



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

Selección y multiplicación de plantas aromático medicinales élite
resistentes a sequía y de interés para la industria agroalimentaria

D. Gustavo Javier Cáceres Cevallos

2023



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

Selección y multiplicación de plantas aromático medicinales élite
resistentes a sequía y de interés para la industria agroalimentaria

Autor: D. Gustavo Javier Cáceres Cevallos

Directora: D^a. María José Jordán Bueso

2023



**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD
DE LA TESIS PRESENTADA EN MODALIDAD DE COMPENDIO O ARTÍCULOS PARA
OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. Gustavo Javier Cáceres Cevallos

doctorando del Programa de Doctorado en

TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA (PLAN 2013)

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Selección y multiplicación de plantas aromático medicinales élite resistentes a sequía y de interés para la industria agroalimentaria

y dirigida por,

D./Dña. María José Jordán Bueso

D./Dña.

D./Dña.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Además, al haber sido autorizada como compendio de publicaciones o, tal y como prevé el artículo 29.8 del reglamento, cuenta con:

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 28 de septiembre de 2023

*Firmado por CACERES CEVALLOS GUSTAVO JAVIER - ***0465**
el día 28/09/2023 con un certificado emitido por AC*

Fdo.: FNMT Usuarios

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

El presente Proyecto de Tesis ha sido realizado para optar al grado de Doctor en el Programa Oficial de Doctorado en Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología por la Universidad de Murcia. Esta Tesis Doctoral se propone para Mención de Doctorado Internacional en virtud de la estancia predoctoral realizada bajo la supervisión de la Dra. Sandra Correia del Departamento de "Ciências da Vida", situado en "Universidade de Coimbra, Centro de Ecología Funcional" de Coimbra (Portugal)

This Thesis Project has been carried out to qualify for the degree of Doctor in the Official Doctoral Program in Food Technology, Nutrition and Bromatology at the University of Murcia. This Doctoral Thesis is proposed for International Doctoral Mention by virtue of the pre-doctoral stay carried out under the supervision of Dr. Sandra Correia of the Department of "Ciências da Vida", located at "Universidade de Coimbra, Centro de Ecología Funcional" of Coimbra (Portugal)

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a Dios por siempre mostrar en mi vida su fidelidad y demostrarme que nada es imposible sin su favor. A mi esposa Priscilla por la paciencia y la motivación brindada para ser perseverante durante este largo proceso. A mi padre por el amor y apoyo desde lejos que siempre me ha demostrado y que ha sido mentor en mi vida profesional. A Rebecca y Coco por ser mi recarga de energía y darme alegrías en los días de más trabajo.

Además, quiero agradecer a mi directora la Dra. María José Jordán por la oportunidad y confianza depositada en mí para llevar a cabo este proyecto de Tesis, pero, sobre todo, por el conocimiento y la guía brindada durante este largo proceso que me enseñó a mejorar y madurar mi camino en la investigación científica, que después de cuatro años todo lo que he aprendido es gracias a ella. Sin su ayuda, no hubiera podido llevar a cabo este proyecto de Tesis.

Agradezco también al equipo de profesionales del grupo de Plantas Aromáticas del IMIDA, María Quílez, Inma García, Cristina Martínez y María José Soler, que durante estos cuatro años aportaron para la consecución del proyecto de Tesis, siendo excelentes compañeros de trabajo y estando predispuestos siempre a prestar su ayuda incondicional. Especialmente agradezco a Pascual Romero por todas las horas dedicadas, ideas, consejos y aportes que me dio desde el inicio de la Tesis doctoral.

Mi agradecimiento también al Dr. Alfonso Albacete por la ayuda y conocimiento brindado en el campo de las fitohormonas, el cual fue un parámetro importante en el presente proyecto de Tesis.

También quiero agradecer a la Dra. Sandra Correia y a Tércia López que pertenecen al Departamento de “Ciências da Vida”, de la “Universidade de Coimbra, Centro de Ecología Funcional” por toda la ayuda que me brindaron durante mi estancia doctoral en Portugal.

También agradezco al Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental (IMIDA) por la acogida en sus instalaciones y a todas las personas que de una u otra manera conocí y me brindaron su ayuda para realizar mi trabajo en el centro de investigación.

Finalmente quiero agradecer al Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades del Gobierno de España por la ayuda otorgada para contratos predoctorales para la formación de doctores, y al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) por la financiación a través del proyecto RTA2017-00031-C04-04.

A Dios

A mis padres César e Ivonne

A mi esposa Priscilla

“Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes, porque Jehová tu Dios estará contigo en dondequiera que vayas.”

Josue 1:9

“A scientist in his laboratory is not a mere technician: he is also a child confronting natural phenomena that impress him as though they were fairy tales.”

Marie Curie

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Capítulo 1	Introducción	1
1.1	Plantas aromáticas y medicinales	1
1.1.1	Generalidades	1
1.1.2	Aceites esenciales de plantas aromático-medicinales.....	2
1.1.3	Subproductos de plantas aromático-medicinales.....	5
1.2	Usos y aplicaciones de las plantas aromático-medicinales.....	6
1.2.1	Uso alimentario.....	8
1.2.2	Uso medicinal y farmacéutico.....	13
1.2.3	Uso en perfumería y cosmética	16
1.2.4	Uso en sanidad vegetal.....	17
1.3	Cultivo de plantas aromático medicinales.....	19
1.4	Familia <i>Lamiaceae</i>	21
1.4.1	Espliego (<i>Lavandula latifolia</i> Medik).....	22
1.4.2	Tomillo rojo (<i>Thymus zygis</i> subs. <i>gracilis</i>)	23
1.5	Cambio climático	25
1.6	Fisiología del estrés en plantas.....	28
1.6.1	Estrés en las plantas	28
1.6.2	Sequía	31
1.7	Perspectivas de futuro	52
1.7.1	Fenotipado	52
1.7.2	Cultivo in vitro	53
1.7.3	Modificación genética	54
1.7.4	Edición genética.....	55
1.7.5	PRIMING	55
Capítulo 2	Justificación y Objetivos.....	59
2.1	Justificación	61
2.2	Objetivos	65
Capítulo 3	METODOLOGÍA GENERAL	67
3.1	Relative water content	69
3.2	Leaf water potential	69
3.3	Proline	70
3.4	Abscisic acid	70
3.5	α -tocopherol y plastochromanol-8	70
3.6	Lipid peroxidation.....	72
3.7	Photosynthetic pigments.....	72
3.8	Identification and quantification of phenolic compounds.....	73
3.8.1	Phenolic compounds identification	73
3.8.2	Phenolic compounds quantification	74
3.9	Antioxidant capacity	74
3.9.1	FRAP.....	74
3.9.2	DPPH*	75
Capítulo 4	Evaluation of the physiological parameters in <i>Lavandula latifolia</i> Medik. under water deficit for preselection of elite drought-resistant plants	77
4.1	Introduction	79
4.2	Materials and methods	79
4.2.1	Plant growth material and experimental design.....	81
4.2.2	Statistical analysis	81
4.3	Results and discussion.....	81

4.3.1	Physiological parameters	81
4.3.2	Non-enzymatic antioxidant system and malondialdehyde production.....	84
4.3.3	Photosynthetic pigments	86
4.3.4	Phenolic profile and antioxidant activity	88
4.4	Conclusions	91
Capítulo 5	Agronomic Evaluation and Chemical Characterization of <i>Lavandula latifolia</i> Medik. under the Semiarid Conditions of the Spanish Southeast	93
5.1	Introduction	95
5.2	Materials and methods	96
5.2.1	Crop Experimental Design and Plant Material	98
5.2.2	Essential oil extraction.....	99
5.2.3	Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS)	100
5.2.4	Statistical analysis	100
5.3	Results.....	100
5.3.1	Phytomass Production and Essential Oil Yield	100
5.3.2	Essential Oil Composition	102
5.3.3	Phenolic profile	105
5.3.4	Antioxidant capacity	106
5.4	Discussion.....	107
5.5	Conclusions	110
Capítulo 6	Physiological evaluation of <i>Thymus zygis</i> ssp. <i>gracilis</i> against drought, in ecotypes pretreated with high intensity LED light	111
6.1	Introduction	113
6.2	Materials and methods	114
6.2.1	Plant material, in vitro growth and priming conditions, and drought treatment	116
6.2.2	Statistical analysis	117
6.3	Results and discussion.....	117
6.3.1	Physiological parameters	117
6.3.2	Non-enzymatic antioxidants and lipid peroxidation	123
6.3.3	Photosynthetic pigments	126
6.3.4	Phenolic profile and antioxidant activity	129
6.4	Conclusions	137
Capítulo 7	Conclusiones.....	140
Capítulo 8	Resumen.....	144
Capítulo 9	Difusión de Resultados	152
Capítulo 10	Referencias	158
Capítulo 11	Anexos	200

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1 Evolución anual de publicaciones de plantas aromático-medicinales desde el 2012-2022.	7
Figura 1-2. Principales campos de aplicación de las plantas aromático-medicinales y sus derivados.	7
Figura 1-3. Producción mundial de aceites esenciales.	19
Figura 1-4. Superficies de cultivo de PAM en España.	20
Figura 1-5. Evolución del cultivo de PAM en España y la Región de Murcia.	21
Figura 1-6. Mapa de la región de Murcia de Murcia y principales municipios productores de PAM.	21
Figura 1-7. Arbusto de un espliego silvestre (<i>L. latifolia</i>).	23
Figura 1-8. Tomillo rojo (<i>Thymus zygis</i> subsp. <i>gracilis</i>).	24
Figura 1-9. Esquema representativo de la seguridad alimentaria para el año 2050.	25
Figura 1-10 Cambios en el rendimiento de los cultivos europeos modelados para cuatro escenarios simulados (HadCM3 A2, HadCM3 A2, ECHAM A2 y ECHAM A2) para el período 2071-2100.	26
Figura 1-11. Esquema de las moléculas que intervienen en la reacción global de la fotosíntesis.	27
Figura 1-12. Esquema del uso de los aceites esenciales de la planta como aleloquímicos.	29
Figura 1-13. Tipos de estrés abiótico en plantas.	30
Figura 1-14. Fases de las respuestas de las plantas a situaciones de estrés ambiental.	30
Figura 1-15. Principales respuestas al estrés por sequía de las plantas.	32
Figura 1-16. Ejemplos de los efectos perjudiciales de la sequía en las plantas.	33
Figura 1-17. Equilibrio entre los antioxidantes y ROS.	34
Figura 1-18. Esquema de la peroxidación lipídica.	34
Figura 1-19. Principales osmolitos relacionados con el ajuste osmótico.	36
Figura 1-20: Resumen de las reacciones del sistema antioxidante enzimático sobre diferentes ROS.	38
Figura 1-21 Ruta del AsA-GSH (ascorbato-glutatión).	40
Figura 1-22. Estructuras de los tocoferoles.	42
Figura 1-23 Estructura del plastocromanol-8.	42
Figura 1-24. Biosíntesis del ácido abscísico.	46
Figura 1-25. Esquema de las reacciones enzimáticas en el ciclo de la clorofila.	48
Figura 1-26. Esquema del ciclo de las xantofilas.	49
Figura 1-27: Diagrama esquemático de la fotosíntesis C ₃ , C ₄ y CAM.	51
Figura 1-28. Estructura de un fenotipado de plantas.	53
Figura 1-29. Respuesta de priming de una planta en la misma generación y transgeneracional.	56
Figura 1-30. Principales mecanismos de regulación epigenética.	56
Figure 4-1 Graphical abstract of Experiment 1.	80
Figure 4-2. a) %RWC, b) ψ WP, c) ABA, and d) proline in spike lavender, in response to the drought (DS) and well-watered (WW) treatments.	82
Figure 4-3. Synthesis of a) α -toc, b) PC-8, and c) MDA in spike lavender in response to the drought (DS) and well-watered (WW) treatments.	85
Figure 5-1. Graphical abstract from Experiment 2.	97
Figure 5-2 Climatic data of the experimental area of the first-, second-, and third-year crop.	98
Figure 5-3 Evaluation of (a) agronomic yield and (b) essential oil yield in <i>Lavandula latifolia</i> during three consecutive years.	101
Figure 5-4 Antioxidant capacity of <i>L. latifolia</i> in three consecutive crop years by methods (a) DPPH assay and (b) FRAP assay.	106
Figure 6-1 Graphical abstract of Experiment 3.	115
Figure 6-2 Outline of the experimental design.	117
Figure 6-3 Physiological parameters (a, b) relative water content (%RWC), (c, d) proline (Pro), and (e, f) abscisic acid (ABA) in light-primed and control <i>Thymus zygis</i> plants and their response to drought-stress and watering treatments.	120

Figure 6-4 Synthesis of (a, b) α -tocopherol (α -T), (c, d) plastochromanol-8 (PC-8), and (e, f) malondialdehyde (MDA) in light-primed and control *Thymus zygis* plants and their response to drought-stress and watering treatments124

Figure 6-5 Content of (a, b) chlorophyll a (Chl-a), (c, d) chlorophyll b (Chl-b), (e, f) carotenoids (Car), and (g, h) total chlorophyll (ChlT) in primed and control *Thymus zygis* plants and their response to drought-stress and watering treatments.127

Figure 6-6 Principal component analysis for the phenolic compounds in primed and control *Thymus zygis* plants and their response under drought conditions.....133

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. Eficacia biológica de compuestos bioactivos de diferentes PAM pertenecientes a la familia <i>Lamiaceae</i>	16
Tabla 1-2. Insecticidas y acaricidas comerciales basados en aceites esenciales de plantas	18
Tabla 1-3. Clasificación de las enzimas relacionadas con la acumulación de prolina durante el ajuste osmótico	37
Tabla 1-4. Clasificación de compuestos fenólicos	44
Table 4-1 Effects of the drought treatment on the chlorophyll and carotenoid contents of leaves of eight spike lavender ecotypes.....	87
Table 4-2 Effects of the drought treatment on the polyphenolic profile and antioxidant activity of eight spike lavender ecotypes.....	89
Table 5-1. Essential oil yield and chemotype definition of the four ecotypes under study	99
Table 5-2 Essential oil volatile profile of <i>Lavandula latifolia</i> over three years of cultivation practices	102
Table 5-3 Phenolic profile analysis of four spike lavender ecotypes. Results are expressed as mean \pm SD. Different letters indicate a significant difference between years per component at $p < 0.05$	105
Table 6-1 Analysis of variance (mean squares) in relative water content (RWC), proline, abscisic acid (ABA), α -tocopherol (α -T), plastochromanol-8 (PC-8), malondialdehyde (MDA), chlorophyll a (Chl-a), b (Chl-b), total (ChlT), and carotenoids (Car) by (A) ecotype and (B) light priming (control vs primed group), and their interactions, under drought conditions	119
Table 6-2 Quantitative phenolic profile of light-primed and control <i>Thymus zygis</i> ssp. <i>gracilis</i> ecotypes and their response to drought-stress and watering treatments.....	130
Table 6-3 Antioxidant activity of ten ecotypes of <i>Thymus zygis</i> ssp. <i>gracilis</i> by methods (a) DPPH assay and (b) ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay	136

ABREVIATURAS

AAO: ABA-aldehído oxidasa

ABA: ácido abscísico

AE: aceites esenciales

APX: ascorbato peroxidasa

AsA-GSH: ascorbato glutatión

CAM: metabolismo ácido de las crasuláceas

CAT: catalasa

Chl: clorofilas

COV: compuestos orgánicos volátiles

DHA: dehidroascorbato peroxidasa

DHAR: dehidroascorbato reductasa

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EFSA: European Food Safety Authority

FDA: U.S. Food and Drug Administration

FRAP: Ferric Reducing Ability Power

GM: genéticamente modificado

GR: glutatión reductasa

GSH: glutatión reducido

LED: Light Emitting Diode

MDA: malondialdehído

MDAR: monodehidroascorbato reductasa

MDR: multidrug-resistant

NCED: 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa

NPQ: non-photochemical quenching

PAM: plantas aromático medicinales

PC-8: plastochromanol-8

POD: peroxidasa

PS I: photosystem I

PS II: photosystem II

ROS: reactive oxygen species

RWC: relative water content

SFE: Supercritical fluid extraction

SOD: Superóxido dismutasa

TCA: Tasa de conversión alimenticia

ZEP: zeaxantina epoxidasa

α -Toc: α -tocopherol

ψW_p : osmotic pressure

Capítulo 1 Introducción

Introduction

1.1 Plantas aromáticas y medicinales.

1.1.1 Generalidades

Las plantas aromático-medicinales (PAM) pueden definirse como aquellas especies que tienen propiedades o efectos farmacológicos beneficiosos sobre los humanos o los animales [1]. Esta definición permite diferenciar las plantas cuyo efecto terapéutico o farmacológico ha sido demostrado científicamente, de aquellas que se les atribuye un efecto medicinal pero no ha sido comprobado [2].

Históricamente, el registro más antiguo del uso de las PAM data de hace aproximadamente 5000 años en la civilización sumeria, el cual se basaba en recetas escritas en arcilla para preparar diferentes “medicamentos” donde se evidencia el uso de aproximadamente unas 250 plantas, siendo destacado el uso de la amapola, beleño, regaliz y mandrágora [3]. Posteriormente, civilizaciones como la china, la hindú y la egipcia escribieron libros donde recopilaban los usos y beneficios de diferentes plantas en tratamientos sobre la salud; inclusive, en datos recopilados de la Biblia y el libro sagrado judío Talmud, señalan que rituales de sanaciones eran acompañados de PAM como el mirto, el incienso y la mirra. [4]. Incluso, hoy en día en zonas desfavorecidas de la India, donde el acceso a la medicina y farmacología es escaso, se sigue practicando un tipo de medicina denominada “medicina Ayurvedica”, la cual contiene información ancestral del uso de PAM en el tratamiento de diferentes enfermedades [5].

Durante las últimas décadas el uso de PAM en la farmacología y medicina se ha extendido enormemente gracias a los avances tecnológicos, lo que ha permitido investigar y desarrollar fármacos basados en principios activos extraídos de estas plantas (principalmente obtenidos de los aceites esenciales), llegando a estar presentes en casi el 30% de los medicamentos producidos y vendidos en el mundo [6]. En este sentido, numerosas farmacopeas (Ph Eur 6, USP XXXI y BP 2007, entre otras) reconocen el valor medicinal de los fármacos derivados de plantas, inclusive países como el Reino Unido, Rusia y Alemania cuentan con una farmacopea de especies vegetales [4].

En la legislación mundial NORMA GENERAL PARA LOS ADITIVOS ALIMENTARIOS CODEX STAN 192-1995, en su última revisión 2019 12.2.1 Hierbas aromáticas y especias. se describen los productos cuyo uso tiene por objeto acentuar el aroma y el sabor del alimento. Las hierbas aromáticas y las especias normalmente se obtienen de fuentes vegetales y pueden deshidratarse, y presentarse molidas o enteras. Ejemplos de hierbas aromáticas son la albahaca, el orégano y el tomillo.

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés), ha desarrollado desde el 2005 diferentes Comités Científicos para la evaluación de la seguridad de productos botánicos y preparados botánicos en la alimentación, señalando que si los productos botánicos para los que existe un conocimiento adecuado de su inocuidad podrían beneficiarse de una “presunción de seguridad” sin necesidad de realizar más pruebas, mientras que, para los productos que no tienen la “presunción de seguridad” estarán sujetos a una evaluación para garantizar su inocuidad [7].

Por su parte, la industria alimentaria ya en el DECRETO 2484/1967, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español contempla en el Capítulo XXIV 3.24.00. el uso reglamentario de condimentos y especias. Así la sección 3^{ra} 3.24.21. define el concepto de condimento aromático como: “*Se designa con el nombre de especias o de condimentos aromáticos a las plantas, frescas o desecadas, enteras o molidas, que, por tener sabores u olores característicos se destinan a la condimentación o a la preparación de ciertas bebidas*”.

Entre las especies catalogadas dentro del Código Alimentario Español destacan por su gran interés para la Región de Murcia el uso de hojas y sumidades sanas, limpias y secas de varias especies como Artemisa (*Artemisia vulgaris* L.), espliego (*Lavandula latifolia*), el orégano (*Origanum vulgare* L., y *O. virens*), la mejorana (*O. majorana* L.), almoradux (*Thymus Mastichina* L.), menta poleo (*Menta pulegium*), romero (*Rosmarinus officinalis* L.), salvia (*Salvia officinalis*); *S. lavandulaefolia* subsp. Vahl. y Tomillo (*Thymus vulgaris*).

1.1.2 Aceites esenciales de plantas aromático-medicinales

De acuerdo con la Farmacopeia Europea [8], un aceite esencial (AE) se define como “*producto oloroso, generalmente de composición compleja, obtenido a partir de una materia prima vegetal definida botánicamente, por destilación con vapor, por destilación seca, o por un proceso mecánico apropiado sin calentamiento*”. Los aceites esenciales normalmente se separan de la fase acuosa mediante un proceso físico que no afecta significativamente a su composición [9]. Las plantas con mayor producción de AE pertenecen a varios géneros distribuidos en aproximadamente 60 familias. Entre ellas destacan, *Alliaceae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Myrtaceae*, *Poaceae* y *Rutaceae* como buenas productoras de aceites esenciales con un elevado valor para la medicina y/o la industria [10].

Un AE está formado por compuestos orgánicos volátiles (COVs) de bajo peso molecular en su mayoría (terpenoides y compuestos fenólicos), que son sintetizados durante el metabolismo secundario de las plantas. No obstante, la composición química de estos puede estar influenciada por varios factores como condiciones ambientales y geográficas de crecimiento, composición genética, variaciones fisiológicas, ataques de patógenos, entre otras [11].

La biosíntesis de estas fracciones volátiles tiene lugar en las hojas, donde se acumulan en células, cavidades secretoras o pelos glandulares [12], permaneciendo allí hasta la floración. Durante este proceso los AE migran hacia las flores y parte de ellos se consumen durante la fecundación [13]. Tras este estado fenológico, el AE pasa a acumularse en frutos y semillas, o bien migra hacia las hojas, corteza y raíz de la planta [14]. Los metabolitos secundarios presentes en los AE cumplen funciones importantes en las plantas como la protección y la interacción entre las mismas [11]. Por ejemplo: en el caso de la protección, se ha evidenciado que algunas plantas liberan metabolitos secundarios para atraer al depredador de su herbívoro atacante y éste logre eliminarlo [15]. Mientras que, en el caso de la interacción entre plantas, la emanación de metabolitos secundarios puede activar un mensaje de alerta ante un posible ataque patógeno e inducir expresión génica de defensa en otras plantas, o en algunos casos pueden generar un efecto alelopático sobre otras plantas [16].

Los AE tienen propiedades aromáticas que les confieren características especiales para su uso en diferentes campos. Es por eso que se estima que aproximadamente un total de 3.000 plantas son utilizadas por sus AE, de las cuales unas 300 tienen un mercado económico importante [3]. Inclusive, el valor en mercado de una PAM estará determinado por su rendimiento y la cantidad de los diferentes metabolitos secundarios que contenga su AE (quimiotipo) [17,18].

Sadgrove, Padilla-González, y Phumthum [19], señalan que los metabolitos que puede contener un AE se pueden clasificar según cuatro diferentes criterios: (1) origen biosintético primario, (2) tamaño o número de carbonos, (3) esqueleto carbonado de los metabolitos y (4) carácter de la oxidación por átomos electronegativos. Además, estos autores destacan que existen cuatro rutas biosintéticas principales (ruta del mevalonato, metil eritritol fosfato, shikimato y glucosinolato) que pueden sintetizar tres grandes grupos de compuestos volátiles (terpenos, fenilpropanoides e isotiocianatos.)

La obtención de AE se logra mediante diferentes técnicas de extracción como la destilación, hidrodestilación o extracción con disolventes orgánicos, siendo la más utilizada el método por destilación. Sin embargo, en los últimos años se ha extendido el uso de la extracción con dióxido

de carbono supercrítico la cual trabaja a temperaturas más bajas que la hidrodestilación para mantener principios activos que pudiesen degradarse a altas temperaturas [3].

Métodos de extracción de aceites esenciales

El proceso por el cual se separan los AE esenciales contenidos en una planta se conoce como extracción, que dependiendo de la técnica aplicada puede ser química, bioquímica y/o mecánica, la cuál será escogida para maximizar los rendimientos de obtención sin disminuir la calidad del AE [20]. Los métodos de extracción de AE pueden dividirse en dos grandes grupos: métodos convencionales y no convencionales.

Métodos convencionales

La hidrodestilación es el método de extracción más antiguo y utilizado para la obtención de AE, siendo hasta la actualidad, el más eficaz para extraer el AE contenido en material vegetal leñoso y/o en floración. De hecho, este método además facilita la liberación de compuestos hidrófobos contenidos en la planta que poseen un alto punto de ebullición (las fracciones más pesadas) [21].

La destilación con arrastre de vapor es otra técnica ampliamente utilizada por su alta efectividad para la obtención de compuestos volátiles, teniendo un rendimiento de aproximadamente el 93% [22]. Este método a diferencia de la hidrodestilación, utiliza vapor de agua lo cual lo convierte en un método eficiente al reducir el gasto hídrico, inclusive Yildirim y colaboradores [23] mencionan que al medir la capacidad antioxidante a través de la técnica de DPPH* (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) de los AE obtenidos por arrastre con vapor, muestran una mayor capacidad que los obtenidos por otros métodos convencionales.

La hidrodifusión es un método convencional que se utiliza para la extracción de AE contenidos en material vegetal seco que pueden degradarse a altas temperaturas. Actualmente, este método ha mejorado mediante la tecnología de microondas [21,24,25], puesto que, es un método que tiene una baja eficiencia de obtención y un alto consumo energético e hídrico por su larga duración [22].

Métodos no convencionales

En la actualidad, la extracción mediante el uso de un fluido supercrítico como disolvente (agente extractante) (SFE, por sus siglas en inglés) es una técnica muy utilizada por sus grandes beneficios,

como la disminución en el tiempo de extracción y una menor pérdida de compuestos de interés [22]. De hecho, se ha evidenciado un aumento en la concentración de los terpenoides contenidos en AE (componentes mayoritarios) por su alta solubilidad en dióxido de carbono denso, el cual es el disolvente supercrítico más usado por su baja toxicidad y estabilidad química [21,26]. En este método, la extracción se da una temperatura no mayor de 31,1°C y con una presión que sobrepase los 7,4 MPa.

Asimismo, la extracción a través del agua en estado subcrítico (SWE, por sus siglas en inglés) es otro método altamente eficiente por sus tiempos cortos en la extracción de AE (aproximadamente 15 minutos) y con un alto rendimiento en obtención de compuestos oxigenados, sin embargo, es un método caro y con un alto coste energético [22].

La extracción con microondas sin disolvente (SFME, por sus siglas en inglés), es una técnica que fue diseñada para extraer AE a nivel de laboratorio, sin la adición de agentes extractantes y utilizando una energía de microondas [27]. Este método es considerado el más efectivo y respetuoso con el medioambiente por no usar agua [28].

El residuo generado tras el proceso de extracción de los aceites esenciales, sin utilidad aparente y compuesto en su mayoría por hojas, tallos y sumidades floridas, es una fuente de componentes fenólicos con marcadas propiedades biosaludables [29]. Estos remanentes, cuando son reutilizables, se catalogan como subproductos ya que pueden cumplir con las especificaciones técnicas establecidas, son seguros tanto para la salud humana como para el medio ambiente y existe un mercado para su venta (Reglamento (CE) 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH) y el Reglamento (CE) 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008).

1.1.3 Subproductos de plantas aromático-medicinales

En los últimos años, el aprovechamiento de materias ricas en polifenoles provenientes de residuos de la industria alimentaria (extracción y obtención de metabolitos secundarios), ha permitido revalorizar residuos de otros procesos industriales, que al ser usados en la agricultura y/o la producción de alimentos contribuyen a la creación de nuevas cadenas de valor en el medio rural y al desarrollo de la economía circular [30]. Este hecho permite una gestión libre de residuos y aprovechamiento al máximo del material producido por las PAM, como los extractos polifenólicos procedentes de la misma materia prima vegetal usada en la extracción de aceites esenciales.

Extractos fenólicos

Como se menciona anteriormente, en años recientes la demanda en el uso de subproductos vegetales provenientes de la destilación de plantas aromáticas durante la obtención de aceites esenciales, por su riqueza en compuestos de interés, ha crecido rápidamente [31]. Estos subproductos vegetales libres de aceite esencial, están enriquecidos por compuestos fenólicos que no han sido arrastrados por el vapor de agua durante la destilación, por lo que, son altamente demandados por la industria agroalimentaria al ser una fuente natural, segura y novedosa de antioxidantes [32].

Un extracto fenólico (EP) podría definirse como un compuesto o sustancia que puede ser extraído de un material vegetal o subproducto vegetal, cuya principal función es ser reutilizado como aditivo alimentario gracias a la cantidad presente de metabolitos secundarios [33].

Los componentes presentes en los EP suelen ser mayoritariamente ácidos fenólicos y flavonoides, principios activos con marcada capacidad antioxidante que aportan una protección frente al estrés oxidativo [34]. Por ello, en la actualidad el uso de extractos polifenólicos se ha convertido en una estrategia innovadora para mejorar la calidad y las características organolépticas de la carne fresca y sus derivados [35]. Sin embargo, la aplicación de estos extractos dependerá de ciertos factores, entre ellos, el perfil lipídico, perfil fenólico y presencia de compuestos volátiles, así como, su estructura y funcionalidad [36].

Los extractos polifenólicos pueden obtenerse a través de métodos clásicos, como la extracción mediante disolventes orgánicos, o mediante técnicas más modernas como la extracción con fluidos supercríticos, o la asistida por: microondas, por ultrasonido, o por líquidos iónicos [37].

1.2 Usos y aplicaciones de las plantas aromático-medicinales

En la última década el estudio sobre PAM en el mundo científico ha crecido de forma exponencial. Según información recopilada en la base de datos bibliográfica de resúmenes y citas de artículos de revistas científicas “Scopus”, el crecimiento en I+D de PAM en una década pasó de 85 publicaciones a 256 publicaciones por año, indicando un crecimiento de aproximadamente un 300% (Figura 1-1).

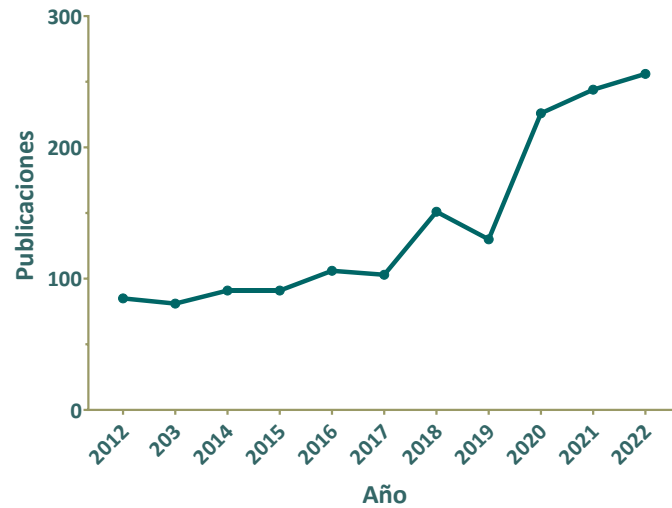


Figura 1-1 Evolución anual de publicaciones de plantas aromático-medicinales desde el 2012-2022. Fuente: Elaboración propia de datos tomados de la base de datos Scopus con el criterio de búsqueda “aromatic-medicinal plants”

Gracias a este crecimiento en la investigación de los usos y aplicaciones de las PAM, su campo de aplicabilidad es muy versátil, siendo usadas en industrias como la alimentaria, médica y farmacológica, cosmética y perfumería, sanidad vegetal, entre otras (Figura 1-2).



Figura 1-2. Principales campos de aplicación de las plantas aromático-medicinales y sus derivados. Fuente: elaboración propia

1.2.1 Uso alimentario

Uso alimentario en humanos

Gastronomía

Indudablemente el uso de PAM en la gastronomía ha permitido potenciar sabores y dar características únicas a la cocina de diferentes regiones del mundo. De hecho, la importancia de sus propiedades ha hecho que exista un intercambio cultural de sabores gracias a lo que se conoce como “especias”. La farmacognosia diferencia una especia de una planta aromática mediante el método de secado aplicado; así para obtener las primeras se realiza un proceso de postcosecha solo de las partes con características organolépticas interesantes para la gastronomía [38].

En la actualidad, tanto a nivel gastronómico como tecnológico se buscan productos que permitan innovar la preparación de platos y alimentos, otorgándoles un valor agregado que vaya más allá de una experiencia sensorial [39]. Igualmente, la aplicación de PAM se ha extendido a la condimentación para preparar dietas más sanas y equilibradas, ya que puede conllevar una disminución en el uso de la sal, cuyo consumo en exceso genera problemas cardiovasculares [40].

Alimentos funcionales

El término de alimento funcional, engloba *“a todo alimento o ingrediente alimentario que, además de su valor nutritivo, contiene componentes biológicamente activos que aportan algún efecto añadido y beneficioso para la salud y reducen el riesgo de contraer ciertas enfermedades”*[41].

El uso tradicional de plantas aromático-medicinales con fines preventivos permite su inclusión en el catálogo de alimentos funcionales [42]. Como ejemplo destacan las especias, que además de conferir sabor a los alimentos mejoran la digestión y por lo tanto ayudan a prevenir ciertas enfermedades.

Entre las propiedades beneficiosas descritas en PAM destacan antioxidante, antiinflamatoria, antitumoral, anticolesterolémica y antimicrobianas, entre otras [43]. El consumo de alimentos enriquecidos con compuestos bioactivos, procedentes del metabolismo secundario de PAM, entre los que se incluyen ácidos fenólicos, flavonoides y alcaloides están recomendados en las pautas dietéticas para prevenir los efectos derivados del estrés, la hipertensión y enfermedades cardiovasculares. Así mismo, el consumo de estos alimentos puede ayudar a la modulación del metabolismo lipídico, previniendo así la acumulación de grasa y la obesidad [44].

Otro aspecto a considerar es la capacidad de estas plantas para prevenir enfermedades transmitidas por alimentos y su efecto positivo sobre la vida útil de los mismos. Este hecho las ha posicionado en la industria alimentaria como fuente de bioactivos en sustitución del uso de aditivos artificiales [45]. Hoy en día, tanto los extractos como los aceites esenciales de plantas aromático-medicinales, con efectos beneficiosos sobre la salud, se consideran aditivos naturales de nueva generación [46]. Este nuevo enfoque ha supuesto un impulso importante en la innovación dentro de la industria alimentaria. Su uso es especialmente interesante en la elaboración de alimentos mínimamente procesados con carácter funcional y comercializados con etiquetas limpias [47].

Aditivos Conservantes de alimentos

El uso y aplicación de productos provenientes de PAM ha permitido encontrar una solución alternativa a los antioxidantes y conservantes sintéticos utilizados tradicionalmente en la industria alimentaria [47]. De hecho, gracias a su gran poder antioxidante se usan PAM como aditivos alimentarios para la conservación de alimentos procesados como carne, bollería, grasas y congelados derivados del pescado entre otros, ya que mantiene sus propiedades y evita la oxidación lipídica de los mismos [48,49]. El aumento en el uso de extractos polifenólicos de PAM se ha dado por la alta demanda de productos naturales que puedan inhibir este tipo de oxidación sin comprometer la salud de los consumidores [36].

Un claro ejemplo de aditivo conservante es el romero, una PAM catalogada como una de las mayores fuentes de compuestos antioxidantes por su alta riqueza en ácido carnósico y carnosol [50]. El extracto lipofílico de romero ha sido reconocido por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) como un extracto natural de origen vegetal seguro para la aplicación como aditivo alimentario. Así, la Unión Europea lo ha autorizado como antioxidante (E392), en dosis máximas de 150mg/kg en productos cárnicos y de pescado [51].

Otro de los productos derivados de PAM y de interés como conservante alimentario son los aceites esenciales. El uso de AE de algunas especies aromáticas ha permitido una disminución de sustancias citotóxicas como las micotoxinas, que se producen en los alimentos durante su almacenamiento [52,53]. Sin embargo, su uso suele estar limitado a la cantidad de AE que es necesario añadir para alcanzar el efecto deseado, lo que podría cambiar las propiedades organolépticas del alimento o generar el efecto contrario al deseado. No obstante, en los últimos años se han encontrado soluciones como las señaladas por Hyldgaard y colaboradores [54], que consisten en la adición de AE en encapsulados de polímeros biodegradables para mantener las

propiedades antioxidantes y antimicrobianas del AE y permitir una liberación lenta en la matriz del alimento, o añadir otros compuestos antimicrobianos y generar un efecto sinérgico de ambos [55].

El uso indirecto de los AE, como conservantes alimentarios incorporados en envases activos, es otra de las tecnologías utilizadas para el incremento de la vida útil de los alimentos [56]. Un envase activo, en el que se incluyen AE, está diseñado para liberar sustancias bien directamente sobre el alimento envasado o en su entorno. Dependiendo de la composición química de estos aceites y de su interacción con la matriz del polímero, las moléculas activas liberadas pueden actuar como agentes antioxidantes y/o antimicrobianos [57].

Aromatizantes y saborizantes

Las PAM tienen propiedades organolépticas capaces de influir sobre la decisión del consumidor al momento de escoger un determinado producto alimenticio. En este caso, realzar el sabor y con ello la palatabilidad del producto, es un valor agregado que se puede conseguir mediante el uso de PAM y sus derivados [58,59].

De hecho, el Consejo de Europa permite el uso de carvacrol (metabolito secundario presente en los AE de determinadas PAM) como saborizante químico (Categoría B) que puede ser adicionado en pocas cantidades (2 ppm, 5 ppm o hasta 10 ppm) en alimentos como bebidas alcohólicas, productos horneados, chicles, budines, caramelos blancos, entre otros [60]. Asimismo, la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) permite el uso de carvacrol como aditivo directo en productos de consumo humano, siempre y cuando éste sea añadido en pequeñas cantidades, y que su combinación con otros coadyuvantes sea inocua para la salud (CFR – Código de Regulaciones Federales. Título 21. Sección 172-515)

Otro de los compuestos bioactivos producidos por las PAM con numerosas aplicaciones es el alcanfor, componente volátil que se utiliza como potenciador de sabor, conservante y para dar frescor a productos como dentífricos. Incluso, se estima que entre 30 a 32 mil toneladas métricas de alcanfor son consumidos anualmente, convirtiéndolo en el compuesto aislado natural más importante económicamente [61]. De hecho, las concentraciones a las cuales el alcanfor puede ser añadido a los diferentes productos alimenticios, han sido registradas por La Asociación Europea de Saborizantes y Fragancias (EFFA) y la Organización Internacional de la Industria de Saborizantes (IOFI), estableciendo concentraciones seguras para uso alimentario [62].

Uso de semillas de PAM

En la actualidad, la búsqueda de alimentos con valores añadidos y funcionales se ha extendido rápidamente, por lo que, el consumo de semillas de PAM se ha incrementado gracias a la alta riqueza de compuestos bioactivos que contienen los aceites de sus semillas, entre los que se destacan los ácidos grasos esenciales, los cuales son en su mayoría de carácter poliinsaturado y pertenecientes a la familia de los omega-3 y omega-6. Estos componentes pueden llegar a constituir cerca del 75% de los ácidos grasos totales del aceite [63].

Desde 2009, la EFSA ha permitido la comercialización y uso de las semillas de PAM y sus derivados en la alimentación, entre ellas, las semillas de albahaca (Comission Implementig Regulation EU 2017/2470/EC), el aceite de chía (Comission Implementig Regulation EU 2014/890/EC), las semillas y aceite refinado de *Echium plantagineum* (Comission Decision 2008/558/EC), entre otras. Asimismo, las semillas de las PAM pueden ser ricas en fibra, como es el caso de la chía, (*Salvia hispánica*), que le confiere una mejor absorción y mayor retención de agua en comparación con otros tipos de fibra alimenticia, haciéndolo idóneo en mejoras de planes de nutrición [64].

Uso alimentario animal

Promotores de crecimiento animal

Tras evidenciar los efectos nocivos sobre la salud del uso de antibióticos como promotores de crecimiento en animales de consumo, se prohibió su uso a partir de 01 de Enero del 2006 en los países de la Unión Europea [65]. Como consecuencia de esto, se impulsó el desarrollo de tecnologías que permitiesen un reemplazo de los antibióticos en sistemas de producción ganadera convencional, apareciendo como una solución prometedora el uso de las PAM como suplementos alimenticios[66].

De hecho, los beneficios que genera una alimentación rica en PAM sobre los animales para consumo se ha evidenciado en diferentes mejoras tales como ganancia en peso corporal, reducción de la morbilidad y mortalidad, mejoramiento en consumo de alimento y tasa de conversión alimenticia (TCA), entre otros [67–69]. Además, se ha demostrado que el uso de AE en suplementos alimenticios ayuda a mejorar el sabor y la palatabilidad del alimento, pueden generar una inmunomodulación a través de una proliferación de células inmunitarias, y promueven la modulación de la microflora intestinal [70–73].

Disminución del estrés animal

El estrés que puede sufrir un animal puede deberse a múltiples factores como el cambio en el régimen nutricional, manipulación del mismo, exposición a temperaturas extremas, etc., que le genera una producción de corticosterona como respuesta, causándole problemas de salud [74]. Asimismo, el estrés genera cambios en el comportamiento de los animales lo que disminuye considerablemente su bienestar. Para intentar minimizar estos efectos no deseados, la inclusión de PAM, ya sea tanto la hoja seca, como la de sus aceites esenciales se postula como un remedio favorable. Esto se ha podido evidenciar en el trabajo realizado por Lábaque y cols. [75], en el que la suplementación de alimentos ricos en timol en la dieta de codornices, disminuye considerablemente su respuesta frente a situaciones de estrés. A su vez, la inclusión de aceite esencial de orégano, rico en carvacrol, en dosis bajas (0.0025%) en la dieta de acabado de cerdos reduce significativamente los niveles de cortisol y creatinina en suero generados por el estrés asociado al transporte animal [76].

En el caso de animales rumiantes los cambios del pH de la carne (parámetro que está influenciado por la cantidad de glucógeno que produce el animal previo al sacrificio), tiene un impacto significativo en el color, almacenamiento y textura. En la búsqueda bibliográfica realizada por Odahib y cols.[77], señalan que el uso en la alimentación de diferentes PAM como el romero y el tomillo podrían generar un efecto positivo en los rumiantes, manteniendo bajos los niveles de glucógeno al momento del sacrificio para evitar los cambios en el pH de la carne.

Alimentos funcionales para animales

En la actualidad, las restricciones del uso de antibióticos como promotores de crecimiento ha permitido el desarrollo de nuevas y mejores tecnologías en nutrición animal, como los alimentos funcionales o nutraceúticos, los cuales tienen un rol importante en el mantenimiento o mejora en las funciones fisiológicas del mismo [78]. De hecho, la EFSA ha incorporado en la Comisión Reguladora 429/2008/EC, el uso de alimentos ricos en componentes bioactivos provenientes de PAM en dieta animal.

Los alimentos funcionales que contienen productos y subproductos de PAM han demostrado ser eficientes en la mejora del metabolismo animal, siendo la respuesta inmunológica una de las más demostradas al detener el crecimiento de un amplio espectro de bacterias patógenas para el animal, gracias a la capacidad inhibitoria sobre la adhesión de las bacterias al huésped [33,74,79–81].

1.2.2 Uso medicinal y farmacéutico

En la industria médica y farmacéutica, una gran parte de la producción de medicamentos está sintetizada a partir de compuestos extraídos de material vegetal o derivados de PAM. Incluso, la alta demanda de compuestos extraídos de PAM por esta industria ha llevado a mejorar las técnicas de obtención y extracción para acortar el tiempo del proceso y maximizar los recursos vegetales [82].

Estas mejoras, han permitido investigar y demostrar el efecto beneficioso que tienen los componentes volátiles y fenólicos procedentes de las PAM sobre los seres humanos y animales. Por ejemplo, el timol ha sido utilizado contra trastornos del sistema respiratorio y como inmunomodulador [83], el linalool se presenta como un efectivo anticancerígeno frente a células cancerígenas de próstata, el carvacrol genera un efecto gastroprotector en lesiones estomacales [84], el 1,8-cineol (eucaliptol) ha sido identificado como un agente reductor de moco en trastornos de rinosinusitis aguda [85], el ácido rosmarínico se utiliza como un novedoso tratamiento antialérgico, etc.

Actividad antibacteriana y antifúngica

La actividad antimicrobiana y antifúngica de las PAM y sus derivados, probablemente es el efecto beneficioso más conocido y estudiado, teniendo una gran cantidad de evidencias sobre su resultado *in vitro* en una amplia gama de microorganismos [86]. La acción de los AE obtenidos de PAM sobre las bacterias aún no está entendido del todo, sin embargo, su efecto antimicrobiano podría deberse a que aumenta la permeabilidad de las membranas celulares y mitocondriales del microorganismo, generando una extravasación de iones y moléculas que altera el gradiente de potencial de membrana, causando su muerte [11,60] En otros casos, el AE cambia la hidrofobicidad de las membranas celulares, quitándoles su capacidad de infección y rompiendo su membrana celular [66].

Por otra parte, el mecanismo de acción antifúngico de las PAM y sus derivados es el de generar cambios irreversibles en la estructura de las paredes celulares de los hongos, comprometiendo su integridad estructural y afectando la capacidad de reproducción [34]. En la actualidad se han reportado novedosas aplicaciones de AE para la detoxificación de micotoxinas producidas por ciertos hongos, un caso práctico de estas aplicaciones se puede encontrar en la especie *Aflamomum danielli* (PAM originaria del oeste de África) cuyos AE pueden alcanzar una tasa de degradación entre el 90% y 95% sobre ocratoxina A (micotoxina de hongo del género *Penicillium* y *Aspergillus*) [87]. De la misma manera, Tian y colaboradores [88], reportaron que la aplicación

de AE de *Thymus vulgaris* genera un efecto antiaflatoxigenico evitando el crecimiento micelar y disminuyendo la producción de aflatoxinas del hongo *Aspergillus flavus*.

Actividad anticancerígena y antimutagénica

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud el término cáncer es utilizado para un grupo de enfermedades que afectan cualquier parte del cuerpo, que se caracteriza por un crecimiento anormal de células más allá de los límites del cuerpo [11]. El tratamiento del cáncer mediante quimioterapia y radioterapia genera incontables efectos adversos que disminuyen la calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, el uso de PAM en los tratamientos de diferentes tipos de cáncer como hepático, colon, pulmonar, de mama y leucemia ha mostrado resultados prometedores, sin comprometer el bienestar de la persona enferma [10]. Un ejemplo de ello es el reportado por López-Jiménez y cols. [89], quienes encontraron que el extracto de *Rosmarinus officinalis* podría inhibir cualquiera de las etapas de la carcinogénesis celular, además de detener la angiogénesis tumoral. Así, estos autores concluyen que los extractos de romero pueden ser usados como quimiopreventores y como tratamientos anticancerígenos.

Otro ejemplo, es el uso de *Salvia prionitis* (perteneciente a la familia *Lamiaceae*) en estudios anticáncer por su alto contenido en el diterpeno salvicina [90], un metabolito secundario que tiene un efecto inhibitorio sobre células cancerígenas llegando inclusive a ser citotóxico para células tumorales resistentes a múltiples fármacos (MDR, por sus siglas en inglés)[91].

Los AE de PAM también pueden actuar como antimutagénicos, gracias a su capacidad para inhibir el paso de agentes mutágenos dentro de las células, eliminar radicales libres, inhibir la formación del citocromo P450 (inhibidor de medicamentos antineoplásicos), y promover apoptosis celular cuando hay fallos en los sistemas de reparación de ADN que pueden inducir mutaciones [10]. Inclusive, estudios *in vitro* han reportado que el uso de AE de diferentes especies de la familia *Lamiaceae* puede prevenir un daño mitocondrial y disminuir la apoptosis celular, lo cual, confiere un importante rol en los tratamientos preventivos anticáncer [92–95]

Actividad antiinflamatoria

La inflamación es una respuesta biológica compleja que ocurre cuando el cuerpo está expuesto a un agente infeccioso o a un cambio físico o químico [61]. Estos ataques infecciosos generan cambios a nivel vascular que se presentan en forma de hinchazón, enrojecimiento (eritema), calor, y en peores casos desencadenan en edemas, pérdidas de función y tejidos [11]. Por ello, la

búsqueda para contrarrestar esta respuesta usando PAM y sus derivados ha sido el de mayor interés por muchas investigaciones.

