

Metabolitos secundarios y clorofilas en cempasúchil en respuesta a estrés salino*

Secondary metabolites and chlorophyll in cempasúchil in response to salinity stress

Ma. Guadalupe Peralta-Sánchez¹, Libia Iris Trejo-Téllez^{1§}, Fernando Carlos Gómez-Merino², Ma. de las Nieves Rodríguez-Mendoza¹, Miguel Ángel Serrato-Cruz³ y J. Cruz García-Albarado²

¹Colegio de Postgraduados- Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km. 36.5, Montecillo, Municipio de Texcoco, Estado de México. C. P. 56230. México. (mgperalta@colpos.mx; marinie@colpos.mx). ²Colegio de Postgraduados-Campus Córdoba. Carretera Córdoba-Veracruz, km. 348, Congr. Manuel León, Municipio de Amatlán de los Reyes, Veracruz. C. P. 94946. México. (fernandg@colpos.mx; jcruz@colpos.mx). ³Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Carretera México-Texcoco km 38.5, Montecillo, Municipio de Texcoco, Estado de México. C. P. 56230. México. (serratoacruz@gmail.com). [§]Autora para correspondencia: tlibia@colpos.mx.

Resumen

Factores de estrés bióticos y abióticos tienen influencia en la biosíntesis de metabolitos secundarios en algunas especies medicinales. En este sentido, se ha reportado que el estrés salino altera las propiedades bioquímicas de un gran número de cultivos. En este contexto, esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto del tratamiento que dos niveles de NaCl (10 y 47 mM) adicionados a la solución nutritiva, ocasionan en plantas de cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn) var. Inca, en fase de floración. La concentración de carotenoides y flavonoides fue evaluada en flores. En hojas, flores, tallos y raíces se realizó identificación de aceites esenciales y se hizo una cuantificación cualitativa de éstos. En hojas, se determinó la concentración de clorofilas a, b y total. La concentración alta de NaCl evaluada, redujo en 26.7 y 27.9% las concentraciones de carotenoides y flavonoides totales en flores. Las concentraciones de clorofilas a y total no fueron afectadas por el nivel de salinidad; mientras que la concentración de clorofila b fue incrementada significativamente con el suministro de 47 mM de NaCl. Se identificaron siete constituyentes esenciales en aceite proveniente de hojas de plantas tratadas con 10 mM NaCl; mientras que solo cuatro, cuando la concentración de NaCl aumentó; por el contrario, un mayor número de compuestos

Abstract

Biotic and abiotic stresses factors influence the biosynthesis of secondary metabolites in some medicinal species. In this regard, it has been reported that salinity stress disrupts the biochemical properties of a large number of crops. In this context, this study aimed to evaluate the effect of treatments of two NaCl levels (10 and 47 mM) added to the nutrient solution that would cause to cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn) var. Inca in flowering stage. The concentration of carotenoids and flavonoids was evaluated in flowers. In leaves, flowers, stems and roots identification of essential oils was made and a qualitative quantification of these was done. In the leaves, the concentration of chlorophyll a, b and total was determined. The high concentration of NaCl tested, reduced by 26.7 and 27.9% carotenoid concentrations and total flavonoids in flowers. The concentrations of chlorophyll a and total were not affected by salinity; while the concentration of chlorophyll b was increased significantly with the supply of 47 mM NaCl. Seven essential oil constituents were identified from leaves of plants treated with 10 mM NaCl; while only four, when NaCl concentration increased; conversely, a larger number of compounds were identified in stems and roots with 47 mM NaCl. The presence of farnesene in flowers is noteworthy, only with the level of NaCl supplied.

* Recibido: marzo de 2014
Aceptado: agosto de 2014

fue identificado en tallos y raíces con 47 mM NaCl. Destaca la presencia de farneseno en flores, solo con el nivel alto de NaCl suministrado.

Palabras clave: aceites esenciales, carotenoides, clorofila, flavonoides.

Introducción

Una amplia gama de factores de estrés abiótico como alta y baja temperaturas, sequía, alcalinidad, salinidad, luz UV, entre otros, son potencialmente perjudiciales para las plantas. En particular, la salinidad es uno de los principales factores que afectan negativamente la producción agrícola a nivel global, dado que más de 800 millones de ha a nivel mundial son afectadas por la salinidad, lo que representa más de 6% de la superficie del planeta. La salinidad afecta a los cultivos al causar desbalance nutricional, estrés osmótico, deficiencia de agua y estrés oxidativo (Munns y Tester, 2008).

La tolerancia a la salinidad en plantas superiores es un rasgo fisiológicamente multifacético, por tanto involucra diversos mecanismos. Entre los más importantes se encuentran el ajuste osmótico, reducción en la absorción de Na^+ por parte de las raíces y el incremento de eflujo de este ión fuera de la célula, secuestro intracelular de Na^+ , acumulación de K^+ en citosol; secuestro tejido-específico de Na^+ , control de la carga de este catión en el xilema, exclusión del Na^+ del vástago y tolerancia al estrés oxidativo (Zhu, 2003).

En particular, para la tolerancia al estrés causado por la salinidad, las plantas modifican la síntesis de metabolitos secundarios (Wahid y Ghazanfar, 2006). Los metabolitos secundarios son referidos a menudo como compuestos que no tienen una función fundamental en el mantenimiento de los procesos vitales de las plantas, pero son importantes para la interacción de la planta con su ambiente, su adaptación a éste y como defensa (Ramakrishna y Ravishankar, 2011).

De esta manera, en especies tolerantes a salinidad, el incremento en el contenido de antocianinas es una respuesta de éstas, cuando son sometidas a estrés salino (Parida y Das, 2005). Así también como una consecuencia del estrés osmótico, el ajuste osmótico en el citoplasma celular debe ser inducido, lo cual conduce a la acumulación de osmolitos de bajo peso molecular como rafinosa, glicina betaína y prolina, así como de proteínas hidrofílicas de alto peso molecular de la

Keywords: essential oils, carotenoids, chlorophyll, flavonoids.

Introduction

A wide range of abiotic stresses such as high and low temperatures, drought, alkalinity, salinity, UV light, among others, are potentially harmful to plants. Specially, salinity is one of the main factors that adversely affect agricultural production globally, given that more than 800 million hectares worldwide are affected by salinity, representing more than 6% of the planet's surface. Salinity affects crop by causing nutrient imbalance, osmotic stress, water deficiency and oxidative stress (Munns and Tester, 2008).

