

# RENDIMIENTO Y CALIDAD DE ACEITE DE *Thymus vulgaris* L., POR EFECTO DE HONGOS MICORRÍZICOS, RIZOBACTERIAS Y FITORREGULADORES

## YIELD AND QUALITY OF *Thymus vulgaris* L. OIL, UNDER THE EFFECT OF MYCORRHIZIC FUNGI, RHIZOBACTERIA AND PHYTOREGULATORS

López-Ambrocio, R. M.<sup>1</sup>; Delgadillo-Martínez, J.<sup>2</sup>; Ruiz-Posadas, L. M.<sup>3</sup>

<sup>1,3</sup>Botánica. *Campus* Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Carretera México-Texcoco, Km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México. mireya.lopez@colpos.mx<sup>1</sup>, lucpo@colpos.mx<sup>3</sup>.

<sup>2</sup>Area de Microbiología, Edafología, *Campus* Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Carretera México-Texcoco, Km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México. juliandm@colpos.mx.

**Autor de correspondencia:** lucpo@colpos.mx

### RESUMEN

El tomillo (*Thymus vulgaris* L.) se comercializa principalmente por sus hojas y aceite esencial, y con base en la creciente demanda de ingredientes naturales y aceites de alta calidad, se evaluó el efecto que tiene la aplicación de un fitorregulador comercial, la inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) y hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el rendimiento y composición del aceite esencial de tomillo, resaltando la primicia del efecto de las relaciones simbióticas para la especie, con la producción y calidad de aceite, bajo un diseño experimental completamente al azar, con 32 repeticiones para cada tratamiento. La distancia de plantación fue de 1.5×1.0 m entre hileras y plantas respectivamente. El mayor rendimiento lo presentó el tratamiento de inoculación con la bacteria P61 con 13.3 mg AE g<sup>-1</sup> MS. Se observó que el número de componentes y el porcentaje presente en el aceite esencial son diferentes en cada tratamiento. La mayor concentración de timol se registró en el Testigo (52.55%), seguido por plantas inoculadas con P61 (51%) y los HMA Zac19+Cedro (50.66%). Para O-Cimeno el tratamiento inoculado con HMA Zac19 (21.79%) presentó la mayor concentración, seguido de HMA Zac19+Cedro y el fitorregulador Bioforte® con 20.38% y 19.37%, respectivamente. Respecto a la concentración de J-terpino, la inoculación con el HMA Cedro y la bacteria P61 mostraron mejor respuesta con 17.9 y 17.84%, respectivamente.

**Palabras clave:** Tomillo, micorriza, aromáticas.

### ABSTRACT

Thyme (*Thymus vulgaris* L.) is commercialized mainly for its leaves and essential oil, and because of the growing demand of natural ingredients and high-quality oils, the effect of applying a commercial phyto regulator and inoculating with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and arbuscular mycorrhizae fungi (AMF) on the yield and composition of the essential thyme oil, was evaluated, highlighting the first indication of the impact of symbiotic relationships on the species with the production and quality of the oil, under a completely random experimental design with 32 repetitions for each treatment. The planting distance was 1.5×1.0 m between rows and plants, respectively. The greatest yield was presented by the inoculation treatment with bacteria P61 with 13.3 mg AE g<sup>-1</sup> MS. It was observed that the number of components and the percentage present in the essential oil is different in each treatment. The highest concentration of thymol was seen in the Control (52.55 %), followed by plants inoculated with P61 (51 %) and AMF Zac19+Cedar (50.66 %). For ocimene, the treatment inoculated with AMF Zac19 (21.79 %) presented the highest concentration, followed by AMF Zac19+Cedar and phyto regulator Bioforte®, with 20.38 % and 19.37 %, respectively. With regard to the concentration of J-terpinene, inoculation with AMF Cedar and bacteria P61 showed a better response with 17.9 and 17.84 %, respectively.

**Keywords:** thyme, mycorrhiza, aromatic.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido la base de los sistemas de medicina tradicional de las culturas y actualmente siguen utilizándose. Registros ancestrales mencionan el uso de aceites de especies de *Cedrus* (Cedro) y *Cupressus sempervirens* (ciprés), *Glycyrrhiza glabra* y *Papaver somniferum* (Gurib-Fakim, 2006). Las plantas medicinales tienen diversos compuestos químicos que actúan de forma individual o aditiva. Algunas plantas contienen sustancias amargas que estimulan la digestión, antioxidantes y antimicrobianos (Gurib-Fakim, 2006); otras se caracterizan por poseer propiedades olores y sabores específicos que les confieren el nombre de aromáticas (PAM) ya que contienen aceites esenciales (Lubbe y Verpoorte, 2011). Actualmente ha incrementado el interés en las PAM, como el tomillo (*Thymus vulgaris* L.), ya que sus aceites tienen actividad biológica y capacidad antioxidante con amplias aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética, agroalimentaria, agrícola, avícola y ganadera. También son ampliamente usados en aromaterapia y como productos alternativos de la salud (Amad et al., 2011; Juárez-Rosete et al., 2013). La demanda de ingredientes naturales han impulsado la producción de aceite esencial (AE) de acuerdo a Normas Internacionales que para el caso del tomillo es la ISO 6754:1996, que fija las hojas frescas de tomillo deben contener un mínimo de 0.5% de AE y molidas al menos 0.2%, y el timol debe ser el componente mayoritario.