La actividad antiinflamatoria que tienen los EP o AE de PAM se debe a la capacidad que tienen de inhibir la migración de los granulocitos neutrófilos a las células epiteliales [34]. Asimismo, esta actividad está relacionada con la inhibición de la expresión de moléculas que permiten la adhesión de citocinas y de monocitos a células epiteliales [89].

En la actualidad se ha evidenciado el uso de AE de diferentes PAM entre las que se incluyen *Leucas aspera* [96], *Lavandula multifida* y *Boswellia Serrata* [97], como un potente agente antiinflamatorio. De hecho, se ha reportado que la aplicación de aceite esencial de lavanda (*Lavandula angustifolia*) en aromaterapia usado en terapias de dolor, ha mejorado la calidad de vida de pacientes con artritis reumatoide, disminuyendo el dolor que sufren por esta enfermedad [98].

Actividad antivírica

Las PAM y sus derivados además de tener una respuesta beneficiosa frente a diferentes patógenos como bacterias y hongos, también exhiben una actividad antivírica. Esto puede atribuirse a la habilidad que tienen de interferir en las envolturas peptídicas víricas, evitando que el virus se adhiera a la célula huésped [10], inclusive se ha evidenciado que el uso de AE pueden inhibir la expresión temprana de genes de citomegalovirus impidiendo su actividad viral [99]. En la Tabla 1-1 se resumen diferentes usos y aplicaciones de las PAM en el campo de la medicina y farmacología.

Tabla 1-1. Eficacia biológica de compuestos bioactivos de diferentes PAM pertenecientes a la familia *Lamiaceae*.

Fuente: Adaptado de Chakrabarty y cols. 2022 [44].

Compuesto bioactivo	Planta	Tipo de compuesto/ Parte de la planta	Mecanismo de acción
Marrubina	<i>Leonotis leonurus</i> (L.)	Diterpenoide /hojas	Inhibe la vía de señalización de la cinasa y relaja la contracción de los vasos sanguíneos inducida por el ion K+
Eriodictiol	<i>Satureja cuneifolia</i> Ten.	Flavonoide/Toda la planta	Inhibe la contracción inducida por KCl y noradrenalina en vasos sanguíneos
Ácido rosmarínico y cafeico, carnosol y cirmisimartina.	<i>Salvia officinalis</i> L.	Fenoles y flavonoides/ Tallos, hojas y flores	Previene la peroxidación lipídica a través de la eliminación de radicales libres.
Ácido salvianólico	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	Ácido fenólico/raíces	Inhibición de la agregación plaquetaria y disminución del tamaño de un coágulo.
Ácido rosmarínico y cafeico	<i>Thymus satureioides</i> Coss.	Ácidos fenólicos /Toda la planta	Produce una reducción significativa de los triglicéridos plasmáticos y el nivel de colesterol en la sangre dentro de las 24 horas posteriores a la administración
	<i>Thymus zygis</i> L.		Prolonga el tiempo y el proceso de coagulación e inhibe la formación de coágulos de plasma

1.2.3 Uso en perfumería y cosmética

Un producto cosmético se puede definir como una sustancia que puede ser aplicada de manera externa al cuerpo, dientes o boca, con el objetivo de limpiar, perfumar o proteger, mantener unas buenas condiciones o cambiar su apariencia [3]. Por ello, y gracias a la alta riqueza en compuestos polifenólicos, la industria cosmética ha buscado usar PAM para desarrollar cosméticos más eficientes y que satisfagan las necesidades del consumidor [100].

La industria cosmética y perfumera es un mercado económico muy importante para las PAM, así, Anuradha y Bharadvaja[101] estiman que para el 2028 estas empresas tengan un tasa de mercado de 784.6 billones de dólares (USD). Un ejemplo de esto, es el uso cotidiano de productos conocidos como “skincare”, entre los que se pueden destacar cremas, bálsamos, champús, jabones y perfumes [10].

Dentro de las características de los productos de la industria cosmética, la fragancia es una propiedad importante al momento de escoger un producto por parte del consumidor [101]. Por ello, el uso de los AE y derivados de PAM ha permitido ofrecer una amplia variedad de opciones para obtener diferentes tipos de perfumes y fragancias en los productos cosméticos [102].

Como ejemplos de estas aplicaciones se pueden destacar el uso de hojas secas de *Lavandula angustifolia* [103], el AE de plantas del género *Eucalyptus* [21] y el AE de lavandin el cual es uno de los más apreciados en la elaboración de perfumes y agua de colonia [104]. Sin embargo, una de las especies más utilizadas en este campo es el espliego (*Lavandula latifolia*), una planta aromática a la que se le atribuyen propiedades olfatorias muy deseables en la perfumería por las características químicas de su AE [105,106].

Además de lo mencionado anteriormente, Adewinogo y cols [107] señalan que el aumento en la demanda por el uso de las PAM en la cosmética se debe a dos razones importantes: (1) hay bastante evidencia científica que avala su efectividad como cosmeceútico, y (2) las pequeñas moléculas lipofílicas (provenientes del aceite esencial) garantizan una mejor penetración en las capas de la piel.

Aunque los AE son los principales derivados de PAM utilizados en la industria cosmética, también se ha evidenciado el uso de otros derivados como las grasas, ceras, oleorresinas, extractos de plantas y colorantes, entre otros. Todos ellos tienen un efecto particular en el producto final que incluyen impartir una fragancia, dar un color, actuar como humectante, ser agente espesante y/o estabilizador; sin contar con la alta contribución de antioxidantes que poseen sus derivados [3].

Otra ventaja del uso de las PAM es que las entidades reguladoras como la FDA no exigen la aprobación de una fragancia que pueda contener aceite esencial como lo exigen para el uso alimentario, ya que las fragancias son consideradas ingredientes cosméticos [102]. Sin embargo, los AE y las fragancias pueden ser agentes alergénicos, que la organización internacional IFRA (Asociación Internacional de Fragancias) se encarga de regular. Esta organización establece que AE y que componentes del mismo son considerados de alto riesgo alergénico, como las concentraciones máximas de uso para obtener productos cosméticos seguros [108].

1.2.4 Uso en sanidad vegetal

Los AE de las PAM están compuestos de metabolitos secundarios volátiles, los cuales en ocasiones son producidos para defenderse de artrópodos (como insectos y ácaros) que las atacan, por lo que se cree que estas fracciones volátiles son importantes ya que desencadenan una coevolución

entre plantas e insectos [109]. Por ello, se ha propuesto el uso de los AE como alternativa al uso de plaguicidas sintéticos, por ser considerados seguros para el medio ambiente al poseer compuestos biodegradables y no tóxicos para la fauna [110]. Estos aceites o bioplaguicidas presentan una alta efectividad frente a patógenos como: nemátodos, insectos, hongos, bacterias y virus. De hecho, su uso es predominante en países de economías emergentes, por ser rentables, económicos y por ser de fácil disponibilidad, accesibilidad y uso. [111].

Sin embargo, a pesar de tener suficiente evidencia sobre el efecto en plagas pertenecientes a diferentes grupos taxonómicos, el uso de bioplaguicidas presenta desventajas como: escasa información acerca de la formulación, material vegetal no seleccionado, alta volatilidad, entre otros [112]. No obstante, según Isman [113], en el mercado están disponibles algunos insecticidas con base de aceites esenciales entre los que se pueden destacar al Ecotec™ que ha sido usado en el control de mosca blanca (*Bemisia tabaci*), pulgón verde (*Myzus persicae*) y oruga de la esparragera (*Spodoptera exigua*). En la Tabla 1-2. se resumen más ejemplos de bioplaguicidas comerciales usados en los últimos años.

Tabla 1-2. Insecticidas y acaricidas comerciales basados en aceites esenciales de plantas. Fuente: Isman (2019)

Producto	Productor	Ingrediente activo	Dosis (L/ha)	Cultivo aplicado	Plagas controladas
EcoTroI™	KeyPLex (USA)	10% AE de romero 5% geraniol 2% AE de menta	1,43 -5,7	Verduras Bayas Uva Frutales Cítricos	Pulgones, ácaros, cicadélidos, mosca blanca, cochinillas y chinches lygus.
TetraCURB™	Kemin (USA)	50% AE de romero 5% aceite de clavo 1,95% AE de menta	0,25-2% en agua	Cultivos alimentarios y no alimentarios, de interior y exterior	Araña roja
Requiem ^R	Bayer (USA)	59,7% α -terpineno 22,4% <i>p</i> -cimeno 17,9% <i>d</i> -limoneno	1,17-9,35	Verduras Uva Frutales Semillas de oleaginosas	Ácaros, mosca blanca, cicadélidos, psílidos
Prev-Am ^R	Oro Agri (RSA)	5-6% AE de naranja	3,65-14,6	Verduras Bayas Uva Frutales	Pulgones, ácaros, mosca blanca, psílidos, cochinillas,
Eco-oil ^R	Organic Crop Protectans (AUS)	Mezcla al 2% de aceites de árbol de té (<i>Melaleuca</i>) y AE de eucalipto	0,5-1,0% en agua	Verduras Bayas Cítricos	Ácaros, pulgones, moscas blancas de invernadero, cochinillas, minador de hojas de cítricos

Producto	Productor	Ingrediente activo	Dosis (L/ha)	Cultivo aplicado	Plagas controladas
Akabrown ^R	Green Corp Biorganiks (MEX)	1,25% AE de canela 1% AE de menta 0,5% aceite de clavo 0,25% AE de orégano	1-1,5	Vegetales Bayas	Araña roja

1.3 Cultivo de plantas aromático medicinales

Las superficies cultivadas de PAM han experimentado un crecimiento exponencial en los últimos años consecuencia directa de sus propiedades y consiguientes aplicaciones ya comentadas anteriormente. Además, su extensa cadena de suministro hace que la comercialización de PAM este interconectada desde la siembra y cosecha, hasta la llegada a los consumidores finales, hecho que supone un importante beneficio para el desarrollo de la economía [114].

Sin embargo, el producto más valorado de las PAM son sus AE, los cuales no tienen una estimación real de producción puesto que, hay muchos registros de productores locales que no son cuantificados o en muchos países son considerados dentro de un grupo que abarcan una gama de productos relacionados [115]. No obstante, este mismo autor ha recogido los registros de evolución de producción de AE desde 1990 hasta 2020, a partir de los datos recopilados por la EFEO (European Federation of Essential Oils) y el ISMEA (Istituto di Servizi per il Mercato Agricolo Alimentare), lo que se resume en la Figura 1-3.

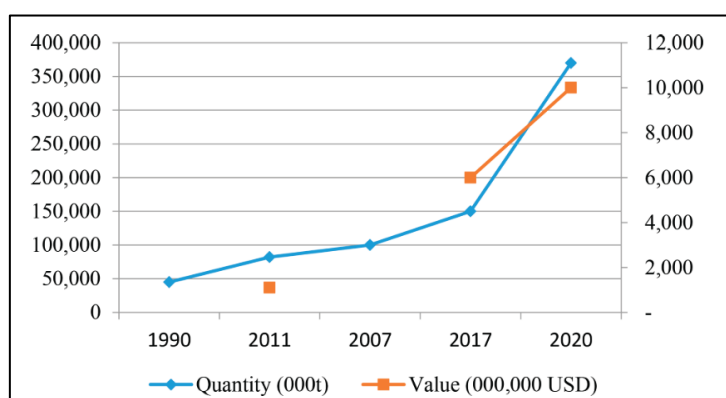


Figura 1-3. Producción mundial de aceites esenciales. Fuente: Barbieri y Borsotto[115]

Como se muestra en la Figura 1-3, la producción mundial de AE en el 2017 fue aproximadamente de 150.000 toneladas que estuvieron valoradas en alrededor de 6 mil millones de USD, lo cual comparado con 1990 (45.000 toneladas), triplicó el volumen de producción. Asimismo, se observa que ya en 2020 las producciones mundiales superaron las 370.000 toneladas con un valor de 10.000 millones de USD, tendencia que se espera mantener durante las siguientes décadas.

Dentro de esta producción mundial, la Unión Europea (UE) cuenta con aproximadamente 36.000 compañías que lideran el cultivo, procesado y distribución de PAM, alcanzando aproximadamente 200.000 ha de cultivo mundial. En este cómputo, España lidera la tercera posición en volumen de producción con aproximadamente 27.800 ha, solamente por detrás de Francia (52.000 ha) y Polonia (30.000 ha) [115].

En España la búsqueda de nuevos cultivos alternativos ha propiciado un incremento significativo en la producción de PAM para la obtención de AE. En este sentido, según datos extraídos de la Encuesta sobre Superficies y Rendimientos de Cultivos (ESYRCE, 2022), la superficie cultivada de lavanda y lavandin actualmente alcanza las 8.010 ha, sin contar otros cultivos importantes como el espliego, tomillo, romero, salvia, etc., que aumentaría notablemente esta estimación. Los volúmenes de producción en España se distribuyen como muestra la Figura 1-4.

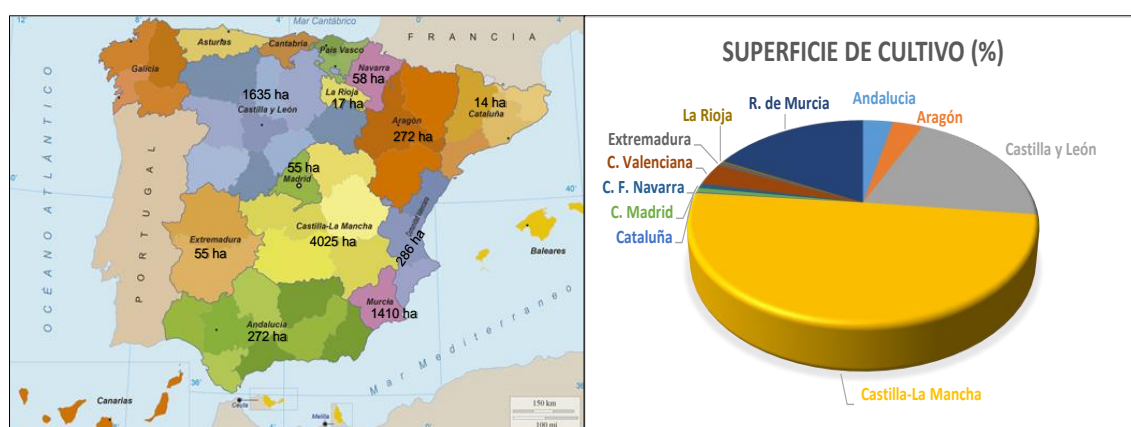


Figura 1-4. Superficies de cultivo de PAM en España. (a) Superficie (ha), (b) superficie (%) Fuente: Modificado de datos obtenidos del ESYRCE 2022.

A pesar de que los AE pueden considerarse un importante producto de exportación, durante el año 2022 se produjo una disminución del precio de mercado (según datos recogidos por el DATACOMEX de AE sin la cuota de mercado de los cítricos), rondando los 80.470€ al exportar 2224 tn de AE, de las cuáles solo el 16% (350 tn) pertenecían a AE esenciales puros y naturales provenientes de PAM.

En el caso de la Región de Murcia, el crecimiento en la producción de superficie cultivada de PAM (datos recopilados del MAPA en superficie de lavanda y lavandin), ha incrementado considerablemente (Figura 1-5), pasando de producir 190 ha a 2831 ha en una década.

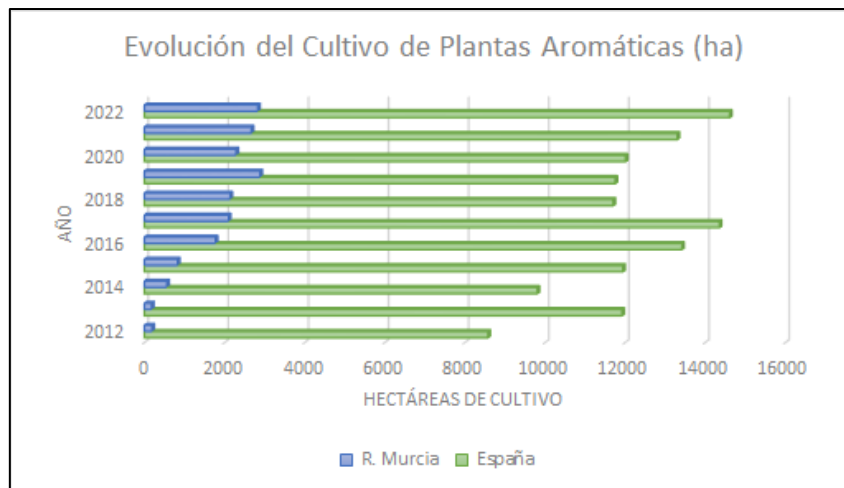


Figura 1-5. Evolución del cultivo de PAM en España y la Región de Murcia. Fuente: modificado de datos provistos por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA).

La recolección, transformación y venta de las PAM tiene una extensa tradición en las Comarcas del Noreste de la Región de Murcia (Figura 1-6), especialmente en PAM pertenecientes a la familia de las *Lamiaceae*, entre las que destacan especies del género *Lavandula*, *Salvia*, *Thymus* y *Rosmarinus*.

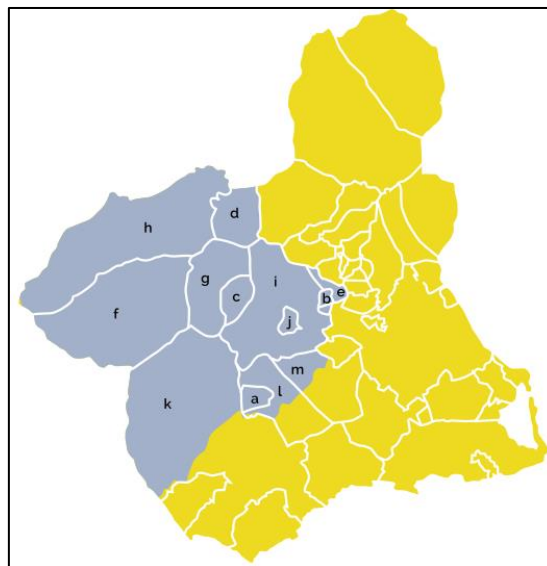


Figura 1-6. Mapa de la región de Murcia de Murcia y principales municipios productores de PAM. Fuente: Sánchez et al. [116]. Significado de letras: a) Aledo, b) Albudeite, c) Bullas, d) Calasparra, e) Campos del Río, f) Caravaca de la Cruz, g) Cehegín, h) Moratalla, i) Mula, j) Pliego, k) Lorca, l) Totana y m) Alhama de Murcia.

1.4 Familia Lamiaceae

La familia *Lamiaceae* (también conocida como familia de las labiadas), la conforma más de 7000 especies que se agrupan en 240 géneros. Se encuentra distribuida principalmente en la región

Mediterránea, aunque una pequeña parte se puede encontrar habitando zonas de Australia, Sudeste Asiático y Sudamérica [117].

Según Sim, Rani y Husain [118], las especies pertenecientes a la familia *Lamiaceae* a menudo presentan tallos de cuatro ángulos o cuadrangulares con la presencia de pelos glandulares. Tienen una raíz pivotante y ramificada. Sus flores son hipóginas y bilateralmente simétricas con cinco pétalos y sépalos unidos. Las hojas, por lo general son simples y dispuestas de forma opuesta y verticilada. Las semillas no son endospermicas.

Como se ha mencionado anteriormente, los AE de PAM que pertenecen a la familia *Lamiaceae* tienen compuestos muy valorados por sus múltiples aplicaciones. Sin embargo, el perfil químico del aceite esencial (quimiotipo) que determina su valor económico, puede variar mucho dentro de una especie, incluso PAM que pertenecen a una misma especie no pueden ser utilizadas para el mismo fin [119].

Además, la familia *Lamiaceae* es considerada una de las más importantes en términos de producción y actividad antimicrobiana y antioxidante [120]. De hecho, se ha evidenciado que ciertas especies pueden llegar a tener 300 diferentes compuestos de bajo peso molecular en sus AE, aunque plantas de los géneros *Lavandula*, *Geranium* o *Rosmarinus* pueden contener entre 450 y 500 compuestos activos entre los que destacan diferentes tipos de éteres, aldehídos, cetonas, ésteres, fenoles, terpenos y cumarinas [121].

Dentro de la familia *Lamiaceae* existen dos especies con una importancia socio-económica significativa para la Región de Murcia [122], el espliego (*Lavandula latifolia* Medik.) y el tomillo rojo (*Thymus zygis* subsp. *gracilis*), que son las especies objeto de estudio en este proyecto de Tesis.

1.4.1 Espliego (*Lavandula latifolia* Medik)

El espliego (*L. latifolia*) es un arbusto que crece espontáneamente en la región Mediterránea donde la precipitación media anual ronda entre los 350 a 600 mm, prefiriendo zonas soleadas con suelos rocosos y calizos (pH 7,3 a 8,4) con materia orgánica relativamente pobre [106].

La parte aérea de un arbusto de espliego adulto está formada por unidades morfológicas que consisten en racimos de hojas diferenciados sostenidos por tallos cortos, muchos de los cuales producen una inflorescencia terminal a principios del verano (Figura 1-7)



Figura 1-7. Arbusto de un espliego silvestre (*L. latifolia*). Fuente: Alonso y cols. (2018)[123]

Las flores del espliego son hermafroditas y se polinizan principalmente por insectos. Su reproducción es exclusivamente a través de semillas, cuyo número producido por cada inflorescencia dentro de la misma planta es muy variable, lo que le confiere una alta variabilidad en su descendencia [123].

Su cultivo se destina a la obtención de AE, el cual es muypreciado en la industria perfumera por su olor, aunque también se le reconocen otras propiedades como antibiótico y antifúngico. Por esta razón, su AE es el más comercializado de España, llegando a producir cerca de 150 a 200 toneladas por año [17].

Sin embargo, a pesar de su interés comercial y buena adaptación a las condiciones ambientales del secano mediterráneo, su cultivo se ha visto desplazado por la producción de especies con mayor rendimiento de AE como el lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel.), pero con menor precio en el mercado [106].

Los componentes mayoritarios de su AE varían según los rangos de tres importantes monoterpenos: 1,8-cineol que va de 6,6% a un 71,5%, linalol que oscila entre el 0,2% y 61,1% y alcanfor que varía entre el 1,1% 54,7%; representando casi el 70% del perfil volátil total. Inclusive, la proporción de estos volátiles define la calidad del AE, siendo mejores aquellos que tienen más linalol que 1,8-cineol y alcanfor [116].

1.4.2 Tomillo rojo (*Thymus zygis* subs. *gracilis*)

T. zygis (también conocido como tomillo rojo), es una planta perteneciente al género *Thymus*, que habita principalmente en la península Ibérica y noreste de África, siendo un arbusto de los más comunes en la península y capaz de crecer en diferentes ecosistemas [124]. Inclusive, Sotomayor y cols. [125] la catalogan como una especie endémica de la península ibérica de la que

se reconoce tres subespecies, dos de las cuales se encuentra en el sudeste español (subsp. *sylvestris* Brot ex Coutinho y subsp. *gracilis* (Boiss.) R. Morales (Figura 1-8).

Al tomillo rojo se lo reconoce por sus hojas que son muy estrechas y con el margen revoluto, lineares y que no difieren de las florales, además, poseen pelos largos o cilios en la base. Sus inflorescencias son usualmente estrechas, alargadas, espiciformes, que están formadas por numerosos verticilos superpuestos [124].



Figura 1-8. Tomillo rojo (*Thymus zygis* subsp. *gracilis*). Fuente: Propia

En la Región de Murcia, hasta la fecha, se han descrito 14 especies del género *Thymus* [126], en los que se han identificado al menos siete quimiotipos diferentes en sus AE (1,8-cineol, geraniol, linalol, γ -terpineol, carvacrol, timol y terpinen-4-ol) [127]. Frente a esto, *T. zygis* por lo general, posee un quimiotipo simple definido por el fenol terpénico timol cuya riqueza puede variar entre el 29,93% y 71,84% en el momento idóneo de recolección [125].

Gracias a la alta riqueza en timol, al AE del *T. zygis* subsp. *gracilis* se le confiere una excelente calidad y, por ende, un alto valor económico que lo convierte en el tomillo más comercializado de España [128]. Además, sus AE son muy valorados por sus propiedades bioactivas entre las que destacan la actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral, insecticida entre otras [129].

Estudios llevados a cabo por Jordán y cols.[130] ponen de manifiesto el efecto de las prácticas culturales sobre el rendimiento y la calidad del aceite esencial en este tomillo. Los resultados revelan el efecto negativo de la deficiencia de riego y el número de cortes realizado sobre el rendimiento productivo de esta especie en el tiempo. En este sentido, está demostrado científicamente que el rendimiento de las plantas aromáticas merma significativamente por efecto del estrés hídrico. La sequía disminuye significativamente los litros de aceite esencial obtenidos por hectárea, puesto que reduce la cantidad de biomasa obtenida [131]. Es importante considerar que la viabilidad económica de estos cultivos depende completamente de los beneficios obtenidos, los cuales están relacionados con el rendimiento de la producción y de los

precios concertados en el mercado tanto del material vegetal (hoja seca para herboristería) como del aceite esencial extraído.

La agricultura, particularmente en las zonas áridas y semiáridas, es el primer sector y el más afectado en episodios de sequía, ya que absorbe hasta el 80 por ciento de todos los impactos directos, con múltiples efectos en la producción, la seguridad alimentaria y los medios de vida rurales. Por este motivo resulta necesario conocer la respuesta fisiológica de estos cultivos aromáticos frente al inminente cambio climático, como medida de selección de ecotipos con mayor tolerancia a la sequía.

1.5 Cambio climático

Durante el último siglo se han registrado cambios significativos en las condiciones climáticas globales. Desde la revolución industrial, la quema intensiva de combustibles fósiles ha generado un aumento excesivo en la concentración de gases de efecto invernadero como el dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) y diferentes especies de dióxidos de nitrógeno (NO_x), generando cambios climáticos significativos [132].

Según Anderson, Bayer, y Edwards [133], estos cambios en el clima han producido una subida de la temperatura global, que a su vez en un futuro generará un aumento en el número de días y noches cálidas, así como, cambios en la frecuencia y severidad de eventos climáticos como la sequía y las precipitaciones. Incluso, se prevé que estos escenarios sigan incrementándose en los próximos años sino se mitigan las causas del cambio climático, lo cual, comprometerá la agricultura y con ello la seguridad alimentaria mundial [134].

Esto se puede evidenciar con la revisión bibliográfica realizada por Gupta, y cols. [135], quienes señalan que para el 2050 la población mundial se incrementará hasta alcanzar los 10 billones de personas, por lo que para garantizar la seguridad alimentaria, la tierra cultivable se deberá duplicar junto con la demanda de agua, la cual estará menos disponible para esos años (Figura 1-9).

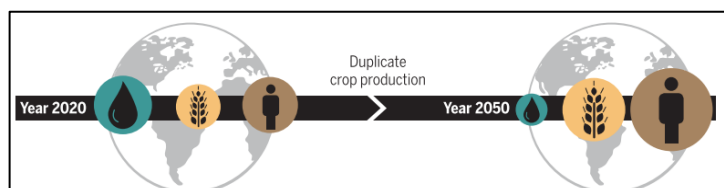


Figura 1-9. Esquema representativo de la seguridad alimentaria para el año 2050. Fuente: Gupta y cols. [135]

No obstante, a pesar de que el cambio climático es un evento de carácter mundial, los efectos que puede generar son dependientes de la zona, es decir, según latitud y altitud sus posibles efectos pueden variar entre sequía, inundaciones, aumento de temperaturas, cambio de ciclos de lluvia, aumento de la salinidad del suelo, entre otros [136], siendo la sequía uno de los efectos más perjudiciales para la producción agrícola.

De hecho, Iglesias y cols. [137] recopilaron datos para la elaboración de modelos de estimación de producción agrícola de la UE en escenarios futuros (año 2080), basándose en diferentes variables como la productividad, manejo y coste de un cultivo, y su adaptabilidad a escenarios más cálidos y secos. Como se observa en la Figura 1-10, a pesar de que los cuatro modelos proyectan diferentes resultados, todos los escenarios muestran que los cultivos en el sur de Europa disminuirán su productividad significativamente por el cambio climático.

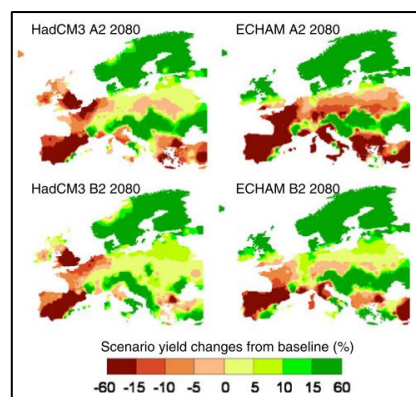
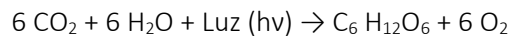


Figura 1-10 Cambios en el rendimiento de los cultivos europeos modelados para cuatro escenarios simulados (HadCM3 A2, HadCM3 A2, ECHAM A2 y ECHAM A2) para el período 2071-2100. Fuente: Iglesias y cols. (2012) [137]

El Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático (IPCC, 2014), señaló que la emisión continua de gases de efecto invernadero provocará mayor calentamiento y cambios perennes en todos los componentes del sistema climático (olas de calor, sequías, inundaciones, etc.), aumentando la probabilidad de episodios catastróficos e irreversibles en los ecosistemas. Estos cambios hacen prever que los próximos años pongan en riesgo de extinción a aproximadamente 15000 especies de PAM debido a la destrucción de su hábitat y la sobreexplotación de las mismas [138], puesto que muchas de ellas crecen espontáneamente en la naturaleza.

El mayor componente de los gases de efecto invernadero es el dióxido de carbono (CO_2), gas utilizado por las plantas para incorporarlo a la ruta oscura de la fotosíntesis y producir materia orgánica [139]. Se ha estimado que un incremento de CO_2 en condiciones controladas, genera un aumento en la productividad y rendimiento de los cultivos de algunas especies [133]. Este aumento en la productividad está dado por la importancia que tiene el CO_2 en la fotosíntesis de

las plantas, proceso que tiene lugar en el estroma de los cloroplastos y que puede resumirse con la siguiente ecuación:



La incorporación del CO_2 de la atmósfera a las hojas más el agua captada por las raíces, producen sólido hidrosoluble (azúcares) con la liberación de O_2 a la atmósfera (Figura 1-11).

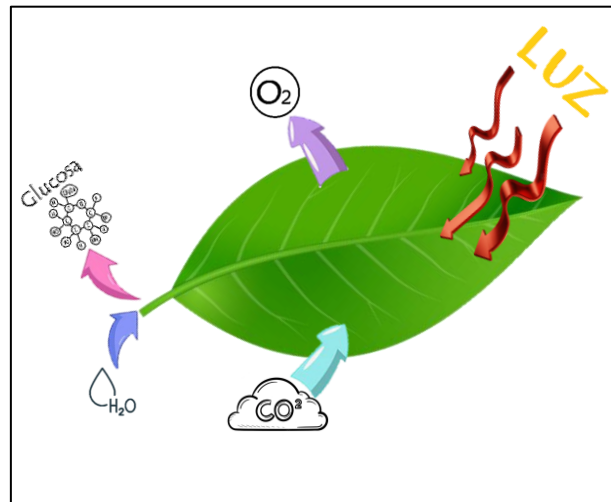


Figura 1-11. Esquema de las moléculas que intervienen en la reacción global de la fotosíntesis. Fuente: Modificado de Azcón-Bieto and Talón, (2003)[139]

Sin embargo, una exposición prolongada al CO_2 tiene efectos nocivos sobre la fisiología de las plantas, como por ejemplo: produce una reducción del nitrógeno en las hojas, así como, una acumulación excesiva de almidón lo que disminuye la disponibilidad de carbono y nitrógeno en otros órganos de la planta [140]. En algunos casos, la producción de hormonas también se ve alterada causando cambios en vías metabólicas y comprometiendo sus mecanismos transcripcionales de defensa frente a patógenos [141].

Asimismo, aumento progresivo de CO_2 en la planta afecta a la fotosíntesis *per se*, puesto que, las plantas tienen una capacidad de regeneración lenta de la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP) que es la encargada de la fijación del CO_2 en el ciclo de Calvin [142].

Por otra parte, si bien el cambio climático tiene una influencia directa sobre las plantas y su producción, se ha evidenciado que puede afectar también de manera indirecta. Por ejemplo: en el caso de los insectos y plagas, para compensar los bajos niveles de nitrógeno en su alimento, incrementan el consumo de material vegetal causando la pérdida de los cultivos en menor tiempo [143]. Asimismo, se podrían generar cambios en la disponibilidad del agua para el riego agrícola primando su uso para el consumo humano, además del efecto causado por el aumento en los niveles del mar que afectarían a los cultivos de zonas costeras [144].

Igualmente, los efectos del cambio climático tendrán una repercusión económica ya que el coste de producción de las PAM muchas veces se estima en función a dos tipos diferentes de gastos: fijos y variables (independientes y dependientes del riego utilizado, respectivamente). Por lo que los costes variables en tiempos de escasez de agua incrementarán el gasto de producción y precio final para el consumidor [145].

1.6 Fisiología del estrés en plantas

1.6.1 Estrés en las plantas

Aunque el término estrés está definido específicamente en la mecánica, en la biología este término puede abarcar muchos significados. Debido a ello, se ha tratado de definir al término estrés como las condiciones que pueden generar situaciones adversas para el desarrollo y funcionamiento normal de un ser vivo [146]. Estos cambios influyen en el crecimiento y desarrollo de las plantas, que aunque son organismos incapaces de desplazarse y evitar situaciones adversas, han perfeccionado mecanismos que les permiten vivir en un amplio rango de situaciones medioambientales desfavorables [139]. Dependiendo de la naturaleza del agente causal del estrés, se puede clasificar en dos tipos: biótico y abiótico.

Estrés biótico

El biótico es un estrés causado por otros seres vivos, entre los cuales se pueden incluir a insectos, hongos, bacterias, virus, entre otros, causando generalmente una patogénesis [147]. Como se mencionó anteriormente, la activación del metabolismo secundario permite una comunicación entre plantas y/o insectos de manera coordinada al emitir compuestos volátiles (i.e. aleloquímico). Para ello la planta genera tres tipos de volátiles que sirven para beneficiar a la misma planta como emisora (alomona), a insectos como receptores (kairomona) o en ambos casos (sinomona), como se observa en la Figura 1-12.

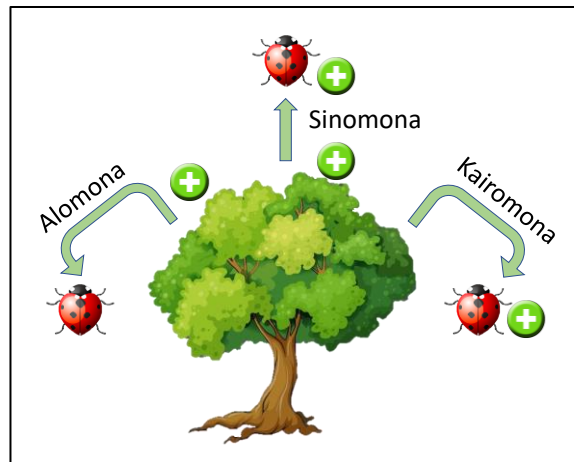


Figura 1-12. Esquema del uso de los aceites esenciales de la planta como aleloquímicos. Fuente: Modificado de Park y Tak (2016)[109]

La activación del metabolismo secundario se da cuando los agentes bióticos emiten unas estructuras de origen biológico denominadas elicitores, cuyas funciones están relacionadas con diferentes receptores que activan o inactivan una serie de enzimas o canales iónicos de rutas metabólicas importantes frente a la defensa de patógenos [148]. Entre los principales elicitores de origen biótico destacan carbohidratos (oligogalacturonidos), proteínas (celulosa, glicoproteínas, lectinas, etc.), rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (*Pseudomonas putida*, *Azospirillum fluoescens*, *Rhizobium*, etc.), hongos (*Trichoderma*, *Azotobacter*, *Fusarium*, etc.) y hormonas (auxinas, citoquininas, ácido giberélico, etc.) [149].

Estrés abiótico

Cuando una planta se encuentra en la naturaleza experimenta diferentes tipos de estímulos, que cuando son lo suficientemente fuertes o se prolongan en el tiempo producen un estrés. Cuando el estímulo no proviene de un agente biológico se cataloga como estrés abiótico [150]. Estos tipos de estrés generan cambios metabólicos y bioquímicos que influyen negativamente sobre el crecimiento vegetativo y el rendimiento de los cultivos [151].

Los factores abióticos dependen de la naturaleza del factor causante del estrés, estos pueden dividirse en químicos o físicos (Figura 1-13). Dentro de los químicos se encuentran la salinidad (componente iónico tóxico), carencia de elementos minerales y contaminantes ambientales como el dióxido de azufre, óxidos de nitrógeno, clorofluorocarbonados, ozono y metales pesados. Mientras que, entre los factores físicos encontramos al déficit hídrico, insuficiente o excesiva radiación, temperaturas extremas (calor y frío), salinidad (componente osmótico), inundación y estrés mecánico (viento o compactación del suelo) [139].

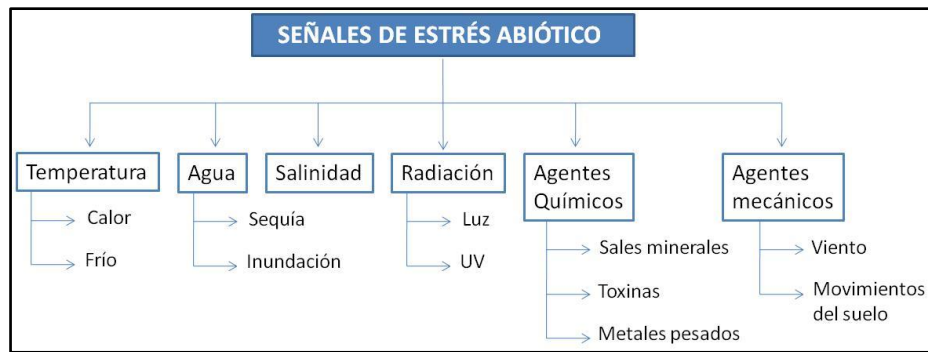


Figura 1-13. Tipos de estrés abiótico en plantas. Fuente: adaptado de Ramakrishna y Ravishankar (2011)[152]

El estrés abiótico que sufren las plantas provoca daños severos sobre el desarrollo y rendimiento de las mismas [153]. Es importante destacar que una planta puede estar recibiendo dos o más estreses al mismo tiempo, no obstante, la respuesta fisiológica es específica aunque en repuestas a largo plazo, pueden interactuar diferentes mecanismos de acción frente a un estrés [154].

Las plantas están adaptadas a las condiciones en las cuales se han desarrollado, sin embargo, cuando experimentan cambios considerables en dicho ambiente, generan una respuesta que puede explicarse mediante cuatro etapas (Figura 1-14).

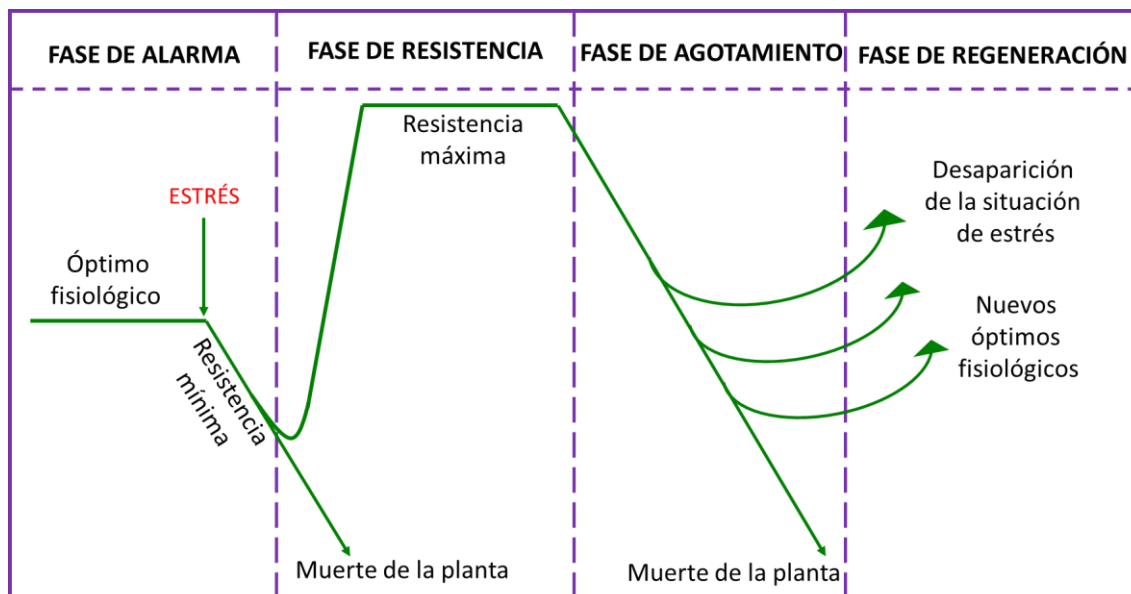


Figura 1-14. Fases de las respuestas de las plantas a situaciones de estrés ambiental. Adaptado de Azcón-Bieto and Talón, (2003)

El inicio de la respuesta al estrés conlleva la ralentización de las funciones básicas y la activación de los mecanismos defensivos frente al estrés (fase de alarma). Posteriormente, su metabolismo se estabiliza y comienza una reparación de daños celulares y generación de adaptaciones morfológicas (fase de resistencia). Si el episodio de estrés se prolonga en el tiempo, pierde la capacidad de resistencia y ralentiza nuevamente su metabolismo (fase de agotamiento),

pudiendo conllevar, en caso de exposiciones muy prolongadas, la muerte. No obstante, si las condiciones desfavorables cesan, la planta recupera su estado fisiológico óptimo y entra a la fase de regeneración [139].

1.6.2 Sequía

La sequía se puede definir como un episodio de escasez de agua suficiente en la zona radicular que evita que la planta mantenga su producción y crecimiento de manera normal [155]. En términos cuantitativos, la sequía es una pérdida en el potencial hídrico del suelo [156].

Este estrés abiótico, es uno de los factores estresantes más perjudiciales en la agricultura, de hecho, el agua es un recurso tan necesario que aproximadamente el 70% del agua dulce disponible en el mundo se destina a la producción agrícola, pudiendo disminuir su disponibilidad en los próximos años debido al calentamiento climático [157]. Por ello, la investigación en los cambios fisiológicos que experimentan las plantas durante déficits hídricos y sus múltiples mecanismos de adaptación y tolerancia, han sido extensamente estudiados para buscar posibles soluciones a este problema [158].

El déficit hídrico genera cambios bioquímicos, fisiológicos y moleculares (Figura 1-15) en la planta que le permiten activar señales hidráulicas desde la raíz al tallo, así como, la inducción de la síntesis de hormonas [159]. Las plantas tienen mecanismos de acción para afrontar estas situaciones de escasez de agua en el suelo mediante escape, evasión y/o tolerancia [158]. Estos mecanismos pueden actuar de manera independiente o en algunas especies pueden activarse al mismo tiempo [160].

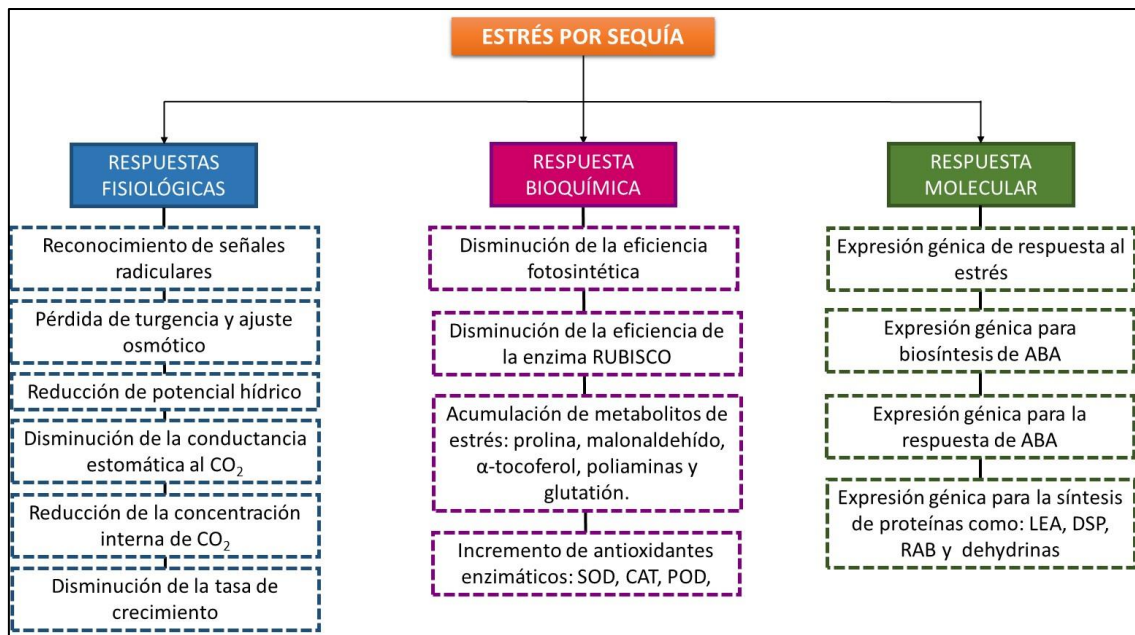


Figura 1-15. Principales respuestas al estrés por sequía de las plantas. **Abreviaturas:** ABA: ácido abscísico, SOD: superóxido dismutasa, CAT: catalasa, POD: peróxido dismutasa, LEA: late embryogenesis abundant protein. Fuente: Modificado de Reddy y cols., (2004)[161]

1.6.2.1 Respuesta de las plantas al estrés hídrico

Las plantas en condiciones ambientales severas (déficit hídrico) generan cambios y respuestas que les permiten sobrellevar esas situaciones. Así, según su capacidad de resistir a estos escenarios con escasez de agua se pueden catalogar en tres tipos: xerófitas (plantas que crecen generalmente en zonas áridas), mesófitas (plantas de hábitats semiáridos y subhúmedos) e hidrófitas (distribuidas en zonas húmedas con suficiente disponibilidad de agua) [158].

Por otra parte, cuando se usa el término resistencia se hace referencia a los diferentes mecanismos y/o métodos que poseen las plantas para tolerar o evitar situaciones de estrés. Sin embargo, sus posibles respuestas se pueden clasificar en tres posibilidades: daño, tolerancia y evasión.

1.6.2.1.1 Daño

La respuesta más evidente de las plantas cuando están sometidas a condiciones desfavorables es el daño, proceso que conlleva cambios metabólicos y que en casos extremos desencadenan en la muerte. En línea con esta afirmación, Sade, Soyly, y Yetim (2011)[162] señalan que los diferentes tipos de estrés, tanto biótico como abiótico, generan una pérdida en la productividad y calidad de los cultivos a pesar de tener sistemas de defensa que responden de forma efectiva.

Pérdida del rendimiento y disminución del crecimiento

La pérdida del rendimiento de los cultivos bajo condiciones de estrés está extensamente estudiada [133,137,163–166], habiéndose demostrado que el efecto perjudicial es más evidente en especies mesófitas y que el grado de daño es dependiente del estado ontogénico de la planta (Figura 1-16). Por ejemplo, la escasez de agua durante la germinación o el establecimiento de las plántulas produce una inhibición o retraso en el desarrollo, causando una disminución del número de individuos vigorosos. Si el déficit hídrico tiene lugar durante las etapas tempranas de crecimiento se observa una reducción en el rendimiento generativo y vegetativo [167]. De hecho, el daño en los primeros estadios de desarrollo suele ser el más perjudicial, puesto que, cuando las plantas alcanzan la madurez reducen significativamente el área foliar, la tasa fotosintética y la producción de asimilados, entre otros [168].