Salt tolerance in higher plants is a physiologically multifaceted trait, therefore involves different mechanisms. Among the most important osmotic adjustment, reduction in Na^+ uptake by the roots and increasing the ion efflux from the cell, intracellular sequestration of Na^+ , accumulation of K^+ in cytosol; sequestration specific-tissue of Na^+ , charge control of this cation in the xylem, excluding Na^+ and oxidative stress tolerance (Zhu, 2003).

Particularly, for the tolerance to stress caused by salinity, the plants modified synthesis of secondary metabolites (Wahid and Ghazanfar, 2006). Secondary metabolites are often referred to as compounds not having a key role in maintaining life processes of plants, but they are important for the interaction of the plant with its environment, adaptation and as a defence (Ramakrishna and Ravishankar, 2011).

Thus, in salt tolerant species increased anthocyanin content is a response, when subjected to salt stress (Parida and Das, 2005). Likewise as a consequence of osmotic stress, the osmotic adjustment in the cell cytoplasm to be induced, which leads to the accumulation of low molecular weight osmolytes such as raffinose, betaine glycine and proline, as well as hydrophilic proteins of high molecular weight the superfamily of abundant proteins during late embryogenesis (Kosova *et al.*, 2011). In medicinal plants it has been associated an increase in the concentration of aromatic compounds such as isoprenoids, phenols and alkaloids, as part of its response to salt stress due to the antioxidant properties of these compounds. Furthermore, derivatives of phenylpropanoid phenols, such as flavonoids, tannins

superfamilia de proteínas abundantes durante la embriogénesis tardía (Kosova *et al.*, 2011). En plantas medicinales, se ha asociado el incremento en la concentración de compuestos aromáticos tales como isoprenoides, fenoles y alcaloides, como parte de su respuesta al estrés salino debido a las propiedades antioxidantes de estos compuestos aromáticos. Por otra parte, los fenoles derivados de fenilpropanoides, tales como flavonoides, taninos e hidroxycinnamatos (ésteres); los cuales son producidos bajo condiciones diversas situaciones de estrés, representan importantes eliminadores de radicales libres (Selmar, 2008).

En lo que respecta a la síntesis de aceites esenciales en respuesta a salinidad, los resultados son contradictorios. En manzanilla (*Matricaria chamomila*), regada con agua con diferentes niveles de salinidad (0, 84, 168, 252 y 336 mM NaCl), se registró el mayor contenido de aceites esenciales en el tratamiento testigo (Razmjoo *et al.*, 2008). Por el contrario, en mejorana tunecina (*Origanum majorana*) se registró un incremento significativo en el rendimiento de aceites esenciales cuando las plantas fueron regadas con aguas con conductividad eléctrica de 5 dS m⁻¹ respecto al testigo (0 dS m⁻¹); dicho incremento fue de 55.5%; mientras que el aumento en la conductividad del agua de riego a 10 dS m⁻¹ redujo significativamente el rendimiento de éstos (Jelali *et al.*, 2011).

Si bien, los efectos del estrés salino se han investigado ampliamente en cultivos, es necesaria la generación de información referente a las modificaciones del metabolismo secundario en plantas medicinales como lo es el cempasúchil, en respuesta a salinidad. En este contexto, este estudio tiene como objetivo evaluar dos niveles de salinidad a partir de NaCl en las concentraciones de carotenoides y flavonoides en flores, clorofilas en hojas; así como en la identificación y cuantificación de aceites esenciales por órgano, en cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn.) var. Inca.

Materiales y métodos

Condiciones experimentales y material vegetal. La investigación se realizó bajo condiciones de invernadero. Plántulas de cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn.) var. Inca fueron trasplantadas en macetas de plástico negras de 1 L de capacidad, conteniendo como sustrato una mezcla de tezontle:perlita (60:40, v:v).

and hydroxycinnamates (esters); which are produced under various stress conditions, are major free radical scavengers (Selmar, 2008).

With respect to the synthesis of essential oils in response to salinity, the results are contradictory. In chamomile (*Matricaria Chamomila*), irrigated with water with different salinity levels (0, 84, 168, 252 and 336 mM NaCl), the highest content of essential oils in the control treatment (Razmjoo *et al.*, 2008) was recorded. On the other hand, in Tunisian marjoram (*Origanum majorana*) a significant increase in the performance of essential oils was recorded when plants were irrigated with water with conductivity of 5 dS m⁻¹ compared with the control (0 dS m⁻¹); the increase was 55.5%; while the increase in the irrigation water conductivity to 10 dS m⁻¹ significantly reduced the yield (Jelali *et al.*, 2011).

Although the effects of salt stress have been extensively investigated in crops, generating information concerning changes of secondary metabolism in medicinal plants such as the cempasúchil is needed in response to salinity. In this context, this study aims to evaluate two levels of salinity from NaCl concentrations of carotenoids and flavonoids in flowers, leaves chlorophyll; as well as the identification and quantification of essential oils for body, in cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn.) var. Inca.

Materials and methods

Experimental conditions and plant material. The research was conducted under greenhouse conditions. Seedlings of cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn.) Var. Inca pots were transplanted into black plastic of 1 liter capacity as a substrate containing a mixture of volcanic rock: perlite (60:40, v: v).

Experiment management. Once transplanted, the seedlings were irrigated with tap water (pH 7.3 and EC 0.37 dS m⁻¹) for seven days. They were then irrigated with nutrient solution of 25% (Steiner, 1984) supplemented with micronutrients from AZ Tradecorp™ commercial product at the concentrations described by Trejo-Téllez *et al.* (2013). The pH of the nutrient solution was adjusted to 5.5 and this was supplied by a drip irrigation system. Two irrigations were made each day in every pot, each of which has a volume of 150 mL.

Manejo del experimento. Una vez trasplantadas, las plántulas fueron regadas con agua de la llave (pH 7.3 y CE de 0.37 dS m⁻¹) durante siete días. Posteriormente fueron regadas con la solución nutritiva de Steiner a 25% (Steiner, 1984) complementada con micronutrientes a partir del producto comercial Tradecorp AZTM, en las concentraciones descritas por Trejo-Téllez *et al.* (2013). El pH de la solución nutritiva fue ajustado a 5.5 y ésta se suministró mediante un sistema de riego por goteo. Se realizaron dos riegos por día en cada maceta, cada uno de ellas con un volumen de 150 mL.