La creciente demanda de aceite esencial de tomillo obliga a obtener altos rendimientos. Las prácticas agrícolas intensivas dirigidas a los cultivos demandan el uso de fertilizantes químicos y pesticidas, que además de ser caros, tienen impactos negativos al ambiente. La tendencia de una alimentación dirigida hacia lo sano ha incrementado la demanda de los alimentos orgánicos, y a este respecto, el uso de fitorreguladores de crecimiento, así como, microorganismos del suelo es una alternativa económica y sustentable para incrementar el rendimiento. Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) juegan un papel importante en la mejora de crecimiento de las plantas, y en los últimos años han sido utilizados como inoculantes bajo condiciones controladas y naturales. Con base en lo anterior, se evaluó el efecto de un fitorregulador, rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y hongos micorrízicos arbusculares en el crecimiento, rendimiento y calidad de aceite de tomillo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Fase de invernadero

Se estableció un experimento de producción de plantas en condiciones de invernadero, previo al trasplante en campo, en *Campus* Montecillo del Colegio de Postgraduados (2,242 m de altitud, 19° 28' 4.26" N y 98° 53' 42.18" W). El clima es templado con lluvias en verano, temperatura media anual de 15.9°C y una precipitación media anual de 710 mm.

### Material vegetal

Se compraron plántulas de tomillo en el vivero comercial CONAPLOR, ubicado en Cuautla, Morelos (N 18° 50' 57.28" W 98° 58' 09.75" y 1,330 msnm).

Las plántulas se identificaron taxonómicamente (Bailey, 1963) y se proporcionaron dos ejemplares al herbario del Colegio de Postgraduados, *Campus* Montecillo. Con el fin de conocer la morfología de las hojas se tomaron fotografías del envés y del haz en un microscopio electrónico de barrido marca JEOL-JSM 6390; también se capturaron imágenes de un corte trasversal de la hoja para conocer las capas que conforman la cutícula. La propagación de las plantas de tomillo se llevó a cabo en un invernadero. Las plantas se propagaron por esquejes separando ramas jóvenes de 10 cm de altura, se plantaron en bolsas negras de polietileno de 5 cm de diámetro y capacidad de 0.5 L. Se utilizó sustrato compuesto de peat moss: agrolita: suelo (2:2:1 v/v), previamente esterilizado durante 3 h a 18 lb plg<sup>2</sup> de presión, con un pH de 4.4, conductividad eléctrica 2.2, materia orgánica 39.4, con un contenido de P, K, Ca y Mg en 27, 0.6, 4.5 y 1.7 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Las plantas fueron regadas diariamente con agua corriente. Una vez establecidos los esquejes, estos se trasplantaron en bolsas de polietileno color negro, de 20 centímetros de diámetro y capacidad de 3 kg con sustrato similar al anterior.

### Establecimiento de tratamientos e inoculación

Al momento del trasplante se establecieron seis tratamientos: 1: inoculación con el consorcio de HMA Zac19; 2: con el consorcio de HMA Cedro; 3: con los consorcios de HMA Zac19 y Cedro; 4: con la RPCV *Paenibacillus polymyxa* P61; 5: aplicación del fitorregulador de crecimiento comercial Bioforte<sup>®</sup> y 6: testigo. La inoculación con HMA, se hizo inoculando con 10 g<sup>-1</sup> de

HMA directamente sobre el sistema radical (Alarcón *et al.*, 2007). Los inóculos con HMA tenían la siguiente composición específica: Zac-19 compuesto de *Glomus diaphanum*, *G. albidum*, *Claroideglomus claroideum*; y Cedro por *Scutellospora sp.*, *S. cerradensis*, *Glomus sp.*, *Claroideglomus etunicatun*, *Acaulospora sp.*, *Entrophospora infrequens*.

### Inoculación con RPCV

Se utilizó una cepa proporcionada por el Área de Microbiología, Edafología, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados clasificada como *Paenibacillus polymixa* (P61). Se propagó en caldo nutritivo durante 48 h en incubadora con agitación orbital a 28 °C y 120 rpm. Una vez que las bacterias llegaron a fase estacionaria de crecimiento, se centrifugó, y descartando el medio de cultivo, las bacterias se resuspendieron en solución salina isotónica. La suspensión bacteriana contenía  $56.3 \times 10^8$  células mL<sup>-1</sup>. Se aplicaron 5 mL<sup>-1</sup> de esta solución directamente sobre el sistema radical.

### Aplicación del fitorregulador

Debido al tipo de hojas, se añadieron 2 mg kg<sup>-1</sup> de un surfactante (marca DAP-PLUS FCO®) al regulador de crecimiento comercial Bioforte, el cual se aplicó en una dosis de 50 mg kg<sup>-1</sup>. La aplicación se realizó por la mañana 8:00 am cada 15 días asperjando las plantas.

### Fase de campo

Después de 120 días de cultivo en invernadero, las plantas se establecieron en una superficie de 500 m<sup>2</sup>. El suelo presentaba un pH de 8.3, conductividad eléctrica de 2.2 ds, contenido de P, K, Ca y Mg de 15.39, 2214, 4170 y 1452 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. El riego se realizó una vez por semana en un sistema

de irrigación rodado. Las plantas se distribuyeron de acuerdo a un diseño experimental completamente al azar, con 32 repeticiones para cada tratamiento. La distancia de plantación fue de 1.5×1.0 m entre hileras y plantas respectivamente.

### Variables

A los 105 días después del trasplante (DDT), se cortaron las plantas y se evaluó la **Altura** en tallo principal (cm); **Cobertura** (cm); **Número de inflorescencias** por conteo manual por planta; **Número de ramas** por conteo manual como número de ramas principales. El **Peso seco de la parte aérea**, se obtuvo secando en una estufa marca Riossa E-71 durante 6 días, a una temperatura de 70 °C hasta obtener peso constante. La **Colonización micorrízica**, mediante la recolecta de raíces de plantas de cada tratamiento mediante el método de tinción azul de tripano descrito por Phillips y Hayman (1970). También se tomaron fotos de las estructuras internas en un Fotomicroscopio III DE Carl Zeiss.