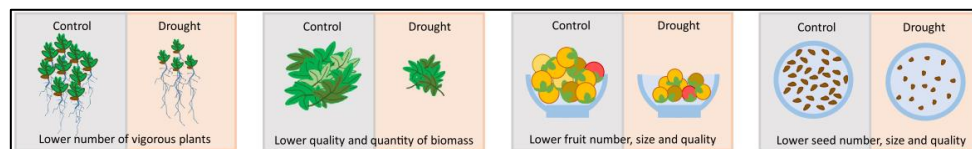


Figura 1-16. Ejemplos de los efectos perjudiciales de la sequía en las plantas. Fuente: Modificado Dietz, Zörb, and Geilfus (2021) [167].

El efecto de la sequía sobre las PAM se ha investigado extensamente, puesto que, este tipo de estrés afecta de manera severa a su comportamiento. Dentro de las Lamiaceae se podría mencionar casos como en albahaca morada (*Ocimum tenuiflorum*) que disminuye considerablemente su contenido de eugenol [169], en almaro (*Salvia sclarea*) y melisa (*Melissa officinalis* L.) que reducen su rendimiento de AE y compuestos fenólicos [170,171], en lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill) que inhibe el crecimiento óptimo [172], en piperita (*Mentha piperita*) que disminuye considerablemente la producción de biomasa, entre otras especies.

Daño oxidativo

Si bien durante la fotosíntesis la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) son necesarias para la señalización de diferentes vías metabólicas, éstas son degradadas por un sistema antioxidante. Sin embargo, cuando la producción de ROS es superior a la capacidad del sistema antioxidante para contrarrestar sus efectos, desencadena lo que se conoce como daño oxidativo [173]. Cuando las plantas están sometidas a estrés, el daño oxidativo aumenta, lo cual genera una disminución en su rendimiento y crecimiento [172].

Esta acumulación de ROS dentro de los cloroplastos, bajo condiciones de estrés, se produce por la tasa de asimilación del CO₂ subóptima, que, ligado a la cantidad de luz, genera un exceso de energía. Cuando este exceso de energía, en la cadena de transporte de electrones durante la fotosíntesis, no puede ser disipado en forma de calor (NPQ, *non-photochemical quenching*) genera una acumulación de la clorofila *a* singlete (¹Chl^{*}) y la consecuente formación de la clorofila *a* triplete excitada (³Chl^{*}). A su vez, este radical en el fotosistema II transforma el oxígeno molecular (O₂) en oxígeno singlete (¹O₂^{*}), una de las formas de ROS más dañinas para los cloroplastos [174,175].

Los principales ROS que incrementan su presencia en condiciones de estrés y generan daño oxidativo son: el radical superóxido (O₂^{•-}), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el radical hidroxilo (OH[•]) y el oxígeno singlete (¹O₂^{*}) [176]. Cuando existe un desequilibrio entre niveles de oxidantes y antioxidantes (Figura 1-17), se ocasionan daños como la degradación proteica, la peroxidación lipídica, la pérdida de cloroplastos y daños en el ADN, entre otros [177].

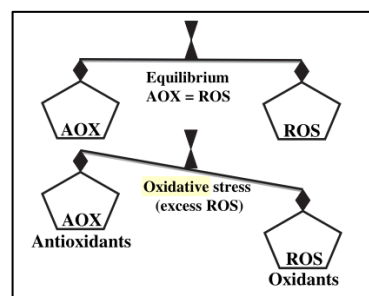


Figura 1-17. Equilibrio entre los antioxidantes y ROS. Fuente: Gill y Tuteja (2010)[173]

La peroxidación lipídica se considera uno de los procesos más dañinos para las plantas, que como se puede observar en la Figura 1-18, se activa por la presencia del radical OH[•], que da lugar a la formación de peróxidos y a la degradación de la membrana tilacoidal [139], lo que genera una acumulación de productos oxidados de membranas lipídicas como el malondialdehído (MDA) y otros aldehídos citotóxicos [173].

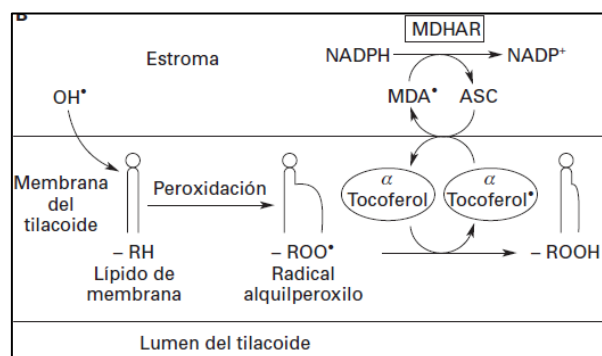


Figura 1-18. Esquema de la peroxidación lipídica. Fuente: Adaptado de [139]

Según Mohammadi y cols. (2021)[178], el contenido de MDA es considerado un indicador de peroxidación lipídica, es decir, un indicador del daño oxidativo de las membranas de los organelos celulares por algún estrés, puesto que, un incremento en su contenido indica una ineficiente respuesta del sistema antioxidante de la planta, que no es lo suficientemente efectivo para contrarrestar la tasa de peroxidación a la que está sometida la planta.

Las PAM han desarrollado adaptaciones como parte de su mecanismo de protección frente al daño oxidativo causado por las ROS, a través de la biosíntesis de una amplia gama de metabolitos secundarios, como los compuestos fenólicos y los AE, cuando están atravesando situaciones de estrés biótico y abiótico[179].

1.6.2.1.2 Tolerancia

La respuesta a la sequía está relacionada con la capacidad que tienen las plantas para mantener sus funciones fisiológicas semejantes a las normales cuando el estrés es leve, y baja ligeramente su tasa metabólica en condiciones de estrés severo o prolongado [146]. Asimismo, la tolerancia como respuesta ante la escasez de agua (en términos moleculares y genómicos) está relacionada con la capacidad de expresión de genes asociados a la síntesis de proteínas, factores de transcripción y/o enzimas que permiten a la planta tolerar escenarios con escasez de agua [168]. Inclusive, se puede decir además que las plantas con una buena tolerancia a la sequía tienen la capacidad de sintetizar una gran cantidad de metabolitos secundarios [180].

Existen diferentes mecanismos de tolerancia en las plantas. A continuación, se describen lo más importantes:

Ajuste osmótico

En condiciones de escasez de agua las células de los tejidos vegetales tienden a deshidratarse, situación que provoca un aumento en la cantidad de solutos internos y por ende una disminución de su potencial osmótico. La capacidad que tienen las plantas para acumular solutos de manera activa dentro de la célula, para reducir el potencial osmótico de forma drástica, se le conoce como ajuste osmótico u osmoregulación. Sin embargo, estos términos pueden diferir en función del tiempo y forma de acumular solutos, es decir, ajuste osmótico permite una bajada del potencial osmótico mediante una acumulación neta de sales, mientras que, la osmoregulación es la capacidad de añadir o eliminar solutos para generar un equilibrio del potencial osmótico entre el interior y exterior de la célula [181]. De esta forma, la capacidad que tiene una planta para regular

de manera eficiente un ajuste osmótico u osmoregulación está directamente relacionada con la tolerancia que pueda presentar bajo condiciones de escasez de agua [180,182,183].

Los osmolitos que la planta puede acumular activamente para mantener un ajuste osmótico adecuado suelen ser de bajo peso molecular y no interfieren en su metabolismo [154], permitiendo que la turgencia celular se mantenga, inclusive a elevados potenciales osmóticos [153]. En línea con esta afirmación, la tolerancia también está relacionada con la capacidad que tienen las plantas para mantener la presión osmótica intracelular constante, mediante la acumulación de osmolitos como la glicina, betaína, prolina y azúcares, manteniendo íntegras las estructuras de las paredes celulares [184].

En términos químicos, los osmolitos o también llamados osmoprotectores se clasifican en tres grupos: betaínas (derivados de aminoácidos completamente N-metilados) y compuestos relacionados (DMSP-dimetilsulfoniopropionato y colina-O-sulfato), algunos aminoácidos como la prolina y la ectoína; y finalmente algunos tipos de polioles y azúcares no reducidos como la trehalosa, tal y como se muestra en la Figura 1-19

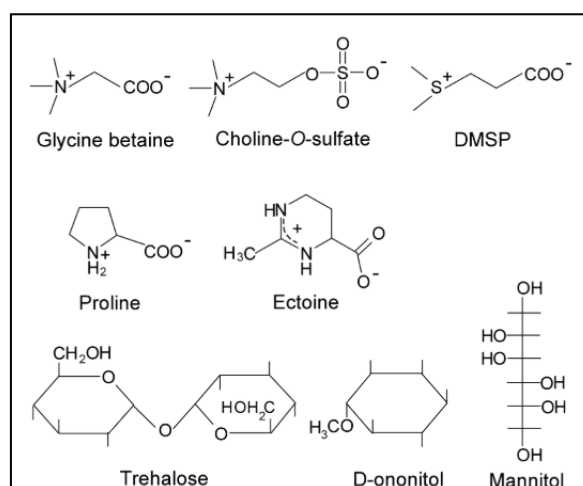


Figura 1-19. Principales osmolitos relacionados con el ajuste osmótico [185]

Bajo situaciones de estrés el osmolito compatible que más se acumula durante un ajuste osmótico es la prolina. Este aminoácido tiene unas valiosísimas propiedades bioquímicas entre las que se destacan: mantener una carga neutra a pH fisiológico, ser inocuo para el metabolismo celular y estabilizar estructuras subcelulares así como membranas celulares [186–188]. Además, Reddy y colaboradores (2004)[161] señalan que a la prolina también se le puede atribuir una actividad antioxidante y protectora, puesto que a elevadas concentraciones puede estar relacionada con el mecanismo de eliminación de ciertos ROS. Inclusive, se ha podido evidenciar su aporte en la disminución del daño fotooxidativo en las membranas tilacoidales a través de la reducción en la producción del oxígeno singlete (1O_2).

El mecanismo de acción de la prolina aún no se conoce en su totalidad, sin embargo, se sabe que se almacena en las vacuolas de las células, y es transportada al citoplasma cuando la presión osmótica extracelular aumenta durante un estrés hídrico, permitiendo que la célula aún pueda absorber agua extracelular y mantenga un estado de turgencia y equilibrio osmótico deseable [189]. Además, los mismos autores señalan que existen tres categorías de enzimas que podrían estar relacionadas con la acumulación de la prolina durante un ajuste osmótico (Tabla 1-3).

Tabla 1-3. Clasificación de las enzimas relacionadas con la acumulación de prolina durante el ajuste osmótico

<i>Categorías</i>	<i>Enzimas</i>	<i>Funciones</i>
Primera	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Δ-pirrolina-5-carboxylato sintetasa (P5CS) ▪ Pirrolina-5-carboxylato reductasa (P5CR) ▪ Ornitina-δ-aminotransferasa (δ-OA) 	Enzimas de síntesis
Segunda	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Prolina dehidrogenasa (ProDH) ▪ Δ-pirrolina-5-carboxylato dehidrogenasa (P5CDH) 	Enzimas de degradación
Tercera	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ProT 	Enzimas de transporte

Por otra parte, Yang y colaboradores (2021)[189] mencionan que el ajuste osmótico tiene ciertas limitaciones que impide que sea un mecanismo útil a largo plazo, es decir, bajo condiciones de estrés severo y prolongado la turgencia no se puede mantener, teniendo que recurrir a mecanismos auxiliares para evitar daños mayores y consigo la muerte celular.

Puesto que la acumulación de prolina es un mecanismo importante para mantener el ajuste osmótico, numerosos estudios en PAM sugieren que es un buen indicador de tolerancia al estrés hídrico y salino [190–194].

Sistemas de defensa antioxidante

El mantenimiento de un estado fisiológico redox óptimo en las plantas requiere un nivel umbral mínimo de ROS en las células. Sin embargo, un exceso de ROS conlleva cambios en la homeostasis celular y con ello daños en los orgánulos celulares, así como una interrupción en las rutas metabólicas guiadas por estas especies reactivas del oxígeno[151]. Para contrarrestar todos estos ROS en condiciones de estrés abiótico las plantas han desarrollado un sistema antioxidante que según sus características químicas pueden ser sistemas de defensa antioxidante enzimático y no enzimático [195].

Sistema antioxidante enzimático

Reddy y colaboradores (2004)[161] mencionan que el sistema de defensa antioxidante enzimático está regulado por enzimas que interactúan con los ROS degradándolos o

transformándolos en productos menos reactivos. Entre las principales se encuentran superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POD); y un conjunto de enzimas que interactúan en la ruta conocida como ciclo ascorbato-glutatión (AsA-GSH) entre las que destacan la ascorbato peroxidasa (APX), la monodehidroascorbato reductasa (MDAR), la glutatión reductasa (GR) y la dehidroascorbato reductasa (DHAR).

De manera general, la Figura 1-20 muestra el proceso de acción de los antioxidantes enzimáticos donde se puede observar que, durante un estrés, existe un incremento del anión radical $O_2^{\cdot-}$ que por acción de la SOD se transforma en oxígeno molecular O_2 y H_2O_2 . Posteriormente el peróxido de hidrógeno por acción de la CAT (en el espacio intracelular) y la POD (en el espacio extracelular) pasa a formar H_2O y O_2 [174].

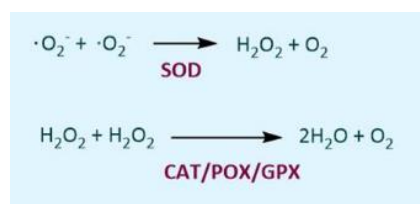


Figura 1-20: Resumen de las reacciones del sistema antioxidante enzimático sobre diferentes ROS. Fuente: Modificado de Rajput y cols. (2021)[196]

Superóxido dismutasa (SOD)

La SOD es una metaloenzima considerada el antioxidante enzimático intracelular más eficaz que está presente en los organismos aerobios. Esta enzima se acumula en compartimentos subcelulares, donde es más frecuente que suceda el estrés oxidativo producido por los ROS [173].

Otra característica importante de la SOD, es que se encuentra asociada a cofactores metálicos como Cu, Zn, Mn, Fe y Ni que genera diferentes isoformas, de las cuales Cu/Zn-SOD está presente en el apoplasto, citoplasma, cloroplastos y peroxisomas, mientras que la forma Mn-SOD se encuentra en la matriz mitocondrial [196].

Catalasa (CAT)

La catalasa es una enzima tetramérica que contiene un grupo hemo con la capacidad de dismutar el H_2O_2 a H_2O y O_2 , con una de las tasas más altas de rotación enzimática, es decir, cada molécula de CAT puede convertir aproximadamente 6 millones de H_2O_2 a H_2O y O_2 por minuto [173]. Sin embargo, la especificidad de esta enzima por el H_2O_2 es limitada por lo que se activa solamente cuando existe un incremento significativo del contenido en H_2O_2 [197].

Las plantas poseen tres clases principales de catalasas que se clasifican de acuerdo a su perfil de expresión en: (1) clase I que está presente en todos los tejidos fotosintéticos o dependientes de la luz; (2) clase II que se encuentra en tejidos vasculares; y (3) clase III que se ha localizado en semillas y en estadios tempranos de la germinación [196].

Peroxidasa (POD)

La POD es una glicoproteína que se sintetiza en el retículo endoplasmático y aparato de Golgi que se excreta a la zona extracelular o a las vacuolas. Existen al menos tres clases de enzimas peroxidasas, sin embargo, la clase III es la más activa en la matriz extracelular para disminuir el H_2O_2 producido en condiciones de estrés [196].

No obstante, la función de las peroxidasas va más allá de actuar en el catabolismo del H_2O_2 , inclusive, se conoce que está implicada en reacciones metabólicas importantes como el control en el crecimiento celular, induce un mecanismo de defensa ante un ataque de patógenos e interviene en los metabolismos de etileno y auxinas [198]. De forma general, las peroxidasas se dividen en dos grandes grupos: (1) las que tienen un grupo hemo, entre las cuales podemos incluir a la APX y guaicol peroxidasa y (2) las que no presentan el grupo hemo, también llamadas tiorredoxina peroxidasas, de las que cabe a destacar la glutatión peroxidasa y la tiorredoxina peroxidasa [197].

Enzimas del ciclo AsA-GSH: APX, MDAR, GR y DHAR

Este conjunto de enzimas permite la activación de un importante mecanismo de defensa antioxidante conocido como ciclo AsA-GSH (ascorbato-glutatión) o también conocido como ruta Foyer-Halliwel-Asada (Figura 1-21). Este ciclo de defensa antioxidante convierte el H_2O_2 en agua actuando el ascorbato reducido (AsA) como donador de electrones, lo que produce monodehidroascorbato (MDHA) y dehidroascorbato (DHA). Seguidamente, por acción del glutatión reducido (GSH) y la enzima DHAR, estas dos especies son recicladas nuevamente como AsA. Finalmente, el glutatión oxidado (GSSG) es reducido nuevamente a GSH por acción de la enzima GR [165,199].

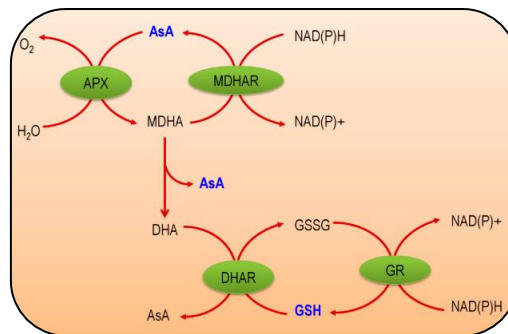


Figura 1-21 Ruta del AsA-GSH (ascorbato-glutiación). [Abreviaciones: AsA, ascorbato; APX, ascorbato peroxidasa; MDHA, monodehidroascorbato; MDHAR, monodehidroascorbato reductasa; DHA, dehidroascorbato; DHAR, dehidroascorbato reductasa; GSH, glutatiión; GSSG, glutatiión oxidado; GR, glutatiión reductasa; NAD(P)H, Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida); NAD(P)+, Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)]. Fuente: Hasanuzzaman y colaboradores (2019)[201]

Como se mencionó anteriormente, la APX tiene una de las funciones más importantes durante la detoxificación de ROS por su alta afinidad hacia H₂O₂, siendo probablemente la primera enzima en actuar en el ciclo AsA-GSH ante un proceso de estrés [197]. En este sentido, Dumanović y cols (2021)[198] señalan que esta enzima se localiza en diferentes compartimentos celulares tales como: estroma y tilacoides de los cloroplastos, peroxisomas, citosol y matriz mitocondrial. Además, Hasanuzzaman y cols. (2020) [201] señalan que la APX tiene una función directa sobre el α -tocoferol para mantenerlo en estado reducido.

La MDHAR es una enzima de dinucleótido de flavina y adenina (FAD) que está presente en la célula vegetal como una isoenzima cloroplástica y citosólica [173]. Además, se ha documentado que la MDHAR utiliza el NADH o NADPH (teniendo preferencia por la forma reducida NADH), como donador de electrones para catalizar la reducción del MDHA a AsA y mantenerlos a niveles bajos [196].

La GR es una enzima considerada flavoenzima que tiene en su estructura un grupo disulfuro y que está presente en organismos fotosintéticos, tanto eucariotas como procariontas [197]. Aunque la mayor actividad de esta enzima (alrededor del 80%) se produce en los cloroplastos (evitando el daño principalmente del fotosistema II), su presencia ha sido demostrada en otros compartimentos celulares como el citosol, núcleo, peroxisomas y la mitocondria [196].

La enzima DHAR es un monómero que pertenece a una superfamilia de enzimas conocidas como GSHT-transferasas [200]. Por su gran importancia en ciclo AsA-GSH, se ha evidenciado que su sobreexpresión en diferentes modelos de plantas (*Arabidopsis thaliana*) ha permitido comprobar su mejora en la tolerancia a diferentes tipos de estreses abióticos [173].

Sistema antioxidante no enzimático

El sistema antioxidante no enzimático se caracteriza por la acción de moléculas de bajo peso molecular que permiten neutralizar, eliminar y/o transformar ROS, para alcanzar una homeostasis celular en condiciones de estrés. Sin embargo, el comportamiento y la eficiencia de este sistema es dependiente de varios factores como el tipo, periodo e intensidad del estrés, así como, el genotipo, órgano, tejido, entre otros [197].

Tocoferoles, tocotrienoles y plastocromanol-8

Dentro del sistema antioxidante de defensa no enzimático se encuentran una variedad de antioxidantes lipofílicos que pueden prevenir el inicio o inclusive evitar la peroxidación lipídica cuando ha comenzado, sobre todo en las membranas lipídicas de organelos celulares [202]. Los antioxidantes lipofílicos más destacados son los tococromanoles (tocoferoles, tocotrienoles y plastocromanol-8), y algunas quinonas isoprenoides (plastoquinona-9 y plastoquinol-9) [203]. Según Vincent, Mesa, y Munne-Bosch (2020)[204], todos los tococromanoles tienen una alta eficiencia en cuanto a actividad antioxidante se trata, evitando una peroxidación lipídica y amortiguando el efecto dañino especialmente del 1O_2 generado durante el proceso de fotosíntesis. Para ello, los tococromanoles pueden atrapar y disipar la energía que lleva el 1O_2 , o en su lugar, permiten su autodegradación, produciendo subproductos oxidados que pueden ser fácilmente reciclados por la ruta AsA-GSH [205].

Los tocoferoles son un pilar fundamental para la adaptación que posee una planta a situaciones de estrés, siendo más tolerantes aquellas que tienen un incremento relativo de α -tocoferol. Además, se ha evidenciado que el α -tocoferol se regula en dos fases: la primera donde ocurre una mayor síntesis para contrarrestar los ROS y la segunda donde se genera una degradación cuando las plantas atraviesan un estrés severo. La primera fase es predominante en plantas resistentes a sequía mientras que la segunda predomina en plantas sensibles a este tipo de estrés [206].

De acuerdo con Lushchak y Semchuk (2012)[207], existen cuatro formas de tocoferoles que se nombran como α -, β -, γ - y δ -tocoferol, cuya estructura básica consiste en un anillo cromanol de carácter polar junto a una cadena lateral hidrofóbica, donde el número y la posición de los grupos metilo en el anillo cromanol difieren en las cuatro estructuras Figura 1-22. Entre ellos, α - y γ -tocoferol predominan en los tejidos vegetales, siendo la forma α -tocoferol (α -toc) la mayoritaria en las membranas fotosintéticas de las hojas, mientras que, la estructura γ -tocoferol (γ -toc) se puede encontrar en frutos y semillas [206].

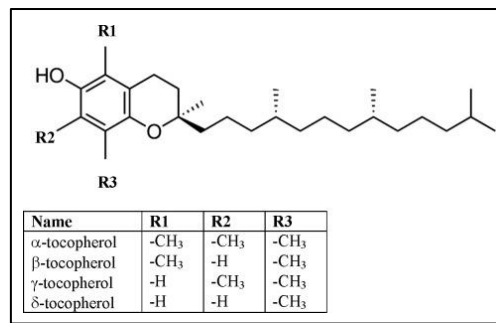


Figura 1-22. Estructuras de los tocoferoles. Fuente: Gruszka, Pawlak y Kruk (2008)[208]

Según Dumanović y cols. (2021)[198], la mayor capacidad antioxidante relativa de los isómeros de tococromanoles en estudios *in vivo* corresponde a las siguientes formas $\alpha > \beta > \gamma > \delta$, lo cual está relacionado con el número de grupos metilos que se encuentran en la cabeza del anillo cromanol y al patrón de la metilación.

El proceso por el cual el α -toc neutraliza los efectos del ROS (especialmente el 1O_2) empieza por la oxidación que el ROS genera en su estructura, lo que lleva a la transformación del α -toc en α -tocopherol hidroperóxido (α -TOOH) que a su vez se descompone en una molécula más estable conocida como α -tocopherol quinona (α -TOQ) [203].

El plastocromanol-8 (PC-8) es una molécula homóloga del γ -tocotrienol que tiene una cadena lateral larga de 8 unidades de isoprenoides (Figura 1-23), la cual se sintetiza a partir de la forma reducida de la plastoquinona que es catalizada por una enzima llamada tocoferol ciclasa [209]. Además, se ha evidenciado que el PC-8 presenta las mismas propiedades antioxidantes que los tocoferoles y tocotrienoles, aunque posee una mejor capacidad para atenuar el efecto del 1O_2 por su cadena lateral más larga y menos saturada [205].

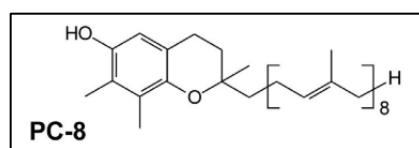


Figura 1-23 Estructura del plastocromanol-8. Fuente: Kruk y cols. (2014)[210]

Aunque la evidencia científica aún sigue siendo escasa con respecto a la localización del PC-8 en las células, la gran mayoría de los estudios señala que se encuentra en tejidos vegetales ricos en cloroplastos [204], aunque su riqueza en esas localizaciones dependerá de la edad, estado fenológico de la planta y genotipo, entre otras [211].

Las PAM se caracterizan por tener sistemas antioxidantes no enzimáticos eficientes, puesto que, se las consideran buenas productoras de tococromanoles en condiciones de estrés. Así lo evidencia diferentes estudios, entre las que destacan plantas pertenecientes a la familia de las

Lamiaceae como espliego (*Lavandula latifolia* subsp. Medik.) [212], hiedra terrestre (*Glechoma hederacea* L.), orégano (*Origanum vulgare* subsp. virens) y tomillo blanco (*Thymus mastichina* L.) [213],

Compuestos fenólicos

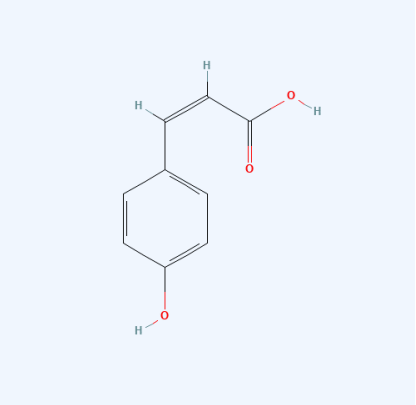
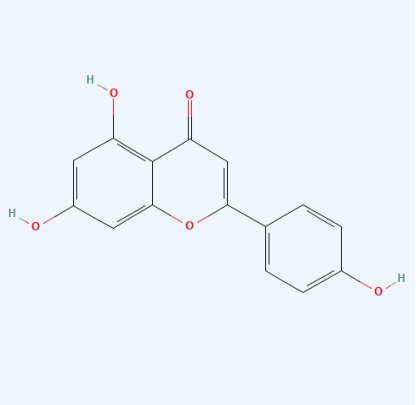
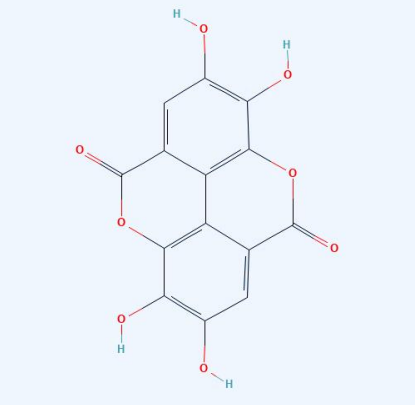
En situaciones de estrés, las plantas reducen su metabolismo primario en favor de un metabolismo secundario para la producción de compuestos conocidos como metabolitos secundarios [214]. De acuerdo con Namdeo [215], los metabolitos secundarios son compuestos que no se les reconoce un rol fundamental en el ciclo vital de una planta al sintetizarlos, sin embargo, tienen una función importante en la interacción de la planta con el ambiente que la rodea. Incluso la cantidad sintetizada es tan baja que no sobrepasa el 1% del peso seco de la planta.

Los polifenoles son el grupo más grande de metabolitos secundarios que generalmente se derivan de la ruta del ácido shikímico y/o ácido malónico, cuyas configuraciones moleculares varían desde un solo anillo aromático hasta estructuras más complejas [214].

En la actualidad, se han llegado a identificar cerca de 10.000 compuestos fenólicos de carácter hidrofílico y lipofílico con una reconocida actividad antioxidante derivada de las propiedades redox que poseen [216]. Además, se ha evidenciado que algunos compuestos fenólicos están relacionados con la generación de cambios estructurales en la membrana lipídica para disminuir la fluidez de la misma, y así, evitar la difusión de radicales libres que generen un daño en los cloroplastos [198].

De acuerdo con Varela y cols. [180], los compuestos fenólicos pueden dividirse en 3 grandes categorías según su estructura química: (1) no flavonoides, (2) flavonoides y (3) taninos (Tabla 1-4).

Tabla 1-4. Clasificación de compuestos fenólicos. Fuente: Andrés-Lacueva y colaboradores (2009)[217]

CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS		
<p>No flavonoides</p>	<p>Son moléculas que poseen al menos un anillo fenólico y cuyos hidrógenos pueden ser sustituidos por diferentes grupos reactivos, obteniendo diferentes compuestos fenólicos como: ácidos hidroxicinámicos, coumarinas, benzofenonas, estilbenos, chalconas, lignanos, iridoides, etc.</p>	 <p>Ej.: Ácido <i>p</i>-coumárico (ácido hidroxicinámico)</p>
<p>Flavonoides</p>	<p>Generalmente son moléculas con una estructura de fenilbenzopirano que está conformado por 2 anillos aromáticos unidos por una cadena de 3 carbonos que cerrada forma un anillo pirano (C6-C3-C6). Pueden subclasificarse en antocianidinas, flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas y flava-3-oles</p>	 <p>Ej.: Apigenina (Flavona)</p>
<p>Taninos</p>	<p>Los taninos pueden subdividirse en dos subgrupos: (1) taninos no hidrolizables: son polímeros de flava-3-oles y son de tipo A (C7-C2) y tipo B (C4-C8 o C4-C6); (2) taninos hidrolizables que son polímeros de ácidos fenólicos unidos a 5 o 6 anillos de carbono.</p>	 <p>Ej.: ácido elágico (Tanino hidrolizable)</p>

No obstante, es necesario recalcar que la riqueza y la disponibilidad de ciertos compuestos fenólicos depende del estado fenológico de la planta, así como, de las condiciones ambientales que la rodean [218]. En línea con estas afirmaciones, se ha propuesto que los compuestos fenólicos sean indicadores de estrés en plantas por su acumulación durante estos episodios [216].

Como se mencionó anteriormente, las PAM son plantas que se caracterizan por su alta producción de compuestos fenólicos, presentes tanto en sus aceites esenciales como en sus

extractos no volátiles, de gran aplicabilidad en la industria agroalimentaria. Así, el manejo de diferentes tipos de estrés (abiótico o biótico) ha sido extensamente estudiado, con el objetivo de obtener mejoras en el incremento de los niveles de compuestos fenólicos que pueden sintetizar las plantas como una respuesta a las condiciones adversas [130,219–222]. De igual forma, García-Caparrós y cols. [145] señalan que cuando las plantas atraviesan un estrés por sequía existe un incremento y/o disminución de ciertos compuestos fenólicos que afectan al rendimiento y la calidad del aceite esencial en PAM.

Asimismo, se ha evidenciado que el estrés hídrico genera una acumulación de compuestos fenólicos por su acción en la regulación de las rutas biosintéticas de los fenilpropanoides, es decir, regula la codificación de las principales enzimas implicadas en la síntesis de estos compuestos [151].

Fitohormonas

Como se ha comentado anteriormente, las plantas en condiciones de sequía indiscutiblemente regulan sus procesos fisiológicos por dos razones: (1) la sequía compromete la función estomática, afecta el intercambio gaseoso, lo que conlleva a una sobreproducción de ROS y causa un daño oxidativo, y (2) el déficit hídrico inhibe la división celular, la expansión del área foliar, el engrosamiento del tallo y la proliferación de las células de la raíz. [156]

Ante estos escenarios, los cambios en la distribución y síntesis de las hormonas, en la mayoría de las plantas se alteran radicalmente puesto que tienen una función importante en las respuestas de las plantas para contrarrestar los efectos negativos ante la falta de agua [150].

Dentro de las fitohormonas el ácido abscísico (ABA) es considerado una de las más importantes en la respuesta frente al déficit hídrico, ya que suele incrementar su concentración hasta 50 veces durante episodios de estrés por sequía [157].

El ABA es un metabolito secundario con estructura de sesquiterpenoide, cuyo catabolismo comienza en el cloroplasto y termina su síntesis en el citosol [223]. La síntesis de esta hormona deriva del β -caroteno, el cual pasa por diferentes rutas mediadas por tres importantes enzimas: (1) zeaxantina epoxidasa (ZEP), (2) 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED) y (3) ABA-aldehído oxidasa (AAO); que se complementa con la ayuda de un cofactor de azufre y molibdeno (MoCo) [224].

En la Figura 1-24 se esquematiza la síntesis del ABA, que empieza dentro del plastidio con la epoxidación de la zeaxantina (Z) por acción de la ZEP para transformarla en anteraxantina (A) que

a su vez se transforma en violaxantina (V) por acción de otra ZEP. Posteriormente, la V a través de dos isomerasas, forma dos metabolitos: 9-cis-violaxantina y 9-cis-neoxantina, que formarán con ayuda de la enzima NCED la xantoxina (X) (precursor del ABA). Finalmente, la X se transforma en un aldehído abscísico que con acción de la AAO en conjunto con el cofactor MoCo forman el ácido abscísico.

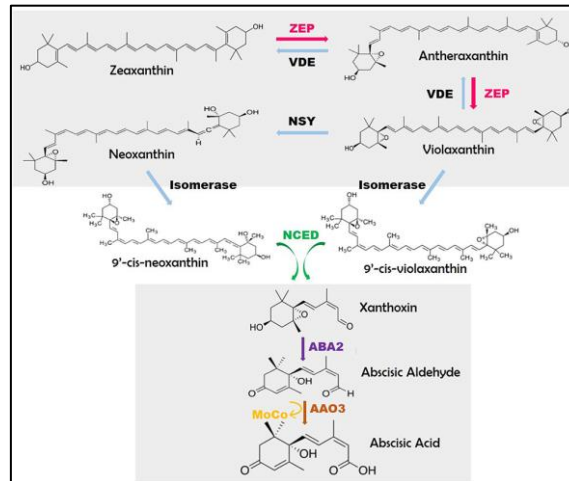


Figura 1-24. Biosíntesis del ácido abscísico. [Abreviaturas: ZEP, zeaxantina epoxidasa; VDE, violaxantina de-epoxidasa; NSY, neoxantina sintasa; NCED, 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa; ABA2, alcohol deshidrogenasa; AAO, ABA-aldehído oxidasa; MoCo; cofactor de azufre y molibdeno]Fuente: Vishwakarma y cols. (2017)[224]

La importancia del ABA en la respuesta de las plantas a situaciones de estrés hídrico ha sido extensamente estudiada [224–229]. Esto se debe al efecto que tiene sobre la regulación del estado hídrico de las plantas, mediante el control de las células guarda de los estomas y/o la inducción de genes que codifican enzimas y proteínas que confieren a la planta cierta tolerancia a las sequía[229].

Los estomas son unos pequeños poros localizados en la superficie de las hojas formados por las células guarda y que se encargan del control del intercambio gaseoso, que en situaciones de estrés ante el incremento en la concentración de ABA se cierran [185]. Este mecanismo es eficiente para evitar que la planta sufra una pérdida de agua por transpiración, sin embargo, esta medida fisiológica hace que la fotosíntesis se vea comprometida por la baja disponibilidad de CO₂ en ciclo de Calvin [230].

Gong y cols. [157], señalan que a pesar de que las raíces son los primeros órganos en percibir una escasez de agua, se ha evidenciado que la expresión génica de enzimas implicadas en la síntesis de ABA aumenta en tejidos vasculares del tallo y hojas, que tras su acumulación son transportadas a la raíz y a las células guarda. Sin embargo, a pesar de que las raíces no son el lugar de síntesis,

son las encargadas de reconocer el déficit hídrico y transmitir las señales que preparan a la planta para la generación y acumulación de ABA y así estimular la respuesta frente al estrés hídrico [153].

Contenido de pigmentos fotosintéticos

La fotosíntesis es el proceso por el cual la energía solar (lumínica) se transforma en energía química, siendo una de las rutas más sensibles a cambios cuando una planta está sometida a estrés. [231]. Esta transformación de energía tiene lugar a través de la captación de fotones de luz por los cloroplastos y la disociación de las moléculas de agua que generan protones, electrones y ROS [203].

Los cloroplastos para cumplir su función precisan de un alto contenido en clorofila, que es el pigmento más abundante en los sistemas fotosintéticos. En las hojas se localizan dos tipos: clorofila a (Chl a) y clorofila b (Chl b), y su síntesis y proporción varía en función de las condiciones ambientales que rodean a la planta [232].

Asimismo, Hu y cols. [232] señalan que la Chl a y la Chl b tienen funciones diferentes, por ejemplo, la Chl a es importante para la fotoquímica en los cloroplastos (transformación de la energía solar en química), mientras que, la Chl b permite un mayor espectro de absorción de luz (cerca de los 450 nm), región en la cual la Chl a no tiene una absorción eficiente. Por ello, la planta genera mecanismos de autorregulación a través de la acumulación o degradación de pigmentos según las condiciones adversas por las que atraviesa la planta.

Tanto la Chl a como la Chl b se autorregulan mediante una vía metabólica conocida como ciclo de la clorofila (Figura X), para ello, una porción de la Chl a se transforma en Chl b por acción de la enzima chlorofilida oxigenasa (CAO): A su vez, la Chl b puede ser reconvertida a Chl a, a través de dos isoenzimas de Chl b reductasa: la non-yellow coloring 1 (NYC1) y la similar a NYC1 (NOL); y la enzima 7-hidroximetil Chl a reductasa (HCAR) [233] (Figura 1-25).

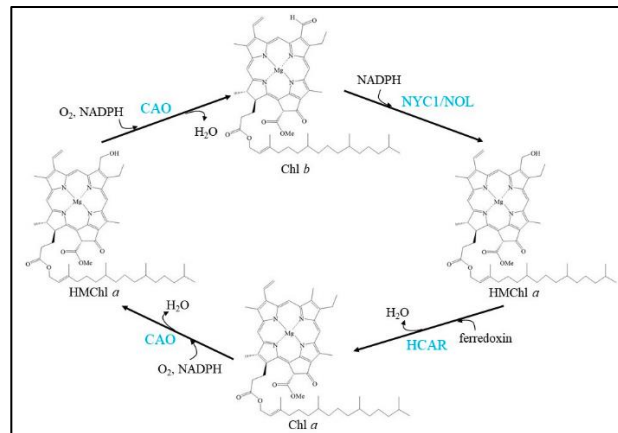


Figura 1-25. Esquema de las reacciones enzimáticas en el ciclo de la clorofila. Fuente: Hu y cols. (2021)[232]

La acumulación de ROS producida por la fotosíntesis y/o estrés que está atravesando una planta genera una desestabilización y oxidación de la membrana tilacoidal de los cloroplastos, causando una degradación de los pigmentos fotosintéticos (principalmente de la clorofila) [234]. Para contrarrestar este efecto, las plantas desarrollan mecanismos que le permiten mantener condiciones óptimas, como la acumulación de antioxidantes o la mejora de la eficiencia fotosintética en condiciones adversas [235].

En aras de mantener la eficiencia fotosintética, las plantas incrementan el contenido en carotenoides, pigmentos que además de contribuir a la captación de energía lumínica para la fotosíntesis, ejercen una acción fotoprotectora de los cloroplastos. [236].

Los carotenoides tienen una alta eficiencia para contrarrestar los efectos dañinos producidos por las condiciones de estrés severo a través de tres mecanismos: (1) eliminar la clorofila triplete ($^3Chl^*$) formada durante la fotosíntesis, (2) atrapar diferentes ROS como el 1O_2 , y (3) disipar el exceso de energía a través de la extinción no fotoquímica (NPQ, por sus siglas en inglés) [237]. Este último se da a través de un proceso metabólico conocido como ciclo de xantofilas (Figura 1-26) que consiste en la acumulación de zeaxantina a partir de la violaxantina actuando como intermediario la anteraxantina [161]. Sin embargo cuando las condiciones vuelven a ser óptimas para el desarrollo de la planta, el ciclo de las xantofilas se da a la inversa, es decir, existe una regeneración de la violaxantina a partir de la anteraxantina [238].

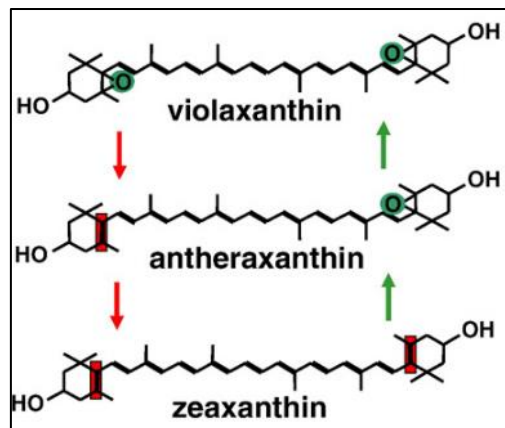


Figura 1-26. Esquema del ciclo de las xantofilas. Fuente: Modificado de Jahns, Latowski, and Strzalka (2009)[238]

1.6.2.1.3 Evasión

A diferencia de la tolerancia, la evasión genera una bajada considerable del metabolismo de la planta llegando a tener episodios de latencia y/o dormancia hasta que las condiciones sean nuevamente favorables. Generalmente, estos mecanismos de tolerancia y evasión en las plantas pueden ser de diferentes tipos, provocando que estas respuestas actúen en combinación en la mayoría de situaciones de estrés [146].

Una respuesta eficiente de evasión a la sequía permite a la planta tener una tasa relativamente alta de crecimiento lo que le permite tener un metabolismo estable sin comprometer la degradación de metabolitos secundarios en su proceso de respuesta, siempre y cuando el episodio de estrés sea temporal [180].

Al igual que la tolerancia, la evasión en las plantas es una respuesta que genera la planta mediante cambios morfológicos y fisiológicos como elongación de la raíz, acortamiento del tallo, disminución en el área y espesor foliar, e inclusive, pliegan sus hojas para disminuir la evapotranspiración [184,239]. A continuación, se describen los mecanismos de respuesta de evasión más importantes:

Modulación en la arquitectura del sistema radicular

Las plantas obtienen el agua y los nutrientes a través de la raíz, por lo tanto, el sistema radicular juega un papel importante en la respuesta frente al estrés hídrico. De hecho, en algunas plantas se ha visto una elongación del sistema radicular en estadios tempranos ante una escasez de agua [158]. Con la elongación o restructuración del sistema radicular, la planta promueve la captación

de agua en suelos más profundos (hidrotropismo), e inclusive, al mejorar su sistema radicular, disminuyen la evapotranspiración sin comprometer el rendimiento en condiciones de estrés [240]. Esta alometría de la raíz se puede desarrollar por eventos coordinados entre la división celular, la elongación y la diferenciación del ápice de la raíz. De hecho, el reacomodamiento del sistema radicular en escenarios escasos de humedad favorece la producción de raíces laterales hacia sitios donde la humedad es mayor [135].

Estos cambios en la arquitectura del sistema radicular están mediados por el ABA, hormona que como se mencionó anteriormente incrementa su contenido en situaciones de estrés, lo que permite una regulación en la arquitectura del sistema radicular, así como, el crecimiento o achicamiento de la raíz según las características del suelo o las necesidades de la planta [241].

Cambios en la estructura foliar

Frente a la escasez de agua, las plantas tienen que modificar su estructura foliar para disminuir la pérdida de agua y mejorar el uso eficiente de la misma. Para ello, pueden desarrollar estructuras xeromórficas tales como: desarrollo de hojas más delgadas y pequeñas, aumento en la cantidad de tricomas, disminución en la cantidad de estomas, desarrollo de una pequeña cutícula alrededor de la hoja, engrosamiento del tejido de empalizada, mejor desarrollo de la vaina del haz vascular, entre otras [158,242].

En el caso del aumento de tricomas y cutículas de las hojas, Li y cols. (2023) señalan que dentro de las múltiples funciones que se les atribuye (biosíntesis y producción de COVs), tienen un aporte en la evasión frente a un estrés, puesto que, los tricomas tienen una capacidad de absorber agua para mejorar el estado hídrico y la eficiencia fotosintética. Por otra parte, un incremento de la cutícula en la superficie de las hojas se ha asociado a una mejor retención de agua en estos órganos en algunas angiospermas [244].

A pesar de que muchas de estas modificaciones se dan bajo condiciones de estrés severo, existen especies que cambian su follaje según la estación del año, como por ejemplo durante el verano ciertas plantas pierden las hojas para evitar un incremento en la evapotranspiración, mientras que otras finalizan su ciclo anual antes de entrar a una sequía estival [245].

Este es el caso de algunas aromáticas como la *Salvia officinalis* L. que pierde sus hojas maduras para reacondicionar su metabolismo y favorecer el crecimiento de hojas jóvenes cuando las condiciones de estrés desaparecen [246], la *Salvia hispánica* L. que una vez que el fruto alcanza su madurez produce la senescencia de sus hojas para evitar un exceso de evapotranspiración [247] y en los casos de *Salvia lavandulifolia* y *Satureja montana* L. que pierden sus hojas para la

reciclar el contenido de nitrógeno y carbono para la formación de hojas jóvenes después del verano [248].

Cambios en la fotosíntesis

Como se mencionó anteriormente la producción y rendimiento de un cultivo está limitado por la eficiencia de la fotosíntesis, que depende directamente de la apertura estomática (que permite la entrada y salida de CO₂ y H₂O en forma de vapor) y de la actividad fotosintética del mesófilo [158].

Puesto que las modificaciones en la estructura foliar son necesarias para una evasión temporal a la sequía, las plantas sufren cambios en los procesos fotosintéticos. De hecho, Chaves, Flexas, y Pinheiro [249] señalan que un cierre estomático o disminución de los estomas en las hojas impide la entrada de CO₂ al ciclo de Calvin-Benson causando una disminución en la tasa fotosintética.

Las plantas poseen tres vías metabólicas de fijación del CO₂ en el ciclo de Calvin-Benson para la producción de carbohidratos (Figura 1-27), lo cual las categoriza en tres grupos: plantas de la vía metabólica C₃, plantas de la vía metabólica C₄ y plantas de la vía metabólica C₃-C₄ o también conocido como el metabolismo del ácido crasuláceo (CAM, por sus siglas en inglés)[250]. Aunque el metabolismo C₃ es el más común, bajo condiciones de estrés, el metabolismo C₄ es mucho más eficiente reteniendo agua en condiciones de estrés [189]. Por otra parte, las plantas CAM concentran el CO₂ durante la noche usando la vía C₄ y fijándolo en el ciclo de Calvin-Benson durante el día, es decir, la apertura estomática la realizan en la noche para evitar la pérdida de agua por evapotranspiración [158].

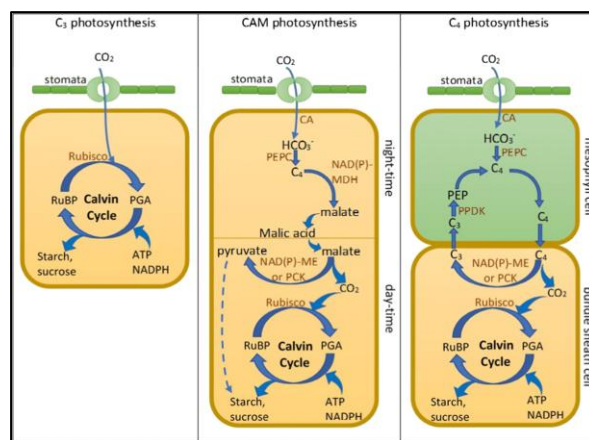


Figura 1-27: Diagrama esquemático de la fotosíntesis C₃, C₄ y CAM. [Abreviaciones: *RuBP*, ribulosa 1,5-bisfosfato; *PGA*, ácido fosfoglicérico; *ATP*, adenosín trifosfato; *NADPH*, Nicotinamida-Adenina dinucleótido fosfato hidrogenado;

CA, anhidrasa carbónica; HCO_3^- , bicarbonato; *NADP*, Nicotinamida-Adenina dinucleótido fosfato; *NAD(P)-MDH*, NADP-malato deshidrogenasa; *NAD(P)-ME*, enzima málico-NADP dependiente; *PCK*, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa; *PEPC*, fosfoenolpiruvato carboxilasa; *PPDK*, piruvato ortofosfórico diquinasa; *PEP*, fosfoenolpiruvato]. Fuente: Dehigaspitiya y cols. (2019)[251]

De manera general, las plantas con fotosíntesis C_4 y CAM están mejor adaptadas a ambientes áridos y cálidos por su mayor eficiencia en el uso de agua que las plantas con fotosíntesis C_3 [250]. No obstante, existen algunas plantas conocidas como CAM facultativas que cuando atraviesan un período de escasez de agua, son capaces de cambiar su vía fotosintética de C_3 a CAM [158].