Tratamientos evaluados. Al inicio de la floración se adicionaron a la solución nutritiva los tratamientos con NaCl: 10 y 47 mM de NaCl, con valores de conductividad de 1.25 y 5.25%, respectivamente. La adición de 10 mM de NaCl (1.25 dS m⁻¹) no causa daños ni afectaciones significativas de ningún tipo en esta especie (Valdez-Aguilar *et al.*, 2009), por tanto puede considerarse como un tratamiento de referencia.

Diseño experimental. El diseño experimental empleado fue completamente al azar, y cada uno de los tratamientos tuvo 32 repeticiones. La unidad experimental consistió en una maceta con una planta.

Variables evaluadas

Carotenoides totales en flores. La cosecha de las flores fue manual cuando éstas alcanzaron su mayor apertura. Las flores cosechadas fueron secadas en estufa de aire forzado (Felisa, FE291AD, México) a 40 °C por 48 h; posteriormente se pesaron en una balanza analítica (Ohaus, AdventurerTM Pro, Estados Unidos de América) y se molieron finamente y se almacenaron en recipientes de plástico con tapa a 4 °C, para su posterior análisis. La técnica de extracción de carotenoides totales, se realizó con el método descrito por Nagata y Yamashita (2002). Las absorbancias de los extractos de diez repeticiones fueron leídas en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Multiskan[®], Estados Unidos de América) a 453, 503, 645 y 663 nm de longitud de onda; para la estimación de carotenoides totales, los valores obtenidos se sustituyeron en la siguiente fórmula (Nagata y Yamashita, 2002):

$$\text{Carotenoides totales (mg/100 mL)} = (0.216)(A_{663}) - (1.220)(A_{645}) - (0.304)(A_{505}) + (0.452)(A_{453})$$

Flavonoides totales. La preparación de la muestra (secado, molido y almacenamiento) es la indicada en el apartado anterior para carotenoides. La concentración de flavonoides totales se cuantificó con un método modificado a partir de

Treatments evaluated. At the beginning of flowering were added to the nutrient solution with NaCl: 10 and 47 mM NaCl, with conductivity values of 1.25 y 5.25%, respectively. Addition of 10 mM of NaCl (1.25 dS m⁻¹) is not harmful or significantly affected whatsoever in this species (Valdez-Aguilar *et al.*, 2009) therefore can be considered as a reference treatment.

Experimental design. The experimental design was completely randomized, and each treatment had 32 replicates. The experimental unit consisted of a potted plant.

Variables evaluated

Total carotenoids in flowers. Harvest of the flowers was manual when they reached their greater openness. The harvested flowers were dried in forced air oven (Felisa, FE291AD, Mexico) at 40 °C for 48 h; then weighed on an analytical balance (Ohaus AdventurerTM Pro, USA) and ground finely and stored in plastic containers with lids at 4 °C for subsequent analysis. The technique of extracting total carotenoids was performed using the method described by Nagata and Yamashita (2002). The absorbances of the extracts of ten repetitions were read in a spectrophotometer (Thermo Scientific Multiskan[®], USA) at 453, 503, 645 and 663 nm wavelength; for estimation of total carotenoids, the obtained values were substituted into the following formula (Nagata and Yamashita, 2002):

$$\text{Total carotenoids (mg/100 mL)} = (0.216)(A_{663}) - (1.220)(A_{645}) - (0.304)(A_{505}) + (0.452)(A_{453})$$

Total flavonoids. Sample preparation (drying, grinding and storage) is indicated in the previous section for carotenoids. The total flavonoid concentration quantified with a modified method from those described by Ghasemi *et al.* (2009), Ebrahimzadeh *et al.* (2008) and Nanyonga *et al.* (2013). The extracts of the samples were read in a spectrophotometer (Bausch and Lomb, Spectronic 20, USA) at 415 nm. For the preparation of the calibration curve was used to estimate the concentration of total flavonoids, quercetin was used as standard.

Identification of essential oil compounds by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). For this determination, four plants per treatment randomly selected were sectioned in flowers, leaves, stems and roots. The samples were dried in a forced air oven at 40 °C for 48 h (Felisa, FE291AD, Mexico), the dried samples were ground and processed each plant organs separately.

los descritos por Ghasemi *et al.* (2009), Ebrahimzadeh *et al.* (2008) y Nanyonga *et al.* (2013). Los extractos de las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (Bausch and Lomb, Spectronic 20, Estados Unidos de América) a 415 nm. Para la elaboración de la curva de calibración que permitió estimar la concentración de flavonoides totales se utilizó como estándar quercetina.

Identificación de compuestos de aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Para esta determinación, cuatro plantas por tratamiento seleccionadas al azar fueron seccionadas en flores, hojas, tallos y raíces. Las muestras se secaron en una estufa de aire forzado a 40 °C por 48 h (Felisa, FE291AD, México), las muestras secas fueron molidas y se procesaron cada uno de los órganos de la planta por separado.

Para la identificación de compuestos se utilizó la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), con un cromatógrafo de gases (HP-6890) acoplado a un detector de masas (HP-5973). Se utilizó una columna HP-5MS (Largo 30m, ID 0.250 mm, film 0.25 µm), velocidad promedio de 36 cm/seg. Las condiciones de operación del cromatógrafo fueron: temperatura inicial de 40 °C por 5 min, primera rampa hasta 150 °C, con un aumento de 9 °C min⁻¹. Se mantiene por 3 min, segunda rampa hasta 220 °C con un aumento de 9 °C min⁻¹. La fuente de iones a 230 °C, cuadrupolo a 150 °C. Inyector modo splitless, temperatura de 220 °C, 6.97 psi. Como gas acarreador se usó helio y se inyectó 1 µL de las muestras concentradas en forma manual.

En la identificación de terpenoides se usó el programa Data Analysis y la base de datos que se consultó fue NIST (National Institute of Standards and Technology), basándose en tiempos de retención de cada compuesto y los espectros de masas.

Clorofilas a, b y totales. La concentración de clorofilas, se determinó en hojas frescas por el método de Harbone (1973). La absorbancia de las muestras se realizó en un espectrofotómetro (Spectronic 20, Bausch and Lomb), a longitudes de onda de 663 y 645 nm. Los valores obtenidos se sustituyeron en las siguientes fórmulas para la estimación de los pigmentos fotosintéticos.

$$\begin{aligned} \text{Clorofila a} &= (12.7 * A_{663}) - (2.59 * A_{645}) \\ \text{Clorofila b} &= (22.9 * A_{645}) - (4.7 * A_{663}) \\ \text{Clorofila total} &= (8.2 * A_{663}) + (20.2 * A_{645}) \end{aligned}$$

Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), with a gas chromatograph (HP-6890) coupled to a mass detector (HP-5973) was used for the identification of compounds. An HP-5MS (30 m length, 0.250 mm ID, 0.25 µm film) column, average speed of 36 cm/s was used. The GC operating conditions were: initial temperature of 40 °C for 5 min, first ramp to 150 °C, an increase of 9 °C min⁻¹. It is maintained for 3 min, the second ramp up to 220 °C with a rise of 9 °C min⁻¹. The ion source to 230 °C, 150 °C quadrupole. Splitless Injector at 220 °C, 6.97 psi. Helium as carrier gas was used and injected with 1 µL of concentrated samples manually.