### Aceite esencial (AE)

El material seco recolectado de cada planta se colocó en un embudo bola de tres entradas, se agregó agua destilada hasta cubrir el material vegetal, el embudo fue conectado a un equipo de destilación por arrastre con vapor de agua durante 3 h. El destilado se colocó en un embudo de separación y se realizaron tres extracciones con diclorometano para separar la fase acuosa del AE. Al diclorometano con el AE recuperado se le agregó sulfato de sodio anhidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) con el objetivo de retirar agua residual en la muestra para ser concentrada en un rotaevaporador (Brinkmann), con el agua a 20 °C de temperatura has-

ta que todo el diclorometano fue separado. La muestra se colocó en viales de 5 mL a 4 °C hasta el análisis cromatográfico. El rendimiento de AE se calculó multiplicando la concentración de AE de cada tratamiento por el promedio de peso seco de la parte aérea correspondiente. Los datos se expresaron en mg de AE planta<sup>-1</sup>.

### Análisis del aceite esencial por cromatografía de capa fina

En una placa de sílica gel de 8×10 cm, se aplicaron 50 μL de cada muestra y de los estándares de timol y linalol. La placa se colocó en una cámara con un eluyente compuesto de tolueno-acetato de etilo (93:7); y poder observar a luz ultravioleta para marcar las manchas correspondientes a los compuestos del AE. Posteriormente la placa fue asperjada con un revelador de vainillina-ácido sulfúrico y se calentó durante 5 min a 100 °C (estufa marca LC-Oven LAB-LINE). Para obtener el valor de retención (Rf) **se calculó el cociente de la distancia recorrida desde el centro del origen por el compuesto entre la distancia recorrida desde el origen por el frente del eluyente**. La distancia recorrida por el compuesto se midió desde el centro de la mancha. Se realizó la comparación correspondiente con los estándares elegidos de acuerdo a la literatura.

### Análisis del aceite esencial por cromatografía de gases

La composición química del aceite esencial se obtuvo mediante un Cromatógrafo de Gases Marca HP6890 acoplado a un detector selectivo de masas HP5973. La identificación de los componentes estuvo basada en la composición de su espectro de masas y la base

de datos del espectrómetro. El análisis se realizó utilizando las condiciones propuestas por Alpaslan *et al.* (2013). El sistema cromatográfico usó una columna HP-5MS 30 m de longitud  $\times$  0.250 mm de diámetro interno y 0.25  $\mu$ m de grosor de fase estacionaria. La temperatura del horno comenzó en 40 °C y aumentó 5 °C por minuto hasta alcanzar 150 °C para mantenerse a esta temperatura por 3 min y luego comenzar a aumentar 5 °C por minuto hasta alcanzar 220 °C. Se usó helio como gas acarreador con 99.9% de pureza a flujo constante de 1.3 mL por minuto y a energía de ionización fue de 70 eV. La temperatura del puerto de inyección en modo splitless fue de 220 y 280 °C como temperatura de interface. Para el detector de masas la temperatura de la fuente de iones fue de 230 °C y 250 °C para el cuadrupolo. Se inyectó 1  $\mu$ L de muestra diluida en hexano grado GC (1  $\mu$ m de muestra en 10 mL de hexano). Se utilizaron estándares de timol y linalol. La identificación de los componentes se realizó mediante su índice de retención con los datos reportados en la literatura. En análisis estadístico se realizó con el análisis de varianza y comparación de medias de Tukey  $\alpha=0.05$  con el paquete estadístico SAS versión 9.0 (SAS, 2002).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Altura

La aplicación de HMA, RPCV y fitoregulator comercial no tuvieron efectos significativos en la altura de las plantas (Figura 2a). Se esperaba que la RPCV inoculada promoviera el crecimiento y desarrollo de la planta a través de mecanismos directos e indirectos, ya que las RPCV facilitan el crecimiento mediante la fijación de nitrógeno, solubilización de minerales y síntesis de sideróforos y hormonas, que aumentan la absorción de nutrimentos de las plantas, y los mecanismos indirectos consisten en favorecer su crecimiento protegiéndola de patógenos a través de producción de ciertos metabolitos o cambiando la vulnerabilidad de la planta a través de un mecanismo de defensa sistémica inducida (Mahmood *et al.*, 2014). En este caso, podría ser la producción de aceite esencial y/o terpenos. El efecto que tienen los RPCV en la inducción sistémica de terpenos y compuestos aromáticos, ha sido reportado por otros autores (Santoro *et al.*, 2011; Cappellari *et al.*, 2013; Colombo *et al.*, 2013) y en algunos casos con HMA se ve un efecto en el crecimiento de la planta pero no en el rendimiento y composición del AE. Para el presente caso, la altura de la planta no fue afectada.

### Cobertura

En lo que respecta a la cobertura de las plantas (Figura 2b), se registró que las inoculadas con HMA Cedro y con RPCV P61 superaron a las inoculadas HMA Zac19; de manera general todos los tratamientos presentaron una cobertura similar a la del testigo, a excepción de HMA Zac 19.

### Número de inflorescencias

Las plantas inoculadas con la RPCV P61 superaron (Figura 2c) a los tratamientos restantes con un promedio de 8.5 inflorescencias planta<sup>-1</sup>, atribuido a la producción y/o emisión de hormonas de crecimiento inducidas por las RPCV, pues se ha demostrado que éstas contribuyen directamente a la planta a través de síntesis de auxinas, citoquininas y giberelinas (Ahmed *et al.*, 2014; Capellari *et al.*, 2015). Así mismo, la floración inició primero en las plantas con la RPCV P61. Las plantas inoculadas con HMA no se vieron favorecidas en la producción de inflorescencias debido a la asignación de la biomasa.