1.7 Perspectivas de futuro

Las plantas son la base de la producción de la biósfera incluida la producción humana (alimentos, piensos, energía, materiales), lo que implica que, los factores ambientales que puedan afectar a los cultivos tengan una gran repercusión tanto económica como medioambiental [205]. Por ello, en los últimos años se ha llevado a cabo estudios enfocados hacia el conocimiento de cómo el estrés influye en las plantas y cómo éstas se regulan para hacer frente a dichas situaciones [157].

En este sentido, el principal desafío que tiene la agricultura, para no comprometer los cultivos importantes en un futuro inmediato, es identificar y optimizar herramientas que permitan una mejora en la tolerancia de las plantas a diferentes tipos de estrés [161]. Dentro de este campo se integra el estudio del genotipo con el fenotipo en diferentes ambientes para seleccionar plantas más tolerantes de manera eficiente y rápida a través de lo que se conoce como “fenotipado” [252].

1.7.1 Fenotipado

El fenotipado de plantas es una herramienta poderosa para abordar y comprender la interacción que tienen los cultivos con su entorno, y su posible aplicación para un fitomejoramiento [253]. Así, Li, Zhang, y Huang [252] definen el fenotipado como una evaluación integral de los rasgos complejos de las plantas, entre los que se incluyen el crecimiento, desarrollo, tolerancia, resistencia, anatomía, fisiología, genética, ecología, rendimiento, etc., para la obtención de especies con características deseadas.

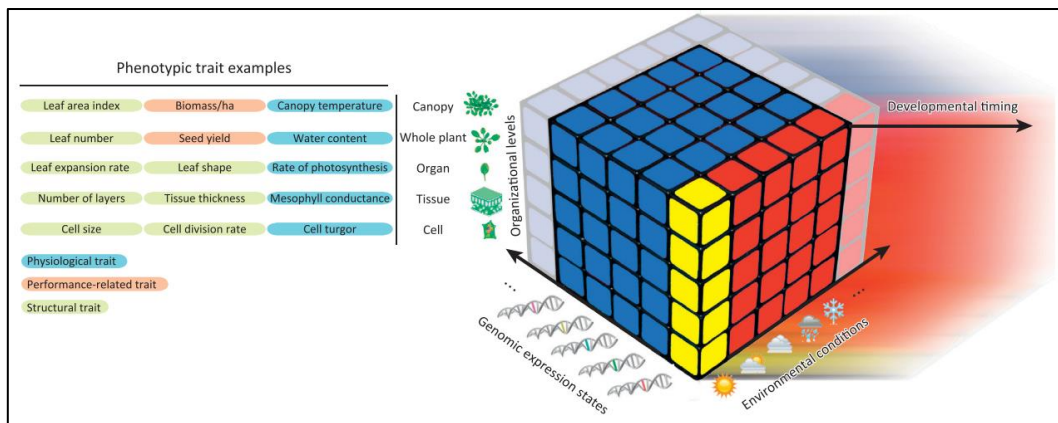


Figura 1-28. Estructura de un fenotipo de plantas. Fuente: Modificado de Dhondt, Wuyts y Inzé (2013)[254]

En la Figura 1-28 se observa que el fenotipo de los cultivos se puede realizar en múltiples niveles de organización, que van desde el campo hasta un nivel celular (y eventualmente un nivel subcelular). Asimismo, los rasgos fenotípicos de interés se pueden categorizar como fisiológicos, estructurales o de rendimiento, los cuales son evaluados en conjunto con un estado de expresión génica dada y unas condiciones ambientales conocidas (columna de cubos amarillos).

En las PAM se ha venido utilizando esta técnica para la obtención de variedades mejoradas en producción o que tengan mayor tolerancia y/o resistencia a diferentes tipos de estrés. Este es el caso de la selección de variedades de albahaca (*Ocimum basilicum* L) resistentes a sequía y salinidad [255], de variedades de rosa de damasco (*Rosa damascena* Mill.) que producen AE de buena calidad y con alto rendimiento[256], y de variedades de esclarea (*Salvia sclarea*) con una alta producción de esclareol [257].

1.7.2 Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* es una técnica extensamente aplicada en programas de mejoramiento que ha permitido el desarrollo de plantas genéticamente iguales a gran escala. Bajo estas condiciones se consiguen multiplicar individuos que en condiciones *ex vitro* tienen dificultades de crecimiento y/o desarrollo, incrementando así su producción y rendimiento [258]. Además, en los últimos años el cultivo *in vitro* ha sido estudiado extensamente, lo que ha permitido obtener mejoras de los cultivos mediante técnicas más especializadas como el rescate de embriones, fusión de protoplastos, producción de plantas haploides y variaciones somaclonales [259].

En el caso de las PAM, por su alta riqueza en metabolitos secundarios de gran interés en diferentes campos de aplicación, se ha desarrollado el uso de las suspensiones celulares que

permiten obtener una mayor producción de metabolitos secundarios de manera más eficiente y sin necesidad de tener un terreno o plantación para su obtención [260].

Como ejemplo de la aplicación de esta tecnología, durante el desarrollo de este proyecto de tesis se han desarrollado dos protocolos de micropropagación para la obtención a gran escala de espliego y romero [122]. Asimismo, en la recopilación bibliográfica recogida por Grigoriadou y cols. [261] se evidencia la gran aplicabilidad de esta técnica en una variedad de PAM pertenecientes a la familia Lamiaceae con gran interés agroalimentario, entre las que destacan: el orégano de creta (*Origanum dictamnus*) y varias especies del género *Sideritis* (*S. perfoliata*, *S. raeseri*, *S. scardica*, *S. sipylea* y *S. syriaca*)

1.7.3 Modificación genética

Los cultivos transgénicos o genéticamente modificados (GM) tienen una transformación en el genoma a través de técnicas de ingeniería genética (técnicas transgénicas), las cuales permiten una incursión de genes al genoma de una planta huésped de cualquier procedencia, es decir, la ingeniería genética facilita la transferencia de cualquier gen que no esté estrechamente relacionado con la genética de la planta huésped para obtener las características deseadas del gen donante [262].

Una de las técnicas más utilizadas en cultivos GM es la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* que permite obtener líneas transgénicas más estables. No obstante, para la expresión transitoria del ADN del gen donante se utilizan otras técnicas como el bombardeo de partículas (biolística), la sonicación y/o la electroporación [263].

En la actualidad se han identificado y secuenciado diferentes genes que están directamente relacionados con la síntesis de enzimas que actúan en la producción de compuestos fenólicos específicos en los AE de diferentes PAM [264]. Por ejemplo, en el caso del género *Lavandula* se han identificado dos genes que están relacionados con el inicio de una floración temprana (*LaAGAMOUS-like* y *LaSEPALLATA3-like*) [265].

Estos avances han permitido el desarrollo de variedades transgénicas de PAM del género *Lavandula* con altos rendimientos de AE y contenido de linalol [266], con un aumento en el contenido de precursores para la síntesis de monoterpenos específicos [267], con cambios en la fragancia debido a la variación relativa de compuestos alcanforados en sus AE [268,269], etc.

1.7.4 Edición genética

La edición del genoma es un método que permite reconocer y ubicar con precisión una secuencia de nucleótidos específica dentro de un genoma para varios propósitos. A diferencia de las herramientas transgénicas que suelen insertar aleatoriamente las secuencias deseadas, la edición génica permite insertar una secuencia de nucleótidos en un tramo específico del genoma de una planta [270].

Existen varias herramientas para la edición génica entre las que destacan (1) nucleasas con dedos de zinc (ZFN), nucleasas efectoras semejantes a activadores de transcripción (TALENs) y (3) repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR o CRISPR/asociado-9 (Cas9)) o en otras palabras, fragmentos de ADN repetitivos [271]. Según Dey (2021)[272] la técnica CRISPR/Cas 9 es una de las herramientas de mutagénesis dirigida más eficaces y fáciles de aplicar para el fitomejoramiento por tener dos ventajas: (1) la secuencia génica que va a ser editada se elimina por completo y (2) los cambios en el genoma huésped son estables y se mantienen en la descendencia.

Con esta última ya se ha logrado obtener una variedad transgénica de albahaca (*Ocimum basilicum* 'FT Italiko') resistente a la enfermedad del mildiu veloso (*Peronospora belbahrii*) [273].

1.7.5 PRIMING

Las plantas que crecen en condiciones normales experimentan múltiples tipos de estreses que pueden ocurrir de forma secuencial o simultánea. Sin embargo, para que las plantas adquieran una mayor tolerancia a estos episodios de estrés en las condiciones de cultivo, son previamente sometidas a un estrés (esta exposición previa se la conoce como "priming") [274].

De acuerdo con Wang, Liu, y Jiang [275] un priming puede ser cualquier tipo de estrés (biótico o abiótico) que genere una memoria de respuesta frente al mismo estrés en el futuro y que esa memoria sea heredable a la siguiente generación de manera más eficiente (Figura 1-29). La memoria que se genera con el priming incluye la acumulación de proteínas señalizadoras o factores de transcripción, así como, mecanismos de regulación epigenética en las plantas que producen un silenciamiento y/o activación de genes para mejorar la respuesta al estrés cuando las plantas son sometidas a episodios de estrés consecutivos [276].

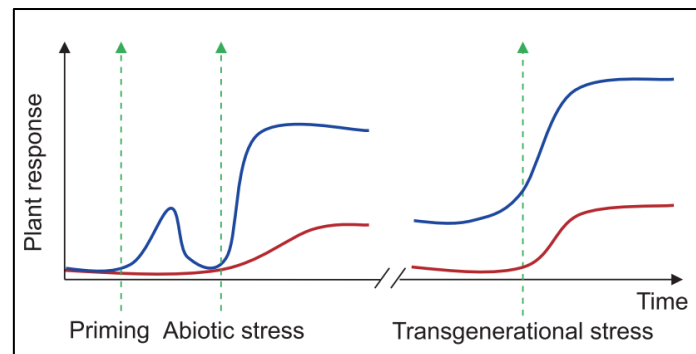


Figura 1-29. Esquema de la respuesta de priming de una planta en la misma generación y transgeneracional.

Etiquetas: (azul) plantas con priming, (rojo) plantas sin priming. Fuente: modificado de Wang y cols. (2017)[275]

A nivel celular, los mecanismos de regulación epigenética son de tres tipos (Figura 1-30): (1) modificación de las histonas, (2) metilación del ADN y (3) regulación postranscripcional mediada por microARN (miRNA, por sus siglas en inglés) [277,278]; los cuales podrían ser transmitidos a la siguiente generación como una “memoria transgeneracional” [147]. Además, se ha evidenciado que estos mecanismos de regulación han permitido a poblaciones de plantas hacer frente a sus entornos edafoclimáticos, y las mutaciones epigenéticas hereditarias adquiridas (epimutaciones) podrían contribuir a las variaciones fenotípicas transmisibles a su progenie [279].

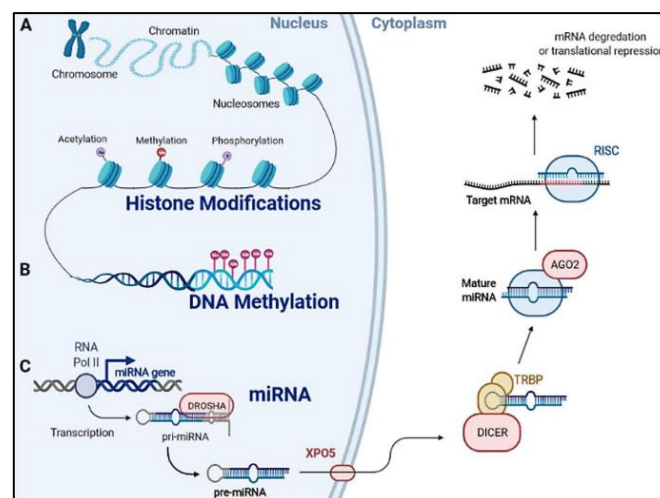


Figura 1-30. Principales mecanismos de regulación epigenética. A. Modificación de histonas; B. Metilación de ADN; C. regulación con miRNA. Fuente: Modificado de Rotondo y cols. (2021)[278]

Entre ejemplos de priming como técnica de fitomejoramiento se puede destacar el que se les da a las semillas de algunas especies para desarrollar una mejora pregerminativa, que le permitirá una respuesta temprana en los primeros estadios durante una germinación bajo condiciones de estrés hídrico [184].

A través de esta técnica, Kahveci y cols [280] concluyeron que un priming en semillas de albahaca con ácido salicílico, β -caroteno y triptófano mejoraron la capacidad de germinación en ambientes

salinos. Asimismo, Moori y Ahmadi-Lahijani [281] obtuvieron plantas de tomillo (*Thymus vulgaris* L.) provenientes de semillas pretratadas con hormonas (ácido salicílico y ácido jasmónico), tolerantes a suelos con altos niveles de metales pesados (cadmio).

Asimismo, se puede destacar el uso de la luz a diferentes longitudes de onda como priming, en la mejora de cultivos frente a estreses bióticos o abióticos sin necesidad de usar herramientas biotecnológicas más avanzadas [282,283]. En este sentido, Ahmadi, Shabani, y Sabzalian [284], señalan que las plantas para adaptarse a las variaciones de longitud de onda producen cambios en su metabolismo para incrementar la producción de compuestos fenólicos.

De igual manera, una aplicación de alta intensidad lumínica ha sido asociada con un efecto priming sobre las plantas. Inclusive, Han, Park, y Park [285] mencionan que una alta intensidad de luz puede modular diferentes reacciones transcripcionales en rutas metabólicas, permitiéndole una mejora en la tolerancia de la planta a un estrés por calor.

En la actualidad el manejo de la luz LED en cuanto a calidad y cantidad, ha permitido que se use extensamente como un pretratamiento priming y/o inductor de una respuesta fenotípica deseada en PAM [286–290]. De este modo, se podría concluir que esta tecnología novedosa es una herramienta útil y segura para la obtención y mejora de PAM con interés industrial.

Capítulo 2 Justificación y Objetivos

Justification and objectives

2.1 Justificación

El presente trabajo de Tesis Doctoral se centra en la obtención, selección y multiplicación de plantas aromático-medicinales (*Lavandula latifolia* Medik y *Thymus zygis* subsp. *gracilis*), con mayor tolerancia a la sequía para su uso en la industria agro-alimentaria.

El espliego (*Lavandula latifolia* Medik) es una de las plantas aromáticas con mayor interés para las industrias farmacéutica y perfumera, lo que la convierte en una de las especies de PAM más importantes para la economía de España y en concreto para la Región de Murcia [17]. Sin embargo, la sequía, una de las mayores amenazas para la agricultura, se prevé que incrementará con los años según las predicciones de los estudios sobre calentamiento climático [136], por lo que es necesario obtener ecotipos de espliego homogéneos que resistan a estos escenarios.

En línea con esto, debido a que estas especies poseen una alta variabilidad y una baja tasa de multiplicación con técnicas tradicionales, es necesario el desarrollo de protocolos de cultivo *in vitro* que permitan obtener material vegetal genéticamente idéntico y libre de patógenos [291]; permitiendo una producción masiva de plántulas en poco espacio y que generen cultivos homogéneos donde se pueda observar su comportamiento real en campo.

Por ello, en el Experimento 1 "Evaluation of the physiological parameters in *Lavandula latifolia* Medik. under water deficit for preselection of elite drought-resistant plants" se establece la selección de dos ecotipos de espliego tolerantes a sequía, a través de la evaluación de varios parámetros fisiológicos (contenido relativo de agua, %RWC; presión osmótica, ψ_{WP} ; concentración de ácido abscísico, ABA; y niveles de prolina), sistema antioxidante no enzimático (α -tocoferol, plastocromanol-8), peroxidación lipídica (MDA), pigmentos fotosintéticos (clorofilas y carotenoides), perfil fenólico y actividad antioxidante de sus extractos (ensayos de FRAP y DPPH \cdot). En este capítulo se pretende avalar la hipótesis de trabajo de que el estudio de estas variables fisiológicas permita la selección de espliegos resistentes a sequía en condiciones de invernadero, que posteriormente, deben ser evaluadas en condiciones reales de campo y así determinar su comportamiento.

Asimismo, a pesar de la importancia económica y social que tiene el espliego y las investigaciones realizadas en esta especie, todavía no se ha conseguido establecer en España cultivares comerciales homogéneos que presenten un alto rendimiento agronómico en AE [116]. La variabilidad intraespecífica existente se asocia a diversas razones como: genética, estrés, tiempo de recolección del material vegetal, técnica de extracción, entre otras [292–295]. Además, la creciente demanda de productos antioxidantes naturales por parte de la industria agroalimentaria, exige buscar cultivos que aparte de ser tolerantes a la sequía presenten una alta

actividad biológica en sus extractos y AE [32]. Por esta razón, el Experimento 2 denominado “Agronomic Evaluation and Chemical Characterization of *Lavandula latifolia* Medik. under the Semiarid Conditions of the Spanish Southeast”, compara el comportamiento de los dos espliegos seleccionados por sequía en el Experimento 1, frente a dos espliegos provenientes de una explotación comercial, establecidos en una parcela experimental durante 3 años consecutivos. La clonación *in vitro* de estos 4 ecotipos ha permitido evaluar su rendimiento agronómico en AE, junto con la calidad del perfil volátil, el perfil fenólico de sus extractos metanólicos y su actividad antioxidante mediante ensayos de FRAP y DPPH[•]. La hipótesis de este trabajo es que, al conocer el comportamiento y la estabilidad de los espliegos seleccionados por sequía durante tres años consecutivos de cultivo, relativo a la producción de biomasa, rendimiento y calidad del AE, y riqueza de compuestos fenólicos; permitirá adoptar nuevas estrategias de mejora para esta variedad.

De igual manera, el presente proyecto de Tesis también contempla la obtención de plantas de tomillo rojo (*T. zygis* ssp. *gracilis*) resistentes a sequía y con marcada actividad antioxidante. El tomillo rojo es una variedad con un alto interés económico y agroalimentario para España y la Región de Murcia por la alta riqueza de timol en sus AE, lo que le confiere una excelente calidad [128]. En base a esto, se ha utilizado una herramienta útil para la fitomejora como el priming con un exceso de luz el cual ha sido asociado a una mejora en la respuesta de plantas frente a escenarios de estrés por calor [285]. Por esta razón, el Experimento 3 denominado “Evaluación fisiológica de *Thymus zygis* frente a la sequía, en ecotipos pretratados con alta intensidad de luz LED” recoge una evaluación del efecto de un priming por exceso de luz LED sobre la respuesta del *T. zygis* frente a un estrés hídrico en invernadero, comparando varios parámetros fisiológicos (%RWC, ABA y prolina), sistema antioxidante no enzimático (α -tocoferol, plastocromanol-8), peroxidación lipídica (MDA), pigmentos fotosintéticos (clorofilas y carotenoides), perfil fenólico y actividad antioxidante de sus extractos (ensayos de FRAP y DPPH[•]). La hipótesis de trabajo para este experimento consiste en que un exceso de luz LED como priming puede generar una memoria en *T. zygis*, e inducir una respuesta más eficiente ante un episodio de estrés futuro, lo cual permitiría una mejora y selección de variedades más resistentes a sequía.

Finalmente, estos avances en la selección de plantas aromático-medicinales con mayor resistencia a la sequía permitirán un ahorro de recursos hídricos, confiriéndole además a estos cultivos una importancia socio-económica por su posible uso como fuente de antioxidantes naturales en la industria agroalimentaria. La revalorización de estas producciones favorecerá el reasentamiento sobre las zonas rurales de la Región de Murcia, y por lo tanto, se aportarán herramientas que permitan alcanzar los objetivos propuestos en la Agenda 2030 por el Programa

de las Naciones Unidas para el Desarrollo.

Justification

This Doctoral Thesis work focuses on obtaining, selecting and multiplying aromatic-medicinal plants (*Lavandula latifolia* Medik y *Thymus zygis* subsp. *gracilis*) with greater tolerance to drought for their use in the agri-food industry.

Spike lavender (*Lavandula latifolia* Medik) is one of the aromatic plants with the greatest interest for the pharmaceutical and perfume industries, which makes it one of the most important PAM species for the economy of Spain and the Region of Murcia [17]. However, drought, one of the greatest threats to agriculture, is expected to increase over the years according to the predictions of studies on climate change [136], thus it is necessary to obtain homogeneous spike lavender ecotypes that can resist these scenarios.

In line with this, due to the high need of these species and the low capacity they have for their reproduction traditionally, it is necessary to develop *in vitro* culture protocols to obtain genetically identical and pathogen-free plant material [291], providing a massive production of seedlings in a small space and that generates homogeneous crops where its real behavior in the field can be observed.

Therefore, in Experiment 1 “Evaluation of the physiological parameters in *Lavandula latifolia* Medik. under water deficit for preselection of elite drought-resistant plants” the selection of two drought-tolerant spike lavender ecotypes is established, through the evaluation of several physiological parameters (relative water content, %RWC; osmotic pressure, ψ_{WP} ; concentration of abscisic acid, ABA; and proline levels), non-enzymatic antioxidant system (α -tocopherol, plastochromanol-8), lipid peroxidation (MDA), photosynthetic pigments (chlorophylls and carotenoids), phenolic profile and antioxidant activity of their extracts (assays of FRAP and DPPH*). This chapter aims to support the working hypothesis that the study of these physiological variables allows the selection of spike lavender more resistant to drought under greenhouse conditions, which must later be evaluated under real field conditions and hence determine their agronomical behavior.

Likewise, despite the economic and social importance of spike lavender and the research carried out on this species, it has not yet been possible to establish homogeneous commercial cultivars in Spain that present a high agronomic and AE yield [116]. The existing intraspecific variability is associated to several factors such as: genetics, stress, plant material collection time, extraction technique, among others [292–295]. In addition, the growing demand for natural antioxidant products by the agri-food industry requires looking for crops that, apart from being drought

tolerant, present high biological activity in their extracts and AE [32]. For this reason, Experiment 2 titled "Agronomic Evaluation and Chemical Characterization of *Lavandula latifolia* Medik. under the Semiarid Conditions of the Spanish Southeast", compares the behavior of the two spike lavenders pre-selected as drought-tolerant in Experiment 1, compared to two spike lavenders from a commercial producer, established in an experimental plot for 3 consecutive years. The *in vitro* cloning of these 4 ecotypes has made it possible to evaluate their agronomic performance, the EO yield, the EO volatile profile, the phenolic profile of their methanolic extracts and their antioxidant activity by means of FRAP and DPPH• assays. The hypothesis of this work is based on, when knowing the behavior and stability of spike lavenders pre-selected by drought during three consecutive years of cultivation, relative to biomass production, yield and quality of EO, and richness of phenolic compounds; It will allow adopting new improvement strategies for this variety.

Similarly, this Thesis project also contemplates obtaining red thyme plants (*T. zygis* ssp. *gracilis*) resistant to drought and with marked antioxidant activity. Red thyme is a variety with high economic and agri-food interest in Spain and the Region of Murcia due to the high thymol richness in its EO, which gives it excellent quality [128]. Based on this, a useful tool for plant breeding such as priming with excess light has been used, which has been associated with an improvement in the response of plants to heat stress scenarios [285]. For this reason, Experiment 3 titled "Physiological evaluation of *Thymus zygis* against drought, in ecotypes pretreated with high intensity LED light" includes an evaluation of the effect of priming, due to excess LED light, on the response of *T. zygis* against water stress in a greenhouse, comparing various physiological parameters (%RWC, ABA, and proline), non-enzymatic antioxidant system (α -tocopherol, plastochromanol-8), lipid peroxidation (MDA), photosynthetic pigments (chlorophylls and carotenoids), phenolic profile and antioxidant activity of their extracts (FRAP and DPPH• assays). The working hypothesis for this experiment is that an excess of LED light as priming can generate a memory in *T. zygis*, and induce a more efficient response to a future stress episode, which would allow improvement and selection of more resistant varieties to drought.

Finally, these advances in the selection of aromatic-medicinal plants with higher resistance to drought will allow savings in water resources, also giving these crops socio-economic importance due to their possible use as a source of natural antioxidants in the agri-food industry. The reevaluation of these productions will favor the resettlement of the rural areas of the Region of Murcia, and therefore, tools will be provided to achieve the objectives proposed in the 2030 Agenda by the United Nations Development Program.

2.2 Objetivos

Objetivo general

Obtener un banco de germoplasma de espliego y tomillo rojo de interés para la industria agroalimentaria resistentes a sequía, mediante micropropagación de clones con alto rendimiento agronómico y calidad de sus aceites esenciales, así como, una elevada riqueza en compuestos bioactivos.

Objetivos específicos:

Primero: Obtener plantas élite de espliego (*Lavandula latifolia* Medik.) resistentes a sequía mediante la evaluación de su respuesta frente a un estrés hídrico severo.

Segundo: Determinar durante tres años consecutivos de cultivo, el rendimiento agronómico, la cantidad y la calidad de los aceites esenciales, y la riqueza en compuestos bioactivos en las producciones de dos ecotipos de espliego pre-seleccionados por su resistencia a sequía.

Tercero: Evaluar el posible efecto de un “priming” (tratamiento) de alta intensidad lumínica en tomillo rojo (*T. zygis* ssp. *gracilis*) sobre la respuesta fisiológica frente a la sequía, así como, la activación de su sistema antioxidante como fuente de compuestos bioactivos.

Objectives

General aim

Obtaining a spike lavender and red thyme germplasm bank of interest for the agri-food industry resistant to drought, through micropropagation of clones with high agronomic yield and quality of their essential oils, as well as a high richness in bioactive compounds.

Specific objectives

First: Obtaining elite spike lavender plants (*Lavandula latifolia* Medik.) resistant to drought by evaluating their response to severe water stress.

Second: Determining for three consecutive years of cultivation, the agronomic yield, the quantity and quality of essential oils, and the richness in bioactive compounds in the production of two ecotypes of lavender preselected for their resistance to drought.

Third: Evaluating the possible effect of high-light intensity in red thyme (*T. zygis* ssp. *gracilis*) on the physiological response to drought, as well as the activation of its antioxidant system as a source of bioactive compounds.

Capítulo 3 METODOLOGÍA GENERAL

General methodology

This Thesis project is part of the R&D project titled "Cultivation and clonal selection of elite sage, rosemary, marjoram, and lavender plants for their innovative application in the field of human health and nutrition (RTA2017-00031-C04- 04)", Subproject 1: "Selection and multiplication of elite drought-resistant aromatic-medicinal plants of interest to the agri-food industry" financed by the National Institute of Agricultural Research and Technology of the Ministry of Economy, Industry, and Competitiveness.

Chapter 3 provides an overview of the common methodology used in Experiment 1, experiment 2, and Experiment 3 (described below), which have been conducted to address the general aim of the present Thesis.

For this, three experiments were designed:

Experiment 1: Evaluation of the physiological parameters in *Lavandula latifolia* Medik. under water deficit for preselection of elite drought-resistant plants.

Experiment 2: Agronomic Evaluation and Chemical Characterization of *Lavandula latifolia* Medik. under the Semiarid Conditions of the Spanish Southeast

Experiment 3: Physiological evaluation of *Thymus zygis* against drought, in ecotypes pretreated with high intensity LED light

3.1 Relative water content (%RWC)

The relative water content (RWC) was measured by weighing (FW) three leaves immediately after harvesting the plants. Then, the leaves were placed in distilled water for 24 hours at 8°C and weighed again (TW). Finally, the leaves were kept at 65°C for 24 hours to obtain their dry weight (DW). The RWC was calculated using the equation (1) described by Ahmadi et al. (2019) [296]:

$$RWC = (FW - DW) / (TW - DW) \times 100 \quad (1)$$

3.2 Leaf water potential (ψ WP)

The leaf water potential (ψ WP) was measured according to Scholander et al. (1965) [297]. Briefly, three mature and expanded leaves from each plant were enclosed in plastic bags and immediately placed in a pressure chamber (Model 600; PMS Instrument Company, Albany, USA).

3.3 Proline

Proline was analyzed by following the method described by Abraham et al. (2010)[298], based on a ninhydrin colorimetric assay. The chromophore produced by the reaction was measured using a Shimadzu (UV-2401PC, Japan) spectrophotometer at 520 nm. Quantification of proline was carried out with linear regression models, using standard dilution techniques (1.25, 2.5, 5, 10, 20, and 30 μ M).

3.4 Abscisic acid (ABA)

The analysis of abscisic acid was carried out following a modified protocol to that described by Albacete et al. (2008) [299]. Shortly, 100 mg of homogenized plant material were extracted with 1.5 mL of a cold (-20°C) solution (methanol/water, 80/20, v/v). The extracts were centrifuged (20000 x g, 15 min, 4°C) and the precipitate was re-extracted with the same solution. Supernatants were pooled and subjected to solid phase extraction using Sep-Pak Plus C 18 cartridges (SepPak Plus, Waters, USA) in order to eliminate interfering substances. The extracts were evaporated at 40°C under vacuum and redissolved with 0.5 mL of a solution composed of methanol/water (20/80, v/v). Then, samples were filtered with nylon-membrane filters of a pore size of 0.22 μm (Millipore, Bedford, MA, USA).

The filtered extract (10 μL) was run in a U-HPLC (Accela, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) coupled to a mass spectrometer (Exactive, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) that was equipped with a heated electrospray ionization (HESI) interface. The Xcalibur software (version 2.2, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used to obtain the mass spectra. The quantification of ABA was done by constructing a calibration curve (1, 10, 50, and 100 $\mu\text{g/L}$). Quantitative data were corrected for 10 $\mu\text{g/L}$ of deuterated internal standard and the percentages of recovery were higher than 92%.

3.5 α -tocopherol (α -toc) y plastochromanol-8 (PC-8)

Both α -tocopherol (α -T) and plastochromanol-8 (PC-8) were extracted and analyzed following the method used by Quílez et al. (2018) [63] with some modifications. In brief, 100 mg of plant material was homogenized in a mortar with 1.5 mL of cold extraction solution of hexane/ethyl acetate (60/40, v/v). The pool was extracted by agitating for 4 h at 15°C in darkness. To remove water content, anhydrous sodium sulfate was added and the mixture was centrifuged for 10 min

at 2,061 g and 15°C. The supernatant was filtered using a 0.45-µm pore size filter nylon membrane (Millipore SAS, Molsheim, France) and evaporated at 35°C under vacuum in an evaporator system SpeedVac®-SPD121P (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). The residue was washed in 2 mL of pure ethyl acetate and samples were frozen (-80°C) until analysis.

Samples were analyzed by fluorescence detection using a 1200 HPLC system (Agilent, Waldbronn, Germany) equipped with a G1311A binary pump and a G1321A FLD detector. Excitation and emission wavelengths were set at 290 nm and 330 nm respectively. Fifteen microliters of extract were injected onto a ZORBAX SB-C18 reversed-phase column (4.6 × 250 mm, 5-µm pore size, Agilent Technologies, CA, USA) using a guard column (ZORBAX SB-C18 4.6 × 125 mm, 5-µm pore size, Agilent Technologies, CA, USA), with a flow rate of 1 mL/min at 25°C. The mobile phases were methanol (A) and methyl tert-butyl ether (B). In the case of, PC-8 a different mobile phase gradient was used, as described by Gruszka and Kruk [300]. In Table 3-1 and Table 3-2 are shown the mobile phase gradients used, respectively.

Table 3-1. Mobile phase used in the determination of α-tocopherol by HPLC-FL

Time (min)	Methanol (A)	Methyl tert-butyl ether (B).
0	99%	1%
3	98%	2%
6	97%	3%
9	96%	4%
12	95%	5%
25	89%	11%
28	75%	25%
30	99%	1%
35	99%	1%

Table 3-2. Mobile phase used in determination of plastochromanol-8 by HPLC-FL

Time (min)	Methanol (A)	Methyl tert-butyl ether (B).
0	85%	15%
3	55%	45%
5	45%	55%
8	35%	65%
10	85%	15%
12	85%	15%

The limit of detection (LOD) was calculated as the concentration corresponding to three times the standard deviation of the baseline noise and the limit of quantification (LOQ) as the concentration corresponding to ten times the standard deviation of the baseline noise. In the case of α-T, the estimated values of LOD and LOQ were 0.0425 µg/mL and 0.1416 µg/mL, respectively; whereas for PC-8, they were 0.053 µg/mL and 0.161 µg/mL, respectively.

3.6 Lipid peroxidation (malondialdehyde)

Malondialdehyde was extracted by following the method described by Botsoglou et al. (1994)[301], with some modifications. Briefly, 100 mg of the sample were homogenized with 1.0 mL an extraction solution comprising 5% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) and 500 μ L of 0.8% butylated hydroxytoluene (BHT) diluted in hexane (w/v). The extracts were centrifuged for 30 min at 20000 $\times g$ and 2°C. The supernatant was mixed with 600 μ L of 0.8% (w/v) thiobarbituric acid (TBA). Following incubation for 30 min at 70°C, the samples were cooled immediately. The extracts were centrifuged at 20000 $\times g$ and 16 °C for 10 minutes and supernatant were kept at -80°C until their corresponding analyses.

Analysis of MDA was performed using the method described by Moselhy et al. (2013)[302], by reverse phase HPLC, using a fluorescence detector (the same instrumental equipment described for the α -tocopherol analysis) programmed with excitation at 515 nm and emission at 553 nm. Samples (10 μ L) were injected with a flow rate of 1 mL/min, at 35 °C. The mobile phase, pumped at 1 mL/min, consisted of methanol (A) and acidified water containing 5% formic acid (B). The gradient applied is detailed in Table 3-3:

Table 3-3. Mobile phase used in determination of MDA by HPLC-FL

Time (min)	Methanol (A)	Acidified water (B)
0	5%	95%
5	25%	75%
10	95%	5%
15	95%	5%
15.1	5%	95%
20	5%	95%

Quantification of MDA was performed by linear regression analysis (calibration curve: 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, and 1.0 μ g/mL), using a stock solution of 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP). The LOD and LOQ were calculated as described in subsection 3.1.5, showing values of 0.0158 μ g/mL and 0.0478 μ g mL, respectively.

3.7 Photosynthetic pigments (chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, and carotenoids)

Chlorophyll a (Chl-a), chlorophyll b (Chl-b), and carotenoids (Car) were extracted following the method described by Bekhradi et al. [303]. All samples were read at 663 nm and 647 nm for Chl-a and -b, respectively, and at 470 nm for Car using the aforementioned Shimadzu

spectrophotometer. Photosynthetic pigments were quantified applying the equations (equations 2, 3, and 4) proposed by Lichtenthaler and Buschmann [304]. Results were expressed as mg pigment/g DW.

$$\text{Chl-a } (\mu\text{g/ml}) = 16.72 A_{675} - 9.16 A_{652.4} \quad (2)$$

$$\text{Chl-b } (\mu\text{g/ml}) = 34.09 A_{652.4} - 15.28 A_{665.2} \quad (3)$$

$$\text{Car } (\mu\text{g/ml}) = (1000 A_{470} - 1.63_{\text{Chl-a}} - 104.96_{\text{Chl-b}})/221 \quad (4)$$

3.8 Identification and quantification of phenolic compounds

Phenolic compounds extraction was accomplished by following the method described by Jordán et al. [29], with some modifications. In brief, 100 mg of lyophilized plant material were extracted with 40 mL of methanol by stirring for 2 h at 30°C in darkness. Each extract was centrifuged for 15 min at 2000 x g and 4 °C and the supernatant was evaporated to dryness under vacuum in a Buchi evaporator system (Syncore Polyvap R-96). The residue was redissolved in pure methanol and the samples were kept at -80°C until their corresponding chromatographic analysis.

3.8.1 Phenolic compounds identification

Qualitative analyses were performed on a Kinetex column (5 μm, C18, 100 Å, 150 x 4.6 mm; Phenomenex, UK). The mobile phase consisted of two solvents: acetonitrile (A) and water-formic acid (1%) (B) and the gradient applied is specified in Table 3-4. The flow rate and the injection volume were 800 μL/min and 20 μL, respectively.

Table 3-4. Mobile phase of HPLC-DAD-ESI/MSn qualitative analyses of phenolic compounds

Time (min)	Acetonitrile (A)	Acidified water (B)
0	10%	90%
25	30%	70%
30	40%	60%

Spectral data for all peaks were registered at the 240-400 nm range, and chromatograms were recorded at 260, 290 and 340 nm. HPLC-DAD-ESI/MSn analyses were performed on an Agilent HPLC 1200 series unit equipped with a diode array detector and an a mass detector (Agilent Technologies, Germany). The HPLC system consisted of a binary pump (model G1376A), an autosampler (model G1377A) cooled to 4°C (G1330B), a degasser (model G1379B) and a photodiode array detector (model G1315D). It was controlled by ChemStation software (Agilent, v. B.01.03-SR2). The ion trap mass detector was a Bruker spectrometer (model HCT Ultra)

equipped with an electrospray ionization interface and controlled by LCMSD software (Agilent, v. 6.1). Ionization conditions were set at 350°C and 4.0 kV for capillary temperature and voltage, respectively. Nebulizer pressure was 65.0 psi and nitrogen flow rate was 11 L/min. The complete mass scanned covered the range from m/z 100 to m/z 1200. Collision-induced fragmentation experiments were carried out in the ion trap using helium as the collision gas, with voltage ramp cycles from 0.3 to 2 V. Mass spectrometry data from the ion trap were acquired in the negative ionization mode. MS2 was performed in the automatic mode on the most abundant fragment ion in the MS.

3.8.2 Phenolic compounds quantification

For phenolic compounds quantification, a method modified from Jordán et al. [130] was used. The HPLC equipment and the column used were described in subsection 3.1.5. The mobile phase was acetonitrile (A) and acidified water containing 0.05% formic acid (B). The gradient is shown in Table 3-5. The flow rate was 1.0 mL/min, and the wavelengths of detection were set at 280 and 330 nm.

Table 3-5. HPLC-DAD quantitative analyses of phenolic compounds

Time (min)	Acetonitrile (A)	Acidified water (B)
0	95%	5%
10	85%	15%
30	75%	25%
35	70%	30%
50	45%	55%
55	10%	90%
57	0%	100%
67	95%	5%

3.9 Antioxidant capacity

3.9.1 FRAP

Ferric Reducing Antioxidant Power was determined following the method described by Jordán et al. (2013)[50]. The FRAP reagent was made with 300 mM acetate buffer (pH 3.6), 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-S-triazine) dissolved in 40 mM HCl and 20 mM FeCl₃. The three solutions were mixed in a proportion of 10:1:1 (v/v/v). A 40 µL aliquot of the extract was combined with 1.2 mL of FRAP reagent, followed by incubation for 30 minutes in darkness at 37°C. All the samples were measured spectrophotometrically at 593 nm. The results were expressed as micromoles of FeSO₄·7H₂O/g of dry weight.

3.9.2 DPPH•.

The ability of methanolic extracts to scavenge 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radicals (DPPH•) was determined following the method described by Jordán et al. [306]. Briefly, 500 µL aliquots were added to 1 mL of DPPH• methanolic solution (0.1 mM). The samples were incubated for 20 min in darkness at room temperature, and then measured spectrophotometrically at 517 nm. Absorbance was measured against a blank of 500 µL of methanol mixed with 1 mL of DPPH• solution. Results were expressed as µmoles of Trolox equivalents/g of DW.

Capítulo 4 Evaluation of the physiological parameters in *Lavandula latifolia* Medik. under water deficit for preselection of elite drought-resistant plants

Results and discussion concerning this current experiment have been accepted for publication in **Evaluation of the physiological parameters in *Lavandula latifolia* Medik. under water deficit for preselection of elite drought-resistant plants** in *Industrial Crops & Products*, by 23 April 2023. DOI: [10.1016/j.indcrop.2023.116742](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116742). Annex 1

4.1 Introduction

Lavandula latifolia Medik. also known as spike lavender, is an aromatic-medicinal plant belonging to the Lamiaceae family. It is native to the Mediterranean region, and Spain is one of the most important producers, with an annual production of 150-200 t of essential oil. essential oil [307]. This industrial crop, with minimal water requirements, represents an added value for the most depopulated arid areas, serving as a catalyst for rural development.

Nevertheless, abiotic stresses, such as salinity, water scarcity, extreme heatwaves, UV radiation, cold, and toxic metals, are among the main threats to agricultural production and inevitably have an impact on the yield and quality of the essential oil (EO) production in several aromatic-medicinal plants (AMP) [308]. In fact, the effect of drought on the quality and yield of EO has been documented in previous studies [130,145,303,309], where each species or variety exhibited a different behavior under similar conditions.

The review compiled by Avramova [310] indicated that plants that suffer repeated stresses are able to respond to subsequent stress events in a way that is different from what they first overcome. Hence, understanding the response of the plant to different episodes of drought is of vital importance for the selection of tolerant cultivars [161,239].

In line with this, the objective of this experiment was to evaluate the response of preselected *L. latifolia* plants (plants surviving a first episode of drought) to a new period of dryness and to select drought-tolerant plants based on their physiological response.

4.2 Materials and methods

The methodology used in this experiment is represented in a graphical abstract (Figure 4-1)

EXPERIMENT 1

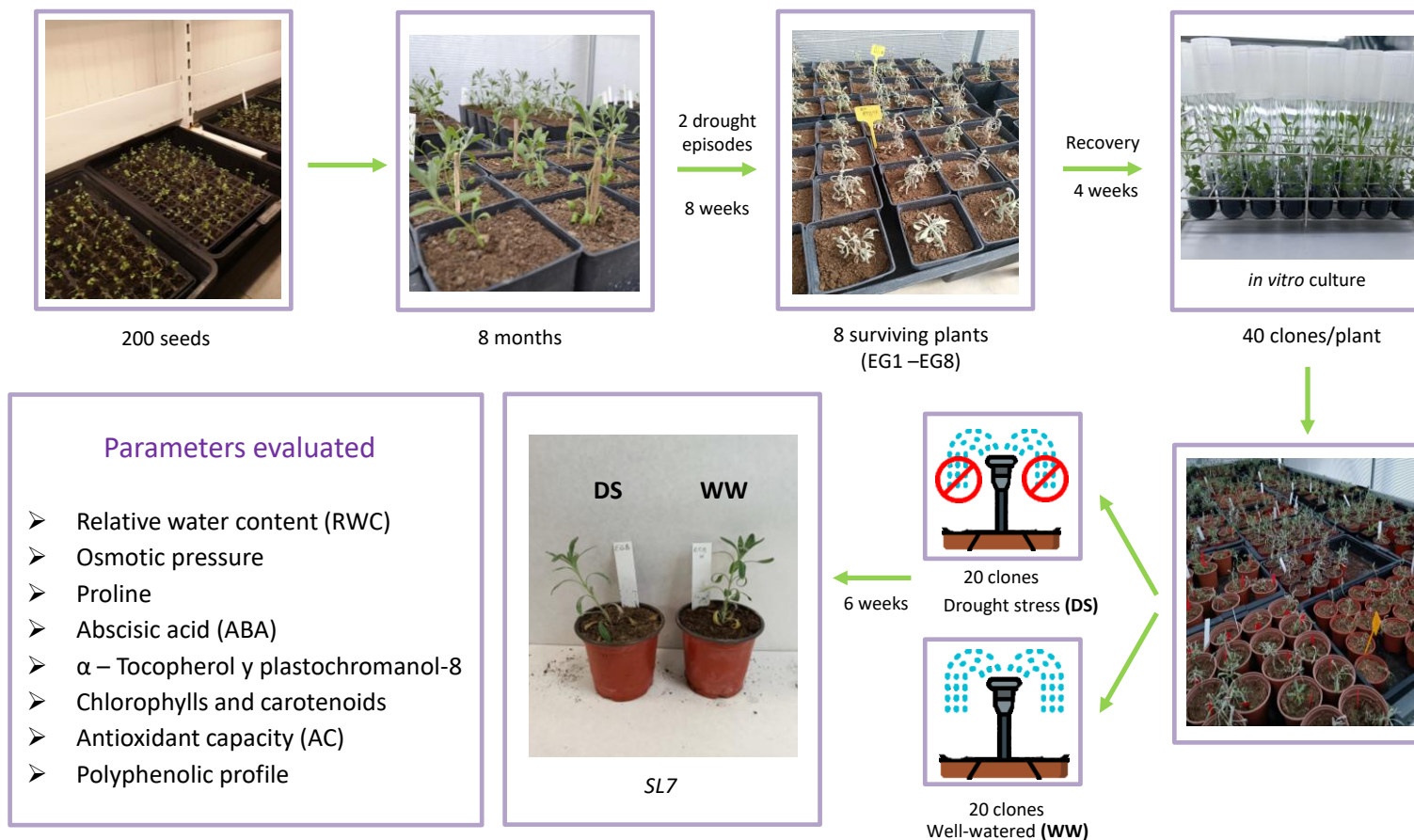


Figure 4-1 Graphical abstract of Experiment 1

4.2.1 Plant growth material and experimental design

Seeds were obtained from commercial *L. latifolia* crops established in the northwest of the Region of Murcia, Spain. A total of 200 seeds were germinated and healthy seedlings were transferred to individual pots with approximately 0.3 L of a mixture of peat and perlite, and were grown in a greenhouse for 8 months (from July to February).

The plants underwent two cycles of drought stress in order to preselect sufficient seedlings. The first cycle consisted of withholding water for 8 weeks, followed by a recovery period of irrigation for 4 weeks. The surviving plants were subjected to a second cycle of water deprivation for 6 more weeks. After the final stage of the experiment, eight plants survived (referred to as SL1 to SL8), which were rehydrated so that they could be propagated to obtain clones.

Nodal segments from SL1 to SL8 were micropropagated according to the protocol established by Cáceres-Cevallos et al. (2021) [122]. After root formation, the plants were placed in pots and grown in a greenhouse for 2 months. Subsequently, the clones of each plant were assigned randomly to two homogeneous groups of 20 plants. One group was subjected to drought by stopping the water supply, while the other group acted as a control and was watered regularly to field capacity (60% soil moisture content, measured by sensors connected to a Qbic-Qampo data logger).

The experiment was carried out from December to February (8 weeks) in a greenhouse in which the range of the temperature in those months was 10-18°C (day) and 12-16°C (night), the relative air humidity was 60 ± 5%, and the photoperiod was 12 h. Once the experiment had ended, all the plants were harvested, frozen at -80°C, and freeze-dried until their corresponding analysis.

4.2.2 Statistical analysis

The data are shown as the average ± SE. The data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), verifying homoscedasticity previously by Levene's test. Fisher's LSD test was used to compare means at $p < 0.05$. Correlations were measured by Pearson's correlation coefficients.

All statistical analyses were performed using the software STATGRAPHICS Centurion XVI.I.