Terpenoids in identifying the Data Analysis program and database that is consulted were NIST (National Institute of Standards and Technology) based on retention times of each compound and the mass spectra were used.

Chlorophyll a, b and total. Chlorophyll concentration of fresh leaves was determined by the method Harbone (1973). The absorbance of the samples was performed on a spectrophotometer (Spectronic 20, Bausch and Lomb) at wavelengths of 663 and 645 nm. The obtained values were substituted into the formulas for estimation of photosynthetic pigments.

$$\begin{aligned} \text{Chlorophyll a} &= (12.7 * A_{663}) - (2.59 * A_{645}) \\ \text{Chlorophyll b} &= (22.9 * A_{645}) - (4.7 * A_{663}) \\ \text{Total chlorophyll} &= (8.2 * A_{663}) + (20.2 * A_{645}) \end{aligned}$$

Results analysis. The data were statistically analysed according to the experimental design, using analysis of variance (ANOVA) of SAS (SAS, 2011). Means were compared with Tukey's test (*p* 0.05).

Results and discussion

Total carotenoids. Among the non-enzymatic antioxidants are carotenoids, which are presented ubiquitously in plants and have been reported as vital actors in mitigating adverse effects of salinity on plant growth and metabolism (Rawia *et al.*, 2011). Example of this direct relationship between the level of salinity and concentration of carotenoids are the results of Borghesi *et al.* (2011), who reported that salt stress may lead to similar or higher increases in the fruit of tomato carotenoids and anthocyanins, those made by genetic engineering; therefore, this represents an option with considerable potential exploitation of tomatoes for

Análisis de resultados. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente de acuerdo al diseño experimental empleado, usando análisis de varianza (ANOVA) del paquete estadístico SAS (SAS, 2011). Las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Resultados y discusión

Carotenoides totales. Entre los antioxidantes no-enzimáticos se encuentran los carotenoides, mismos que se presentan de manera ubicua en plantas y han sido reportados como actores vitales en la mitigación de efectos adversos de la salinidad en el crecimiento y metabolismo vegetal (Rawia *et al.*, 2011). Ejemplo de esta relación directa entre el nivel de salinidad y concentración de carotenoides, son los resultados de Borghesi *et al.* (2011), quienes reportaron que el estrés salino puede conducir a incrementos similares o superiores en el fruto de tomate de carotenoides y antocianinas, a aquellos logrados por la ingeniería genética; por tanto, esto representa una opción con potencial de explotación considerable de los suelos salinos para obtener tomates con niveles mayores de metabolitos secundarios. Asimismo, en brotes de trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum* M.) tratados con 50 y 100 mM de NaCl, la concentración de carotenoides fue dos veces más grande a plantas testigo (Lim *et al.*, 2012). No obstante lo anterior, en esta investigación la concentración de carotenoides totales en flores fue reducida significativamente, con la adición de 47 mM de NaCl, en comparación con el suministro de 10 mM de NaCl; dicha reducción es del orden de 26.7% (Figura 1).

Flavonoides totales. La concentración de flavonoides en flores tuvo una relación negativa con la concentración de NaCl en la solución nutritiva; observándose que el aumento de NaCl de 10 a 47 mM redujo en 27.9% la concentración de éstos (Figura 2). De manera similar, en manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) tratada con diferentes niveles de NaCl (40, 80, 120 y 190 mM), se observó una reducción en la concentración de flavonoides respecto al testigo (sin NaCl); no obstante, con una concentración de NaCl de 40 mM, se encontró el mayor contenido de flavonoles 3-O-glicósidos, flavonoides más abundantes en flores de esta especie (Afzali *et al.*, 2007).

Contrario a los resultados de flavonoides obtenidos en este estudio, en hipocotilos y cotiledones de plántulas de tomate (*Solanum esculentum* cv. H-2274) y de col roja (*Brassica oleraceae* convar. *capitata* (L.) Alef. var. rubra

saline soils with higher levels of secondary metabolites. Also in buckwheat sprouts (*Fagopyrum esculentum* M.) treated with 50 and 100 mM NaCl, carotenoid concentration was twice as high in control plants (Lim *et al.*, 2012). Nevertheless, in this study the concentration of total carotenoids in flowers was significantly reduced with the addition of 47 mM NaCl, compared to the supply of 10 mM NaCl; a reduction of 26.7% (Figure 1).

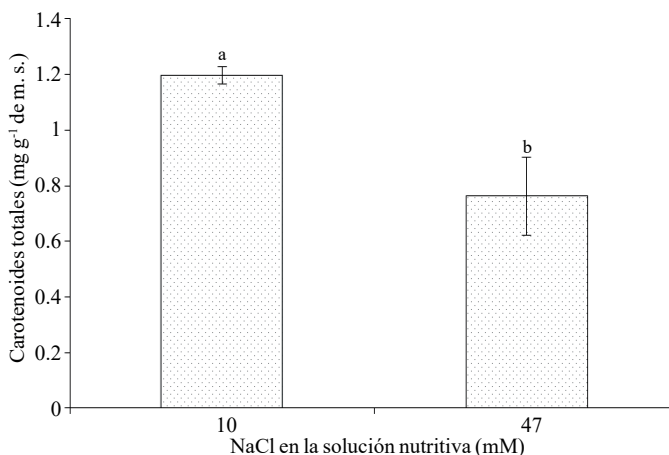


Figura 1. Carotenoides totales en flores de plantas de campesúchil var. Inca, tratadas con dos concentraciones de NaCl en fase de floración. Medias \pm DE con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$) entre tratamientos.

Figure 1. Total carotenoids in campesúchil flowers var. Inca, treated with two concentrations of NaCl in flowering stage. Mean \pm SD with different letters indicate significant differences (Tukey, $p \leq 0.05$) between treatments.