### Número de ramas

El número de ramas se representa en la Figura 2d, donde se observa que las plantas que presentaron mayor número de ramas fueron las inoculadas con Zac19, seguido del tratamiento con la RPCV P61, con valores de 15.63 y 15.58, respectivamente. Los tratamientos restantes presentaron un número de ramas similar al del testigo.

### Peso seco de la parte aérea

La (Figura 2e) indica que el tratamiento con mayor peso seco fue con plantas inoculadas con HMA Cedro con 22.2 g<sup>-1</sup>, superando a tratamientos testigo e inoculado con HMA Zac19+Cedro. El tratamiento con aplicación de Bioforte<sup>®</sup> y el inoculado con HMA Zac19 también superaron al testigo, pero fueron similares al inoculado con la RPCV P61. Los beneficios de HMA se relacionan con la promoción de crecimiento y peso seco de la parte aérea, el uso de inóculos mixtos aumenta la posibilidad de que uno de los hongos colonice el sistema radical (De La Rosa, 2009); sin embargo, el beneficio de los HMA puede tener variaciones y en algunos casos mantener la simbiosis puede ser muy costoso para la planta y causar efectos negativos en el crecimiento (Zubek *et al.*, 2012; An-Dong *et al.*, 2013).

### Colonización micorrízica

Los HMA presentaron alta infectividad de acuerdo a lo indicado por Tapia *et al.* (2010). El tratamiento inoculado con HMA Zac19 presentó el valor más alto de coloni-



zación micorrízica (72%) (Figura 2f) y abundancia de arbuscúlos y vesículas, seguido por el tratamiento inoculado con Cedro (71.3%) y el consorcio de Zac19+Cedro (68.8%). Se sabe que la asociación micorrízica aumenta cuando la disponibilidad de nutrientes es limitada (An-Dong *et al.*, 2013). En este caso, los datos reflejan variación en la compatibilidad de *T. vulgaris* y los tipos de HMA usados. Las variaciones en el porcentaje de colonización se explican principalmente por la interacción planta-huésped (De La Rosa, 2009). La observación al microscopio de la asociación simbiótica se muestra en la Figura 1 mediante las estructuras internas, tales como, hifas, vesículas y arbuscúlos.

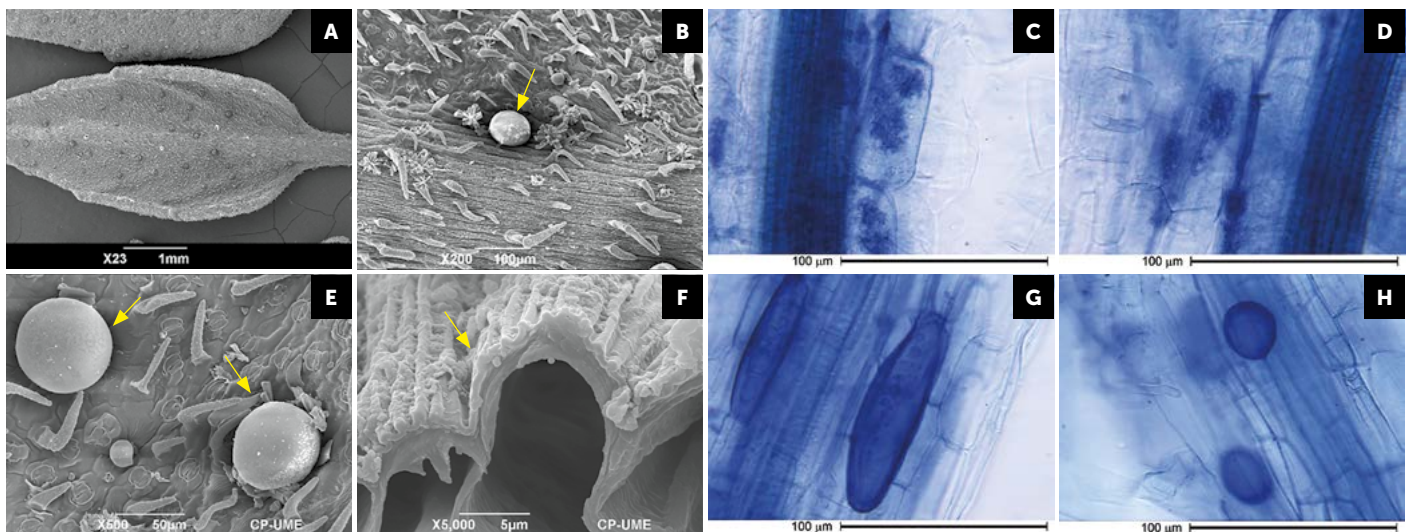
La colonización micorrízica con otras variables no tuvo relación clara con el número de inflorescencias; sin embargo el HMA Zac19 produjo mayor respuesta (Figura 2). En el peso seco de la parte aérea se observó que el testigo tuvo diferencias significativas con los tratamientos HMA Zac19 y Cedro los cuales

produjeron más peso. Respecto al rendimiento de AE, se registró que los HMA favorecieron el rendimiento de AE, destacando el tratamiento de HMA Zac19 con 224.7 mg AE planta<sup>-1</sup>. Este valor es menor al que obtuvo Guerrero *et al.* (2010) en un cultivo hidropónico. El efecto que tienen los HMA en la producción de aceites esenciales ya ha sido reportado, Nemeč y Lund (1990) informaron de que *Glomus intraradices* induce variaciones significativas en el la proporción y la composición de las sustancias volátiles de la hoja en *Citrus jambhiri*. Tres estudios realizados sobre *Mentha arvensis* indican que la presencia de HMA favorecen el crecimiento, la acumulación de aceite esencial y la mejora de absorción de nutrientes (Gupta *et al.* 2002; Copetta *et al.*, 2006).