4.3 Results and discussion

4.3.1 Physiological parameters

Even though spike lavender is a rainfed crop, the effects of drought stress on its physiological behavior were evident and, as expected, there were intraspecific differences among the

responses of the plants. The drought episode generated a significant alteration in most of the parameters under study (Fig 4-2). Similar findings were reported for plants of other species belonging to the *Lamiaceae* family growing under drought conditions [145,172,195,222,311,312]. In line with these authors, Khodadadi et al. (2022) [234] recently demonstrated that drought also had a detrimental effect not only on growth but also on the essential oil yield. and biomass production

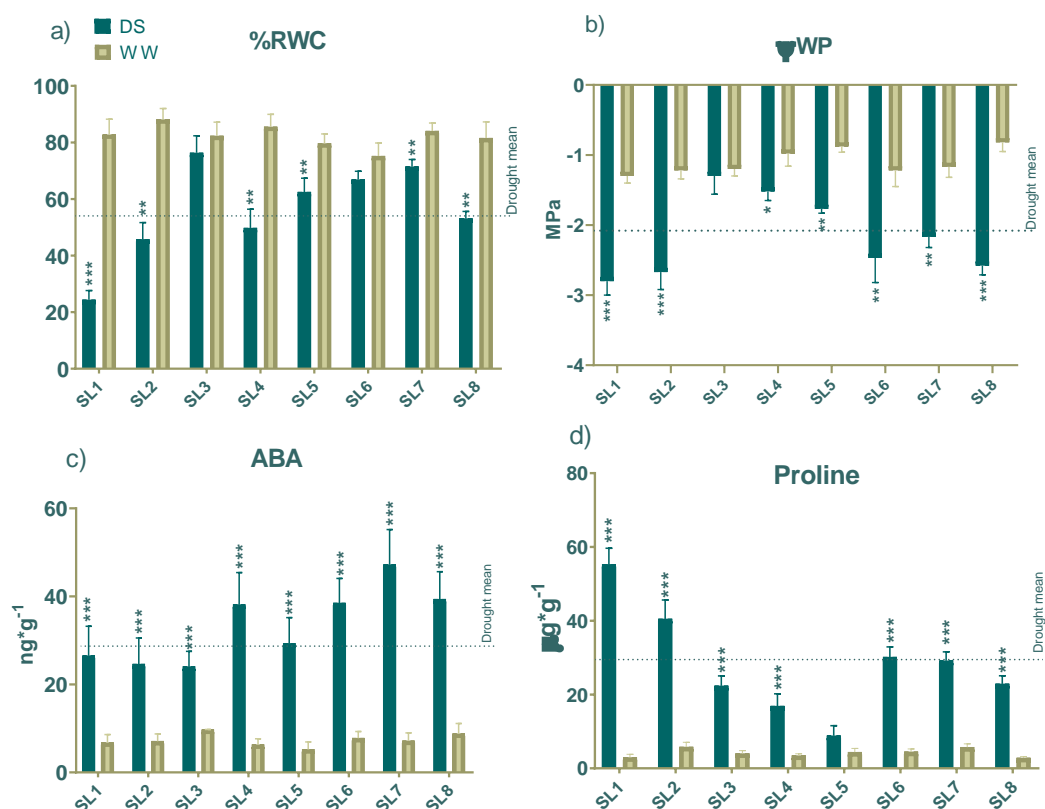


Figure 4-2. a) %RWC, b) ψ_{WP} , c) ABA, and d) proline in spike lavender, in response to the drought (DS) and well-watered (WW) treatments. The results are expressed as the mean \pm SD. Asterisks denote significant differences between the treatments (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, and *** $p<0.001$)

4.3.1.1 Physiological parameters

As can be observed in Figure 4-2. a, the mean values of %RWC in the ecotypes under the drought and watering regimen conditions were $56.3 \pm 16.75\%$ and $82.4 \pm 3.45\%$, respectively. However, some ecotypes showed (under drought episode) above-average %RWC values; for example, those of SL3, SL7, SL6, and SL5 were 35.6%, 26.9%, 18.9%, and 11% higher, respectively. Interestingly, the %RWC of ecotypes SL3 and SL6 did not significantly decrease under the drought treatment, suggesting an efficient adaptation to water scarcity. In this regard, plants with a higher leaf water content may be less affected by drought and maintain their normal functions [313]; thus, %RWC

determination is an easy way to determine the plant status in relation to soil moisture [312]. On the contrary, the ecotype with the lowest %RWC was SL1, its value under drought being significantly different from that of the watering treatment ($p < 0.001$).

Water availability may affect the turgidity of the plant, with drought causing a reduction of leaf water potential (ψ_{WP}) and of the turgor of cells, affecting their normal functioning [216]. According to Lamacque et al. (2020) [314], branches of lavender species exposed to drought had severe damages with very low values of ψ_{WP} . As expected, the main ψ_{WP} was significantly lower (-2.2 ± 0.57 MPa) under drought stress than under well-watered conditions (-1.1 ± 0.18 MPa) (Fig. 4-2.b). These results are similar to those of previous studies of plants belonging to the *Lamiaceae* family [222,315–318]. Interestingly, the SL3 plants showed the highest ψ_{WP} value under drought and this value did not vary significantly with respect to the well-watered conditions, suggesting that it may be related to drought resistance and osmotic adjustment [160]. By contrast, SL1 was the ecotype with the lowest value (-2.8 ± 0.20 MPa).

4.3.1.2 Abscisic acid

The concentrations of ABA determined in the ecotypes under study are shown in Figure 4-2c. They were significantly increased in plants under drought stress ($p < 0.001$) when compared to the corresponding values for the watering regime. This is in accordance with the role of ABA in drought responses, since it induces stomatal closure, thus limiting water loss through transpiration [224]. As a consequence of the intraspecific variability, the ABA concentration varied depending on the ecotype studied. Accordingly, ecotype SL7 had the highest production of ABA (47.2 ± 7.97 ng/g FW), followed by SL8, SL6, and SL4, which reached concentrations above the drought average (32.3 ± 7.90 ng/g FW), being 41.2%, 17.6%, 15%, and 14% higher, respectively. Caser et al. (2019) [222], in *Salvia dolomítica*, and Ahmadi et al. (2019)[296], in *Melissa officinalis* L., reported similar results in these *Lamiaceae* species, since drought also provoked a significant increase in the synthesis of ABA in the plants. Importantly, the ecotype SL3 had the lowest ABA concentration (24.1 ± 3.45 ng/g FW), indicating higher adaptability to drought through improved ABA signaling, thus avoiding over-accumulation of ABA, which is produced and accumulated in guard cells to induce stomatal closure, thereby reducing leaf water loss [228].

4.3.1.3 Proline

During the stress response, plants increase the production of some metabolites such as proline to limit water potential and maintain cell turgor, a process known as osmotic adjustment [153],

which is activated when soil water potential decreases [312]. Additionally, this osmolyte could protect cellular structures, stabilize proteins, and reduce acidity in cells [158,298]. Because of this, proline synthesis increased significantly in most of the ecotypes under drought stress except for SL5 (Fig. 4-2.d), which did not show statistical differences between the drought and well-watered regimes, although it was slightly higher in the drought treatment. Actually, SL5 was the ecotype with the lowest production of proline ($8.8 \pm 2.73 \mu\text{g/g DW}$), being 68.7% lower than the drought average ($22.3 \pm 14.42 \mu\text{g/g DW}$), while SL1 had the highest accumulation ($55.3 \pm 4.35 \mu\text{g/g DW}$). In accordance with our results, previous studies also have found an increment in proline under drought conditions in members of the Lamiaceae [187,195,312], although Szekely-Varga et al. (2020) [172] did not find any increase in proline under drought stress in two commercial varieties of *Lavandula angustifolia*.

Despite proline being negatively correlated with %RWC, when considering all the ecotypes together (%RWC, $R = -0.797$, $p < 0.001$), SL3 was the ecotype with the highest RWC and ψ_{WP} but not with the lowest content in proline under drought. According to Ghosh et al. (2021)[319], other osmolytes, such as glycine-betaine, could be accumulated under drought stress to produce an osmotic adjustment, which could explain the behavior of this ecotype.

4.3.2 Non-enzymatic antioxidant system and malondialdehyde production

4.3.2.1 α -Tocopherol and plastochromanol-8

To measure the non-enzymatic antioxidant system response, two important antioxidant molecules - α -tocopherol and plastochromanol-8 (PC-8)- were estimated together with their effects on lipid peroxidation. The ANOVA (Table 4-1) shows significant differences among the ecotypes for all the parameters measured. The treatments did not induce any significant effect on α -tocopherol or PC-8, while, in most cases, MDA was increased significantly in the drought treatment (Fig 4-3.c). On the contrary, the significant ecotype-treatment interaction indicates that the production of α -tocopherol, PC-8, and MDA under drought varied with the ecotype.

Table 4-1 Analysis of variance (ANOVA) of α -tocopherol, plastochromanol-8 (PC-8), and malondialdehyde (MDA) in eight spike lavender ecotypes under drought and well-watered conditions, and the ecotype-treatment interaction. **, and *** indicate no significance or significant at $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively.

Source of variation	df	Mean square		
		α -Tocopherol	PC-8	MDA
Ecotypes under drought (from SL1 to SL8)	7	47235.3***	489.4***	18.8***
Treatments (drought vs. watered)	1	4495.6	0.7	75.2***
Ecotype x Treatment	9	18325.2**	398.7***	9.0**

Even though thylakoids membranes are enriched with α -toc to scavenge and quench some ROS, which is produced during photosynthesis and increases greatly upon drought stress [174,207], our findings suggest that a specific drought response was induced in each ecotype in relation to α -toc and PC-8. Indeed, SL7 and SL8 were the ecotypes in which these lipophilic antioxidants increased significantly under drought, rising to values approximately 1.5-fold higher than under well-watered conditions (Fig 4-3. a, b), while SL2 and SL3 had the lowest production of α -toc and PC-8.

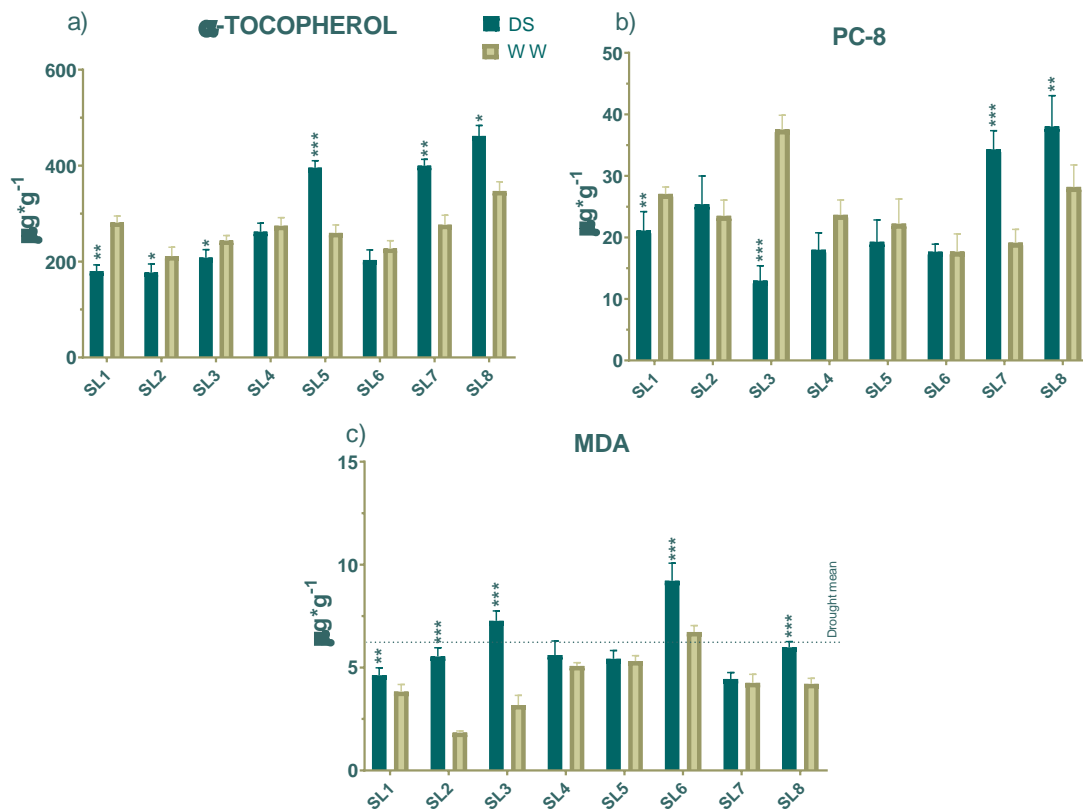


Figure 4-3. Synthesis of a) α -toc, b) PC-8, and c) MDA in spike lavender in response to the drought (DS) and well-watered (WW) treatments. The results are expressed as the mean \pm SD. Asterisks denote significant differences between the drought and well-watered treatments (* p < 0.05, ** p < 0.01, and *** p < 0.001)

In the case of PC-8, our findings agree with those reported by Casadesús et al. (2020)[320], who did not find a significant difference regarding PC-8 between drought-stressed and well-watered plants. In fact, how the synthesis of PC-8 could be altered during drought stress is still poorly understood but it is extensively recognized as a powerful antioxidant [205,208,210,321,322].

In addition, considering all the ecotypes together, there was a moderate correlation between the synthesis of α -tocopherol and that of PC-8 (p < 0.01, R = 0.68). Fleta-Soriano and Munné-Bosch (2017)[323] reported that it is still to be determined whether the accumulation and synthesis of

these two compounds are independent or if they could have a synergistic effect as antioxidants, though they pointed out that this could be regulated by ABA. However, our results do not show any significant correlation between ABA and α -tocopherol or PC-8.

4.3.2.2 Lipid peroxidation (MDA)

Under drought stress, membrane lipid peroxidation occurs due to an excessive accumulation of ROS, MDA increasing as a degradation product of chloroplast damage; hence, MDA can be considered as an oxidative stress indicator in plants [187,324]. Our results show that the lipid peroxidation was statistically higher ($p < 0.05$) in almost all the ecotypes subjected to the lack of water. Importantly, SL7 and SL1 had the lowest lipid peroxidation values (Fig 4-2. c) and SL7 did not even show a statistical difference from the well-watered clones, which may be related to a higher production of α -toc and PC-8 in this ecotype. Furthermore, SL6 was the ecotype in which MDA increased most, to $9.2 \pm 0.85 \mu\text{g/g DW}$, exceeding the drought average. These findings are similar to those reported by several authors in studies of the effects of drought stress on plants belonging to the *Lamiaceae* Family [187,325,326], enabling us to conclude that, despite the fact that spike lavender is a rainfed plant, the stress produced by a lack of water was evident.

4.3.3 Photosynthetic pigments

Photosynthetic pigments were measured in all the ecotypes to evaluate the effects of drought on the chloroplast function (Table 4-2). Overall, our results show that drought stress reduced the levels of Chl-*a*, Chl-*b*, Chl *T*, and *Car*.

Even though the average of Chl *T* and *Car* were reduced under drought in most ecotypes, SL7 did not show any significant decrease from well-watered conditions, thus suffering the lowest degradation of pigments. Osmolovskaya et al. (2018)[156] pointed out that a decrease in chlorophyll content may be related to photo-oxidative damage, causing the degradation of chlorophyll due to several processes, such as the deactivation of chlorophyllase enzyme, pigment-protein complexes disruption, and reduction of gene expression, as well as the altered regulation of some transcription factors [234], underlining the importance of having a competent antioxidant system defense to respond to different stress situations. Indeed, Fang and Xiong (2015) [158] highlighted that adequate protection of the chloroplasts, so that light energy is used more efficiently, may be related to drought resistance. Accordingly, our findings suggest that

higher production of α -toc and PC-8 in SL7 could influence chloroplast protection, and there was even a moderately significant correlation of Chl T with PC-8 ($p < 0.01$; $R = 0.6$).

Table 4-1 Effects of the drought treatment on the chlorophyll and carotenoid contents of leaves of eight spike lavender ecotypes. The results are expressed as the mean \pm SD. Asterisks denote significant differences between the drought and watered treatments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$)

Ecotype	Treatment	Chl-a (mg/g DW)	Chl-b (mg/g DW)	Chl T (mg/g DW)	Car (mg/g DW)
SL1	Drought	3.1 \pm 0.22	2.0 \pm 0.20**	4.6 \pm 0.64	0.6 \pm 0.09***
	Watered	3.2 \pm 0.20	1.2 \pm 0.07	4.4 \pm 0.29	0.9 \pm 0.08
SL2	Drought	3.5 \pm 0.33**	1.7 \pm 0.17***	5.3 \pm 0.50***	0.8 \pm 0.11***
	Watered	6.7 \pm 0.27	2.5 \pm 0.15	9.1 \pm 0.40	1.3 \pm 0.09
SL3	Drought	2.1 \pm 0.21*	1.1 \pm 0.18*	3.2 \pm 0.39*	0.5 \pm 0.03**
	Watered	4.6 \pm 0.11	1.7 \pm 0.07	6.3 \pm 0.18	0.9 \pm 0.02
SL4	Drought	3.2 \pm 0.17	1.4 \pm 0.16	4.6 \pm 0.43	0.8 \pm 0.04
	Watered	3.2 \pm 0.18	1.2 \pm 0.14	4.5 \pm 0.30	0.8 \pm 0.05
SL5	Drought	2.2 \pm 0.23*	1.1 \pm 0.15	3.3 \pm 0.38*	0.5 \pm 0.03*
	Watered	3.1 \pm 0.15	1.3 \pm 0.07	4.4 \pm 0.22	0.8 \pm 0.04
SL6	Drought	3.2 \pm 0.37	1.2 \pm 0.28	4.6 \pm 0.59	0.7 \pm 0.08**
	Watered	3.4 \pm 0.28	1.4 \pm 0.18	4.5 \pm 0.34	0.8 \pm 0.08
SL7	Drought	3.8 \pm 0.34	1.4 \pm 0.16	5.4 \pm 0.24	1.0 \pm 0.17
	Watered	3.9 \pm 0.26	1.5 \pm 0.14	5.3 \pm 0.32	1.0 \pm 0.08
SL8	Drought	3.2 \pm 0.36*	1.6 \pm 0.22	4.7 \pm 0.43	0.7 \pm 0.14*
	Watered	3.9 \pm 0.18	1.5 \pm 0.13	5.2 \pm 0.44	0.9 \pm 0.09

In contrast, SL3 showed a significant decrease in photosynthetic pigments under drought conditions, with the lowest levels among the ecotypes, indicating diminished chloroplast function. In line with this, other researchers have also reported decreased pigment levels under drought conditions in some species of the *Lamiaceae* family, such as sage [222,234,327] and lemon balm [178], whereas Emrahi et al. (2021) [328] reported an improvement of Chl-a, Chl-b, and car in oregano due to a lack of water.

To evaluate the relationships among pigments in the plants exposed to the drought treatment, correlation coefficients were measured, finding a significant correlation between Chl-a and Car ($p < 0.01$; $R = 0.7$). Car have two major functions: to provide photoprotection and to collect energy and pass it to chlorophylls [329], even though chlorophylls, like α -toc, can quench oxygen singlets to control ROS accumulation [174]. In this regard, the data provided in Table 4-2 show that the ecotypes SL3 and SL5, which suffered a loss of Chl-a, probably used more Car to preserve the stability of the chloroplast, although SL5 showed a lower production of MDA than SL3.

4.3.4 Phenolic profile and antioxidant activity

Aromatic-medicinal plants are known to be an important source of phenolic compounds with a commercial interest, whose metabolism depends on environmental conditions. For instance, under drought stress, plants may produce polyphenols to scavenge ROS, whose accumulation increases in such conditions [222]. To our knowledge, no studies have been published so far concerning phenolic compounds in extracts of spike lavender plants in the early stages of growth. Hence, our results have been compared with those of adult plants belonging to the Lamiaceae.

The HPLC-DAD-ESI/MS analysis allowed the identification and quantification of seven polyphenolic components (Table 4-3) previously described in other shrub species belonging to the *Lamiaceae* family [330,331], with the exception of salvianic acid and *O*-coumaric acid, which are described for the first time in *Lavandula latifolia*. Even though rosmarinic acid was the major component quantified previously in adult plants of different species of the genus *Lavandula* [330], *p*-coumaric acid glycoside and rosmarinic acid-3-*O*-glucoside were the major phenolic compounds quantified in our immature plants.

In relation to the effect of the lack of water on the phenolic profile, according to the results shown in Table 4-3, a generalized pattern cannot be described; rather, the response varied among the ecotypes (intraspecific variability). In this regard, water scarcity caused a significant reduction in salvianic acid and the three forms of rosmarinic acid in the ecotype SL1, leading to a decrease in the antioxidant capacity of its extracts regarding the radical scavenging activity against DPPH. In contrast, a significant increment of these three rosmarinic acid forms was observed in SL2, with a consequent increase in the antiradical activity. It is also interesting to mention the case of SL5, in which the concentrations of rosmarinic acid derivate and rosmarinic acid-3-*O*-glucoside increased under drought stress, while a considerable reduction in salvianic acid and rosmarinic acid and an increment in the ferric reducing antioxidant power (FRAP) were detected. In the ecotypes SL4, SL6, and SL8, changes in the quantitative phenolic profile also occurred, with a decrement in the levels of some phenolic compounds including salvianic acid, rosmarinic acid, and ferulic acid-hexoside. However, this just supposed a slight decline in the antioxidant capacity of their extracts after water stress.

Table 4-2 Effects of the drought treatment on the polyphenolic profile and antioxidant activity of eight spike lavender ecotypes. The results are expressed as the mean ± SD. Asterisks denote significant differences between the drought and watered treatments (*p <0.05, **p<0.01, and ***p<0.001)

Ecotype	Treatment	Polyphenolic profile (mg of polyphenol/g DW)							Antioxidant activity	
		Salvianic acid	Rosmarinic acid derivative	p-coumaric acid glycoside	Ferulic acid hexoside	Rosmarinic acid-3-O-glucoside	o-coumaric acid	Rosmarinic acid	DPPH (μmol TEAC/g)	FRAP (μmol Fe ²⁺ /g)
SL1	Drought	0.3± 0.06**	0.4± 0.09**	47.7± 6.22	1.9± 0.37	7.2± 0.70**	0.6± 0.13	4.0± 0.83**	79.5± 8.11**	147.4± 12.14
	Watered	0.7± 0.05	0.6± 0.13	41.6 ± 2.61	2.1± 0.18	10.6± 1.91	0.6± 0.16	7.1± 0.80	97.4± 3.07	164.3± 10.29
SL2	Drought	0.3± 0.05*	0.5± 0.11*	51.6± 2.31***	2.3± 0.10**	7.2± 0.34*	1.0± 0.41**	3.6± 0.79***	75.4± 10.31**	74.4± 3.24*
	Watered	0.3± 0.04	0.3± 0.06	77.3± 3.05	3.6± 0.27	1.9± 0.60	2.5± 0.40	1.5± 0.19	45.9± 7.75	51.8± 7.83
SL3	Drought	0.5± 0.04	0.1± 0.02***	35.2± 1.73*	0.3± 0.06**	5.6± 0.55	1.0± 0.22**	4.1± 0.60**	105.0± 8.15***	127.4± 8.56*
	Watered	0.5± 0.08	0.4± 0.05	79.9± 0.48	3.2± 0.14	4.5± 0.53	2.1± 0.42	2.0± 0.03	46.6± 9.62	101.8± 13.57
SL4	Drought	0.4± 0.04**	0.5± 0.06	47.7± 3.17	2.7± 0.22*	12.8± 2.00	1.9± 0.54	3.5± 0.66**	104.7± 9.40	153.1± 17.91
	Watered	0.6± 0.05	0.4± 0.10	45.1± 2.74	3.8± 0.48	10.2± 2.29	1.1± 0.40	5.1± 0.22	103.2± 8.01	114.1 ± 13.02
SL5	Drought	0.4± 0.05*	0.3± 0.04*	31.0± 1.83	1.1± 0.12*	12.1± 1.25**	0.6± 0.09**	3.7± 0.46*	129.6± 4.85	203.5 ± 15.05**
	Watered	0.7± 0.07	0.2± 0.01	34.0± 2.18	1.6± 0.03	6.8± 0.55	1.2± 0.07	6.4± 0.77	122.7± 5.72	128.7± 26.89
SL6	Drought	0.3± 0.03**	0.3± 0.03	47.4 ± 2.92	2.5± 0.20	6.5± 0.88**	2.2± 0.54	4.5± 0.51	88.5± 5.26**	100.9± 7.41
	Watered	0.4± 0.03	0.4± 0.05	50.6± 2.07	2.8± 0.26	2.5± 0.19	2.6± 0.50	4.1± 0.22	71.3± 7.14	82.3± 11.52
SL7	Drought	0.5± 0.05	0.2± 0.02	44.9 ± 2.95*	2.0± 0.18	12.7± 1.92	1.2± 0.44**	4.4± 0.25***	103.9± 10.57	134.2± 14.84
	Watered	0.5± 0.05	0.2± 0.05	40.0± 2.84	2.0± 0.22	11.6 ± 0.92	2.2± 0.25	2.9± 0.28	110.7± 4.70	129.9± 9.56
SL8	Drought	0.4± 0.07**	0.3± 0.09	54.2 ± 2.03	1.9± 0.22	8.5± 1.71	1.6± 0.37	4.7± 0.49*	98.3± 12.52**	107.9± 10.36***
	Watered	0.8± 0.08	0.4± 0.05	51.2± 3.62	2.1± 0.20	9.5± 1.87	1.9± 0.27	5.7± 0.75	147.4± 9.54	173.1± 9.64

Overall, it is widely believed that plants grown under drought conditions produce higher concentrations of polyphenols that protect them against ROS and prevent damage to the photosynthetic apparatus [332]. The main reason for this drought-induced accumulation of phenolic compounds is the modulation of the phenylpropanoid biosynthetic pathway. Drought regulates many key genes encoding the main enzymes of this pathway, which stimulates the biosynthesis of phenolic compounds [151]. However, our results point to a reduction in the concentration of some phenolic components with the drought stress. This assertion was also made by Albergaria et al. (2020)[333], who, after a deep review of the effect of drought stress on the levels of phenolic compounds in aromatic-medicinal plants, concluded that polyphenols may experience either a decrease or no change in concentration after a severe drought episode. In line with this, and more specifically related to plants belonging to the *Lamiaceae* family, Caser et al. 2019 [222] reported for *Salvia dolomitica* Codd a significant decrease in the total phenol and flavonoid levels after 31 days of severe lack of water. Such a decrease was also described by Khosh-Khui et al. (2012) [334] in thyme after applying irrigation intervals of 2, 4, 6, 8, and 10 days for approximately six months. Regarding sage, Bettaieb et al. (2011) [219] observed a decrease in *p*-coumaric acid under severe water stress, arguing that the production of enzymes involved in phenolic production could be deactivated by the lack of water. Nonetheless, Figueroa-Pérez et al. (2014) [335] suggested that water stress has an important effect on the production of phenolic compounds in peppermint plants, which is reflected in an increased *in vitro* antioxidant capacity.

As has been stated in the above paragraphs, in the scientific literature conflicting results have been reported in relation to the effect of lack of water and osmoregulation on the polyphenolic profile, depending on the type and intensity of the stress applied as well as the species. The species used in our case study, *L. latifolia*, is a xerophytic (rainfed crop) plant and, according to Varela et al. (2016) [180], in these plants, phenolic compounds are an important feature within the mechanisms employed to avoid oxidative stress, and could be used as an indicator of water deficit tolerance. Thus, returning to the results shown in Table 4-3, SL2 and SL3 were the ecotypes in which an increment in DPPH• and FRAP activity was measured under drought. In these ecotypes, a statistically significant increment in rosmarinic acid was also quantified, relative to the corresponding values in well-watered plants. This phenolic acid is considered one of the major polyphenols involved in the antioxidant potential of *L. latifolia* [330]. On the basis of these results, and just taking into account the quantitative profile and the antioxidant capacities of the extracts of plants grown under severe drought conditions, SL2 and SL3 could be postulated as ecotypes with greater tolerance of water stress.

4.4 Conclusions

In the current study, the response of immature spike lavender (*Lavandula latifolia*) plants to drought has been assessed for the first time. The results concerning physiological parameters and the response of the antioxidant defense systems were ecotype-specific. In this sense, not all the ecotypes that exhibited lower losses of water status also showed less oxidative damage. Nevertheless, the results concerning the phenolic profile, in relation to the antioxidant activity, and the physiological responses could be used to identify individuals with desirable traits that can grow in adverse conditions and overcome sceneries with a lack of water. This could be the case of ecotypes SL3 and SL5, where no significant losses of relative water content and water potential were observed, with a slight increase in ABA and proline. The plants of both these ecotypes showed low levels of oxidative damage together with an increase in the production of α -tocopherol and phenolic compounds such as rosmarinic acid, with a high antioxidant capacity. These results are of the utmost importance for the establishment of breeding programs for *L. latifolia*.

Capítulo 5 Agronomic Evaluation and Chemical
Characterization of *Lavandula latifolia* Medik.
under the Semiarid Conditions of the Spanish
Southeast

Results and discussion concerning this current experiment have been accepted for publication in **Agronomic Evaluation and Chemical Characterization of *Lavandula latifolia* Medik. under the Semiarid Conditions of the Spanish Southeast** in *plants*, by 15 may 2023. DOI: [10.3390/plants12101986](https://doi.org/10.3390/plants12101986). (Annex 2)

5.1 Introduction

Selecting and evaluating drought-resistant aromatic-medicinal plants (AMP) that can maintain growth and optimal agronomical yield in essential oils (EOs) under the imminent climate change is a work of great importance [292]. In this sense, previous breeding works performed by the authors allowed for the obtaining of drought-resistant spike lavender in early stages [212] that could be considered to analyze their EOs yield and quality in Mediterranean semiarid field conditions.

Within the *Lamiaceae* family, *Lavandula latifolia*, also known as spike lavender, is an aromatic shrub that grows wild in large areas of the Mediterranean region where the climate is warmer [307]. In fact, the edaphoclimatic conditions of the Spanish southeast have allowed for the establishment of extensive cultivated areas of this species, especially in regions such as Cuenca, Guadalajara, Albacete, and Murcia [336].

Lavandula latifolia is a commercially interesting AMP because its EOs have a high richness of monoterpenes, mainly linalool, 1,8-cineole, and camphor [337], for instance. EOs with lower levels in 1,8-cineole and camphor but higher levels of linalool are highly valued in the pharmaceutical and cosmetic industries [17]. Nonetheless, as normal in AMP, the edaphoclimatic conditions and plant genotype can affect the content of secondary metabolites in EOs [187].

In agreement with this, Fernández-Sestelo and Carrillo [17] mentioned that the EOs yield of *L. latifolia* is influenced by the climate conditions, showing higher yields in rainy areas; furthermore, Herraiz-Peñalver et al. [106] revealed that the chemical composition of EOs varied depending on the geographical situation, showing a similar composition in Spanish wild populations with identical edaphoclimatic conditions. In consonance with this, the soil composition may induce different molecule production secreted by microorganisms that regulate and stimulate the production of EOs in AMP [338]. In addition, EOs in lavender plants may vary among plant parts and seasonal stages [339].

Some researches on other plants belonging to the *Lamiaceae* family [305,340–343] showed that EO composition and yield are determined by growth stages, environmental conditions, and

genotype, being necessary to evaluate the plants according to their climatic conditions to ensure high yield and stable crops during cultivation.

Jordán et al. [50] described that the extraction process of EOs generates a residue that is considered an important natural source of antioxidants; indeed, some authors mentioned that these plant extracts have diverse biological activities that depend on the main phenolic content in them [130,344,345]. Accordingly, the analysis of phenolic extracts of *Lavandula latifolia* may provide an innovative source of natural phenolic compounds.

Dobros et al. [330] suggested that phenolic extracts of flowers of some lavender species contain several phenols, such as flavonoids, hydroxybenzoic acids and hydroxycinnamic acids, including rosmarinic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, cinnamic acid, salvianolic acid, apigenin, and luteolin glycosides, among others. These phenolic compounds are considered important metabolites with several applications due to their biological activity. Specifically, the richness in phenolic compounds in extracts has shown a significant correlation with their antioxidant capacities [346,347]. Although *L. latifolia* has been shown considerable economic interest for several applications in countless important industries, breeding information as well as the evaluation of agronomical behavior growing in field conditions over time is still poorly known.

The importance of this study consists in the fact that in AMP, both agronomical and ecological conditions can improve the biomass and their EOs yield per hectare [348]. At the same time, for future crop establishment, knowledge regarding to the agronomical behavior and EOs quality of different AMP accessions over time may be useful for the selection of ecotypes [343]. In line with the above, and on the basis of the fact that information regarding the stability and growth of *L. latifolia* drought-resistant plants over time could be a useful tool to enhance the production and yield of this important crop, the main objective of the present study was to evaluate biomass production, essential oil yield and quality, and richness of phenolic compounds from extracts of pre-selected spike lavender ecotypes over three consecutive years of cultivation practices.

5.2 Materials and methods

The methodology used in this experiment is represented in a graphical abstract (Figure 5-1)

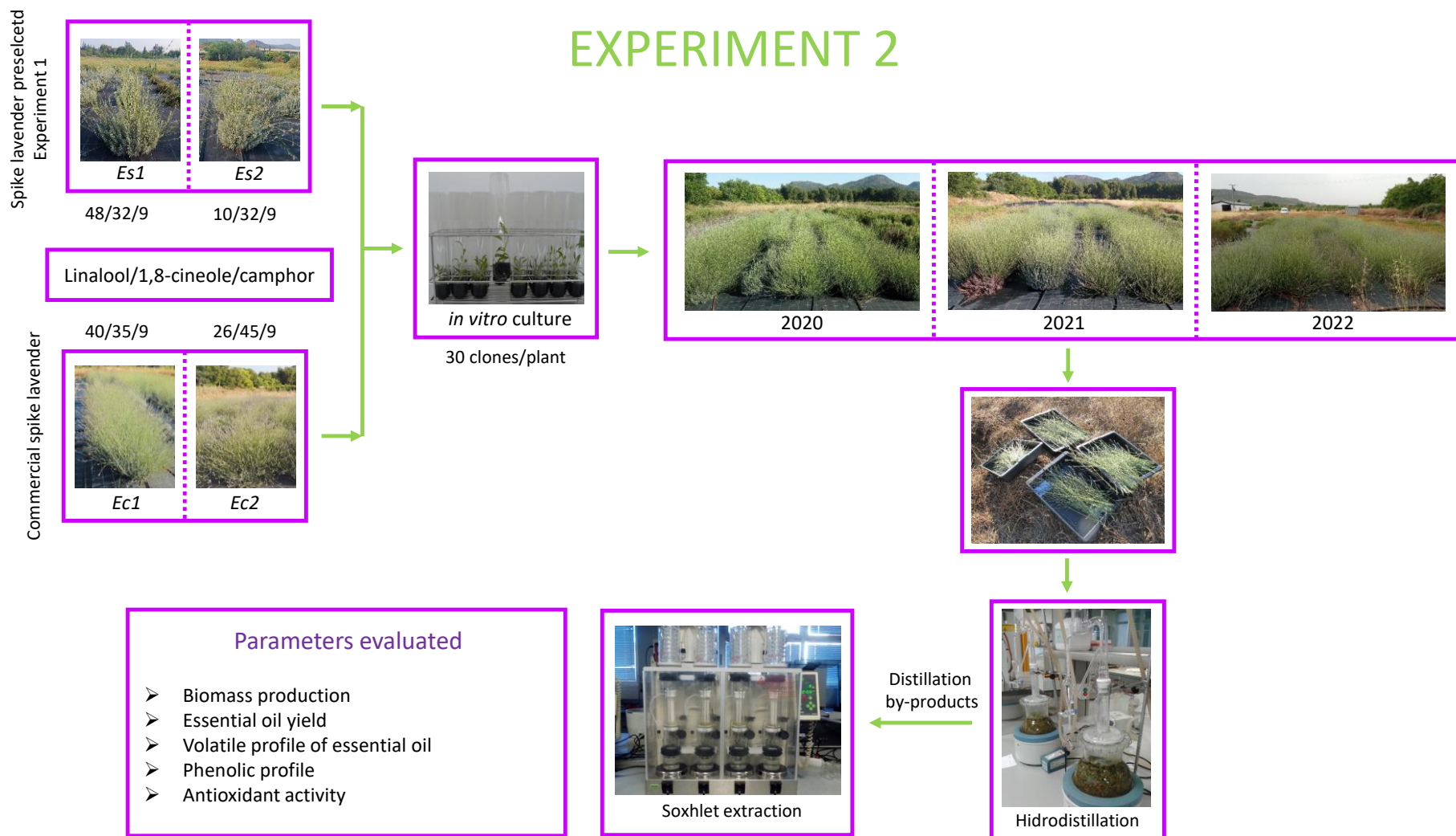


Figure 5-1. Graphical abstract from Experiment 2

5.2.1 Crop Experimental Design and Plant Material

The present study was carried out in an experimental area of IMIDA at “Chaparral” (38°06’39.6” N 1°40’50.0” W, and 400 m above sea level) in Murcia (Spain). Soil conditions in the first 30 cm of the cultivation area can be defined as clay loam (silt (38%), sand (30%), and clay (33%)), with an alkaline pH (8.07), a percentage of soil saturation of 36%, and electrical conductivity of 0.85 dS/m. This experimental area has semiarid climatic conditions, as shown in Figure 5-2, in relation to the monthly average rainfall, temperature, and evapotranspiration throughout this experiment.

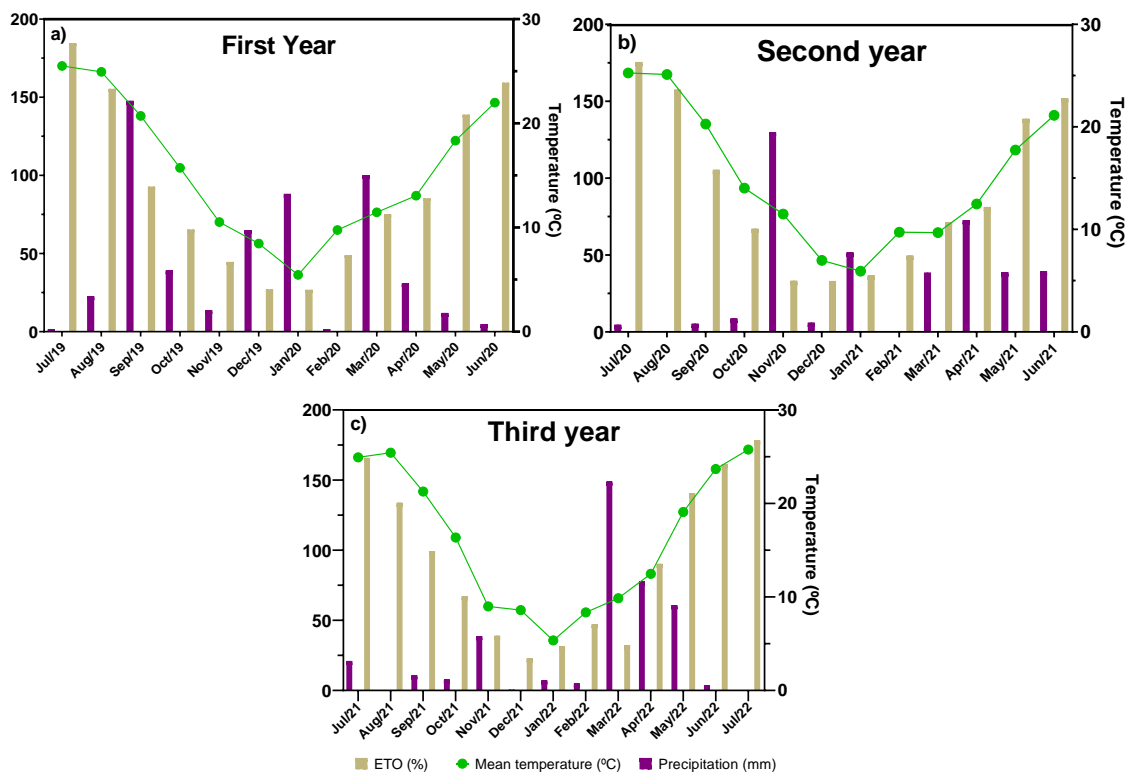


Figure 5-2 Climatic data of the experimental area of the first-, second-, and third-year crop ((a, b, c), respectively).

An assay with three randomized blocks and ten experimental replications per ecotype and block was designed. Each replication area has 10 m², with a planting distance of 0.5 × 1 m, making a total of 120 plants, with a density of 200 plants/100 m².

The plant material used as control (Ec1 and Ec2) was obtained from a local AMP producer. In this case, two individual plants were chosen on the basis of their essential oil yield and chemotype composition. The other two ecotypes (Es1 and Es2) came from the IMIDA germplasm bank, previously selected as drought-resistant plants [212]. Those ecotypes are shown in Table 5-1.

Table 5-1. Essential oil yield and chemotype definition of the four ecotypes under study

	Ec1	Ec2	Es1	Es2
Essential oil yield (%)	3.0	2.2	2.3	2.9
Chemotype	linalool/1,8-cineole/camphor			
Relative concentration (%)	48/32/9	10/46/9	40/35/9	26/45/9

The plants under this study were micropropagated by *in vitro* culture following the protocol described by Cáceres-Cevallos et al. [122]. A total of 30 clones of each ecotype were multiplied. Later, all plantlets were acclimatized and placed in greenhouse conditions for three months until transplanting to the experimental area in April 2019.

Spike lavender is an undemanding crop in nutrients, and therefore just a base dressing was applied at pre-planting. Weed control from the first year of planting was controlled mechanically between rows while manually on the rows.

To evaluate agronomical production and essential oil yield and quality over three years of cultivation, three consecutive harvests were made during the summers of 2020, 2021, and 2022, when the plant material showed a phenological stage of full blooms and the beginning of fructification (which occurred in July, in the third week in 2020 and in the second week in 2021 and 2022). The fresh plant material (FW) was weighed immediately after harvesting, and a sample of 3 kg was kept for the determination of dry matter production. For this purpose, the plant material was dried in a forced-air dryer at 35 °C for 48 h, until it reached a constant weight. The dry matter obtained per 100 m² of cultivation area was determined by extrapolation of the dry matter weight of 3 kg of fresh plant material to the total production in 100 m² of cultivation area [125].

Before essential oil extraction, floral stems from four clones per ecotype and block were dried in a forced-air dryer at 35 °C for 48 h, until they reached a constant weight.

5.2.2 Essential oil extraction

EOs were extracted according to the protocol described by the European Pharmacopoeia [349]. Shortly, the dry floral stems of four clones per ecotype and block were subjected to hydrodistillation for 3 h using a Clevenger-type system. The oil obtained was dried with anhydrous sodium sulphate and stored in amber vials at -20 °C until chromatographic analysis. The percentage yield of EOs was calculated as volume (milliliters) of essential oil per 100 g of distilled floral stems. Essential oil yield expressed as l/ha was calculated considering the weight per plant, the percentage of essential oil, and the density of plantation.

5.2.3 Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS)

For the quantitative and qualitative analysis of the volatile profile of the EOs, a method proposed by Jordán et al. [305] was used. Shortly, the EOs samples (0.1 µL) were subjected to analysis by GC-MS. A 6890 N gas chromatograph (GC) (Palo Alto, CA, USA) equipped with a 30 m x 0.25 mm i.d. HP-5 (5% cross-linked phenyl-methyl siloxane) column with 0.25 µm film thickness was used. The stationary phase was supplied by Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). Helium was used as the carrier gas (constant pressure, β -ionone eluting at 27.6 min), and the split ratio was set at 100:1. The GC was linked to an Agilent model 5972 inert mass spectrometry detector. The initial oven temperature was set at 60 °C, then increased at 2.5 °C/min to 155 °C, and finally raised to 250 °C at a rate of 10 °C min⁻¹; the injection port and transfer line to the mass selective detector were kept at 250 °C and 280 °C, respectively. Individual peaks were identified by retention indices and retention times (relative to C6-C17 n-alkanes), compared with those of known compounds, and by comparison of mass spectra using the NBS75K library (U.S. National Bureau of Standards, 2002) and spectra obtained from the standard. The percentage compositions of samples were expressed as a function of the area of the chromatographic peaks using the total ion current.

5.2.4 Statistical analysis

Data are shown as mean SE. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), verifying previous homoscedasticity by Levene's test. Fisher LSD test was used to compare means at $p < 0.05$. Correlations in treatments were measured by Pearson's correlation coefficients. All statistical analyses were estimated by the software STATGRAPHICS Centurion XVI.I.

5.3 Results

5.3.1 Phytomass Production and Essential Oil Yield

In this study, the agronomic yield, expressed as essential oil production and phytomass, of four different ecotypes was evaluated. This research represents the continuation of a previous work, from which two individual ecotypes were preselected on the basis of their higher tolerance to drought stress [212]. Thus, the principal goal of the present study was to continue with the characterization of these ecotypes (Es1 and Es2) by studying their agronomic yield when compared to two commercial spike lavender plants (Ec1 and Ec2).

Before starting the experimental assay, the four ecotypes were characterized to ensure that they had similar essential oil yield and chemical composition. Thus, differences in final yield could be

related to agronomical behavior. The results concerning these initial values are shown in Table 5-1.

Regarding to EOs yield and phytomass production results, after three consecutive years of cultivation, showed a significant increase, even doubling production between the first and third year of the agronomic assay (Figure 5-3) in all the ecotypes under study. The ecotypes used as control (Ec1 and Ec2) showed close results regarding FW production but not for EOs yield.

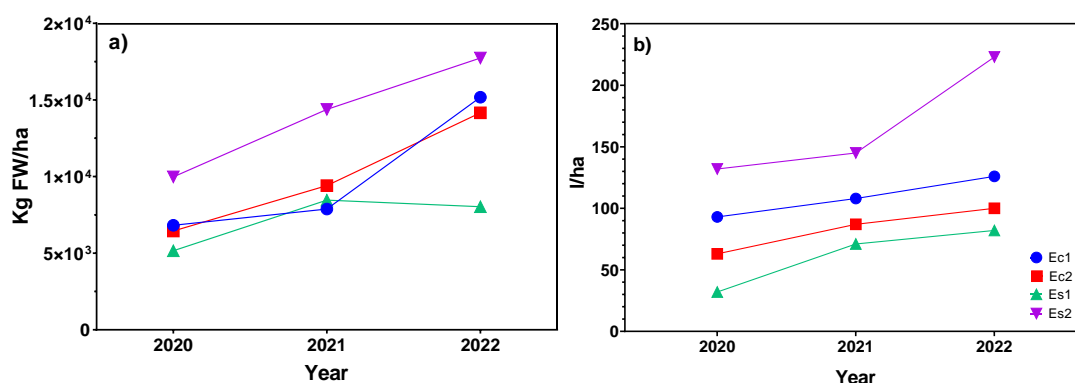


Figure 5-3 Evaluation of (a) agronomic yield and (b) essential oil yield in *Lavandula latifolia* during three consecutive years

However, in the preselected ecotypes (Es1 and Es2), disparate results regarding these two parameters were found. The previous severe drought episode might have positively affected to Es2, but not Es1, which showed the lowest yield among the ecotypes studied. Indeed, Es1 and Ec2 initially yielded the same essential oil content (2%, Table 5-1), but after cultivation practices, the agronomic performance was different.

In this case, Es2 was the ecotype with the highest biomass (FW) and EOs production (17,738 kg FW/ha and 223 l/ha, respectively), followed by ecotype Ec1, even though their biomass production was the lowest in the second crop year (Figure 5-3.a). This could lead to think that the EOs synthesized by this species could be genetically predetermined, since a rise in biomass production is not always related to a significant improvement in EOs yield, as can be observed for Ec1, Ec2, and Es1. This is a preliminary study, and further investigation is needed to confirm this statement.

The ecotype that had the lowest yield through the years of cultivation was Es1, reaching in the last year an agronomic yield of 8034 kg FW/ha and an EO yield of 82 l/ha (Figure 5-3a, b).

5.3.2 Essential Oil Composition

A total of 32 major components were identified, which represented 95–100% of the volatile fraction of *L. latifolia* EOs (Table 5-2). At the quantitative level, ecotypes maintained the chemotype after cloning and re-establishing in culture, with this relative composition being stable during the time (Table 5-2). The chemotype was defined, as mentioned above, by three components, the monoterpene 1,8-cineole, and the terpenoids linalool and camphor, on the basis of the relative concentration at which these three major compounds were present in this volatile fraction.

Table 5-2 Essential oil volatile profile of *Lavandula latifolia* over three years of cultivation practices. Results are expressed as mean \pm SD. Different letters indicate a significant difference between years per component at $p < 0.05$.