Total flavonoids. The concentration of flavonoids in flowers had a negative relationship with the concentration of NaCl in the nutrient solution; observing an increasing of NaCl from 10 to 47 mM 27.9% reduced in their concentration (Figure 2). Similarly, in chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) treated with varying levels of NaCl (40, 80, 120 and 190 mM), there was a reduction in the concentrations of flavonoids than the control's (without NaCl); however, with a NaCl concentration of 40 mM, we found the highest content of flavonols 3-O-glycosides, flavonoids most abundant flowers of this species (Afzali *et al.*, 2007).

Opposite to the results of flavonoids obtained in this study, in hypocotyls and cotyledons of seedlings of tomato (*Solanum esculentum* cv. H-2274) and red cabbage (*Brassica oleraceae* convar. *capitata* (L.) Alef. Var. Rubra DC. Cv Möhrenkopf), gradual increases were observed in the concentrations of anthocyanins, as the NaCl concentration increased from 0 to 150 mM (Eryılmaz, 2006).

DC., cv Möhrenkopf), se observaron incrementos graduales en las concentraciones de antocianinas, a medida que se incrementó la concentración de NaCl desde 0 a 150 mM (Eryılmaz, 2006).

Clorofilas totales. En el Cuadro 1 se presentan las concentraciones foliares de clorofilas bajo dos niveles de NaCl. Las concentraciones de clorofilas a y total no fueron afectadas por el nivel de NaCl adicionado a la solución nutritiva; mientras que, la concentración de clorofila b, fue estadísticamente superior 47 mM de NaCl, en comparación con 10 mM.

Cuadro 1. Concentraciones foliares de clorofilas bajo dos niveles de NaCl.

Table 1. Leaf chlorophyll concentrations under two levels of NaCl.

NaCl, mM	Clorofila		
	a	B	total
10	67.42 ± 1.46 a	23.1 ± 0.51 b	91.43 ± 1.87 a
47	48.8 ± 2.73 a	15.02 ± 0.39 a	64.48 ± 5.82 a

Medias ± DE con letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$) entre tratamientos.

Los estudios sobre los efectos del estrés salino en las plantas se han centrado principalmente en el crecimiento, la acumulación de prolina, contenido de clorofila, relación K^+/Na^+ , relación Ca^{2+}/Na^+ , acumulación de Na^+ y Cl^- . Se ha dicho que los genotipos con una alta acumulación de prolina y contenidos de clorofila, así como con alta relación K^+/Na^+ , y baja acumulación de Na^+ y Cl^- son más tolerantes a la sal (Mane *et al.*, 2011). Considerando lo anterior, es posible afirmar que *Tagetes erecta* var. Inca es una especie tolerante a niveles de NaCl de 47 mM.

Aceites esenciales. Los tiempos de retención de los compuestos de aceites esenciales identificados en hojas, flores, tallos y raíces se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Tiempos de retención de compuestos identificados en aceites esenciales de hojas, flores, tallos y raíces de plantas de cempasúchil tratadas con dos niveles de NaCl.

Table 2. Retention times of compounds identified in essential oils from leaves, flowers, stems and roots of cempasúchil plants treated with two levels of NaCl.

Compuesto	Tiempo de retención	Compuesto	Tiempo de retención
D-Limoneno	12.21	β - Mirceno	11.36
Ocimeno	12.59	Piperitona	16.5
Cariofileno	19.47	Farneseno	20.04
α -Pinenos	9.95	Óxido de cariofileno	23.2
Trans-pinenos	27.5		

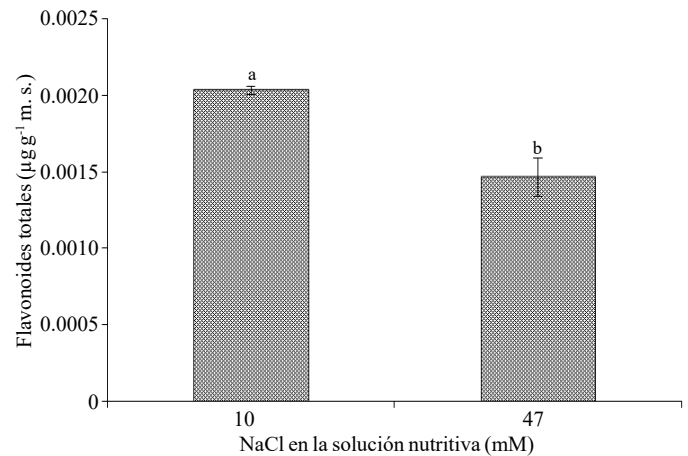


Figura 2. Flavonoides totales en flores de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con dos concentraciones de NaCl en fase de floración. Medias ± DE con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$) entre tratamientos.

Figure 2. Total flavonoids in flowers of cempasúchil var. Inca, treated with two concentrations of NaCl in flowering stage. Mean ± SD with different letters indicate significant differences (Tukey, $p \leq 0.05$) between treatments.

Total chlorophylls. The Table 1 shows the leaf chlorophyll concentrations under two levels of NaCl. Total concentrations of chlorophyll a and were not affected by the level of NaCl added to the nutrient solution; while the concentration of chlorophyll b was statistically superior 47 mM NaCl, 10 mM compared.

Studies on the effects of salt stress in plants have mainly focused on growth, proline accumulation, chlorophyll content, relative K^+/Na^+ , Ca^{2+} ratio / Na^+ , accumulation of Na^+ and Cl^- . It has been said that genotypes with a high accumulation of proline and chlorophyll contents, as well as high ratio K^+/Na^+ and low accumulation of Na^+ and Cl^- are more tolerant (Mane *et al.*, 2011). Considering the above, we can say that *Tagetes erecta* var. Inca is a tolerant species at levels of 47 mM NaCl.

Es importante destacar la amplia diferencia que existe en los componentes de aceites esenciales entre especies de *Tagetes*, dado que de los compuestos aquí identificados no coinciden con los reportados en *Tagetes coronopifolia* Willd, los cuales son en raíces 2, 7, 7-trimetilbicyclo[3.1.1]heptan-2-ol y (1S, 2R, 5S)-4, 6, 6-trimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol (verbenol) (38%); en tallo-hoja, (1S)-6, 6-dimetil-2-metilen-bicyclo[3.1.1] heptan-3-ona, (1R)-cis-4, 6, 6-trimetilbicyclo-[3.1.1] hept-3-en-2-ona (verbenona), 2-oxo-decanoato de metilo y 2, 7, 7-trimetilbicyclo[3.1.1] hept-2-en-6-ona (crisantenona) (41%); mientras en flores, (1S)-6, 6-dimetil-2-metilen-bicyclo[3.1.1] heptan-3-ona y verbenona (Díaz-Cedillo *et al.*, 2013).