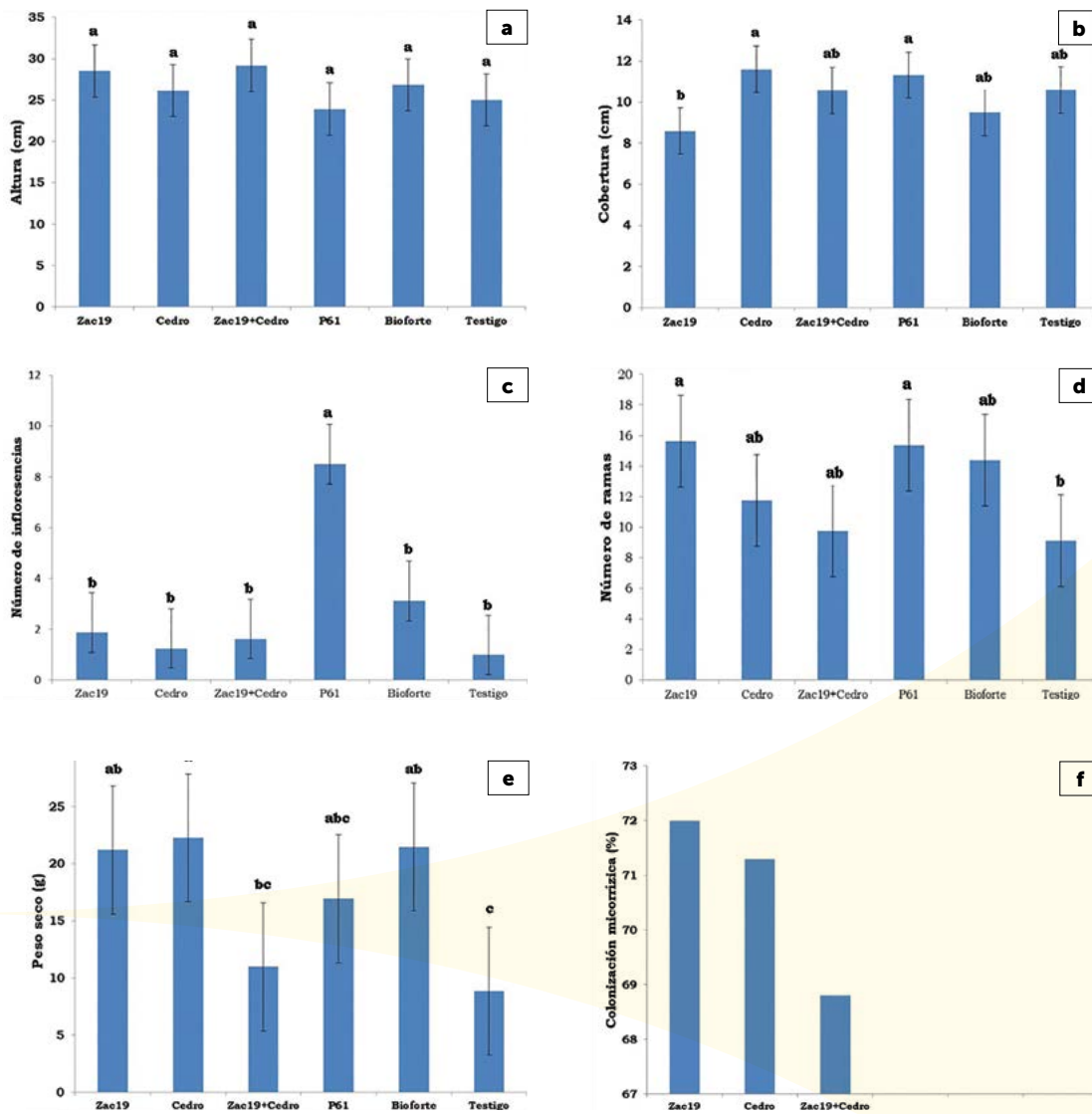
#### Aceite esencial

En relación al rendimiento de AE, el mayor rendimiento se registró en las plantas inoculadas con RPCV P61, HMA Zac-19 y aplicación de Bioforte con valores de 225.4; 224.7; y 212.7 mg planta<sup>-1</sup> respecti-

vamente. El valor más bajo se presentó en el testigo (75.2) y los valores intermedios en los tratamientos inoculados con HMA Cedro con 200.7 y HMA Cedro+Zac 19 con 87.6 mg de AE planta<sup>-1</sup>. De manera general, el aumento en la síntesis de AE pueden ser considerada como una respuesta defensiva a la colonización por HMA y RPCV, ya que varios componentes del AE tienen propiedades antimicrobianas. Otra explicación puede ser que la simbiosis le provee a la planta, principalmente, acceso a nutrientes que favorecen la acumulación de AE (Banchio *et al.*, 2008; Capellari *et al.*, 2013). El mayor rendimiento lo presentó el tratamiento inoculado con la RPCV P61, siendo probable que esto se deba a que las plantas inoculadas con RPCV pueden absorber más agua y nutrientes, por lo tanto, presenta un mejor estado nutricional, mayor tasa de asimilación de carbono y, de este modo, aumentan la biosíntesis de AE (Capellari *et al.*, 2015). Resultados similares han sido reportados por Banchio *et al.* (2008), Colombo



**Figura 1.** Micrografía de hojas de *Thymus vulgaris* L. obtenidas con MEB. A) superficie adaxial y abaxial 23X. B) Glándula esférica que contiene el aceite esencial a 200X. E) Glándulas a 500X. F) Corte transversal de la hoja, se observa que la cutícula presenta una capa cerosa, 5,000X. Estructura interna de la simbiosis entre HMA y la raíz de *Thymus vulgaris* L. en microscopio óptico. C) y D) arbuscúlos en la célula hospedante (Zac19). G) vesículas (Cedro) y H) espora e hifa del HMA (Zac19+Cedro).