Relative Concentration (%)	Year	Ec1	Ec2	Es1	Es2
α -Pinene	2020	0.9 \pm 0.20	1.9 \pm 0.22	2.1 \pm 0.18	1.5 \pm 0.20
	2021	0.9 \pm 0.06	1.7 \pm 0.20	1.5 \pm 0.37	1.5 \pm 0.12
	2022	1.0 \pm 0.09	2.0 \pm 0.20	1.4 \pm 0.27	1.6 \pm 0.10
Camphene	2020	0.2 \pm 0.11	0.2 \pm 0.03 ^a	0.2 \pm 0.04 ^a	0.2 \pm 0.02 ^a
	2021	0.3 \pm 0.01	0.3 \pm 0.02 ^b	0.3 \pm 0.06 ^{ab}	0.3 \pm 0.05 ^b
	2022	0.3 \pm 0.11	0.4 \pm 0.01 ^b	0.3 \pm 0.02 ^b	0.4 \pm 0.01 ^b
Sabinene	2020	0.4 \pm 0.02 ^a	1.1 \pm 0.12	0.7 \pm 0.03	0.8 \pm 0.05
	2021	0.5 \pm 0.02 ^a	1.0 \pm 0.04	0.6 \pm 0.12	0.8 \pm 0.04
	2022	0.6 \pm 0.02 ^b	1.2 \pm 0.05	0.7 \pm 0.07	0.9 \pm 0.09
β -Pinene	2020	1.4 \pm 0.18	3.5 \pm 0.34 ^b	2.8 \pm 0.19 ^b	2.7 \pm 0.26
	2021	1.3 \pm 0.07	2.8 \pm 0.17 ^a	1.9 \pm 0.33 ^a	2.3 \pm 0.11
	2022	1.6 \pm 0.18	3.5 \pm 0.26 ^b	2.1 \pm 0.26 ^a	2.7 \pm 0.14
1-Octen-3-ol	2020	0.0 \pm 0.01	0.1 \pm 0.02	0.0 \pm 0.01	0.0 \pm 0.00
	2021	0.0 \pm 0.01	0.1 \pm 0.00	0.0 \pm 0.01	0.0 \pm 0.01
	2022	0.1 \pm 0.01	0.1 \pm 0.05	0.1 \pm 0.05	0.0 \pm 0.01
Myrcene	2020	0.3 \pm 0.03 ^a	0.7 \pm 0.09 ^a	0.5 \pm 0.01	0.5 \pm 0.06 ^a
	2021	0.4 \pm 0.02 ^a	0.7 \pm 0.06 ^a	0.4 \pm 0.07	0.6 \pm 0.0 ^{ab}
	2022	0.5 \pm 0.03 ^b	0.9 \pm 0.03 ^b	0.5 \pm 0.04	0.6 \pm 0.00 ^b
α -Terpinene	2020	0.1 \pm 0.06	0.2 \pm 0.06	0.1 \pm 0.00 ^a	0.2 \pm 0.06
	2021	0.1 \pm 0.01	0.2 \pm 0.05	0.1 \pm 0.02 ^a	0.2 \pm 0.03
	2022	0.2 \pm 0.06	0.2 \pm 0.05	0.2 \pm 0.02 ^b	0.3 \pm 0.01
<i>p</i> -Cymene	2020	0.1 \pm 0.03	0.1 \pm 0.02	0.1 \pm 0.00	0.1 \pm 0.04
	2021	0.1 \pm 0.01	0.1 \pm 0.00	0.1 \pm 0.02	0.1 \pm 0.01
	2022	0.1 \pm 0.03	0.1 \pm 0.01	0.1 \pm 0.03	0.1 \pm 0.01
Limonene	2020	0.5 \pm 0.27	1.3 \pm 0.08 ^b	0.8 \pm 0.16	0.7 \pm 0.15
	2021	0.5 \pm 0.06	1.0 \pm 0.05 ^a	0.6 \pm 0.14	0.7 \pm 0.06
	2022	0.8 \pm 0.27	1.5 \pm 0.05 ^c	0.8 \pm 0.04	0.7 \pm 0.08
1,8-Cineole	2020	31.8 \pm 2.52	62.1 \pm 0.90 ^c	43.2 \pm 0.10 ^c	49.5 \pm 2.85 ^b
	2021	27.1 \pm 1.00	45.5 \pm 0.97 ^a	31.7 \pm 0.82 ^a	39.9 \pm 1.31 ^a
	2022	30.0 \pm 3.01	53.3 \pm 1.08 ^b	36.3 \pm 2.01 ^b	45.7 \pm 3.86 ^b
<i>(E)</i> - β -Ocimene	2020	0.2 \pm 0.08	0.2 \pm 0.02 ^a	0.2 \pm 0.03	0.2 \pm 0.03
	2021	0.3 \pm 0.01	0.3 \pm 0.03 ^b	0.2 \pm 0.01	0.2 \pm 0.02
	2022	0.2 \pm 0.07	0.2 \pm 0.02 ^a	0.2 \pm 0.04	0.1 \pm 0.01
γ -Terpinene	2020	0.2 \pm 0.04	0.5 \pm 0.02 ^a	0.2 \pm 0.00 ^a	0.3 \pm 0.09
	2021	0.2 \pm 0.02	0.4 \pm 0.03 ^b	0.2 \pm 0.03 ^a	0.3 \pm 0.05
	2022	0.2 \pm 0.04	0.5 \pm 0.02 ^a	0.3 \pm 0.02 ^b	0.4 \pm 0.02
<i>(Z)</i> -Sabinene	2020	0.1 \pm 0.06 ^a	0.3 \pm 0.04	0.3 \pm 0.13	0.3 \pm 0.10

Relative Concentration (%)	Year	Ec1	Ec2	Es1	Es2
hydrate	2021	0.3 ± 0.06 ^b	0.5 ± 0.12	0.4 ± 0.01	0.4 ± 0.12
	2022	0.3 ± 0.06 ^b	0.5 ± 0.10	0.2 ± 0.06	0.2 ± 0.12
α-Terpinolene	2020	0.1 ± 0.08	0.1 ± 0.01 ^a	0.1 ± 0.00 ^a	0.1 ± 0.02 ^a
	2021	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.02 ^b	0.2 ± 0.03 ^b	0.2 ± 0.03 ^b
	2022	0.2 ± 0.08	0.3 ± 0.02 ^b	0.2 ± 0.01 ^b	0.2 ± 0.14 ^b
Linalool	2020	47.5 ± 0.98	8.7 ± 0.82 ^a	34.8 ± 0.32 ^a	26.5 ± 4.32
	2021	47.3 ± 0.66	18.7 ± 0.76 ^c	41.3 ± 3.14 ^b	30.5 ± 0.49
	2022	43.5 ± 0.98	11.0 ± 1.08 ^b	36.1 ± 0.96 ^a	25.8 ± 3.49
α-Campholenal	2020	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.01 ^a	0.1 ± 0.01
	2021	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.04	0.2 ± 0.00 ^b	0.1 ± 0.06
	2022	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.02 ^b	0.1 ± 0.01
Pinocarveol	2020	0.1 ± 0.07	0.2 ± 0.04	0.2 ± 0.03	0.2 ± 0.05
	2021	0.1 ± 0.03	0.2 ± 0.02	0.2 ± 0.01	0.1 ± 0.05
	2022	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.04	0.0 ± 0.01	0.0 ± 0.01
Camphor	2020	9.2 ± 1.43	7.0 ± 0.57 ^a	5.9 ± 1.48	7.7 ± 0.15 ^a
	2021	9.5 ± 0.30	10.2 ± 0.42 ^c	8.6 ± 0.98	10.4 ± 1.18 ^b
	2022	8.7 ± 0.45	9.2 ± 0.09 ^b	9.1 ± 1.30	9.5 ± 0.30 ^b
(E)-Pinocarveol acetate	2020	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.04 ^b	0.2 ± 0.03	0.2 ± 0.02
	2021	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.02 ^b	0.3 ± 0.03	0.1 ± 0.02
	2022	0.0 ± 0.01	0.1 ± 0.04 ^a	0.3 ± 0.01	0.0 ± 0.01
Pinocarvone	2020	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.04 ^b	0.1 ± 0.02 ^a	0.1 ± 0.03
	2021	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.02 ^b	0.2 ± 0.01 ^b	0.1 ± 0.01
	2022	0.0 ± 0.01	0.0 ± 0.01 ^a	0.0 ± 0.01 ^a	0.0 ± 0.01
Borneol	2020	0.7 ± 0.15	0.4 ± 0.09 ^a	0.4 ± 0.07 ^a	0.5 ± 0.03 ^a
	2021	0.8 ± 0.06	0.8 ± 0.03 ^b	0.8 ± 0.11 ^b	0.8 ± 0.06 ^b
	2022	0.9 ± 0.19	0.8 ± 0.01 ^b	0.8 ± 0.14 ^b	0.8 ± 0.07 ^b
γ-Terpineol	2020	0.6 ± 0.03	1.2 ± 0.05 ^b	0.7 ± 0.02 ^a	1.0 ± 0.10 ^a
	2021	0.6 ± 0.02	1.1 ± 0.02 ^a	0.7 ± 0.00 ^a	0.9 ± 0.01 ^a
	2022	0.7 ± 0.08	1.3 ± 0.04 ^c	0.9 ± 0.04 ^b	1.1 ± 0.03 ^b
Terpinen-4-ol	2020	0.6 ± 0.07	1.2 ± 0.03 ^b	0.7 ± 0.00	0.9 ± 0.21
	2021	0.5 ± 0.05	1.0 ± 0.08 ^a	0.6 ± 0.03	0.9 ± 0.10
	2022	0.6 ± 0.07	1.1 ± 0.04 ^b	0.8 ± 0.08	1.1 ± 0.06
α-Terpineol	2020	1.6 ± 0.16	3.6 ± 0.10 ^b	2.2 ± 0.15	2.7 ± 0.11
	2021	1.6 ± 0.07	3.2 ± 0.05 ^a	1.9 ± 0.14	2.6 ± 0.04
	2022	1.7 ± 0.16	3.5 ± 0.10 ^b	2.1 ± 0.05	2.7 ± 0.14
Myrtenal	2020	0.2 ± 0.02	0.3 ± 0.12	0.2 ± 0.03	0.2 ± 0.05 ^a
	2021	0.2 ± 0.02	0.3 ± 0.03	0.3 ± 0.01	0.2 ± 0.02 ^a
	2022	0.2 ± 0.02	0.3 ± 0.02	0.3 ± 0.03	0.3 ± 0.02 ^b
Myrtenol	2020	0.1 ± 0.01	0.0 ± 0.01	0.0 ± 0.01	0.0 ± 0.01
	2021	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.06	0.1 ± 0.04	0.1 ± 0.01
	2022	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.02	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.01
β-Caryophyllene	2020	0.1 ± 0.01 ^a	1.3 ± 0.18 ^b	0.2 ± 0.00 ^a	0.3 ± 0.08 ^a
	2021	0.4 ± 0.06 ^c	0.2 ± 0.01 ^a	0.5 ± 0.07 ^b	0.5 ± 0.08 ^b
	2022	0.3 ± 0.02 ^b	1.5 ± 0.13 ^b	0.4 ± 0.01 ^b	0.3 ± 0.05 ^a
β-Farnesene	2020	0.1 ± 0.06	0.0 ± 0.01 ^a	n.d.	0.0 ± 0.00
	2021	0.1 ± 0.02	0.2 ± 0.06 ^b	n.d.	0.1 ± 0.03
	2022	0.1 ± 0.02	0.0 ± 0.01 ^a	n.d.	0.0 ± 0.00
Germacrene D	2020	0.1 ± 0.04 ^a	0.1 ± 0.04 ^a	0.1 ± 0.06	0.2 ± 0.03 ^a
	2021	0.4 ± 0.05 ^c	0.4 ± 0.40 ^c	0.5 ± 0.07	0.4 ± 0.07 ^b
	2022	0.3 ± 0.01 ^b	0.5 ± 0.07 ^b	0.2 ± 0.05	0.2 ± 0.05 ^a
(Z)-α-Bisabolene	2020	1.3 ± 0.23	0.0 ± 0.01 ^a	1.6 ± 0.76	1.0 ± 0.04
	2021	1.9 ± 0.35	0.2 ± 0.06 ^b	2.0 ± 0.04	1.2 ± 0.28
	2022	2.1 ± 0.31	0.0 ± 0.01 ^a	1.9 ± 0.44	0.7 ± 0.26
Caryophyllene	2020	0.4 ± 0.07	0.9 ± 0.12 ^{ab}	0.1 ± 0.01 ^a	0.3 ± 0.14

Relative Concentration (%)	Year	Ec1	Ec2	Es1	Es2
oxide	2021	0.4 ± 0.03	1.2 ± 0.14 ^b	0.4 ± 0.07 ^b	0.5 ± 0.07
	2022	0.4 ± 0.04	0.7 ± 0.23 ^a	0.1 ± 0.03 ^a	0.4 ± 0.06
Viridiflorol	2020	0.2 ± 0.02 ^a	0.9 ± 0.10	0.3 ± 0.18	0.4 ± 0.17
	2021	0.9 ± 0.10 ^b	0.9 ± 0.13	0.7 ± 0.08	0.6 ± 0.13
	2022	0.9 ± 0.11 ^b	0.8 ± 0.07	0.6 ± 0.13	0.5 ± 0.14

Other volatile compounds that showed averages above 1% in all plants under study and that deserve to be commented on for their contribution to the pleasant spike lavender essential oil aroma are α -pinene, β -pinene, and α -terpineol. It is also interesting to highlight that in Ec2 and Es2, both with 1,8-cineol as the main component quantified, the terpenic alcohols γ -terpineol and terpinen-4-ol were measured at concentrations higher than 1%. As for sesquiterpenic hydrocarbons (*Z*)- α -bisabolene was quantified in Ec1, Es1, and Es2, while for Ec2, β -caryophyllene and caryophyllene oxide were the two sesquiterpenes quantified at relative concentrations above 1%.

Concerning the variation in the relative concentration of these volatile components over three consecutive years of cultivation practices, Ec1 showed slight changes, being the most stable among the ecotypes studied. Thus, the components that define the chemotype in this plant, linalool/1,8-cineole/camphor, did not show statistically significant differences between the relative concentrations at which they were quantified over time. On the contrary, in Ec2, a detriment in the concentration of 1,8-cineole (from 62 to 53%) in favor of an increase in linalool (from 8.87 to 11%) and camphor (from 7 to 9%) was quantified. The volatile compounds of Es1 also showed a decrement in 1,8-cineole after the third year of cultivation practice. Nonetheless, in this case, linalool did not vary in statistically significant differences in its relative concentration between the first and third year of study. Ecotype Es2 showed an evolution closer to Ec1, since although a reduction in 1,8-cineol was quantified together with an increase in linalool concentration in the second year, no statistically significant differences were determined between the first and third year of cultivation.

Minor components including the sesquiterpenes germacrene (Ec1, Ec2), β -caryophyllene (Ec1, Es1), and viridiflorol (Ec1), and the terpenic hydrocarbons sabinene (Ec1), myrcene (Ec1, Ec2, Es2), camphene (Ec2, Es2), α -terpinene and γ -terpinene (Es1), limonene (Es2), and α -terpinolene (Ec2, Es1, Es2), along with (*E*)-sabinene hydrate (Ec1), borneol (Ec2, Es2), γ -terpineol, terpinen-4-ol and α -terpineol (Ec2), increased their relative concentration over time.

5.3.3 Phenolic profile

Concerning the phenolic profile, HPLC-DAD analysis allowed for the identification and quantification of 14 phenolic components (Table 5-3), with salvianic acid, rosmarinic acid derivate, luteolin-7-*O*-glucuronide, and salvianolic acid A being the major phenolic components quantified at the third year of cultivation practices for all the ecotypes under study.

Even the fact that spike lavender is a rainfed crop, the lack of water supply had a positive effect on the synthesis of phenolic components by this aromatic plant. Thus, except for *o*-coumaric acid, luteolin, and apigenin, all the phenolic components quantified had a considerable increase in their concentrations at the end of the experimental research.

Table 5-3 Phenolic profile analysis of four spike lavender ecotypes. Results are expressed as mean \pm SD. Different letters indicate a significant difference between years per component at $p < 0.05$.

Phenolic Compounds mg/ *g DW	Year	Ec1	Ec2	Es1	Es2
Salvianic acid	2020	0.3 \pm 0.05 ^a	0.6 \pm 0.03 ^a	0.7 \pm 0.19 ^a	0.6 \pm 0.19 ^a
	2021	1.2 \pm 0.48 ^b	0.6 \pm 0.22 ^a	0.7 \pm 0.18 ^a	1.8 \pm 0.56 ^b
	2022	3.4 \pm 0.51 ^c	3.7 \pm 0.06 ^b	3.9 \pm 1.29 ^b	5.4 \pm 0.76 ^c
Rosmarinic acid derivative	2020	1.5 \pm 0.30	1.7 \pm 0.09 ^a	1.3 \pm 0.16 ^a	1.0 \pm 0.23 ^a
	2021	2.8 \pm 0.75	4.0 \pm 0.82 ^b	2.9 \pm 0.58 ^b	4.5 \pm 1.23 ^b
	2022	2.9 \pm 0.91	3.7 \pm 0.34 ^b	3.3 \pm 0.28 ^b	3.7 \pm 1.21 ^b
Caffeic acid	2020	0.04 \pm 0.02 ^a	0.1 \pm 0.02	0.1 \pm 0.01	0.1 \pm 0.02 ^a
	2021	0.1 \pm 0.02 ^b	0.1 \pm 0.02	0.1 \pm 0.01	0.2 \pm 0.01 ^b
	2022	0.1 \pm 0.02 ^b	0.1 \pm 0.03	0.1 \pm 0.01	0.1 \pm 0.01 ^a
<i>p</i> -Coumaric acid glycoside	2020	0.3 \pm 0.08 ^a	0.7 \pm 0.02 ^a	0.7 \pm 0.14 ^a	0.4 \pm 0.10 ^a
	2021	1.4 \pm 0.32 ^b	1.5 \pm 0.27 ^b	0.8 \pm 0.12 ^a	1.4 \pm 0.39 ^b
	2022	1.5 \pm 0.27 ^b	1.7 \pm 0.23 ^b	1.6 \pm 0.16 ^b	1.6 \pm 0.35 ^b
Ferulic acid hexoside	2020	0.3 \pm 0.09	0.4 \pm 0.08 ^a	0.3 \pm 0.04 ^a	0.2 \pm 0.07 ^a
	2021	0.3 \pm 0.08	0.7 \pm 0.13 ^b	0.5 \pm 0.09 ^b	0.5 \pm 0.06 ^b
	2022	0.4 \pm 0.07	0.9 \pm 0.12 ^b	0.6 \pm 0.08 ^c	0.6 \pm 0.06 ^b
Luteolin-7- glucoside	2020	0.3 \pm 0.11 ^a	0.3 \pm 0.03 ^a	0.3 \pm 0.13 ^a	0.3 \pm 0.07 ^a
	2021	0.5 \pm 0.11 ^a	0.4 \pm 0.12 ^a	0.4 \pm 0.05 ^a	0.5 \pm 0.06 ^b
	2022	0.8 \pm 0.09 ^b	0.8 \pm 0.14 ^b	0.7 \pm 0.15 ^b	0.8 \pm 0.02 ^c
Luteolin-7- glucuronide	2020	0.9 \pm 0.26 ^a	1.1 \pm 0.03 ^a	1.0 \pm 0.15 ^a	0.8 \pm 0.15 ^a
	2021	1.3 \pm 0.25 ^{ab}	1.4 \pm 0.37 ^a	1.1 \pm 0.23 ^a	1.4 \pm 0.33 ^b
	2022	1.9 \pm 0.47 ^b	2.5 \pm 0.33 ^b	2.2 \pm 0.32 ^b	2.3 \pm 0.12 ^c
Apigenin-7- glucoside	2020	0.3 \pm 0.09 ^a	0.4 \pm 0.01	0.4 \pm 0.08	0.3 \pm 0.03
	2021	0.6 \pm 0.10 ^b	0.5 \pm 0.14	0.4 \pm 0.02	0.5 \pm 0.07
	2022	0.6 \pm 0.10 ^b	0.7 \pm 0.11	0.6 \pm 0.04	0.5 \pm 0.05
<i>o</i> -Coumaric acid	2020	0.6 \pm 0.17	0.7 \pm 0.00 ^{ab}	0.4 \pm 0.21 ^a	1.2 \pm 0.43 ^b
	2021	0.7 \pm 0.18	1.2 \pm 0.37 ^b	2.8 \pm 0.48 ^b	1.1 \pm 0.53 ^a
	2022	0.4 \pm 0.19	0.3 \pm 0.07 ^a	0.3 \pm 0.04 ^a	0.4 \pm 0.04 ^{ba}
Rosmarinic acid	2020	0.3 \pm 0.15 ^a	0.6 \pm 0.01 ^a	0.9 \pm 0.31	0.6 \pm 0.12 ^a
	2021	1.5 \pm 0.09 ^c	1.5 \pm 0.08 ^b	1.4 \pm 0.01	1.4 \pm 0.03 ^b
	2022	0.9 \pm 0.16 ^b	1.5 \pm 0.42 ^b	1.3 \pm 0.30	1.3 \pm 0.20 ^b
Salvianolic acid A	2020	1.0 \pm 0.26	1.1 \pm 0.09 ^a	0.7 \pm 0.15 ^a	0.7 \pm 0.26 ^a
	2021	1.6 \pm 0.62	2.1 \pm 0.26 ^b	1.2 \pm 0.39 ^a	1.9 \pm 0.33 ^b
	2022	1.9 \pm 0.22	3.0 \pm 0.92 ^c	2.5 \pm 0.48 ^b	2.6 \pm 0.16 ^c
Luteolin	2020	0.4 \pm 0.06	0.4 \pm 0.01 ^b	0.4 \pm 0.17 ^b	0.5 \pm 0.14 ^b

	2021	0.3 ± 0.10	0.4 ± 0.09 ^b	1.6 ± 0.13 ^c	0.3 ± 0.09 ^b
	2022	0.2 ± 0.11	0.1 ± 0.02 ^a	0.1 ± 0.01 ^a	0.1 ± 0.01 ^a
Salvianolic acid C	2020	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01
	2021	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.03	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01
	2022	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.02	0.2 ± 0.02
Apigenin	2020	0.1 ± 0.01 ^b	0.1 ± 0.01 ^b	0.1 ± 0.05 ^{ab}	0.1 ± 0.03 ^b
	2021	0.1 ± 0.03 ^{ab}	0.1 ± 0.02 ^b	0.1 ± 0.04 ^b	0.1 ± 0.04 ^b
	2022	0.04 ± 0.0 ^a	0.03 ± 0.00 ^a	0.02 ± 0.00 ^a	0.02 ± 0.00 ^a

In this sense, salvianic acid was the component that modified its concentration to the greatest extent, being more evident in ecotype Es2 (Table 5-3). As expected, the variation in concentration was associated with the component under study; thus, the rosmarinic acid derivate, *p*-coumaric acid glycoside, ferulic acid hexoside, and rosmarinic acid experienced an increase from the first to the second year of crop cultivation, and then was stable in the third year. Nevertheless, for luteolin-7-*O*-glucoside and luteolin-7-*O*-glucuronide, this increase was determined just after the third year of crop cultivation.

It is also interesting to note that, as defined for the EO volatile profile, ecotype Ec1 was the one that appeared most stable in terms of phenolic profile, since, unlike what was observed in the other ecotypes, specifically, the derivative of rosmarinic acid, ferulic acid hexoside, *o*-coumaric acid, salvianolic acid A, and luteolin, no statistically significant differences were quantified among the three years of cultivation practices.

5.3.4 Antioxidant capacity

When evaluating the antioxidant activity of the extracts in three consecutive years of cultivation, it was evident that all ecotypes showed potent antioxidant capacity in both DPPH* and FRAP *in vitro* determinations (Figure 5-4).

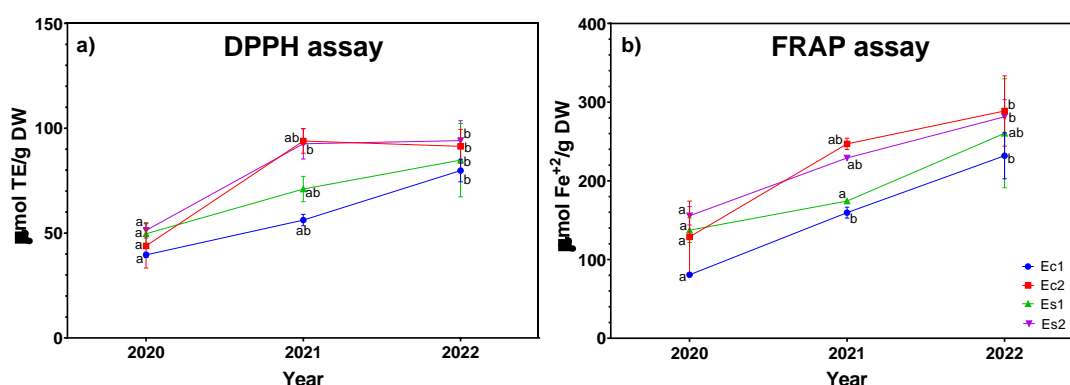


Figure 5-4 Antioxidant capacity of *L. latifolia* in three consecutive crop years by methods (a) DPPH assay and (b) FRAP assay. Different letters indicate a significant difference between years at $p < 0.05$.

Regarding the evolution of cultivation practices over time, all the ecotypes statistically increased their antioxidant activity in the third year compared to the first one. Furthermore, in Figure 5-4, it can be seen that Ec2 and Es2 presented the highest antioxidant activity for the DPPH^{*} assay (94.1 ± 9.52 and 94.1 ± 9.52 $\mu\text{mol TE/g DW}$, respectively) and FRAP assay (288.8 ± 44.66 and 281.4 ± 21.69 $\mu\text{mol Fe}^{+2}$ g/DW , respectively). Nonetheless, between the second and third cropping years, all ecotypes did not show statistical differences in antioxidant capacity, remaining unchanging from the second year onwards.

To evaluate the relationships between phenolic compounds and antioxidant activity, correlation coefficients were evaluated, showing a strong significant correlation ($p < 0.05$) in DPPH^{*} and FRAP with *p*-coumaric acid glycoside ($r = 0.88$ and $r = 0.91$, respectively). Similarly, salvianolic acid A correlated highly with the DPPH^{*} assay ($r = 0.828$), whereas the FRAP assay correlated strongly with luteolin-7-glucuronide ($r = 0.895$).

5.4 Discussion

Variations in the agronomic behavior of AMP are associated not only with environmental conditions, but also, among others, with the plant age, species under study, and the cultivation practices [350]. Therefore, to produce high quality *L. latifolia* plant material with stable and reproducible agronomic yield, it is critical to evaluate the evolution of the agronomic production along with its chemical characterization over time.

Therefore, the evaluation of four ecotypes during three consecutive years of cultivation practices showed that, although biomass production and EOs yield increased in the third year of crop cultivation, the agronomic behavior was ecotype dependent. In the case of the two preselected ecotypes (Es1 and Es2), which were previously subjected to two severe drought stress, a priming effect could occur in their DNA [351], which could explain the differences found between their respective agronomic yield. At the same time, when correlate biomass production and EOs yield over time, no direct proportionality between both parameters was observed. Variations in phytomass production between the second and third year of crop cultivation were lower than the observed increase in EOs yield. This could be justified by edaphoclimatic conditions. As shown in Figure 5-2, the differences between the second and third year were related to the level of potential evapotranspiration, being lower in the third year, which could explain the higher level of EOs yield obtained. Previous studies reported by Herráiz-Peñalver et al. [106] and Fernández-Sestelo and Carrillo [17] described variations in the EOs content of *L. latifolia* depending on annual climatic conditions. For these authors, in wild populations of *L. latifolia* harvested from different

bioclimatic zones of Spain, a positive correlation between EOs content and rainfall was determined.

According to the scientific literature consulted, and to our knowledge, no studies related to the agronomic behavior of *L. latifolia* have been previously performed. Hence, the discussion of the results is based on those obtained with other plants belonging to *Labiatae* family. Thus, contrary to the results determined for *L. latifolia*, Tuttolomondo et al. [343] reported, for *Salvia sclarea*, a decrease (by half) in phytomass and EOs yield after two years of cultivation practices. For these authors, both factors, environmental and genetic conditions, could play a significant role in this production detriment. Nevertheless, Najjar et al. [352] for *Thymus vulgaris* L. described an agronomic behavior close to that reported for *L. latifolia*. According to these researchers, after three years of crop cultivation, *T. vulgaris* L. showed an increase in phytomass production, but not for EOs yield, which was maintained over time.

As for the EOs volatile profile, the chemotype described in the four ecotypes studied, defined by linalool, 1,8-cineol, and camphor, was previously described in individual plants harvested from natural populations of spike lavender from the Eastern Iberian Peninsula [17,106,294,342].

Variations in EOs composition over time presented a different pattern of behavior depending on the chemotype studied. Thus, the evolution of the volatile profile in the ecotypes used as control (Ec1 and Ec2) could point to the fact that genetic factors, rather than environmental conditions, could be directly related to the response of the secondary metabolism of this species, as reported by Farías et al. for four clones of *Origanum* spp. from the Argentine Littoral region [348]. This could explain why Ec1 and Ec2 exhibited different evolutions after three years of cultivation practices under the same environmental conditions.

According to the climatic conditions shown in Figure 5-2 in 2020, there was a higher annual precipitation compared to the other two years under study. Nevertheless, in the third year, the evapotranspiration of the experimental station was lower. Thus, the plants in 2021 were subjected to a greater drought condition. Under this situation, these ecotypes, as a priming effect, could respond to the lack of water by rising linalool and camphor and reducing 1,8-cineol levels.

On the contrary, Muñoz-Bertomeu et al. [294] reported that after a prospection of individual *L. latifolia* plants located in different bioclimatic belts of eastern Spain, milder temperature conditions and higher levels of precipitation (Supra-Mediterranean belt) were found to favor linalool synthesis, reducing the relative concentration of 1,8-cineol and camphor in the volatile profile of these specie. Subsequently, Fernandez-Sestelo and Carrillo [17] in their study on the edaphoclimatic effects on EOs yield and composition of *L. latifolia* wild populations also found a

significant negative correlation between the relative concentrations of 1,8-cineol, linalool, and camphor. The differences between our results and those reported by these researchers could be attributed to the large chemical variability described for this species. According to Muñoz-Bertomeu et al. [294], this intraspecific variability has not only been described among wild populations, but also among individual plants. As indicated above, for the progress of this study, clones of four different ecotypes were cultivated for study. Therefore, variations among clones of the same ecotype should yield more conclusive results regarding the evolution of secondary metabolism in this species. Our results presented that in three of the four ecotypes, there was a rise in the relative concentration of linalool and camphor to the detriment of 1,8-cineol after three years of crop cultivation under the same environmental conditions.

Continuing with the secondary metabolites produced by these plants, and related to the phenolic profile, at present, there is scarce information on these bioactive components extracted from the distillation residues of this AMP. Researchers, such as Mendez-Tovar et al. [353], described rosmarinic acid, luteolin, and apigenin as the main phenols identified and quantified in spike lavender wild populations. Recently, Dobros et al. [354] reported a detailed review on the phytochemical profile of plants belonging to the *Lavandula* genus. For these authors, rosmarinic acid was the most abundant compound quantified in all the species covered in their review. Although at the qualitative level, all the phenolic compounds identified in the four ecotypes under study have been previously reported in the *Lavandula* genus, differences were observed in the concentration at which they were quantified. Variations in the qualitative and quantitative phenolic profile can be attributed to different factors, including genetic (inter and intraspecific variability) and physiological and development stages of the plants [355]. Therefore, depending on the geographical origin of the plant material, differences in chemical composition and agronomic behavior are expected. In fact, it is widely known that phenolic compounds have a great capacity to perform multiple functions in plants exposed to a wide range of abiotic stresses [221].

In the Mediterranean region, plants are exposed to various severe climate conditions, which could explain the evolution of the phenolic profile of *L. latifolia* over the three consecutive years of crop practices. A possible explanation of this statement could be related to the fact that these phenolic components, including phenolic glucosides, hydroxycinnamic acid derivatives, and flavonoids, are involved in secondary cell wall thickening [356] that confers drought tolerance under severe scenarios. This cell reinforcement coupled with their chemical functions confer to these phenolic components an important role in the resistance of the plants to oxidative stress [357]. Thus, under the semiarid conditions of the Spanish Southeast, *L. latifolia* experienced a

significant increase in the concentration of rosmarinic acid derivate, *p*-coumaric acid glycoside, ferulic acid hexoside, rosmarinic acid, luteolin-7-*O*-glucoside, and luteolin-7-*O*-glucuronide. The phenolic compounds showed a positive correlation with both *in vitro* antioxidant test assayed and could help the plant to overcome the adverse climatic conditions of southeastern Spain.

5.5 Conclusions

The agronomical behavior and the evolution of the EOs and the phenolic profiles of clones of four ecotypes, cultivated for three consecutive years in the semiarid conditions of the Spanish Southeast, were ecotype dependent, reaching a stable level of production in the second year of cultivation. Under the same environmental conditions, the evolution over time in terms of biomass and EOs yield suggested that the oil produced by this species could be genetically predetermined, since an increase in phytomass production is not always related to a significant enhancement in EOs yield. Regarding the volatile profile of the EOs, the secondary metabolism of this species, in three of the four ecotypes, seemed to redirect the synthesis of 1,8-cineol to linalool and camphor in response to the harsh Mediterranean climatic conditions. For the phenolic profile, and consequently for the antioxidant activity of their extracts, an increase was observed between the first and second year but remained stable in the third. This tendency could suggest that after episodes of lack of water, the species could maintain this antioxidant system active over time. Nonetheless, additional studies, over a longer period, are needed to confirm these statements. Knowledge of this agronomic behavior is of utmost importance for the development of future spike lavender breeding programs.

Capítulo 6 Physiological evaluation of
Thymus zygis ssp. *gracilis* against
drought, in ecotypes pretreated with
high intensity LED light

6.1 Introduction

The hardness of red thyme allows it to grow and develop under adverse climatic conditions such as long periods of dryness or high temperatures [358]. In addition, it can be considered one of the most commercially important species of thyme in Spain because of the high concentration of thymol in its essential oils (EOs) and hence its high market value [130].

To overcome the damage caused by the lack of water, rainfed crops have developed various adaptative mechanisms, activating physiological and biochemical responses [195]. As would be expected, such behaviors have been observed in several species belonging to the *Thymus* genus [311,313,359].

In relation to abiotic stresses experienced by plants, priming using light from light-emitting diodes (LEDs) with different intensities, wavelengths, and other properties can generate some beneficial responses in plants [155]. In recent years, there has been growing interest in the use of LED light as an alternative to chemicals for priming; it being a more eco-friendly, inexpensive, and easy-to-handle technology [360].

It is known that light intensity and quality determine the rate of photosynthesis, but also that excess light may damage the photosynthetic machinery and result in photoinhibition and ROS accumulation [361]. Photoinhibition implies a downregulation in some biophysical and biochemical processes, causing functional and structural changes in light-harvesting complex and photosystems I and II (PSI and PSII) [362].

To guard against these harmful processes, plants have developed effective systems that involve reducing the size of the light-harvesting antenna, moving light-harvesting complex II antenna from PSII to PSI, photoinhibitory quenching, and non-photochemical quenching [363]. At the same time, the antioxidant system seeks to maintain an optimal level of ROS for protecting cells against oxidative damage under various environmental stresses. Indeed, the balance between antioxidants and ROS is part of the light-dependent redox regulation of plant metabolism, a key process in plant adaptation to harsh environments [364]. Despite all of these potentially damaging effects, it might be possible to use plant response under stressful conditions to achieve “memory” formation, and plants remembering past events may help them develop strategies to cope with future stress episodes [274,365] and respond more rapidly and efficiently. In line with this, Müller-Xing et al. [366] point out that an excess of light produces an epigenetic mark by modifying the structure of chromatin which could generate transcriptional memory. Therefore, for the selection of tolerant cultivars, understanding the response of plants to different episodes of abiotic stress is of vital importance [239].

Previous studies carried out by Lima et al.[367], showed that in plants from semi-arid environments (*Anacardium occidentale* L.) the combined effects of photoprotection mechanisms and enzymatic antioxidants are capable of preventing both photoinhibition and oxidative damage after exposure to a prolonged period of drought followed by high-intensity light stress. To our knowledge, no previous studies have investigated the impact of these two consecutive abiotic stresses (intense light followed by drought) on the role of the non-enzymatic antioxidant system (tocochromanols and phenolic components) in protecting against oxidative damage in plants.

Thus, the main objective of this experiment was to explore possible effects of high-intensity LED light priming of *Thymus zygis* ssp. *gracilis* on its physiological response and activation of its non-enzymatic antioxidant defense system in subsequent severe drought stress. This knowledge might allow the future selection of more drought-tolerant plants for the establishment of red thyme breeding programs.

6.2 Materials and methods

The methodology used in this experiment is represented in a graphical abstract (Figure 6-1)

EXPERIMENT 3

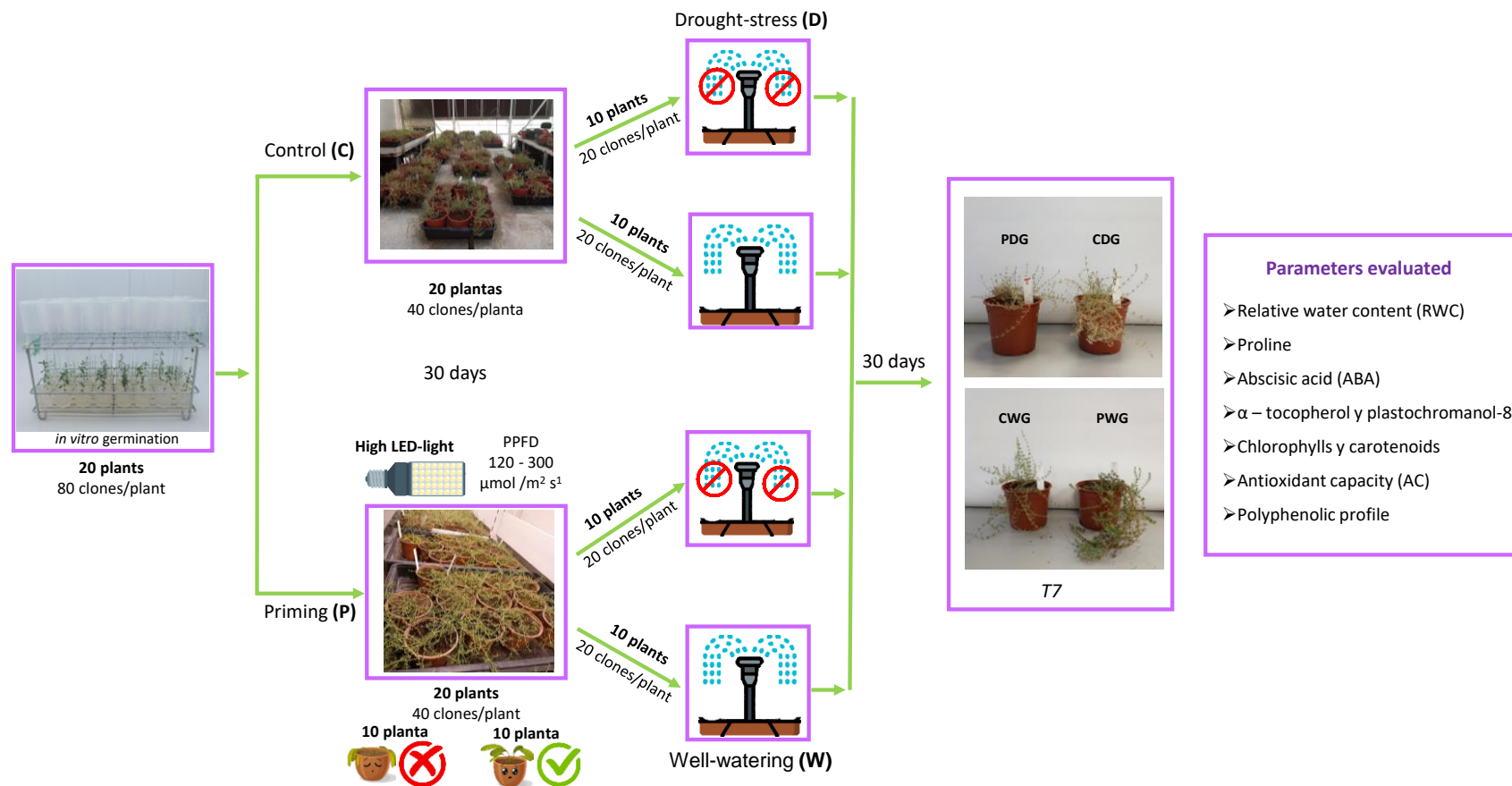


Figure 6-1 Graphical abstract of Experiment 3

6.2.1 Plant material, *in vitro* growth and priming conditions, and drought treatment

Seeds of *Thymus zygis* were obtained from local growers in the northwest of the Region of Murcia (Spain). The seeds were germinated in full-strength basal Murashige and Skoog (MS) medium [368] for 21 days. Next, nodal segments of seedlings were cultivated in MS medium enriched with vitamins and 0.1 mg L⁻¹ kinetin, 0.1 mg L⁻¹ indoleacetic acid, and 20.0 g L⁻¹ sucrose for 1 month seeking to obtain at least 80 clones from each germinated seed. Once the roots had begun to develop, seedlings were acclimatized in pots containing approximately 0.3 L of a mixture of peat and perlite (80/20, w/w) and kept in a controlled chamber for 1 month. Finally, from 20 plants, 1600 clones were available for conducting this experiment.

Subsequently, clones were assigned randomly to one of two homogeneous groups of 800, ensuring that the same number of clones from each of the 20 plants were present in both groups. One group was maintained under greenhouse conditions as a control (CG) and the other was subjected to a priming treatment (PG).

The priming consisted of the application of white LED light (Helios Grow Series, NTE, Librilla, Murcia, Spain), with a gradually increasing photosynthetic photon flux density (PPFD), measured using a spectral PAR meter (PG200N, UPRtek, Zhunan Township, Miaoli County, Taiwan), from 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ up to a maximum of 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at canopy level, when 50% of the plants died. Light intensity was increased, at a rate of 18 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ every 3 days, for 1 month. The priming chamber was kept at 24°C \pm 2°C, with a relative humidity of 70% to 75%, and a 16/8-h light/dark cycle.

At the end of the light pre-treatment, only 10 of the initial 20 ecotypes had survived, and these were submitted under the initial light intensity conditions (120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), for a recovery stage. Thus, 400 clones were available for the objective of investigating whether light priming improves the resistance of thyme to drought stress. Subsequently, both PG and CG plants were divided into two homogeneous subgroups, and one subgroup from each was subjected to drought stress (subgroups DPG and DCG), which consisted of withholding water for 30 days (when the uppermost leaves started wilting and turning yellow), while the other was kept well-watered (field capacity; WPG and WCG), as illustrated in Figure 6-2.

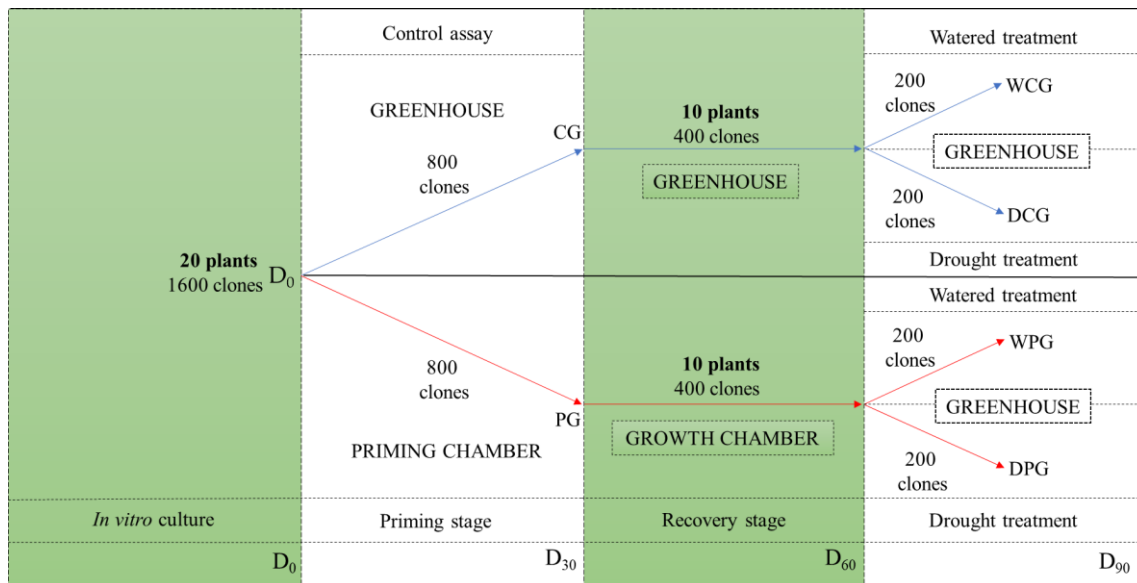


Figure 6-2 Outline of the experimental design. D: day; PG: primed group; CG: control group; DPG: drought-stressed primed group; DCG: drought-stressed control group; WPG: well-watered primed group; WCG: well-watered control group.

The drought treatment was carried out in June and July in greenhouse at temperatures of 24-32°C/day and 16-20°C/night, with a relative humidity of 60 ± 5% and a 16/8-h light/dark cycle. At the end of the experiment (day 90), all plants were harvested, frozen at -80°C, and freeze-dried until analysis.

6.2.2 Statistical analysis

Data are shown as mean ± standard deviation of the number of replicates. One- and two-way analysis of variance was conducted followed by Tukey’s post-hoc test, having previously tested the homoscedasticity assumption using Levene’s test. The relationship among variables was assessed by calculating Pearson’s correlation coefficients. Principal component analysis (PCA) of the correlation matrix was performed to identify variables that characterized clusters of experimental cases. Statistical analysis was carried out using STATGRAPHICS Centurion XVI.I and GraphPad Prim 8 software.

6.3 Results and discussion

6.3.1 Physiological parameters

The exposure of plants to a series of similar stress events generates, according to Avramova [310], a “stress memory” that could help them cope better with future stress. Hence, priming of young plants, consisting of their exposure to high-intensity LED light, might increase their tolerance to severe drought stress. In this context, we evaluated the physiological response (in terms of

%RWC, proline, ABA, and photosynthetic pigment synthesis) and secondary metabolite accumulation in ten red thyme ecotypes exposed to LED light priming followed by a severe drought episode.

Table 6-1 Analysis of variance (mean squares) in relative water content (RWC), proline, abscisic acid (ABA), α -tocopherol (α -T), plastochromanol-8 (PC-8), malondialdehyde (MDA), chlorophyll a (Chl-a), b (Chl-b), total (ChIT), and carotenoids (Car) by (A) ecotype and (B) light priming (control vs primed group), and their interactions, under drought conditions. *, **, and *** indicate significance at $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively

Source of variability	df	RWC	Proline	ABA	α -T	PC-8	MDA	Chl-a	Chl-b	ChIT	Car
Ecotype (A)	9	557.7***	779.8***	14.5***	187069***	16251.0***	16.6***	0.1***	0.2***	0.6***	0.2***
Light priming (B)	1	290.3	1393.6***	0.8	134809***	3052.0**	24.8*	1.5***	0.04	2.3***	3.1***
A x B	1	96.9***	91.2***	34.9***	86272***	2366.6***	13.0***	0.1***	0.2***	0.3***	0.1***
Error	20										

6.3.1.1 Plant water status

The RWC results are summarized in Table 6-1 and Figure 6-3.a and 6-3.b. As expected, RWC was significantly lower after drought stress in most of the ecotypes under both treatments (PG and CG). Marthandan et al.[184] noted that a reduction in RWC can be a primary response to dryness that reduces water potential and promotes stomatal closure, leading to an increase in leaf temperature and subsequent overall metabolic disruption.