El número de compuestos y su concentración en el aceite proveniente de hojas, fueron superiores con el nivel bajo de salinidad evaluado (10 mM), siendo los más abundantes D-limoneno (8.52%) y ocimeno (6.33%) y superiores en 58.92 y 46.13%, respectivamente, a los contenidos de éstos registrados en hojas de plantas tratadas con 47 mM NaCl. Asimismo, es importante destacar que solo con la adición de 10 mM NaCl, se identificaron trans-pineno, β -mirceeno y piperitona (Figura 3A). Rawia *et al.* (2011) reportó en aceite proveniente tejido fresco de plantas de *Tagetes erecta* sometidas a tres concentraciones de NaCl (salinidad), 10 compuestos: cis- β -ocimeno, β -farneseno, óxido de trans-linalool, piperetona, β -jonona, trans-cariofilasa, óxido de cariofilasa, eugenol, linalool y ácido hexa-decanoico metil éster; en todos éstos, la concentración relativa fue reducida a medida que la concentración de NaCl se incrementó. Independientemente del tratamiento, los compuestos más abundantes fueron trans-cariofileno y eugenol. Así este estudio coincide parcialmente con los resultados de esta investigación; menor concentración relativa de aceites esenciales a medida que incrementa la concentración de NaCl; y difieren en la cantidad y tipo de compuestos identificados.

Contrario a los resultados obtenidos en hojas, en flores se encontraron tres compuestos en los aceites esenciales con mayor salinidad; mientras que con la menor salinidad solo dos, cariofileno y óxido de cariofileno. El farneseno solo fue identificado bajo mayor concentración de NaCl en porcentaje de 1.28 (Figura 3B). Coincidentemente, en plantas de menta (*Mentha piperita* L.), se observaron incrementos en algunos componentes de aceites esenciales en respuesta al tratamiento de NaCl, entre los que se encuentra el trans- β -farneseno; con concentraciones relativas de 0.01 y 0.89%, con los tratamientos 0 y 50 mM de NaCl, respectivamente; mientras que con 100 mM NaCl no fue identificado. En el caso de la concentración relativa

Essential oils. The retention times of the essential oil compounds identified in leaves, flowers, stems and roots are presented in Table 2.

Is indeed quite important to highlight the large difference in the components of essential oils from *Tagetes* species, since the compounds identified here do not match those reported in *Tagetes coronopifolia* Willd, which are in roots 2, 7, 7-trimetilbicyclo[3.1.1] heptan-2-ol y (1S, 2R, 5S)-4, 6, 6-trimetilbicyclo[3.1.1] hept-3-en-2-ol (verbenol) (38%); (1S)-6, 6-dimetil-2-metilen-bicyclo[3.1.1]heptan-3-ona, (1R)-cis-4, 6, 6-trimetilbicyclo-[3.1.1]hept-3-en-2-ona (verbenona), 2-oxo-decanoato de metilo and 2, 7, 7-trimetilbicyclo[3.1.1] hept-2-en-6-ona (crisantenona) (41%); while in the flowers, (1S)-6, 6-dimetil-2-metilen-bicyclo[3.1.1] heptan-3-ona and verbenona (Díaz-Cedillo *et al.*, 2013).

The number of compounds and their concentration in the oil from leaves were higher with low salinity level tested (10 mM), the most abundant D-limonene (8.52%) and ocimene (6.33%) and higher at 58.92 and 46.13%, respectively, for the content thereof recorded in leaves of plants treated with 47 mM NaCl. It is also important to note that only by the addition of 10 mM NaCl, trans-pinene, β -myrcene and piperitone (Figure 3A) were identified. Rawia *et al.* (2011) reported oil from fresh tissue of *Tagetes erecta* plants subjected to three concentrations of NaCl (salt), 10 compounds: cis- β -ocimene, β -farnesene, trans-linalool oxide, piperetona, β -ionones, trans-cariofilasa oxide cariofilasa, eugenol, and hexa-decanoico linalool acid methyl ester; in all these, the relative concentration was reduced as the concentration of NaCl is increased. Regardless of the treatment, the most abundant compounds were trans-caryophyllene and eugenol. Therefore, this study overlaps with the results of this research; lower relative concentration of essential oils increases as the concentration of NaCl; and differ in the amount and type of identified compounds.

Contrary to the results of the leaves, in the flowers were found three compounds in essential oils with higher salinity; while with lower salinity only two, caryophyllene and caryophyllene oxide. Farnesene was identified only under higher NaCl concentration of 1.28 percent (Figure 3B). Coincidentally, in peppermint plants (*Mentha piperita* L.), increases were observed in some essential oil components in response to NaCl treatment, including the trans- β -farnesene is located; with relative concentrations of 0.01 and 0.89%, with the treatment 0 and 50 mM of NaCl, respectively; while with 100 mM NaCl was not identified. In the case of the relative concentration

de L-mentol, principal constituyente en el aceite esencial de esta especie, ésta incrementó gradualmente con el aumento de la dosis de NaCl a 50 y 100 mM (Khorasaninejad *et al.*, 2010).

of L-menthol, a major constituent in the essential oil of the species is gradually increased with increasing NaCl dose of 50 and 100 mM (Khorasaninejad *et al.*, 2010).