**Figura 2.** Altura final (a), cobertura foliar (b), número de inflorescencias (c), número de ramas (d), peso seco de la parte aérea (e) y colonización micorrizica (f) de las plantas de tomillo a los 105 DDT con diferentes tratamientos de aplicación de un fitorregulador comercial (Bioforte) e inoculación con HMA y RPCV.  $n=8$ . Medias+DMS. Letras idénticas sobre las barras indican que los promedios de los tratamientos son estadísticamente iguales (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

*et al.* (2013), Capellari *et al.* (2015), estos trabajos demostraron que las inoculación de RPCV aumentan el rendimiento de AE en diferentes PAM. Las plantas micorrizadas presentaron mayor contenido de AE en comparación con el testigo, destacando el inóculo de HMA Zac19.

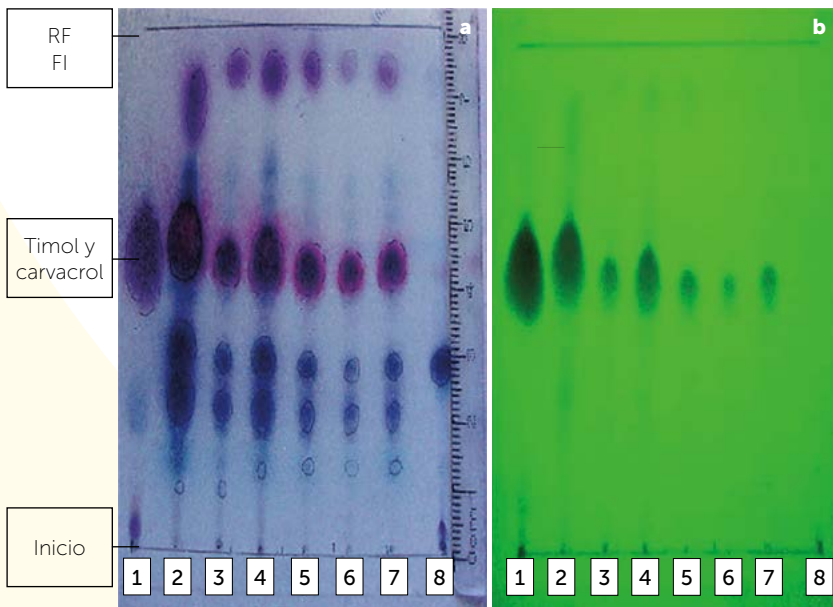
### Análisis del AE por cromatografía de capa fina

Los resultados revelados en las placas de sílica gel mostraron similitud en las manchas y en los valores de retención ( $R_f$ ) para todos los tratamientos. Bajo luz ultravioleta se observó la presencia de un componen-

te (Figura 3). Con la aplicación de revelador con un revelador de Vanilina-Ácido Sulfúrico se acentuaron tres componentes más (Figura 3). En esta prueba, para todos los tratamientos destaca una mancha color morada, rosa fuerte, azul fuerte y azul-verdoso, las cuales de acuerdo con Wagner y Bladt (2001) coinciden con trazas de tujeno y con los estándares de timol, linalol y borneol, respectivamente. En el Cuadro 1 se describen los tiempos de retención para cada mancha observada de los tratamientos y el de los estándares. Los tiempos de retención obtenidos coincidieron con los que han sido reportados en la literatura.

### Análisis del aceite esencial por cromatografía de gases

En el análisis por cromatografía de gases del aceite esencial se observaron 36 componentes, desde monoterpenos oxigenados, hasta monoterpenos hidrocarbonados que son los metabolitos con mayor abundancia en el aceite esencial tales como, el timol en rangos de 43.24%-52.55%, O-Cimeno entre 16.6%-21.8%, J-Terpineno 11.8%-17.9%, linalol de 1.77%-3.6%, y carvacrol de 0.5% a 3.4 (Cuadro 2). El tratamiento que registró mayor concentración de timol fue el Testigo (52.55%), seguido por el inoculado con P61 (51.05%) y Zac19+Cedro (50.66%).



**Figura 3.** a: Cromatografía de silica gel observada con revelador de Vainillina-Ácido Sulfúrico. b: Cromatografía luz ultravioleta. 1: Estándar de timol; 2: Testigo; 3: P61; 4: Zac19; 5: Cedro; 6: Zac19+Cedro; 7: Bioforte; 8: Estándar linalol.

Para O-Cimeno el tratamiento inoculado con Zac19 (21.79) presenta la mayor concentración, seguido de Zac19+Cedro y Bioforte® con 20.38% y 19.37% respectivamente. Respecto a la concentración de J-terpineno, Cedro y P61 mostraron valores más altos con 17.9% y 17.84%, respectivamente.

