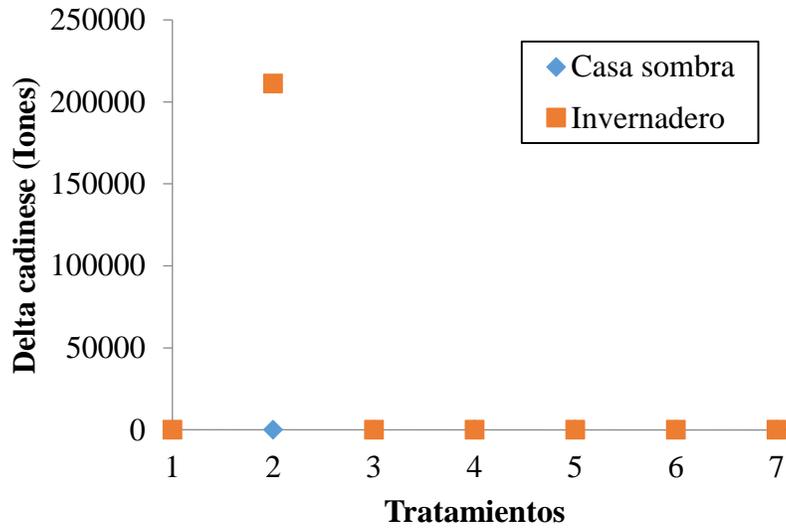


Figura A15. Contenido de delta cadinense identificado en *Rosmarinus officinalis* cultivado en dos ambientes de producción.