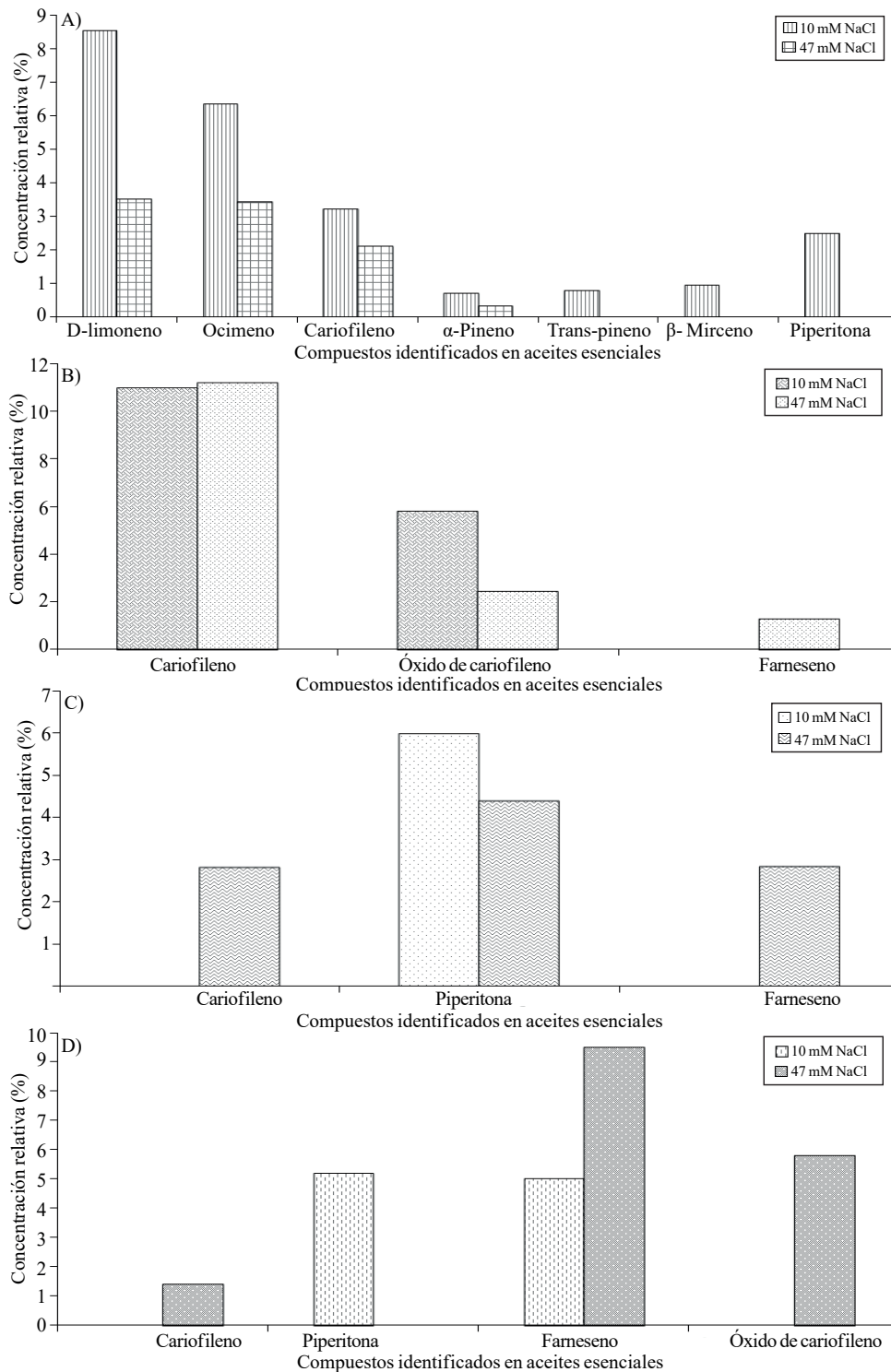


Figura 3. Aceites esenciales identificados en hojas (A), flores (B), tallos (C) y raíces (D) de plantas de cempasúchil var. Inca, tratadas con dos concentraciones de NaCl en fase de floración.

Figure 3. Essential oils identified in leaves (A), flowers (B), stems (C) and roots (D) of cempasúchil var. Inca, treated with two concentrations of NaCl in flowering stage.

Tendencias similares a las registradas en flores, son observadas en tallos; es decir, tres compuestos identificados en plantas tratadas con 47 mM; mientras que solo la piperitona fue detectada con la menor concentración de 10 mM NaCl; no obstante, su concentración superó a la encontrada con mayor concentración de NaCl en 26.63% (Figura 3C).

En raíces, con la dosis alta de NaCl se identificaron cariofileno, farneseno y óxido de cariofileno; de éstos solo farneseno con el incremento en NaCl. Así también solo el compuesto piperitona fue identificado en raíces de plantas sometidas a bajos niveles de salinidad (Figura 3D).

Consistentemente, se observa que la concentración relativa de piperitona, en aceite proveniente de hojas, tallos y raíces fue afectada de manera importante por el aumento de la salinidad (Figura 3).

El incremento de contenido de aceite esencial, como el observado en flores, tallos y raíces de esta especie ha sido reportado en otras, sometidas a factores que causan estrés osmótico. Los contenidos de aceite y de prolina esenciales de albahaca fueron incrementados cuando las plantas se sometieron a estrés hídrico; por el contrario, el crecimiento fue inhibido significativamente (Baeck *et al.*, 2001). Así también, Hendawy y Khalid (2005), reportan que los contenidos de aceite esencial, carbohidratos totales y prolina fueron incrementados en forma significativa con el aumento en el nivel de estrés salino en plantas de salvia (*Salvia officinalis* L. Sage).

Conclusiones

Las concentraciones de carotenoides y flavonoides fueron negativamente afectadas con el incremento de NaCl; por el contrario, las concentraciones de clorofilas a y total no fueron afectadas por el nivel de NaCl, mientras que, la concentración de clorofila b se incrementó con el aumento en la concentración de NaCl.

El tratamiento con 47 mM NaCl reduce los componentes del aceite esencial de hojas, y reduce las concentraciones relativas de éstos. En flores, tallos y raíces; por el contrario, con el aumento en el nivel de NaCl, de manera general se incrementaron los componentes del aceite esencial y sus concentraciones, destacando esta tendencia en tallos y raíces.

Similar to those recorded in flower trends are observed in stems; i.e. three compounds identified in plants treated with 47 mM; while only piperitone was detected with the lowest concentration of 10 mM NaCl; however, its concentration exceeded that found with higher concentrations of NaCl in 26.63% (Figure 3C).

In roots, the high dose of NaCl were caryophyllene, farnesene and caryophyllene oxide identified; of these one-farnesene with increasing NaCl. Just the piperitone compound was identified in roots of plants subjected to low salinity levels (Figure 3D).

Consistently, we observe that the relative concentration of piperitone in oil from leaves, stems and roots was significantly affected by increased salinity (Figure 3).

The increase in essential oil content, as seen in flowers, stems and roots of this species has been reported in other, subject to factors that cause osmotic stress. The content of essential oil and basil proline were increased when plants are subjected to drought stress; the growth was inhibited significantly (Baeck *et al.*, 2001). In addition, Hendawy and Khalid (2005) reported that, the essential oil content, total carbohydrates and proline were increased significantly with the increase in the level of salt stress in plants of salvia (*Salvia officinalis* L. Sage).

Conclusions

The concentrations of carotenoids and flavonoids were adversely affected while increasing NaCl; in contrast, the chlorophyll a and total concentrations were not affected by the level of NaCl, while the concentration of chlorophyll b was increased with increasing NaCl concentration.