Se observó que el número de componentes y el porcentaje presente en el aceite esencial fueron diferentes en cada tratamiento (Cuadro 2). El tratamiento con Bioforte® presentó 26 componentes y una concentración de 43.73% de timol y favoreció la producción de Terpinen-4-ol y acetato de bornilo. El efecto que tienen los fitorreguladores comerciales en el rendimiento y composición del AE ya ha sido reportado, posiblemente su efecto se asocia a que estimulan las enzimas que participan en la producción de monoterpenos. Keltawi

**Cuadro 1.** Tiempos de retención (Rf) de componentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris*.

Manchas y estándares	Color (revelado con Vainillina-Ácido Sulfúrico)	Rf
1	Morado	0.91
2	Rosa fuerte	0.56
3	Azul oscuro	0.37
4	Azul-verdoso	0.31
Estándar timol	Rosa fuerte	0.55
Estándar linalol	Rosa fuerte	0.36

y Croteau (1997) demostraron que las citoquininas ejercen una influencia notable en la acumulación general de monoterpenos.

El AE del tratamiento Cedro es el único que registró limoneno, mientras que el AE del consorcio Zac19+Cedro es el único que presentó Acetato de L-Bornilo. El Alcanfor es el monoterpeno oxigenado presente únicamente en los tratamientos inoculados con HMA. La modificación de aceites esenciales por la presencia de HMA ya ha sido reportada por varios autores y lo atribuyen como consecuencia de los mecanismos de señalización entre los HMA y la planta (Zubek *et al.*, 2010). Al respecto, el establecimiento temprano de la simbiosis del HMA y del crecimiento vegetal la concentración de compuestos fenó-

licos es imprescindible, debido a que estos compuestos fenólicos pueden activar señales moleculares en el sistema simbiótico e influir en la colonización de la raíz por los HMA (De La Rosa, 2009). También se considera que estas modificaciones pueden ser una respuesta de defensa a la colonización HMA, debido a que las propiedades fungicidas de varios constituyentes de los aceites esenciales, y el aumento de la producción de estos metabolitos en plantas micorrizadas podían ser sintetizados como una respuesta de defensa a la presencia de la HMA en las raíces (Coppeta *et al.*, 2006; Karagiannidis *et al.*, 2011).

## CONCLUSIONES

La aplicación de un fitorregulador comercial, la inoculación de HMA y RPCV tienen efectos diferentes en el desarrollo vegetativo de *Thymus vulgaris*, así como en la calidad, composición y rendimiento de su aceite esencial. El rendimiento más alto de AE se presentó en las plantas inoculadas con P61, y en este tratamiento el timol constituye hasta 50% del AE. Los resultados obtenidos cumplen con las características que demanda el mercado ya que los aceites más solicitados son los que presentan compuestos fenólicos como constituyentes mayoritarios y cumplen con el requisito de calidad que exige la Norma ISO 6754:1996. Los resultados demuestran que existen diferencias en el proceso de colonización de los HMA y en los beneficios que le proporciona a las plantas de tomillo.

**Cuadro 2.** Composición química del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L., de plantas inoculadas con hongos micorrizicos arbusculares se observan 23 componentes para Zac19, 24 para Cedro y el consorcio de Zac19+Cedro.

Componente	Concentración (%)					
	1	2	3	4	5	6
2-metil ácido butanoico		0.21	-	-	0.19	-
$\alpha$ -Tujueno	0.84	1.06	0.87	0.7	1.15	0.87
$\alpha$ -Pino	0.66	0.73	0.74	0.54	0.84	0.66
Camfeno	0.54	0.61	0.75	0.5	0.73	0.63
$\beta$ -Pino	-	-	-	-	0.2	-
1-Octen-3-ol	0.6	0.74	0.85	0.79	0.99	0.68
N-methyl-2-Piridinemetanamina	-	-	-	0.98	-	-
3-Octano	-	0.21	-	-	-	-
$\beta$ -Mirceno	1.14	1.38	1.13		1.45	1.17
$\alpha$ -Terpineno	-	1.76	-	1.25	-	1.37
$\alpha$ -Felandreno	-	-	-	-	0.18	-
2-Careno	1.08	-	1.16	-	1.83	-
O-Cimeno	21.79	18.62	20.38	17.15	19.37	16.66
3-Careno	-	-	-	0.44	-	-
Limoneno	-	0.54	-	-	0.59	-
D-Limoneno	0.5	-	0.51	-	-	-
Eucaliptol	0.63	0.42	1.41	0.75	0.52	0.7
J-Terpineno	11.8	17.91	11.94	12.8	17.84	13.97
cis- $\beta$ -Terpineol	0.75	0.83	0.78	0.74	0.73	0.82
Linalol	3.06	2.88	2.21	2.13	2.51	1.77
d-2-Bornanon	-	-	-	-	1.11	-
Alcanfor	0.65	0.97	0.67	-	-	-
Borneol	-	-	1.94	1.94	1.27	-
L-Borneol	1.69	1.06	-	-	-	1.93
Terpinen-4-ol	0.66	0.62	0.58	0.64	0.75	0.39
$\alpha$ -Terpineol	0.23	-	0.28	-	0.73	-
Timol metil éter	0.68	0.24	0.39	0.57	-	-
Isotimol metil éter	-	0.79	-	-	0.73	0.73
Acetato de Bornilo	-	-	-	-	0.25	0.54
Acetato de L-Bornilo	-	-	0.26	-	-	-
Timol	48.08	43.24	50.66	51.05	43.73	52.55
Carvacrol	2.78	2.04	1.15	3.37	0.51	3.42
2-cyano-Acetamida	-	1.28	-	1.82	1.00	-
Cariofileno	1.31	1.56	0.93	1.84	1.27	0.68
Oxido de Cariofileno	0.53	-	0.39	-	0.23	-
Isolimoneno	-	0.27	-	-	-	-

La presente investigación brinda mejor comprensión respecto a la interacción organismos benéficos del suelo (HMA y RPCV) y *T. vulgaris* en condiciones de cultivo en campo. Los HMA y las RPCV (P61)

tuvieron un papel importante en crecimiento de las plantas de to-millo, así como en la calidad y ren-dimiento de su AE, sugiriendo su uso en plantas en condiciones de campo.