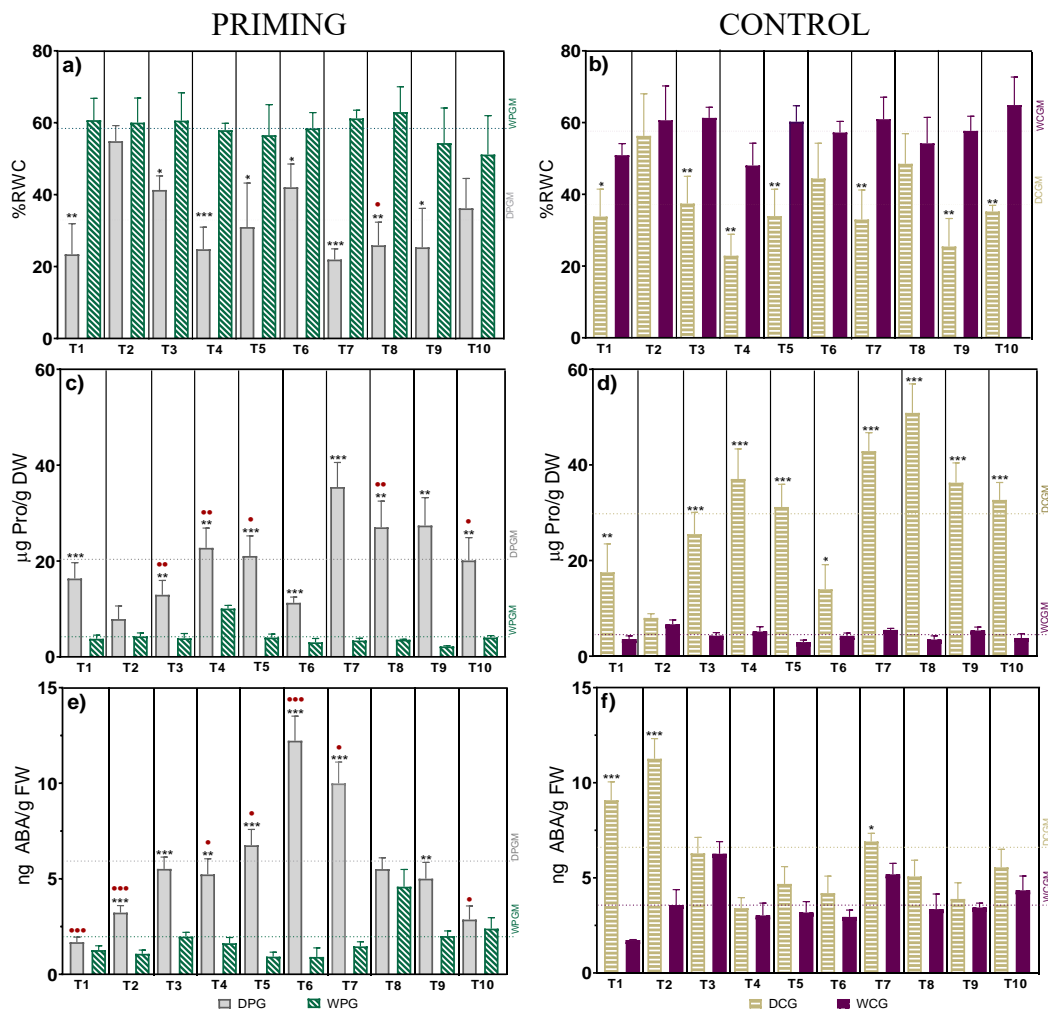


Figure 6-3 Physiological parameters (a, b) relative water content (%RWC), (c, d) proline (Pro), and (e, f) abscisic acid (ABA) in light-primed and control *Thymus zygis* plants and their response to drought-stress and watering treatments.

The results are expressed as the mean \pm SD (n=20). Asterisks indicate significant between-group differences by watering regime: well-watered control group (WCG) vs drought-stressed control group (DCG) and well-watered primed group (WPG) vs drought-stressed primed group (DPG); (*p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001). Filled circles indicate significant differences between primed and control groups - DPG vs DCG (●p<0.05, ●●p<0.01, and ●●●p<0.001). **Abbreviations:** WCGM: well-watered control group mean; DCGM: drought-stressed control group mean; WPGM: well-watered primed group mean, and DPGM: drought-stressed primed group mean.

Since RWC has been used as a drought tolerance index [276], we should highlight that thyme T2 was the ecotype with the highest RWC under drought conditions in both the PG and the CG (Figure 6-2.a, 6-2.b), this ecotype showing a greater ability to cope with water deficit and maintain similar conditions to those in its well-watered controls.

Concerning the effect of light priming on the response to the drought, results did not generally show differences in water status between primed and control plants (Table 6-1) (significant differences only being observed in the case of ecotype T8). That is, the previous exposure to abiotic stress was not associated with an alteration (either positive or negative) in the capacity of this species to maintain its RWC when compared to a control assay.

Controversy about the effect of priming on the capacity of plants to regulate their RWC after consecutive abiotic stresses can be found in scientific research. As could be expected, responses vary depending on the species under study. For example, an enhancement in RWC in response to abiotic stress has been observed in primed plants by Rafeie et al.[369] in basil. By contrast, in lemon balm, Asensi-Fabado et al.[370] observed a decrease in RWC in plants exposed to consecutive episodes of abiotic stress, some plants even dying under combined severe stress (heat and drought). In the case of *T. zygis*, as described above, light priming had no effect on this physiological parameter.

6.3.1.2 Proline

Table 6-1 and Figure 6-3c and 6-3d show that proline levels were significantly higher in most ecotypes (all except T2) subjected to drought stress in both primed and control plants. Proline increases have been related to a primary response to drought that allows osmotic adjustment given its role as an osmoprotectant [170]. Nevertheless, some authors have pointed out that proline not only has a function in osmoregulation but also may act as an antioxidant [158].

Despite this general pattern, it is important to point out that, resistance to abiotic stresses is ecotype dependent [212]. Notably, unlike other ecotypes, T2 maintained its levels of RWC and proline after the severe drought episode (Figures 6-3.a,6-3.b, 6-3.c, and 6-3.d) compared to values in the controls (WCG).

Regarding the effect of light priming on the drought response, between group differences were observed in proline accumulation. Notably, an effect of priming was evident in half of the ecotypes (T3, T4, T5, T8, and T10). In these cases, there was less accumulation of proline after the lack of water, despite these plants tending to maintain their RWC at similar levels to those in the corresponding control clones, as stated above.

These results differ from those of Rafeie et al.[369] in basil, in which they found an increase in proline levels in plants pre-treated with LED light and subsequently exposed to high salinity (a type of abiotic stress that is related to water deficit).

As described previously in this subsection, in many *Lamiaceae* species, high levels of proline are related to greater drought tolerance [371]. Nonetheless, in our study, in *T. zygis* subjected to drought stress, proline content was not significantly correlated with RWC in either primed or control plants. This could be attributed to the activation of other osmolytes such as aspartic acid, glutamic acid, glycine betaine, galactose, and/or raffinose, that may also be involved in osmotic adjustment [372]. Further, this finding suggests that proline may not be an appropriate indicator of drought tolerance in red thyme, as is the case in other alkaline-tolerant species including *Oryza sativa L* [373], though more detailed analysis is needed to confirm this interpretation.

6.3.1.3 Abscisic acid

As expected, ABA content was significantly higher after drought stress, in both primed and control plants (Table 6-1). Some authors have suggested that synthesis of this hormone under this type of abiotic stress may be an indicator of drought tolerance [274], given its key function in the regulation of stomatal closure to prevent water loss.

Regarding the effects of light priming on drought response, in most (seven out of ten) of the ecotypes, ABA levels differed significantly between primed plants and their controls (DPG vs DCG; Figure 6-3.e and 6-3.f). Nevertheless, the response did not indicate a clear trend in ABA content, with ABA production being significantly higher in primed than control plants in four ecotypes (T4, T5, T6, and T7) while it was significantly lower in primed plants in three ecotypes (T1, T2, and T10), and between-group differences did not reach significance in the other three (T3, T8, and T9)

Interestingly, although the mean ABA content under drought stress was similar in primed and control plants (5.8 ± 2.1 and 6.4 ± 2.1 ng g⁻¹ FW, respectively), intense light exposure seemed to have a greater impact on ABA synthesis under well-watered conditions. In this regard, among the well-watered plants, ABA levels were lower in the primed subgroup (WPG) than their corresponding control clones (WCG) (1.9 ± 1.1 vs. 3.6 ± 1.3 ng g⁻¹ FW, respectively). These results can be interpreted by considering the effect of plant exposure to high light intensities on stomatal aperture. According to Gong et al.[157], light induces stomatal opening which is directly related to the down-regulation of ABA synthesis.

It is also important to note that despite the baseline ABA levels being lower in plants exposed to high-intensity light (WPG) than those in the corresponding controls (WCG), after an episode of a severe lack of water, in 70% of the ecotypes under study the ABA levels in primed plants (DPG) were equal to or even greater than that in non-primed plants (DCG).

Comparing levels of proline accumulation and ABA synthesis, it is worth noting that ecotypes initially exposed to high-intensity light accumulated lower levels of proline after a drought episode, but by contrast, they seem to need higher levels of ABA to maintain similar levels of RWC in the plants. In this case, it could be thought that *T. zygis* under this type of abiotic stress redirects its metabolism to the synthesis of this hormone rather than the accumulation of proline.

To the best of our knowledge, no previous studies have explored the use of high-intensity LED light as a priming treatment for *T. zygis*. Similar studies were conducted by Ahmadi et al.[296] in two varieties of basil. These researchers also used a white LED light intensity of $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ as a priming treatment and studied plant response after severe drought stress. The reaction of the plants was variety dependent, no statistically significant differences being detected in one variety (Ilam), while in another (Isfahan) ABA synthesis was higher in the primed group than in controls.

6.3.2 Non-enzymatic antioxidants and lipid peroxidation

6.3.2.1 α -tocopherol and plastochromanol-8

To explore the effects of light priming and drought stress on the non-enzymatic antioxidant system of *T. zygis*, levels of two important tocopherols (α -T and PC-8) were measured.

Concerning the effect of lack of water on α -T levels, the lack of water was associated with significantly lower levels in most ecotypes, the exception being ecotype T6, which had similar levels of this non-enzymatic antioxidant in both primed and control groups (Figure 6-4.a and 6-4.b). On the other hand, in the case of PC-8 (Figure 6-4.c and 6-4.d), while an effect of drought was evident in all ten ecotypes in the control group, with lower levels after drought (WCG vs DCG), a priming effect was detected in four out of the ten thymes ecotypes studied (WPG vs DPG). Specifically, ecotypes T2, T6, T7, and T10 did not show a significant decrease in levels of this lipophilic antioxidant after the severe drought episode.

Regarding whether light priming might enhance the non-enzymatic antioxidant system in plants after drought stress (DCG vs DPG), the analysis of variance (Table 5-1) showed a positive effect on both tocopherols, with significantly higher levels in primed plants in six out of the ten ecotypes (T3, T4, T5, T6, T8, and T10). This effect is also observed in the mean values, plants in the DPG having significantly higher α -T and PC-8 concentrations ($526.0 \mu\text{g } \alpha\text{-T g}^{-1} \text{ DW}$, and $66.8 \mu\text{g PC-8 g}^{-1} \text{ DW}$) than those in the DCG ($443.1 \mu\text{g } \alpha\text{-T g}^{-1} \text{ DW}$, and $44.3 \mu\text{g PC-8 g}^{-1} \text{ DW}$) (Figures 6-4.a, 6-4.b, 6-4.c, and 6-4.d).

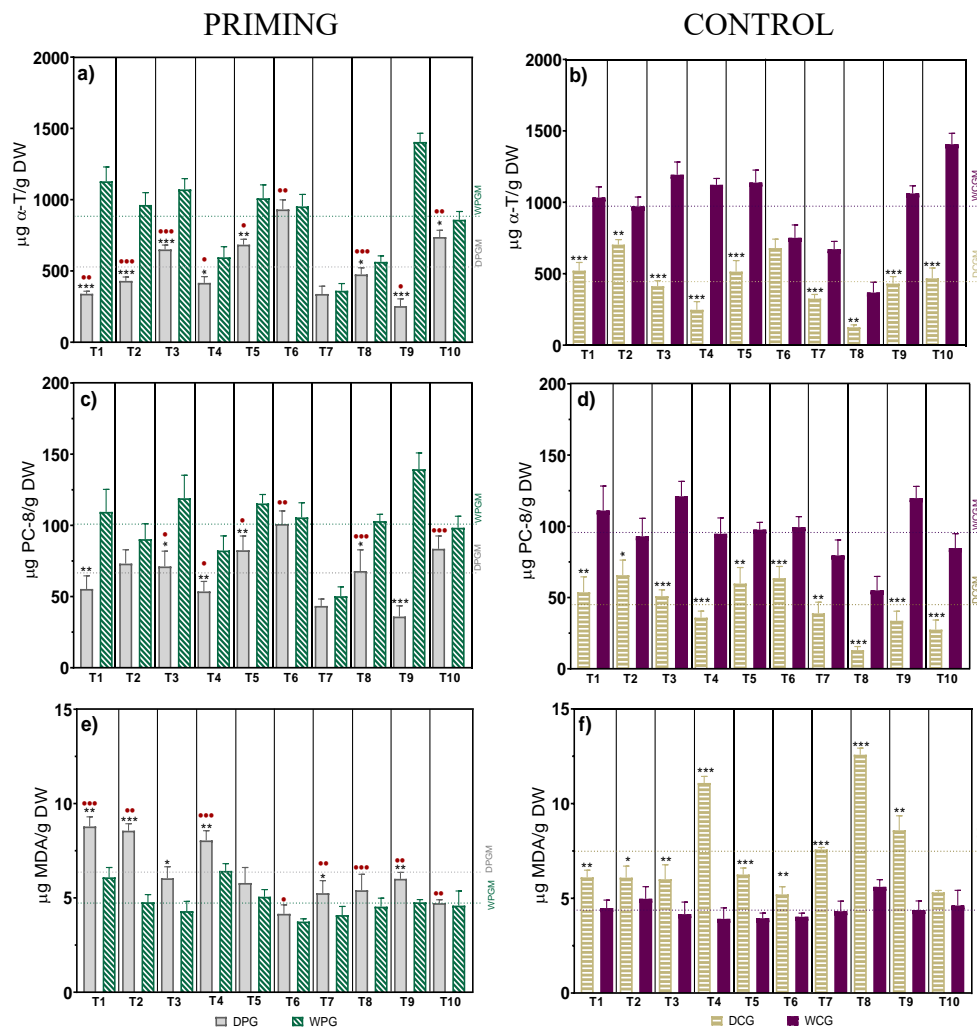


Figure 6-4 Synthesis of (a, b) α -tocopherol (α -T), (c, d) plastochromanol-8 (PC-8), and (e, f) malondialdehyde (MDA) in light-primed and control *Thymus zygis* plants and their response to drought-stress and watering treatments. The results are expressed as the mean \pm SD. Asterisks indicate significant between-group differences by watering regime: well-watered control group (WCG) vs drought-stressed control group (DCG) and well-watered primed group (WPG) vs drought-stressed primed group (DPG); (*p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001). Filled circles indicate significant differences between primed and control groups - DPG and DCG (● p < 0.05, ●● p < 0.01, and ●●● p < 0.001). Abbreviations: WCGM: well-watered control group mean; DCGM: drought-stressed control group mean; WPGM: well-watered primed group mean, and DPGM: drought-stressed primed group mean.

These results are in line with previous studies carried out by Volkova et al.[374] and Samuoliene et al.[375], who indicated that plants exposed to excess light could accumulate α -T to protect their chloroplasts against ROS, which causes destabilization of the membranes in thylakoids. Similarly, Fleta-Soriano and Munné-Bosch [323] mentioned that PC-8 may increase to the same extent as α -T in a second drought episode, suggesting that plants could develop a mechanism to protect their photosynthetic apparatus.

Even though there is a paucity of data concerning the antioxidant function of PC-8 and its interactions as a non-enzymatic antioxidant, it has been demonstrated that this tocopherol

provides stress tolerance [322]. Furthermore, we found a positive correlation between PC-8 and α -T in red thyme plants subjected to drought stress ($p < 0.01$; $R = 0.8$).

Beyond the activation of α -T and PC-8 synthesis, when exposed to an excess of light, plant photosystems become oversaturated, which leads to photoinhibition [376] that, in turn, could generate a “memory” effect [377]. This could explain the lower level of degradation of these two tocochromanol forms in primed red thyme (PG plants) after severe drought stress.

6.3.2.2 Lipid peroxidation

As expected, the extent of oxidative damage in the ecotypes was strongly and significantly influenced by drought (Table 5-1 and Figure 6-4.e and 6-4.f). Although the level of response was ecotype dependent, the effect was slightly more evident in controls than in the primed plants. That is, in the control group, levels of MDA were significantly higher under drought conditions (DCG vs WCG) in nine out of the ten of the ecotypes studied, versus six out of ten (DPG vs WPG) in the same ecotypes previously subjected to light priming. Specifically, MDA concentrations were not significantly higher after the severe drought episode in ecotypes T5, T6, T8, and T10.

The effect of light priming on the antioxidant defense response to drought can be observed by comparing MDA levels in DCG and DPG plants (Figure 6-4.e and 6-4.f). In this case, a possible positive effect could be attributed to the priming in ecotypes T4, T6, T7, T8, T9, and T10, MDA concentrations being significantly lower in the DPG than in the DCG.

Considering all the ecotypes together, there was a negative correlation between levels of α -T and MDA ($p < 0.01$, $R = -0.7$), as well as those of PC-8 and MDA ($p < 0.01$, $R = -0.6$). This behavior was notable in ecotypes T6 in the DPG (Figure 6-4.e) and T8 in the DCG (Figure 6-4.f) deprived of water. On the one hand, T6 had the lowest level of lipid peroxidation but the highest α -T and PC-8 levels, and on the other, T8 showed the highest MDA content but the lowest α -T and PC-8 levels. These results suggest that low levels of lipid peroxidation may be related to high levels of non-enzymatic antioxidant synthesis.

Data concerning the effect of light priming on oxidative damage in plants are inconsistent, results varying between species. For example, for *Melissa officinalis* L. under drought stress conditions, Ahmadi et al.[284] found a negative effect of light priming, MDA content being higher in primed plants. In contrast, studies related to the effects of consecutive episodes of abiotic stress on plants belonging to the *Lamiaceae* family [369,370] concluded that a stress pre-treatment in these species could enhance the response to lipid peroxidation in plants exposed to consecutive stress events.

Our results, as described above, point to some benefits of light priming for reducing the oxidative damage in thylakoid membranes of red thyme under severe drought conditions. This could be used as a preselection tool for more drought-tolerant ecotypes since a reduction in membrane damage has been related to better resistance against this type of abiotic stress [378].

6.3.3 Photosynthetic pigments

Considering that oxidative stress, caused by water deficit, leads to a loss of chlorophyll integrity (which is associated with chloroplast degradation) and produces photoinhibition [374], photosynthetic pigments were quantified in all the ecotypes (Table 5-1) to assess the effects of priming on their response to drought.

As expected, drought stress was associated with significant reductions in the concentrations of *Chl-a*, *Chl-b*, total chlorophylls (*ChlT*), and *Car* (Figure 6-5). The decreases in photosynthetic pigments contents in species belonging to the *Labiatae* family has been previously reported by several researchers, as described in the review of Avasiloaiei et al., (2023). Prolonged drought stress leads to stomatal closure, inhibiting the uptake of CO₂ required for photosynthesis, and subsequent chlorophyll damage. Moreover, photosynthetic pigment loss is also associated with ROS accumulation, which damages chloroplasts [313].

Concerning the effects of LED light on chlorophyll synthesis in thyme, *Chl-a* levels were higher in primed than control plants (WPG vs WCG). This positive effect is also reflected in the response to drought and the smaller reduction in plant pigments (DPG vs DCG). Table 5-1 shows that the drought-associated reductions in *Chl-a* and *ChlT* levels (Figure 6-5.a, 6-5.b, 6-5.g, and 6-5.h) were smaller in primed than in control plants (DPG vs DCG), the difference reaching significance in six out of ten of the ecotypes under study (T1, T2, T3, T7, T8, and T10).

In contrast to our results, several studies have observed a negative effect of high-intensity light on chlorophyll content in plants. Specifically, in the case of *Salvia officinalis*, levels of photosynthetic pigments tended to be higher in shaded plants than those exposed to full sunlight [380]. Further, Araújo et al.[381] reported that levels of plant pigments such as *Chl-a*, *Chl-b*, *ChlT*, and *Car* in *Aeollanthus suaveolens* (*Lamiaceae*) decreased significantly with increasing light intensity.

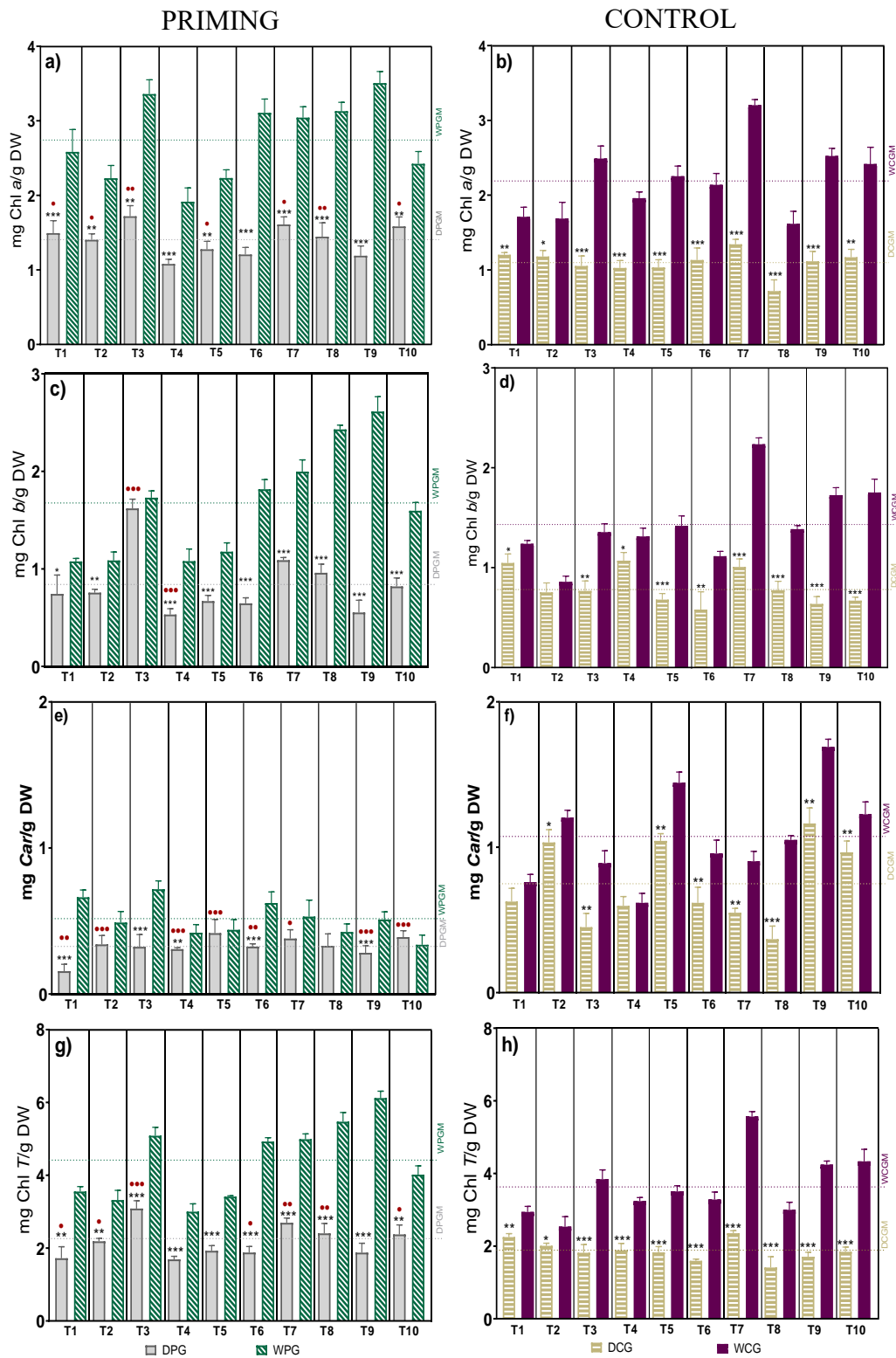


Figure 6-5 Content of (a, b) chlorophyll a (Chl-a), (c, d) chlorophyll b (Chl-b), (e, f) carotenoids (Car), and (g, h) total chlorophyll (ChIT) in primed and control *Thymus zygis* plants and their response to drought-stress and watering treatments. The results are expressed as the mean \pm SD. Asterisks indicate significant between-group differences by watering regime: well-watered control group (WCG) vs drought-stressed control group (DCG) and well-watered primed group (WPG) vs drought-stressed primed group (DPG); (*p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001). Filled circles indicate significant differences between primed and control groups - DPG and DCG (•p < 0.05, ••p < 0.01, and •••p < 0.001). Abbreviations: WCGM: well-watered control group mean; DCGM: drought-stressed control group mean; WPGM: well-watered primed group mean, and DPGM: drought-stressed primed group mean.

On the other hand, Wu et al.[382] reported that Chl-a and ChlT content in cigar tobacco increases under high-intensity light, while Chl-b is not significantly affected. These authors suggested that low-intensity light impairs the photosynthetic machinery, which is consistent with our results. Considering that *T. zygis* is a xerophytic shrub that grows spontaneously in sunny places [128], it makes sense that higher light irradiance leads to the synthesis of Chl-a to avoid the damage produced by the excess of light. To the best of our knowledge, our study is the first to have explored the effect of intense light on photosynthetic pigment content in *T. zygis*, and hence, further studies are required to confirm these statements.

As in Wu et al.[382], no such effect was evident for Chl-b synthesis, just two out of ten of the thyme ecotypes showing alterations in this chlorophyll form, with concentrations being higher in primed plants than in controls in T3, but lower in T4.

Regarding the effect of LED light on the synthesis of carotenoids, we observed significantly lower levels of these pigments in primed ecotypes than in their corresponding control clones (WPG vs WCG). Although the drought stress was associated with reductions in the concentration of these pigments regardless of the pre-treatment, the effect was more marked in unprimed plants, with significantly lower levels in eight ecotypes in the DCG and just five in the DPG.

Besides being light-absorbing pigments, carotenoids have a photoprotective role by quenching ROS formed in chloroplasts and also help to dissipate the harmful excess excitation energy under stress conditions [383], which could explain a higher rate of degradation after their exposure to a long period of light stress. Such oxidative degradation has been correlated with the formation of oxidized molecules including β -cyclocitral, an apocarotenoid that acts as a signaling molecule in the upregulation of oxidative stress-response genes, enhancing the acclimation of plants to high-intensity light environments [236].

Our finding that high-intensity light priming leads to an increase in the content of Chl-a but not of Car is consistent with Beisel et al.[384], who reported higher rates of Chl-a turnover than those registered for Car in mature leaves of *Arabidopsis*, exposed to high light irradiance for 2 weeks. With respect to the influence of light priming on the response to drought, a positive effect was observed, with smaller reductions in the photosynthetic pigments content in DPG than DCG plants.

6.3.4 Phenolic profile and antioxidant activity

6.3.4.1 Phenolic profile

Aromatic-medicinal plants are a natural source of phenolic compounds, which are considered to play an important role in plant resistance to abiotic stress. It is well known that their presence increases under stress situations, favoring the adaptive capacity of plants [385]. Among abiotic stresses, light intensity plays an important role in the mechanisms of the stress-induced production of bioactive compounds [386]. Thus, we analyzed the phenolic profile and how it is affected by two consecutive episodes of abiotic stress.

HPLC-DAD allowed the identification and quantification of 19 major phenolic compounds in *T. zygis* subsp. *gracilis*, (Table 6-2), which have been previously described in other *Thymus* species, including *T. zygis* subsp. *zygis* [128] and *Thymbra capitata* (L.) [387]

In red thyme, it is well known that the essential oil chemotype is defined by thymol [125], which is present in concentrations that range from 55% to 64%. Related to the non-volatile phenolic profile, rosmarinic acid has been defined as the major phenolic acid quantified in this species, as reported by Silva et al.[128]. In agreement with these results, and taking into account that the profile shown in Table 6-2 corresponds to the phenolic extracts of plants not previously distilled, thymol, and rosmarinic acid were the major phenolic compounds quantified in red thyme.

Table 6-2 Quantitative phenolic profile of light-primed and control *Thymus zygis* ssp. *gracilis* ecotypes and their response to drought-stress and watering treatments. *The results are expressed as the mean \pm SD. Different letters indicate a significant difference between treatments per component at $p < 0.05$. **Abbreviations:** L: LED, WR: watering regime, P: primed, C: control, D: drought-stressed, W: well-watered, DW: dry weight

Phenolic compound (mg g ⁻¹ DW)	L	WR	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
Salvianic acid	P	D	0.40 \pm 0.03 ^b	0.74 \pm 0.07 ^a	0.62 \pm 0.12 ^b	0.55 \pm 0.02 ^b	0.44 \pm 0.04 ^{bc}	0.49 \pm 0.04 ^b	0.56 \pm 0.09 ^b	0.57 \pm 0.05 ^b	0.62 \pm 0.06 ^b	0.63 \pm 0.09 ^b
		W	0.31 \pm 0.05 ^c	0.32 \pm 0.08 ^b	0.24 \pm 0.02 ^c	0.28 \pm 0.03 ^c	0.36 \pm 0.10 ^c	0.32 \pm 0.05 ^a	0.32 \pm 0.08 ^c	0.59 \pm 0.06 ^b	0.30 \pm 0.07 ^c	0.38 \pm 0.08 ^c
	C	D	0.52 \pm 0.05 ^a	0.69 \pm 0.0 ^a	0.80 \pm 0.10 ^a	0.64 \pm 0.06 ^a	0.79 \pm 0.10 ^a	0.64 \pm 0.10 ^a	0.92 \pm 0.07 ^a	0.78 \pm 0.05 ^a	0.88 \pm 0.02 ^a	0.96 \pm 0.10 ^a
		W	0.31 \pm 0.06 ^c	0.45 \pm 0.09 ^b	0.21 \pm 0.04 ^c	0.25 \pm 0.02 ^c	0.54 \pm 0.07 ^b	0.32 \pm 0.07 ^a	0.29 \pm 0.08 ^c	0.55 \pm 0.09 ^b	0.28 \pm 0.08 ^c	0.35 \pm 0.06 ^c
Protocatechuic acid	P	D	0.02 \pm 0.003	0.05 \pm 0.009 ^a	0.05 \pm 0.008 ^a	0.05 \pm 0.009 ^{ab}	0.04 \pm 0.01 ^a	0.04 \pm 0.007 ^{ab}	0.03 \pm 0.007 ^{ab}	0.02 \pm 0.003 ^b	0.04 \pm 0.004	0.03 \pm 0.004
		W	0.02 \pm 0.003	0.05 \pm 0.009 ^a	0.04 \pm 0.009 ^{ab}	0.04 \pm 0.004 ^{ab}	0.02 \pm 0.001 ^b	0.03 \pm 0.001 ^b	0.02 \pm 0.008 ^{bc}	0.02 \pm 0.008 ^b	0.03 \pm 0.001	0.03 \pm 0.003
	C	D	0.02 \pm 0.003	0.04 \pm 0.004 ^{ab}	0.04 \pm 0.009 ^{ab}	0.05 \pm 0.009 ^a	0.04 \pm 0.002 ^a	0.05 \pm 0.005 ^a	0.03 \pm 0.005 ^a	0.04 \pm 0.006 ^a	0.04 \pm 0.001	0.03 \pm 0.010
		W	0.02 \pm 0.006	0.02 \pm 0.006 ^b	0.03 \pm 0.004 ^b	0.04 \pm 0.006 ^b	0.02 \pm 0.003 ^b	0.03 \pm 0.006 ^b	0.02 \pm 0.003 ^c	0.02 \pm 0.008 ^b	0.03 \pm 0.008	0.03 \pm 0.003
5-O-feruloylquinic acid	P	D	0.02 \pm 0.007 ^a	0.08 \pm 0.008 ^a	0.06 \pm 0.005 ^a	0.03 \pm 0.007 ^{ab}	0.02 \pm 0.004 ^d	0.06 \pm 0.009 ^b	0.05 \pm 0.005 ^a	0.02 \pm 0.001 ^c	0.07 \pm 0.008 ^b	0.02 \pm 0.003 ^b
		W	0.02 \pm 0.002 ^b	0.04 \pm 0.004 ^c	0.05 \pm 0.006 ^b	0.03 \pm 0.003 ^{ab}	0.09 \pm 0.010 ^a	0.06 \pm 0.005 ^b	0.03 \pm 0.006 ^b	0.06 \pm 0.008 ^b	0.07 \pm 0.001 ^b	0.03 \pm 0.008 ^b
	C	D	0.02 \pm 0.003 ^b	0.07 \pm 0.005 ^b	0.05 \pm 0.006 ^{ab}	0.04 \pm 0.007 ^a	0.04 \pm 0.001 ^c	0.08 \pm 0.009 ^a	0.06 \pm 0.006 ^a	0.10 \pm 0.009 ^a	0.09 \pm 0.009 ^a	0.05 \pm 0.009 ^a
		W	0.01 \pm 0.004 ^b	0.03 \pm 0.007 ^c	0.05 \pm 0.005 ^b	0.03 \pm 0.005 ^b	0.08 \pm 0.008 ^b	0.05 \pm 0.006 ^b	0.03 \pm 0.007 ^b	0.01 \pm 0.009 ^c	0.07 \pm 0.008 ^b	0.03 \pm 0.007 ^b
Vicenin-2	P	D	0.75 \pm 0.06 ^a	0.59 \pm 0.03 ^a	0.47 \pm 0.03 ^a	0.42 \pm 0.04 ^a	0.37 \pm 0.02 ^{ab}	0.44 \pm 0.04 ^a	0.34 \pm 0.04 ^a	0.64 \pm 0.04 ^a	0.51 \pm 0.02 ^{ab}	0.40 \pm 0.04
		W	0.52 \pm 0.03 ^b	0.47 \pm 0.05 ^b	0.36 \pm 0.03 ^b	0.40 \pm 0.03 ^{ab}	0.32 \pm 0.02 ^{bc}	0.38 \pm 0.02 ^a	0.31 \pm 0.02 ^{ab}	0.42 \pm 0.02 ^c	0.46 \pm 0.02 ^{bc}	0.39 \pm 0.04
	C	D	0.49 \pm 0.03 ^{bc}	0.43 \pm 0.03 ^b	0.37 \pm 0.03 ^b	0.42 \pm 0.01 ^a	0.42 \pm 0.03 ^a	0.44 \pm 0.04 ^a	0.33 \pm 0.03 ^a	0.50 \pm 0.01 ^b	0.52 \pm 0.02 ^a	0.43 \pm 0.04
		W	0.45 \pm 0.01 ^d	0.41 \pm 0.04 ^b	0.34 \pm 0.03 ^b	0.36 \pm 0.03 ^b	0.29 \pm 0.04 ^c	0.32 \pm 0.03 ^b	0.26 \pm 0.03 ^b	0.42 \pm 0.01 ^c	0.43 \pm 0.03 ^c	0.42 \pm 0.04
Caffeic acid	P	D	0.12 \pm 0.03 ^b	0.21 \pm 0.02 ^b	0.20 \pm 0.03 ^a	0.16 \pm 0.02	0.17 \pm 0.01 ^c	0.20 \pm 0.02 ^{ab}	0.15 \pm 0.02 ^b	0.13 \pm 0.01 ^b	0.15 \pm 0.02 ^c	0.20 \pm 0.03 ^b
		W	0.15 \pm 0.01 ^{ab}	0.18 \pm 0.02 ^{bc}	0.14 \pm 0.01 ^b	0.17 \pm 0.02	0.28 \pm 0.03 ^a	0.20 \pm 0.01 ^{ab}	0.16 \pm 0.02 ^b	0.23 \pm 0.04 ^a	0.23 \pm 0.04 ^a	0.20 \pm 0.03 ^b
	C	D	0.18 \pm 0.02 ^a	0.29 \pm 0.03 ^a	0.24 \pm 0.02 ^a	0.17 \pm 0.01	0.25 \pm 0.02 ^a	0.22 \pm 0.03 ^a	0.22 \pm 0.03 ^a	0.25 \pm 0.02 ^a	0.20 \pm 0.02 ^{ab}	0.25 \pm 0.02 ^a
		W	0.12 \pm 0.02 ^b	0.16 \pm 0.02 ^c	0.15 \pm 0.03 ^b	0.15 \pm 0.02	0.21 \pm 0.01 ^b	0.19 \pm 0.02 ^b	0.14 \pm 0.03 ^b	0.22 \pm 0.04 ^a	0.16 \pm 0.03 ^{bc}	0.16 \pm 0.02 ^c
Ferulic acid	P	D	0.02 \pm 0.005 ^{bc}	0.03 \pm 0.001 ^a	0.01 \pm 0.004 ^b	0.02 \pm 0.001	0.02 \pm 0.002 ^b	0.02 \pm 0.001 ^b	0.02 \pm 0.003 ^b	0.02 \pm 0.003 ^b	0.02 \pm 0.002 ^b	0.02 \pm 0.002 ^b
		W	0.03 \pm 0.002 ^a	0.03 \pm 0.003 ^{ab}	0.02 \pm 0.004 ^a	0.03 \pm 0.004	0.02 \pm 0.001 ^b	0.02 \pm 0.004 ^a	0.03 \pm 0.002 ^a	0.03 \pm 0.003 ^b	0.03 \pm 0.003 ^{ab}	0.03 \pm 0.006 ^a
	C	D	0.02 \pm 0.003 ^{ab}	0.03 \pm 0.003 ^{ab}	0.02 \pm 0.003 ^a	0.02 \pm 0.005	0.02 \pm 0.003 ^a	0.03 \pm 0.001 ^a	0.03 \pm 0.003 ^a	0.03 \pm 0.003 ^a	0.03 \pm 0.004 ^a	0.02 \pm 0.003 ^b
		W	0.01 \pm 0.001 ^c	0.03 \pm 0.004 ^b	0.02 \pm 0.005 ^{ab}	0.02 \pm 0.004	0.01 \pm 0.003 ^b	0.02 \pm 0.003 ^{ab}	0.02 \pm 0.002 ^b	0.02 \pm 0.002 ^b	0.03 \pm 0.002 ^{ab}	0.02 \pm 0.004 ^b
Luteolin-7-O-glucoside	P	D	1.22 \pm 0.03 ^a	0.73 \pm 0.07 ^a	0.59 \pm 0.05 ^a	0.56 \pm 0.07 ^a	0.35 \pm 0.03 ^b	0.38 \pm 0.03 ^b	0.32 \pm 0.05 ^{ab}	0.87 \pm 0.08 ^a	0.65 \pm 0.08 ^a	0.37 \pm 0.06 ^b
		W	0.84 \pm 0.09 ^b	0.49 \pm 0.09 ^b	0.41 \pm 0.08 ^b	0.39 \pm 0.08 ^b	0.61 \pm 0.07 ^a	0.46 \pm 0.05 ^a	0.31 \pm 0.06 ^{ab}	0.57 \pm 0.08 ^b	0.50 \pm 0.03 ^b	0.66 \pm 0.09 ^a
	C	D	0.67 \pm 0.09 ^c	0.47 \pm 0.04 ^b	0.45 \pm 0.04 ^b	0.56 \pm 0.03 ^a	0.41 \pm 0.04 ^b	0.42 \pm 0.06 ^{ab}	0.41 \pm 0.09 ^a	0.98 \pm 0.07 ^a	0.64 \pm 0.02 ^a	0.34 \pm 0.08 ^b

Phenolic compound (mg g ⁻¹ DW)	L	WR	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
Luteolin-4-O-glucoside	P	W	0.73±0.09 ^{bc}	0.52±0.09 ^b	0.42±0.09 ^b	0.46±0.06 ^{ab}	0.58±0.04 ^a	0.42±0.04 ^{ab}	0.25±0.03 ^b	0.60±0.08 ^b	0.50±0.02 ^b	0.64±0.09 ^a
		D	0.29±0.05 ^a	0.33±0.06 ^a	0.16±0.04	0.28±0.04 ^a	0.12±0.02	0.13±0.02	0.16±0.03 ^a	0.22±0.02 ^{ab}	0.25±0.02 ^a	0.11±0.01
	C	W	0.10±0.02 ^b	0.11±0.03 ^c	0.15±0.01	0.08±0.02 ^b	0.11±0.01	0.13±0.03	0.07±0.02 ^b	0.22±0.02 ^{ab}	0.19±0.01 ^b	0.10±0.02
		D	0.14±0.03 ^b	0.19±0.03 ^b	0.14±0.03	0.13±0.02 ^b	0.15±0.03	0.13±0.02	0.12±0.02 ^{ab}	0.25±0.07 ^a	0.20±0.04 ^b	0.10±0.02
Rosmarinic acid	P	W	0.13±0.02 ^b	0.18±0.02 ^{bc}	0.1±0.02	0.12±0.03 ^b	0.14±0.03 ^a	0.13±0.02	0.09±0.02 ^b	0.16±0.04 ^b	0.19±0.02 ^b	0.09±0.02
		D	6.31±1.10 ^a	8.96±1.20 ^a	5.28±0.73	10.16±0.27 ^a	11.73±1.39 ^a	4.55±1.10 ^b	8.00±0.53 ^a	5.01±0.48 ^b	9.33±0.83 ^a	4.42±1.03 ^b
	C	W	3.20±0.97 ^{bc}	7.71±1.29 ^a	5.31±1.03	3.20±0.60 ^c	2.90±0.52 ^d	3.85±0.48 ^b	2.56±1.07 ^b	4.75±1.36 ^b	5.80±0.18 ^b	4.27±0.99 ^b
		D	4.68±1.29 ^{ab}	7.57±0.96 ^a	5.08±0.28	6.79±0.22 ^b	9.67±1.04 ^b	6.38±1.03 ^a	7.41±1.24 ^a	8.40±1.09 ^a	9.49±1.27 ^a	6.19±1.14 ^a
Caffeic acid methyl ether	P	W	2.79±0.62 ^c	5.20±1.18 ^c	4.95±0.97	3.10±0.49 ^c	6.65±1.04 ^c	3.68±0.47 ^b	2.37±0.74 ^b	2.81±0.85 ^c	5.71±0.35 ^b	4.33±0.92 ^{ab}
		D	1.07±0.12 ^a	0.81±0.09 ^a	0.52±0.08	1.62±0.19 ^a	0.48±0.05 ^{bc}	0.20±0.04 ^{ab}	1.19±0.10 ^a	1.02±0.04 ^a	0.99±0.09 ^a	0.82±0.07 ^a
	C	W	0.17±0.07 ^c	0.48±0.06 ^b	0.44±0.09	0.17±0.05 ^c	0.45±0.04 ^c	0.15±0.04 ^b	0.09±0.03 ^c	0.08±0.03 ^c	0.30±0.04 ^c	0.13±0.03 ^c
		D	0.43±0.08 ^b	0.36±0.03 ^c	0.36±0.09	0.71±0.09 ^b	0.88±0.09 ^a	0.28±0.09 ^a	0.75±0.08 ^b	0.82±0.08 ^b	0.66±0.05 ^b	0.41±0.06 ^b
Eriodictyol	P	W	0.13±0.04 ^c	0.32±0.06 ^c	0.36±0.06	0.18±0.04 ^c	0.60±0.07 ^b	0.14±0.02 ^b	0.09±0.04 ^c	0.08±0.04 ^c	0.32±0.05 ^c	0.14±0.04 ^c
		D	0.31±0.04	0.24±0.02 ^a	0.20±0.02	0.21±0.02	0.19±0.04 ^b	0.18±0.03	0.25±0.05	0.24±0.03 ^b	0.17±0.01 ^b	0.21±0.02 ^b
	C	W	0.30±0.04	0.21±0.03 ^{ab}	0.22±0.04	0.21±0.05	0.76±0.07 ^a	0.19±0.03	0.28±0.07	0.99±0.09 ^a	0.25±0.04 ^a	0.28±0.08 ^b
		D	0.24±0.06	0.19±0.02 ^b	0.18±0.01	0.21±0.02	0.20±0.02 ^b	0.18±0.04	0.29±0.07	0.82±0.08 ^a	0.19±0.05 ^b	0.62±0.09 ^a
Luteolin	P	W	0.30±0.05	0.21±0.03 ^{ab}	0.21±0.04	0.23±0.06	0.70±0.01 ^a	0.17±0.03	0.28±0.03	0.95±0.07 ^a	0.27±0.01 ^a	0.57±0.08 ^a
		D	0.20±0.02 ^a	0.27±0.05 ^a	0.21±0.01 ^a	0.28±0.07 ^a	0.13±0.01 ^b	0.16±0.01 ^b	0.18±0.02 ^b	0.17±0.03 ^b	0.15±0.02 ^b	0.15±0.04 ^b
	C	W	0.18±0.01 ^{ab}	0.15±0.04 ^c	0.13±0.03 ^c	0.19±0.03 ^b	0.14±0.02 ^b	0.12±0.02 ^c	0.10±0.02 ^c	0.15±0.01 ^b	0.14±0.02 ^b	0.16±0.03 ^b
		D	0.15±0.01 ^{bc}	0.11±0.01 ^c	0.10±0.01 ^c	0.17±0.03 ^b	0.16±0.05 ^{ab}	0.22±0.03 ^a	0.23±0.03 ^a	0.16±0.03 ^b	0.21±0.02 ^a	0.15±0.02 ^b
Quercetin	P	W	0.12±0.04 ^c	0.20±0.03 ^b	0.18±0.03 ^b	0.21±0.03 ^{ab}	0.19±0.02 ^a	0.15±0.03 ^{bc}	0.15±0.02 ^b	0.23±0.03 ^a	0.23±0.03 ^a	0.30±0.02 ^a
		D	0.08±0.01 ^{bc}	0.11±0.02 ^a	0.06±0.02 ^a	0.09±0.02	0.02±0.01 ^c	0.06±0.01 ^{ab}	0.06±0.02 ^{ab}	0.08±0.02 ^a	0.04±0.01 ^b	0.05±0.01 ^b
	C	W	0.10±0.01 ^a	0.07±0.01 ^b	0.06±0.00 ^{ab}	0.08±0.02	0.10±0.01 ^a	0.04±0.01 ^c	0.05±0.01 ^b	0.07±0.01 ^{ab}	0.09±0.01 ^a	0.12±0.02 ^a
		D	0.06±0.01 ^c	0.03±0.01 ^c	0.02±0.01 ^c	0.11±0.02	0.07±0.01 ^b	0.08±0.02 ^a	0.07±0.01 ^a	0.05±0.01 ^b	0.07±0.00 ^a	0.05±0.01 ^b
Apigenin-O-hexuronide	P	W	0.09±0.02 ^{ab}	0.07±0.01 ^b	0.08±0.01 ^a	0.10±0.01	0.09±0.01 ^{ab}	0.04±0.01 ^{bc}	0.08±0.02 ^a	0.06±0.02 ^{ab}	0.09±0.02 ^a	0.14±0.02 ^a
		D	0.22±0.06 ^b	0.25±0.04 ^{ab}	0.25±0.03	0.25±0.05 ^c	0.21±0.02 ^b	0.35±0.02 ^b	0.12±0.02 ^c	0.13±0.02 ^b	0.16±0.01 ^b	0.27±0.01 ^c
	C	W	0.27±0.02 ^b	0.24±0.02 ^b	0.22±0.02	0.40±0.05 ^b	0.25±0.03 ^{ab}	0.34±0.03 ^b	0.29±0.04 ^a	0.25±0.05 ^a	0.39±0.02 ^a	0.36±0.04 ^b
		D	0.20±0.03 ^b	0.25±0.01 ^{ab}	0.22±0.02	0.18±0.04 ^c	0.27±0.03 ^a	0.30±0.05 ^b	0.20±0.03 ^b	0.11±0.01 ^b	0.18±0.04 ^b	0.21±0.03 ^c
Naringenin	P	D	0.42±0.06 ^a	0.29±0.04 ^a	0.26±0.03	0.57±0.02 ^a	0.29±0.03 ^a	0.42±0.04 ^a	0.33±0.04 ^a	0.32±0.06 ^a	0.45±0.06 ^a	0.42±0.07 ^a

Phenolic compound (mg g ⁻¹ DW)	L	WR	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
Chrysoeriol-O-hexuronide	C	W	0.32±0.06	0.52±0.05 ^a	0.55±0.06 ^{ab}	0.33±0.07 ^{ab}	0.29±0.05	0.49±0.07 ^a	0.54±0.04 ^a	0.48±0.03 ^a	0.69±0.06 ^a	0.38±0.04 ^a
		D	0.28±0.02	0.37±0.02 ^c	0.43±0.06 ^b	0.32±0.05 ^{ab}	0.24±0.05	0.34±0.07 ^b	0.45±0.07 ^a	0.16±0.01 ^c	0.48±0.07 ^b	0.24±0.07 ^b
		W	0.31±0.07	0.49±0.05 ^{ab}	0.48±0.04 ^{ab}	0.35±0.07 ^a	0.23±0.01	0.47±0.05 ^a	0.48±0.06 ^a	0.52±0.03 ^a	0.74±0.01 ^a	0.36±0.05 ^a
	P	D	0.23±0.02 ^b	0.25±0.03 ^a	0.19±0.02	0.15±0.03 ^c	0.20±0.01 ^{bc}	0.31±0.02 ^{ab}	0.06±0.01 ^c	0.14±0.03 ^b	0.13±0.01 ^c	0.24±0.01 ^c
		W	0.24±0.03 ^b	0.18±0.01 ^b	0.17±0.02	0.30±0.04 ^b	0.18±0.02 ^c	0.29±0.02 ^{bc}	0.31±0.03 ^a	0.21±0.03 ^a	0.35±0.02 ^b	0.28±0.02 ^b
		D	0.16±0.02 ^c	0.22±0.02 ^a	0.19±0.01	0.17±0.03 ^c	0.23±0.02 ^a	0.25±0.04 ^c	0.20±0.02 ^b	0.07±0.02 ^c	0.16±0.03 ^c	0.17±0.03 ^d
Olivetol	C	W	0.33±0.02 ^a	0.22±0.02 ^a	0.18±0.02	0.42±0.03 ^a	0.22±0.03 ^{ab}	0.39±0.03 ^a	0.30±0.04 ^a	0.26±0.04 ^a	0.42±0.04 ^a	0.34±0.03 ^a
		D	2.21±0.13 ^a	1.62±0.12 ^a	1.57±0.13 ^a	1.53±0.14 ^a	1.45±0.18 ^a	1.67±0.13 ^a	1.06±0.14 ^{ab}	1.88±0.08 ^a	1.51±0.07 ^a	1.72±0.12 ^a
		W	1.40±0.08 ^b	1.67±0.11 ^a	1.27±0.09 ^b	1.23±0.12 ^{ab}	0.69±0.07 ^c	1.26±0.07 ^b	1.23±0.16 ^a	1.15±0.14 ^b	1.60±0.08 ^a	1.18±0.15 ^b
	P	D	1.23±0.07 ^{bc}	1.01±0.05 ^b	1.07±0.08 ^c	1.32±0.04 ^{ab}	0.95±0.11 ^b	1.14±0.08 ^{bc}	0.95±0.08 ^b	1.06±0.03 ^b	1.06±0.10 ^b	1.03±0.06 ^b
		W	1.15±0.12 ^c	1.14±0.10 ^b	1.11±0.09 ^{bc}	1.14±0.10 ^b	0.59±0.01 ^c	1.07±0.08 ^c	1.00±0.05 ^b	1.09±0.13 ^b	1.55±0.10 ^a	1.08±0.13 ^b
		D	0.62±0.04 ^a	0.51±0.06 ^a	0.64±0.07 ^a	0.34±0.07 ^b	0.35±0.06 ^c	0.61±0.07 ^a	0.42±0.04 ^c	0.51±0.09 ^c	0.49±0.04 ^b	0.53±0.03 ^b
Carvacrol	C	W	0.46±0.02 ^b	0.54±0.09 ^a	0.58±0.06 ^{ab}	0.46±0.09 ^{ab}	0.82±0.04 ^a	0.59±0.06 ^a	0.65±0.07 ^a	0.51±0.10 ^c	0.71±0.05 ^a	0.65±0.08 ^a
		D	0.42±0.04 ^b	0.40±0.02 ^b	0.38±0.07 ^c	0.42±0.08 ^{ab}	0.36±0.06 ^c	0.41±0.09 ^b	0.53±0.02 ^b	0.93±0.06 ^a	0.49±0.05 ^b	0.64±0.08 ^a
		W	0.41±0.07 ^b	0.49±0.08 ^{ab}	0.53±0.03 ^b	0.49±0.09 ^a	0.69±0.04 ^b	0.51±0.04 ^{ab}	0.72±0.08 ^a	0.68±0.10 ^b	0.66±0.03 ^a	0.64±0.06 ^{ab}
Thymol	P	D	5.45±0.36	6.29±0.84 ^a	7.54±0.37 ^a	3.50±0.52 ^b	3.97±0.93 ^c	7.92±0.89 ^{ab}	5.46±0.52 ^c	5.16±0.77 ^b	6.20±0.27 ^b	6.33±0.48 ^b
		W	5.25±0.30	7.40±0.85 ^a	7.51±0.68 ^a	6.06±0.81 ^a	12.22±0.56 ^a	8.60±0.65 ^a	9.23±0.89 ^a	15.48±1.57 ^a	9.58±0.84 ^a	6.30±0.77 ^b
	C	D	4.83±0.76	4.95±0.36 ^b	4.73±0.95 ^b	5.65±0.44 ^a	4.14±0.73 ^c	5.03±0.80 ^c	7.39±0.48 ^b	13.55±0.45 ^a	6.30±0.61 ^b	5.14±0.97 ^b
		W	4.85±0.85	6.77±0.94 ^a	6.89±0.36 ^a	5.69±0.81 ^a	10.43±0.52 ^b	6.91±0.51 ^b	10.12±1.01 ^a	15.25±1.14 ^a	8.90±0.46 ^a	9.33±0.67 ^a

As a general view of the influence that light priming followed by severe drought stress may have on the secondary metabolic response, principal component analysis was used to assess the relative distribution of the thyme ecotypes according to their phenolic components (Figure 6-6).