The treatment with 47 mM NaCl reduces the essential oil components of leaves and reduces the relative concentrations as well. In flowers, stems and roots; in contrast, with the increasing level of NaCl, generally essential oil components and their concentrations were also increased, noting the trend in stems and roots.

End of the English version



Agradecimiento

A la Línea Prioritaria de Investigación 4 Agronegocios, Agroecoturismo y Arquitectura del Paisaje del Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, por los apoyos y facilidades brindadas para la realización del presente estudio.

Literatura citada

- Afzali, S. F. A. D.; Shariat, M. H.; Hajabbasi, M. A. and Moatar, F. 2007. Salinity and drought stress effects on flower yield and flavonol-o glycosides in chamomile (*Matricaria chamomilla*). Iranian J. Medicinal and Aromatic Plants. 23(3-37):382-390.
- Baeck, H.; Kuenwoo, P.; Baeck, H. W. and Park, K. W. 2001. Effect of watering on growth and oil content of sweet basil (*Ocimum americanum* L.). Korean J. Hort. Sci. Technol. 19:81-86.
- Borghesi, E.; González-Miret, M.L.; Escudero-Gilete, M. L.; Malorgio, F.; Heredia, F. J. and Meléndez-Martínez, A. J. 2011. Effects of salinity stress on carotenoids, anthocyanins, and color of diverse tomato genotypes. J. Agric. Food Chem. 59(21):11676-11682.
- Díaz-Cedillo, F.; Serrato-Cruz, M. A.; De la Cruz-Marcial, J.; Sánchez-Alonso, M. G. y López-Morales, V. 2013. Compuestos mayoritarios del aceite esencial en órganos de una población de *Tagetes coronopifolia* Willd. Rev. Fitotec. Mex. 36(4):405-411.
- Ebrahimzadeh, M. A.; Pourmorad, F. and Bekhradnia, A. R. 2008. Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. Afr. J. Biotechnol. 7(18):3188-3192.
- Eryilmaz, F. 2006. The relationships between salt stress and anthocyanin content in higher plants. Biotechnol. 20(1):47-52.
- Ghasemi, K.; Ghasemi, Y. and Ebrahimzadeh, M. A. 2009. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. Pak. J. Pharm. Sci. 22(3):227-281.
- Harbone, J. B. 1973. Chlorophyll extraction. In: Harbone, J. B. (Ed.). Phytochemical methods. recommended technique. Chapman and Hall, London. 205-207 pp.
- Hendawy, S. F. and Khalid, Kh. A. 2005. Response of sage (*Salvia officinalis* L.) plants to zinc application under different salinity levels. J. Appl. Sci. Res. 1:147-155.
- Jelali, N.; Dhifi, W.; Chahed, T. and Marzouk, B. 2011. salinity effects on growth, essential oil yield and composition and phenolic compounds content of marjoram (*Origanum majorana* L.) leaves. J. Food Biochem. 35(5):1443-1450.
- Khorasaninejad, S.; Mousavi, A.; Soltanloo, H.; Hemmati, K. and Khalighi, A. 2010. The effect of salinity stress on growth parameters, essential oil yield and constituent of peppermint (*Mentha piperita* L.). World Appl. Sci. J. 11(11):1403-1407.
- Kosova, K.; Vitamvas, P.; Prasil, I. T. and Renaut, J. 2011. Plant proteome changes under abiotic stress contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. J. Proteomics. 74:1301-1322.
- Lim, J.-H.; Park, K.-J.; Kim, B.-K.; Jeong, J.-W. and Kim, H.-J. 2012. Effect of salinity stress on phenolic compounds and carotenoids in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.) sprout. Food Chemistry 135:1065-1070.
- Mane, A. V.; Deshpande, T. V.; Wagh, V. B.; Karadge, B. A. and Samant, J. S. 2011. A critical review on physiological changes associated with reference to salinity. Int. J. Environ. Sci. 6: 1192-1216.
- Munns, R. and Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. Annu. Rev. Plant Biol. 59:651-681.
- Nagata, M. and I. Yamashita. 2002. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish. 39:925-928.
- Nanyonga, S. K.; Opoku, A. R.; Lewu, F. B.; Oyedeji, O. O.; Singh, M. and Oyedeji, A. O. 2013. Antioxidant activity and cytotoxicity of the leaf and bark extracts of *Tarchonanthus camphorates*. Tropical J. Pharmaceutical Res. 12(3):377-383.
- Parida, A. K. and Das, A. B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicol Environ Saf. 60:324-349.
- Ramakrishna, A. and Ravishankar, G. A. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. Plant Signaling and Behavior. 6(11):1720-1731.
- Rawia, A. E.; Lobna, S.; Taha, S. M. and Ibrahim, M. 2011. Alleviation of adverse effects of salinity on growth, and chemical constituents of marigold plants by using glutathione and ascorbate. J. Appl. Sci. Res. 7(5):714-721.
- Razmjoo, K.; Heydarizadeh, P. and Sabzalian, M. R. 2008. Effect of salinity and drought stresses on growth parameters and essential oil content of *Matricaria chamomila*. Int. J. Agri. Biol. 10:451-454.
- Statistical Analysis System (SAS) Institute. 2011. SAS user's guide. Statistics. Version 8. SAS Inst., Cary, NC. USA. Quality, and elemental removal. J. Environ. Qual. 19:749-756.
- Selmar, D. 2008. Potential of salt and drought stress to increase pharmaceutical significant secondary compounds in plants. Agric. For. Res. 58:139-144.
- Steiner, A. 1984. The universal nutrient solution. In: ISOSC Proceedings 6th International Congress on Soilless Culture. The Netherlands. 633-649 pp.
- Trejo-Téllez, L. I.; Peralta-Sánchez, M. G.; Gómez-Merino, F. C.; Rodríguez-Mendoza, M. N.; Serrato-Cruz, M. A. y Arévalo-Becerril, A. E. 2013. Cloruro de sodio sobre biomasa seca y absorción de cationes macronutrientes en cempasúchil (*Tagetes erecta* Linn.). Rev. Mex. Cienc. Agríc. 5:979-990.
- Valdez-Aguilar, L. A.; Grieve, C. M.; Poss, J. and Layfield, D. A. 2009. Salinity and alkaline pH in irrigation water affect marigold plants: II. Mineral Ion Relations. HortScience 44(6):1726-1735.
- Wahid, A. and Ghazanfar, A. 2006. Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane. J. Plant Physiol. 163:723-730.
- Zhu, J.-K. 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. Current Opinion in Plant Biology 6(5):441-445.