## LITERATURA CITADA

Alarcón A. 2007. Micorriza arbuscular. In Ferrera-Cerrato R., Alarcón A. Microbiología agrícola: Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo. Trillas, México. 97-98 p.



- Ahmed E.A., Hassan E.A., Tobgy K.M., Ramadan E.M. 2014. Evaluation of rhizobacteria of some medicinal plants for plant growth promotion and biological control. *Annals of Agricultural Science* 59(2): 273-280.
- Alpaslan D., Arslan M., Rusu L. 2013. Effects of harvesting hour on essential oil content and composition of *Thymus vulgaris*. *Farmacía* 61 (6): 1194-1203.
- Amad A., Männer K., Wendler K.R., Neumann K., Zentek J. 2011. Effects of a phylogenetic feed additive on growth performance and ileal nutrient digestibility in broiler chickens. *Poultry Science* 90: 2811-2816.
- An-Dong S., Qian L., Jian-Guo H., Ling Y. 2013. Influence of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Growth, Mineral Nutrition and Chlorogenic Acid Content of *Lonicera confusa* Seedlings Under Field Conditions. *Pedosphere* 23: 333-339.
- Bai-Bailey L. 1963. Manual of cultivated plants. Macmillan Pub Co. 1116 p.
- Banchio E., Bogino P., Zygadlo J., Giordano W. 2008. Plant growth promoting rhizobacteria improve growth and essential oil yield in *Origanum majorana* L. *Biochemical Systematics and Ecology* 36: 766-771.
- Cappellari L., Santoro M., Nieves F., Giordano W., Banchio E. 2013. Increase of secondary metabolite content in marigold by inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. *Applied Soil Ecology* 70: 16-22.
- Cappellari L., Santoro M., Reinoso H., Travaglia C., Giordano W., Banchio E. 2015. Anatomical, morphological, and phytochemical effects of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria on peppermint (*Mentha piperita*). *J Chem Ecol* 41: 149-158.
- Colombo R., Martínez A., Fernández F., Fernández L., Baren C., Lirab P., Godeasa A. 2013. Differential effects of two strains of *Rhizophagus intraradices* on dry biomass and essential oil yield and composition in *Calamintha nepeta*. *Rev Argent Microbiol.* 45(2): 114-118.
- Copetta A., Lingua G., Berta G. 2006. Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. var. *Genovese*. *Mycorrhiza* 16:485-494.
- De La Rosa C. 2009. Micorriza arbuscular y estrés abiótico en el contenido de alcaloides (vinblastina y vincristina) de *Cantharanthus roseus* (L.) G. Don. (Tesis de doctorado) Estado de México: Colegio de Postgraduados, 2009.
- Guerrero L., Ruiz P.L.M 2012. El cultivo de plantas aromáticas, una alternativa agroindustrial para ejidos y comunidades agrarias. México. Editorial del Colegio de Postgraduados. 67 p.
- Gupta M.L., Prasad A., Ram. M., Kumar S. 2002. Effect of the vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus fasciculatum* on the essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (*Mentha arvensis*) under field conditions. *Bioresource Technology* 81:77-79.
- Gurib-Fakim A. 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27: 1-93.
- Juárez-Rosete C. R., Aguilar-Castillo J. A., Juárez-Rosete M. E., Bugarín-Montoya R., Juárez-López P., Cruz E. 2013. Hierbas aromáticas y medicinales en México: tradición e innovación. *Bio Ciencias* 2: 119-129.
- Karagiannidis N., Thomidisa D., Panou-Filotheou E., Karagiannidou C. 2011. Effect of three Greek arbuscular mycorrhizal fungi in improving the growth, nutrient concentration, and production of essential oils of oregano and mint plants. *Scientia Horticulturae* 129: 329-334.
- Keltawi N., Croteau R. 1997. Influence of foliar applied cytokinins on growth and essential oil content of several members of the lamiaceae. *Phytochemistry* 26 (4): 891-895.
- Lubbe A., Verpoorte R. 2011. Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Industrial Crops and Products* 34: 785-801.
- Mahmood S., Ahmad M., Ahmad Z., Javaid A., Ashraf M. 2014. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology Advances* 32: 429-448.
- Phillips, J.M., Hayman D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society.* 55: 158-161.
- Sánchez-Verdugo C., Lucero-Flores M. 2012. Nichos de mercado de especies aromáticas orgánicas tipo gourmet. México. CINBOR. Editorial Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, Baja California Sur.
- Santoro S., Zygadlo J., Giordano W., Banchio E. 2011. Volatile organic compounds from rhizobacteria increase biosynthesis of essential oils and growth parameters in peppermint (*Mentha piperita*). *Plant Physiology and Biochemistry* 49:1177-1182.
- Tapia-Goné J., Ferrera-Cerrato R., Varela-Fregoso L., Rodríguez-Ortiz J., Soria-Colunga J., Tiscareño-Iracheta M., Loredó-Ostí C., Alcalá-Jáuregui A., Villar-Morales C. 2010. Infectividad y efectividad de hongos micorrízicos arbusculares nativos de suelos salino en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*). *Revista Mexicana De Micología* 31: 69-74.
- Wagner H., Blatt S. 2001. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 369 p.
- Zubek S., Stojakowska A., Anińska T., Turnau K. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi alter thymol derivative contents of *Inula ensifolia* L. *Mycorrhiza* 20:497-504.