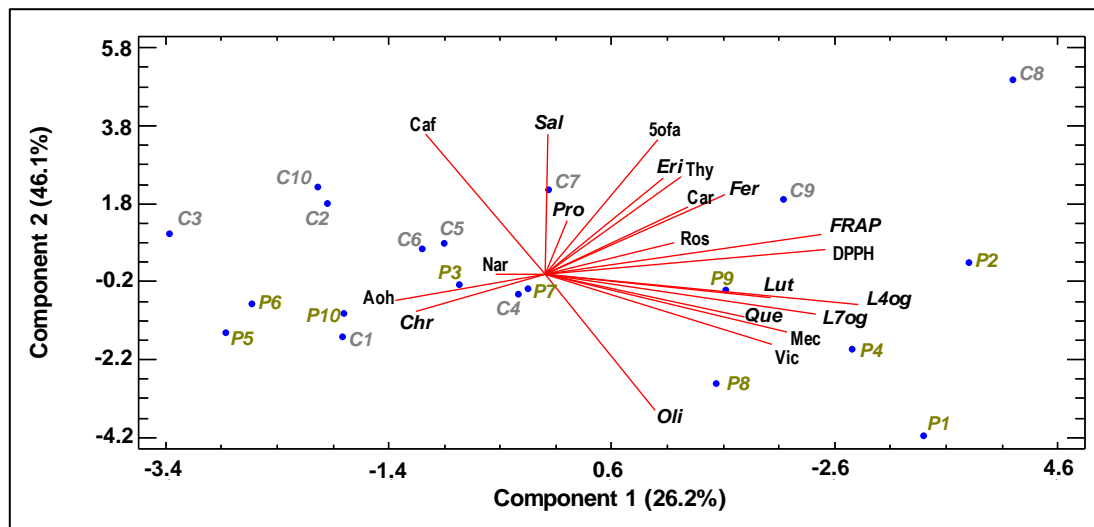


Figure 6-6 Principal component analysis for the phenolic compounds in primed and control *Thymus zygis* plants and their response under drought conditions; the colored letters (●P, primed and ●C, control) represent each ecotype (1 to 10). The red arrows indicate eigenvectors characterized by the direction and the strength of the variable relative to components 1 and 2. **Abbreviations:** Sal, Salvianic acid; Pro, Protocatechuic acid; Sofa, 5-O-feruloylquinic acid; Vic, Vicenin; Caf, Caffeic acid; Fer, Ferulic acid; L7og, Luteolin-7-glucoside; L4og, Luteolin-4-O-glucoside; Ros, Rosmarinic acid; Mec, caffeic acid methyl ether; Eri, Eriodictyol; Lut, Luteolin; Que, Quercetin; Aoh, Apigenin-O-hexuronide; Nar, Naringenin; Chr, Chrysoeriol-O-hexuronide; Oli, Olivetol; Car, Carvacrol; Thy, Thymol.

The first three principal axes accounted for 26.2%, 46.1%, and 62.4% of the total variance; although the results are plotted according to the first two components (Figure 6-6). At the same time, the first principal component was correlated positively with the projection of luteolin-4-O-glucoside content (0.4), and negatively with apigenin-O-hexuronide content (-0.2). On the other hand, the second principal component showed a positive correlation with salvianic acid and caffeic acid concentrations (0.4 in both cases), and a negative correlation with olivetol content (-0.4). It is also interesting to note that two groups are clustered by the pre-treatment received, the PG plants (lower part of Figure 5) showing a higher content of olivetol, and CG plants (upper part of Figure 5) a greater richness in salvianic and caffeic acids.

Table 6-2 presents the results concerning the effect of drought (DCG vs WCG) on the concentration of each phenolic component and the possible influence of light priming on the response of the ecotypes to drought (DPG vs DCG). Notably, the compounds that showed significantly higher concentrations after drought stress were phenolic acids, namely, salvianic, protocatechuic, 5-O-feruloylquinic, rosmarinic, caffeic, and ferulic acids, and caffeic acid methyl ether. By contrast, this exposure to water deficit was associated with lower concentrations of the

phenolic monoterpenes thymol and carvacrol as well as the flavonoids naringenin, apigenin, luteolin, quercetin, and chrysoeriol.

According to Albergaria et al.[333], under drought stress, medicinal plants up-regulate the synthesis of active components that protect them against ROS and prevent damage to the photosynthetic apparatus. Nonetheless, Mahajan et al.[170] state that there is no general pattern related to whether the production of secondary metabolites increases, decreases, or even remains unchanged after an episode of stress in plants, this varying with the species under study, the type of stress and its intensity over time [388].

Our results suggest that it not only depends on these factors but also on the chemical moiety of the components quantified. In relation to this, Mohammadi et al.[327] reported that AMP redirect secondary metabolites toward the synthesis of specific phenolic components to survive under stressful conditions. That is the case of rosmarinic acid, a component for which an increase in concentration was observed, as described above, in agreement with the findings of Luna et al. [166] in fresh sweet basil.

The stimulation of the phenylpropanoid biosynthetic pathway, inducing the synthesis of phenolic acids such as caffeic, ferulic, and rosmarinic acids, is a mechanism of plant tolerance against abiotic stress [389]. This could explain why the concentration of these components in red thyme increases after severe drought stress. It is also interesting to highlight that, in some plant species, there is a strong increase in the concentration of more effective defense molecules at the expense of others [388]. This is the case of flavonoids, which as described above, appear at lower concentrations in ecotypes exposed to severe drought stress.

Regarding the volatile fraction, our results agree with the findings of Askary et al.[390], who have reported pronounced reductions in thymol synthesis in *T. vulgaris* and *T. daenensis* cultivated under water deficit conditions. Morshedloo et al.[9] pointed out that thymol synthase is regulated by the CYP71D178, CYP71D179, and CYP71D182 genes in oregano and thyme. Subsequently, Yousefzadeh et al.[391] described a down-regulation of CYP71D179 and CYP71D182 under mild drought stress in *T. armeniacus*, and a similar down-regulation could explain why the thymol content decreased in red thyme subjected to a lack of water. Nonetheless, further studies are needed to confirm this hypothesis in *T. zygis* subsp. *gracilis*.

Regarding the possible influence of the light pre-treatment on the phenolic profile response to drought stress (DPG vs DCG), a significant positive effect was observed for caffeic acid methyl ether. On the other hand, although the levels of salvianic, *O*-feruloylquinic, ferulic, and caffeic acids also increased after the drought stress (DPG vs WPG), concentrations in the DPG were lower

than those in the DCG plants. This could imply that the priming has a down-regulatory effect on the synthesis of these phenolic acids, their concentrations being similar in WPG and WCG plants. Again, however, further studies are needed to confirm this hypothesis.

By contrast, even though concentrations of protocatechuic acid, rosmarinic acid, vicenin, thymol, carvacrol, naringenin, apigenin, and luteolin were modified by drought stress, the synthesis of these phenolic components did not seem to be affected by light priming. That is, in these cases, no statistically significant differences were detected between DPG and DCG concentrations.

As observed in Table 6-2, no significant changes in concentrations were observed after the drought stress in eriodictyol, olivetol, luteolin-4-*O*-glucoside, or luteolin-7-*O*-glucoside (WCG vs DCG). Nonetheless, it is interesting to note the positive effect that light priming may have on the synthesis of olivetol. In particular, in ecotypes subjected to priming and drought, its concentration was significantly higher than that in their corresponding controls (DPG vs WPG and DPG vs DCG).

Light intensity is known to regulate photosynthesis, and thus, the accumulation of ROS during electron transport. The joint action of ROS and antioxidants determines antioxidant status in tissues and cells, which, in turn, regulate the adjustment of metabolism to harsh environmental conditions [364]. The effect of light intensity on the secondary metabolism of plants was described in a review by Borbély et al.[364]. To our knowledge, however, no previous studies have investigated the priming effect of high-intensity LED light on the response of the secondary metabolism of *Thymus* species to drought. Borbély et al.[296] reported an accumulation of rosmarinic acid following a drought episode in *Melissa officinalis* (var. Isfahan) primed using various different wavelengths of LED light. According to these authors, this accumulation was related to the light treatment rather than the drought stress, unlike in our experiments with *T. zygis*. Notably, thyme and lemon balm both belong to the *Lamiaceae* family, and hence, these results suggest that - even within a family - plant response to abiotic stresses varies with species, among other factors.

6.3.4.2 Antioxidant activity

Results concerning the antioxidant status of the red thyme ecotypes, measured in terms of DPPH radical scavenging activity and FRAP value, are shown in Table 6-3. Overall, comparing WCG vs DCG, the drought stress did not have a clear effect on the antioxidant status in these plants.

Table 6-3 Antioxidant activity of ten ecotypes of *Thymus zygis* ssp. *gracilis* by methods (a) DPPH assay and (b) ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. *The results are expressed as the mean \pm SD. Different letters indicate a significant difference between treatments by component at $p < 0.05$. **Abbreviations:** L: LED, WR: watering regime, P: priming, C: control, D: drought, W: well-watered

Antioxidant activity	L	WR	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
FRAP $\mu\text{mol Fe}^{+2} \text{g}^{-1} \text{DW}$	P	D	425.6 \pm 34.0 ^a	518.9 \pm 27.1 ^a	334.6 \pm 38.7 ^b	510.7 \pm 39.2 ^a	340.8 \pm 24.0 ^d	346.8 \pm 37.3	368.4 \pm 33.1 ^b	343.4 \pm 12.7 ^b	494.5 \pm 21.5 ^a	355.3 \pm 33.6 ^{bc}
		W	323.1 \pm 34.9 ^b	388.3 \pm 39.1 ^b	405.9 \pm 33.4 ^a	400.9 \pm 48.9 ^b	541.7 \pm 38.9 ^b	401.1 \pm 35.6	284.7 \pm 26.1 ^c	405.3 \pm 48.7 ^{ab}	374.9 \pm 34.5 ^b	391.7 \pm 52.8 ^{ab}
	C	D	283.0 \pm 39.3 ^b	393.3 \pm 29.1 ^b	317.0 \pm 31.5 ^b	288.2 \pm 23.6 ^c	427.3 \pm 32.8 ^c	353.8 \pm 36.1	444.6 \pm 39.7 ^a	485.9 \pm 34.7 ^a	515.6 \pm 32.9 ^a	302.5 \pm 33.4 ^c
		W	269.3 \pm 25.2 ^b	463.4 \pm 40.1 ^a	354.5 \pm 40.1 ^{ab}	406.9 \pm 35.2 ^b	634.3 \pm 31.1 ^a	372.5 \pm 32.6	296.7 \pm 30.2 ^c	381.8 \pm 62.3 ^b	415.0 \pm 4.3 ^b	453.6 \pm 41.9 ^a
DPPH $\mu\text{mol TE g}^{-1} \text{DW}$	P	D	125.9 \pm 10.1 ^a	138.6 \pm 8.9 ^a	114.7 \pm 5.2 ^a	137.6 \pm 10.1 ^a	86.4 \pm 7.8 ^b	90.0 \pm 8.4 ^{bc}	112.3 \pm 11.1 ^a	102.0 \pm 9.6	129.8 \pm 6.1 ^{ab}	112.1 \pm 6.7
		W	76.5 \pm 9.5 ^b	103.0 \pm 11.4 ^b	97.9 \pm 11.5 ^b	92.0 \pm 10.2 ^c	104.6 \pm 18.3 ^{ab}	86.4 \pm 5.3 ^c	64.7 \pm 6.4 ^b	109.9 \pm 14.6	107.2 \pm 8.9 ^c	120.9 \pm 13.4
	C	D	89.9 \pm 7.5 ^b	100.9 \pm 9.7 ^b	88.5 \pm 5.3 ^b	119.3 \pm 2.0 ^b	117.8 \pm 8.3 ^a	122.4 \pm 11.5 ^a	128.0 \pm 16.6 ^a	120.8 \pm 15.1	143.7 \pm 14.8 ^a	103.8 \pm 13.0
		W	78.0 \pm 1.1 ^b	117.7 \pm 9.6 ^b	97.1 \pm 9.9 ^b	95.6 \pm 12.6 ^c	127.6 \pm 23.6 ^a	102.9 \pm 8.4 ^b	85.6 \pm 10.8 ^b	109.1 \pm 16.3	119.9 \pm 12.1 ^{bc}	115.6 \pm 17.6

Specifically, in both *in vitro* antioxidant assays, antioxidant levels were higher in the drought-stressed plants in just three ecotypes (T4, T6, and T7 for DPPH; T7, T8, and T9 for FRAP). In addition, in the FRAP assay, antioxidant capacity was significantly poorer in drought-stressed plants in four ecotypes.

In contrast, a priming effect on the response to the lack of water (WPG vs DPG) was more evident with the DPPH technique than the FRAP assay. Specifically, as can be seen in Table 6-3, the antiradical capacity was significantly higher after drought stress in the primed plants in six ecotypes (T1, T2, T3, T4, T7, and T9), while the direction and magnitude of changes in FRAP values varied across the ecotypes, with no clear pattern attributable to priming. These findings agree with those of Ahmadi et al.[296], who detected an increment in DPPH in plants of the Ilam variety of lemon balm grown under LED-light conditions and then subjected to drought stress, concluding that the response in antioxidant activity depends on the levels of phenolic compounds including rosmarinic acid content.

Our results confirm that the variations in the antioxidant status of *T. zygis* after priming and drought stress is ecotype dependent. In particular, only ecotypes T7 and T9 showed an enhanced antioxidant status, in both DPPH and FRAP *in vitro* assays, and this could be related to their higher concentrations of salvianic acid, rosmarinic acid, and caffeic acid methyl ether.

6.4 Conclusions

The drought response of ten ecotypes of red thyme, survivors of a long-lasting high-intensity LED light treatment, was studied in terms of changes in physiological parameters and the response of the antioxidant defense system. As a general pattern, drought generated a decrease in the RWC, together with an increase in proline and ABA levels. This oxidative status leads to a higher rate of degradation of photosynthetic pigments and tocochromanols, favoring the synthesis of phenolic acids, but not flavonoids or the phenolic terpene thymol. These changes did not improve the antioxidant status, and consistent with this, there was a higher level of lipid peroxidation. On the other hand, although the response was ecotype dependent, the effect of light priming was evident in most of the ecotypes, this treatment modifying the concentrations of components including ABA and Car, both decreasing their presence in leaves, while levels of Chl-a and ChlT were markedly higher after this light stress. Nonetheless, the antioxidant defense system did not show any significant variation, levels of tocochromanols, phenolic components, antioxidant status, and lipid peroxidation being similar in these pre-treated ecotypes to those in their corresponding controls. Beyond this, the effect of light priming on plant response to severe

drought stress was positive in that, despite the damaging effect of the lack of water, less degradation was observed in the primed plants than in their corresponding controls. Specifically, although the mean ABA concentrations were similar, it seems that the levels of proline needed to maintain the osmotic adjustment were lower in pre-treated plants. Moreover, there was clear improvement in the antioxidant defense system, with lower levels of degradation in photosynthetic pigments and tocopherols, and higher concentrations of the phenolics olivetol and caffeic acid methyl ether, which was reflected in a lower level of lipid peroxidation. Based on the results of our study, the exposure to excess light as a priming treatment may generate a “memory” effect in plants that helps them to overcome subsequent severe stress in *T. zygis* subsp. *gracilis*.

Capítulo 7 Conclusiones

Conclusions

En esta tesis doctoral se han abordado diferentes metodologías para evaluar la respuesta fisiológica de *Lavandula latifolia* Medik. y *Thymus zygis* ssp. *gracilis* frente al estrés hídrico y lumínico, lo que ha permitido ampliar el conocimiento de la respuesta fisiológica de dos especies con una gran importancia económica para la industria agroalimentaria. En consecuencia, se han llegado a las siguientes conclusiones:

Primera: La respuesta de las plantas de espliego (*Lavandula latifolia* Medik) en estado incipiente a una sequía severa, es dependiente del ecotipo. Aunque no se detectó una relación directa entre el estado hídrico y el daño oxidativo en esta especie, los valores del perfil fenólico, en relación con la actividad antioxidante y la respuesta fisiológica de las plantas, podrían ser una herramienta útil y adecuada para identificar individuos con características deseables que puedan desarrollarse en condiciones adversas y superar escenarios con escasez de agua.

Segunda: El comportamiento agronómico y el rendimiento en aceite esencial durante tres años consecutivos, de ecotipos de espliego preseleccionados como tolerantes a la sequía, sugieren que el aceite producido por esta especie podría estar predeterminado genéticamente, puesto que existe un incremento en la producción de biomasa que no siempre está relacionado con un aumento significativo en el rendimiento de aceite esencial.

Tercera: En respuesta a las duras condiciones climáticas mediterráneas, donde existen episodios severos de escasez de agua, el espliego redirige su metabolismo secundario en favor de la síntesis de linalol, a la vez que enriquece la composición fenólica y mantiene activo el sistema antioxidante en el tiempo. Este efecto supone una mejora importante en la calidad de producciones y en la viabilidad del cultivo.

Cuarta: Bajo condiciones severas de sequía *Thymus zygis* ssp. *gracilis*, a pesar de sufrir importantes daños oxidativos, mantiene la calidad de sus producciones al no mermar el contenido de timol en su aceite esencial.

Quinta: Las mejoras inducidas en el sistema de defensa antioxidante en plantas de *Thymus zygis* ssp. *gracilis* bajo condiciones de estrés hídrico permiten concluir que, el pretratamiento con alta intensidad lumínica sobre plantas incipientes de tomillo rojo mejora significativamente la tolerancia a la sequía en esta especie.

Sexta: La selección de ecotipos de espliego y tomillo rojo con mayor tolerancia a la sequía y riqueza en componentes con elevada actividad antioxidante facilita la apertura de futuras líneas de investigación centradas en la mejora genética de ambas especies. Esta diferenciación permitirá la inclusión de nuevas variedades en la producción de aditivos de interés para la industria alimentaria.

In this doctoral thesis, different methodologies have been approached to evaluate the physiological response of *Lavandula latifolia* Medik. and *Thymus zygis* ssp. *gracilis* against water and light stress, which has allowed to expand the knowledge of the physiological response of two species with great economic importance for the agri-food industry. Consequently, the following conclusions have been achieved:

First. The response of immature spike lavender (*Lavandula latifolia* Medik) plants to drought was ecotype dependent. Although no relationship was detected between hydric status and oxidative damage in this species, values concerning the phenolic profile, in relation to the antioxidant activity, and the physiological responses of the plants could be an adequate tool to identify immature individuals with desirable traits that can grow in adverse conditions and overcome sceneries with severe lack of water.

Second. The agronomical behavior and the essential oil yield during three consecutive years of drought-tolerant spike lavender ecotypes pre-selected, suggested that the EOs produced by this species could be genetically predetermined since an increase in phytomass production is not always related to a significant enhancement in EOs production.

Third. In response to the harsh Mediterranean climatic conditions, under episodes of severe lack of water, spike lavender redirects its secondary metabolism favoring the synthesis of linalool and enriching the phenolic fraction, maintaining this antioxidant system active over time.

Fourth: Under severe drought conditions *Thymus zygis* spp. *gracilis*, despite suffering significant oxidative damage, maintains the quality of its production by not reducing the thymol content in its essential oil.

Fifth: The improvements induced in the antioxidant defense system in *Thymus zygis* spp. *gracilis* under water stress conditions, allow us to conclude that pretreatment with high light intensity on incipient red thyme plants significantly improves drought tolerance in this species.

Sixth: The selection of ecotypes of spike lavender and red thyme with greater tolerance to drought and richness in components with high antioxidant activity facilitates the opening of future lines of research focused on the genetic breeding of both species. This differentiation will allow the inclusion of new varieties in the production of additives of interest to the food industry.

Capítulo 8 Resumen

Abstract

Resumen

Las plantas aromático-medicinales (PAM) además de tener un gran interés botánico y ecológico por su riqueza filogenética y florística representan uno de los cultivos de secano de mayor interés para las industrias alimentarias, cosméticas y farmacéuticas. Sin embargo, son posiblemente las grandes desconocidas de la agricultura española, a pesar de que en nuestro país y más concretamente en la Región de Murcia, se da el cultivo de especies autóctonas con gran interés y proyección comercial como espliego y tomillo rojo.

La producción y demanda de PAM se ha incrementado exponencialmente a nivel mundial en los últimos años, no solo por su importancia económica, sino también dada su rusticidad, por su posible uso para la revalorización de suelos no urbanos en zonas rurales desfavorecidas. Ambos factores suponen un importante revulsivo para el desarrollo de programas de mejora que ayuden a incrementar la viabilidad de estos cultivos.

En este nuevo escenario, una de las principales amenazas a las que se enfrenta la agricultura mundial es el inminente cambio climático que, según modelos matemáticos y estadísticos, se prevé que incrementará en los próximos años causando cambios en la climatología mundial como el aumento de olas de calor y episodios de sequía severa.

A pesar de que los cultivos de secano poseen mecanismos para contrarrestar los efectos negativos de estos cambios adversos, el estrés por sequía es el factor medioambiental más amenazante para la agricultura, con mayor prevalencia en el tiempo lo que lo convierte en un factor limitante para la producción de los cultivos en zonas áridas como la Región de Murcia. Por lo tanto, dentro de los programas de mejora en las producciones de PAM es importante incluir la mayor tolerancia a la sequía como factor de selección en aras de garantizar la sostenibilidad de estas producciones. Con base en esto, el objetivo principal de este proyecto de Tesis se centró en la necesidad de seleccionar y multiplicar ecotipos de PAM con mayor resistencia a las condiciones de escasez hídrica, que permitan obtener nuevas variedades con las que establecer plantaciones con elevado rendimiento y calidad propias de la zona en las cuales son cultivadas.

Como punto de partida, para el establecimiento de parcelas experimentales homogéneas, se pusieron a punto protocolos de micropropagación para la producción masiva de plantas de espliego y tomillo idénticas genéticamente. Paralelamente, para la obtención de variedades resistentes a la sequía se prepararon tres ensayos diferentes.

En el primer ensayo, "Evaluation of the physiological parameters in *Lavandula latifolia* Medik. under water deficit for preselection of elite drought-resistant plants" publicado en la revista *Industrial Crops & Products*, plantas incipientes de espliego fueron sometidas a dos episodios

consecutivos de sequía. Posteriormente, los clones de los ecotipos supervivientes (SL1 a SL8) se asignaron aleatoriamente a dos grupos homogéneos. Un grupo fue regado a capacidad de campo (como control) y el otro fue sometido a estrés hídrico durante dos meses. En las hojas de las plantas control y estresadas, se midieron parámetros fisiológicos entre los que se incluyen: el contenido relativo de agua (% RWC), el potencial hídrico (Ψ_{WP}), la prolina y el ácido abscísico. También se exploró el sistema de defensa antioxidante de las plantas, mediante el análisis de antioxidantes no enzimáticos (α -tocoferol, plastocromanol-8), peroxidación lipídica (MDA) y pigmentos fotosintéticos (clorofilas a y b, y carotenoides). Se determinó el perfil polifenólico y se analizó por primera vez su correspondiente actividad antioxidante en las primeras etapas de crecimiento de esta especie. Bajo el tratamiento de sequía, los valores de los parámetros fisiológicos fueron similares en todos los ecotipos y cambiaron a medida que avanzaba la deshidratación. Sin embargo, la respuesta de la defensa antioxidante a este estrés fue variable dependiendo del ecotipo en estudio. Como patrón general, hubo una reducción en la concentración de pigmentos fotosintéticos. Aunque no se detectaron diferencias estadísticas en el contenido de α -tocoferol y PC-8, en la mayoría de los casos, los valores de MDA aumentaron significativamente después del episodio de sequía. En el perfil polifenólico, el ácido p-cumárico-glucósido y el ácido rosmarínico-3-O-glucósido fueron los componentes mayoritarios cuantificados, describiéndose por primera vez en esta especie el ácido salviánico y el ácido O-cumárico. En cuanto a la respuesta de estos compuestos fenólicos al estrés hídrico, las concentraciones de la mayoría de los polifenoles disminuyeron, a excepción del ácido rosmarínico, cuya concentración después del estrés fue mayor en tres de los ocho ecotipos en estudio. Este incremento se reflejó en una mayor capacidad antioxidante *in vitro*. Estos hallazgos sugieren que *Lavandula latifolia*, a pesar de ser un cultivo con escasa demanda hídrica, sufrió los efectos negativos de la sequía, a la vez que mostró algunas estrategias para contrarrestar los efectos negativos de la deshidratación.

El siguiente paso fue comparar el comportamiento en condiciones reales de cultivo de los espliegos tolerantes a la sequía versus dos espliegos de un cultivo comercial. En el segundo ensayo, “Agronomic evaluation and chemical characterization of *Lavandula latifolia* Medik. under the semiarid conditions of the Spanish Southeast” publicado en la revista *Plants*, se cultivaron en una parcela experimental clones de los dos ecotipos preseleccionados, junto con clones de dos plantas comerciales (control). Los principales resultados confirmaron un aumento en la producción de biomasa y aceite esencial con la edad de la planta. El quimiotipo de aceite esencial definido por 1,8-cineol, linalol y alcanfor se mantuvo en el tiempo, pero se detectó una disminución de 1,8-cineol en beneficio del linalol. En el perfil fenólico se identificaron 14

componentes, siendo el ácido salviánico y un derivado del ácido rosmarínico los principales compuestos cuantificados. Estos extractos fenólicos mostraron una potente capacidad antioxidante *in vitro*, característica que se mantuvo estable durante el segundo y tercer año de cultivo.

Finalmente, para la obtención de ecotipos resistentes a sequía de *Thymus zygis* ssp. *gracilis*, se aplicó un exceso de luz LED para generar una posible "memoria" que permita una mejora en la respuesta a una sequía severa. En el tercer experimento, "Physiological evaluation of *Thymus zygis* ssp. *gracilis* against drought, in ecotypes pretreated with high intensity LED light", se evaluaron los parámetros fisiológicos, incluidos el contenido relativo de agua y los niveles de prolina y ácido abscísico, el contenido de pigmentos fotosintéticos y tococromanoles, los perfiles fenólicos, la capacidad antioxidante y la peroxidación lipídica, en 1600 clones procedentes de 20 ecotipos. Los resultados confirmaron el efecto negativo de la sequía en el estado general de la planta, pero también mostraron un efecto positivo del pretratamiento con luz LED, lo que mejoró la respuesta del sistema antioxidante en el tomillo rojo. Específicamente, el pretratamiento con alta intensidad lumínica se asoció con una menor reducción en el contenido de pigmentos fotosintéticos y tococromanoles, un mayor contenido de éter dimetílico del ácido cafeico y una reducción de la peroxidación lipídica en respuesta a la sequía.

Con base a los resultados anteriores se puede concluir que la variabilidad intraespecífica de *L. latifolia* en la respuesta a la sequía puede considerarse una herramienta útil para la preselección de ecotipos con mayor resistencia a un estrés hídrico, los cuales, al ser evaluados en condiciones reales de campo alcanzaron un buen nivel de producción y rendimiento después del segundo año de establecimiento del cultivo.

Por otra parte, se evidenció que un pretratamiento con alta intensidad lumínica pudo generar una posible "memoria" que permitió a *T. zygis* a superar un episodio de sequía severa; por lo tanto, el estrés lumínico podría considerarse como una tecnología útil para la selección de ecotipos de tomillo rojo con mayor resistencia a la sequía.

Abstract

Aromatic-medicinal plants (PAM), in addition to having great botanical and ecological interest due to their phylogenetic and floristic richness, represent one of the dryland crops of greatest interest for the food, cosmetics and pharmaceutical industries. However, they are possibly the great unknowns of Spanish agriculture, despite the fact that in our country and more specifically in the Region of Murcia, native species with great interest and commercial projection such as spike lavender and red thyme are cultivated.

The production and demand for PAM have increased exponentially worldwide in recent years, not only due to its economic importance but also due to its possible use for the revaluation of non-urban land in disadvantaged rural areas. Both factors represent an essential stimulus for the development of improvement programs that help increase the viability of these crops.

In this new scenario, one of the main threats facing global agriculture is the imminent climate change, which according to mathematical and statistical models, is expected to rise in the coming years, causing changes in global climate such as increased waves of heat and episodes of severe drought.

Even though rainfed crops have mechanisms to counteract the negative effects of these adverse changes, drought is the most threatening environmental factor for agriculture, with a higher prevalence over time, which makes it a limiting factor for crop production in arid areas such as the Region of Murcia. Therefore, within PAM production improvement programs, it is important to include greater tolerance to drought as a selection factor to guarantee the sustainability of these productions. Based on this, the main objective of this thesis project focused on the need to select and multiply PAM ecotypes with greater resistance to water scarcity conditions, which allows for obtaining new varieties which be able to establish plantations with high yield and quality, typical of the area in which they are grown.

As a starting point, for the establishment of homogeneous experimental plots, micropropagation protocols were developed for the mass production of genetically identical spike lavender and thyme plants. At the same time to obtain varieties resistant to drought, three different trials were prepared.

In the first essay, "Evaluation of the physiological parameters in *Lavandula latifolia* Medik. under water deficit for preselection of elite drought-resistant plants" published in the journal *Industrial Crops & Products*, incipient spike lavender plants were subjected to two consecutive episodes of drought. Subsequently, clones of the surviving ecotypes (SL1 to SL8) were randomly assigned to two homogeneous groups. One group was irrigated at field capacity (as a control) and the other

was subjected to water stress for two months. In the leaves of control and stressed plants, physiological parameters were measured, including relative water content (% RWC), water potential (Ψ_{WP}), proline, and abscisic acid.

The next step was to compare the behavior in real growing conditions of drought-tolerant spike lavender versus two spike lavenders from a commercial crop. In the second essay, "Agronomic evaluation and chemical characterization of *Lavandula latifolia* Medik. under the semiarid conditions of the Spanish Southeast" published in the journal *Plants*, clones of the two preselected ecotypes were grown in an experimental plot, along with clones of two commercial plants (control). The main results confirmed an increase in biomass and essential oil production with plant age. The essential oil chemotype defined by 1,8-cineole, linalool and camphor was maintained over time, but a decrease in 1,8-cineole was detected in favor of linalool. In the phenolic profile, 14 components were identified, with salviatic acid and a derivative of rosmarinic acid being the main quantified compounds. These phenolic extracts showed a powerful antioxidant capacity *in vitro*, a characteristic that remained stable during the second and third year of cultivation.

Finally, to obtain drought-resistant ecotypes of *Thymus zygis* ssp. *gracilis*, an excess of LED light was applied to generate a possible "memory" that allows an improvement in the response to severe drought. In the third experiment, "Physiological evaluation of *Thymus zygis* ssp. *gracilis* against drought, in ecotypes pretreated with high intensity LED light", physiological parameters were evaluated, including relative water content and levels of proline and abscisic acid, content of photosynthetic pigments and tocopherols, phenolic profiles, antioxidant capacity and lipid peroxidation in 1600 clones from 20 ecotypes. The results confirmed the negative effect of drought on the general condition of the plant, but also showed a positive effect of pretreatment with LED light, which improved the response of the antioxidant system in red thyme. Specifically, pretreatment with high light intensity was associated with a lower reduction in the content of photosynthetic pigments and tocopherols, a higher content of caffeic acid dimethyl ether, and a reduction in lipid peroxidation in response to drought.

Based on the previous results, it can be concluded that the intraspecific variability of *L. latifolia* in the response to drought can be considered a useful tool for the preselection of ecotypes with greater resistance to water stress, which, when evaluated in real field conditions, the crops reached a good level of production and yield after the second year of crop establishment.

On the other hand, it was evident that a pretreatment with high light intensity could generate a possible "memory" that allowed *T. zygis* to overcome an episode of severe drought; Therefore,

light stress could be considered as a useful technology for the selection of red thyme ecotypes with greater resistance to drought.

Capítulo 9 Difusión de Resultados

Results dissemination

Artículos en revistas

Journal articles

- **Cáceres-Cevallos, G.**, C. Martínez-Conesa, I. García-Aledo, M. Quílez-Simón, P. Romero-Espinar, and M. J. Jordán. 2023. “*Lavandula Latifolia* Medik. Grown with Led Emitting Diode Light Technology, an Initial Approach.” *Acta Horticulturae* 1358:303–9. doi: 10.17660/ActaHortic.2023.1358.39.
- Lozano-Pérez, A. A., **G. Cáceres-Cevallos**, C. Martínez-Conesa, M. Quílez-Simón, I. García-Aledo, P. Romero-Espinar, C. Power, and M. J. Jordán. 2023. “Preliminary Study of Encapsulation in Silk Fibroin Nanoparticles of Phenolic Compounds from *Salvia Lavandulifolia* Vahl. Distillation Residues.” *Acta Horticulturae* 1358:235–41. doi: 10.17660/ActaHortic.2023.1358.31
- **Cáceres-Cevallos, Gustavo J.**, Alfonso A. Albacete-Moreno, Federico Ferreres, Ángel Gil-Izquierdo, and María J. Jordán. 2023. “Evaluation of the Physiological Parameters in *Lavandula Latifolia* Medik. under Water Deficit for Preselection of Elite Drought-Resistant Plants.” *Industrial Crops & Products* 199:116742. doi: 10.1016/j.indcrop.2023.116742.
- **Cáceres-Cevallos, Gustavo J.**, María Quílez, Gonzalo Ortiz de Elguea-Culebras, Raúl Sánchez-Vioque, and María J. Jordán. 2023. “Agronomic Evaluation and Chemical Characterization of *Lavandula Latifolia* Medik. under the Semiarid Conditions of the Spanish Southeast.” *Plants* 12:1986. doi: <https://doi.org/10.3390/plants12101986>.

Congresos y Jornadas

Congresses and conferences

- **TÍTULO/TITLE:** PRELIMINARY STUDY OF THE PHYSIOLOGICAL RESPONSE OF SPIKE LAVENDER (*Lavandula latifolia* Medik) AGAINST DROUGHT STRESS.
Autores/Authors: CÁCERES-CEVALLOS, G., Martínez-Conesa, C., Albacete A., Romero, P., Quílez, M.¹, García, I.¹, and Jordán, M.J.¹
Lugar/Place: XXIV Meeting of the Spanish Society of Plant Biology, XVII Spanish Portuguese Congress on Plant Biology. BP 2021. 7th- 8th July 2021
Formato/Format: Póster – Online
ISBN: 978-84-124005-2-6

- **TÍTULO/TITLE:** Establecimiento de un protocolo de micropropagación de dos ecotipos de espliego (*Lavandula latifolia* Medik.) de interés en la industria alimentaria.
Autores/Authors: Gustavo CÁCERES-CEVALLOS, Cristina Martínez-Conesa, Pascual Romero-Espinar, María Quílez-Simón, Inmaculada García-Aledo y María José Jordán.
Lugar/Place: XIV Reunión de la Sociedad Española de Cultivo *In Vitro* de Tejidos Vegetales (SECIVTV). 8, 9 y 10 de septiembre de 2021. El Ejido, Almería.
Formato/Format: Póster – Presencial
ISBN: 978-84-09-33391-2
- **TÍTULO/TITLE:** Establecimiento de un protocolo de micropropagación de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) a partir de semillas germinadas *in vitro*.
Autores/Authors: Gustavo CÁCERES-CEVALLOS¹, Cristina Martínez-Conesa, Pascual Romero-Espinar, María Quílez-Simón, Inmaculada García-Aledo y María José Jordán.
Lugar/Place: XIV Reunión de la Sociedad Española de Cultivo *In Vitro* de Tejidos Vegetales (SECIVTV). 8, 9 y 10 de septiembre de 2021. El Ejido, Almería.
Formato/Format: Póster – Presencial
ISBN: 978-84-09-33391-2
- **TÍTULO/TITLE:** Selección y multiplicación de plantas aromático medicinales élite resistentes a sequía y de interés para la industria agroalimentaria.
Autores/Authors: Gustavo CÁCERES-CEVALLOS
Lugar/Place: VI JORNADAS DOCTORALES. UNIVERSIDAD DE MURCIA. 24 de junio de 2021.
Formato/Format: Comunicación oral – Online
- **TÍTULO/TITLE:** Importancia de la biotecnología en la multiplicación de plantas aromático-medicinales. Garantía de producción homogénea a gran escala
Autores/Authors: Gustavo CÁCERES-CEVALLOS
Lugar/Place: "Situación y perspectivas del cultivo de Plantas Aromáticas y Medicinales en la Región de Murcia " JORNADAS INFORMATIVAS. Servicio de Formación y Transferencia Tecnológica (SFTT). 25 de noviembre de 2021.
Formato/Format: Comunicación oral – Online

- **TÍTULO/TITLE:** *Lavandula latifolia* Medik. grown with led emitting diode light technology. An initial approach.
Autores/Authors: Gustavo CÁCERES-CEVALLOS¹, C. Martínez-Conesa, I. García-Aledo, M. Quílez-Simón, P. Romero-Espinar and M. Jordán
Lugar/Place: 31st International Horticultural Congress IHC 2022. Angers, Francia. 14 – 20 de agosto de 2022.
Formato/Format: Comunicación oral – Presencial
ISBN: 978-94-6261-357-7

- **TÍTULO/TITLE:** Preliminary study of encapsulation in silk fibroin nanoparticles of phenolic compounds from *Salvia lavandulifolia* Vahl. distillation residues.
Autores/Authors: A. Lozano-Pérez, Gustavo CÁCERES-CEVALLOS, C. Martínez-Conesa, M. Quílez-Simón, I. García-Aledo, P. Romero-Espinar, C. Power and M.J. Jordán
Lugar/Place: 31st International Horticultural Congress IHC 2022. Angers, Francia. 14 – 20 de agosto de 2022.
Formato/Format: Póster – Presencial
ISBN: 978-94-6261-357-7

- **TÍTULO/TITLE:** Evaluation of the physiological parameters in *Lavandula latifolia* Medik. under water deficit for preselection of elite drought-resistant plants.
Autores/Authors: Gustavo CÁCERES-CEVALLOS¹, Alfonso A. Albacete-Moreno, Federico Ferreres, Ángel Gil-Izquierdo, María J. Jordán.
Lugar/Place: Iberian Plant Biology 2023. Braga - Universidad do Minho. 09 – 12 de Julio de 2023
Formato/Format: Poster – Presencial
ISBN: 978-989-33-4917-5

Capítulo 10 Referencias

References

1. Namdeo, A.G. *Cultivation of Medicinal and Aromatic Plants*; Elsevier, 2018; ISBN 9780081021040.
2. Sofowora, A.; Ogunbodede, E.; Onayade, A. The Role and Place of Medicinal Plants in the Strategies for Disease Prevention. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **2013**, *10*, 210–229, doi:10.4314/ajtcam.v10i5.2.
3. Lubbe, A.; Verpoorte, R. Cultivation of Medicinal and Aromatic Plants for Specialty Industrial Materials. *Ind. Crop. Prod.* **2011**, *34*, 785–801, doi:10.1016/j.indcrop.2011.01.019.
4. Petrovska, B.B. Historical Review of Medicinal Plants' Usage. *Pharmacogn. Rev.* **2012**, *6*, 1–5, doi:10.4103/0973-7847.95849.
5. Jan, S.; Abbas, N. *Conservation and Cultivation of Herbs: Challenge and Policy Making*; 2018; ISBN 9780081022276.
6. Fitzgerald, M.; Heinrich, M.; Booker, A. Medicinal Plant Analysis: A Historical and Regional Discussion of Emergent Complex Techniques. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 1–14, doi:10.3389/fphar.2019.01480.
7. Preparation, E.S.C. (ESCO) W.G. on B. and B. *Advice on the EFSA Guidance Document for the Safety Assessment of Botanicals and Botanical Preparations Intended for Use as Food Supplements, Based on Real Case Studies*; 2009; Vol. 7;.
8. Council of Europe *European Pharmacopoeia*; fourth ed.; 2002; ISBN 9287151024.
9. Morshedloo, M.R.; Craker, L.E.; Salami, A.; Nazeri, V.; Sang, H.; Maggi, F. Effect of Prolonged Water Stress on Essential Oil Content, Compositions and Gene Expression Patterns of Mono- and Sesquiterpene Synthesis in Two Oregano (*Origanum Vulgare* L.) Subspecies. *Plant Physiol. Biochem.* **2017**, *111*, 119–128, doi:10.1016/j.plaphy.2016.11.023.
10. Raut, J.S.; Karuppayil, S.M. A Status Review on the Medicinal Properties of Essential Oils. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *62*, 250–264, doi:10.1016/j.indcrop.2014.05.055.
11. Oliveira, M.S. de; Almeida, M.M.; Salazar, M. de L.A.R.; Pires, F.C.S.; Bezerra, F.W.F.; Cunha, V.M.B.; Cordeiro, R.M.; Urbina, G.R.O.; Silva, M.P. da; Silva, A.P.S. e; et al. Potential of Medicinal Use of Essential Oils from Aromatic Plants. *Potential Essent. Oils* **2018**, 1–20, doi:10.5772/intechopen.78002.
12. Rehman, R.; Asif Hanif, M.; Mushtaq, Z.; Mochona, B.; Q, X. Biosynthetic Factories of

- Essential Oils: The Aromatic Plants. *Nat. Prod. Chem. Res.* **2016**, *04*, 1000227, doi:10.4172/2329-6836.1000227.
13. Butnariu, M.; Sarac, I. Journal of Biotechnology and Biosafety. *J. Biotechnol. Biomed. Sci.* **2018**, *3*, 35–43, doi:10.14302/issn.2576.
 14. Bakari, M.; Yusuf, H.O. Utilization of Locally Available Binders for Densification of Rice Husk for Biofuel Production. *Banat. J. Biotechnol.* **2018**, *18*, 47–55, doi:DOI: 10.7904/2068-4738-IX(19)-47.
 15. Ben Farhat, M.; Jordán, M.J.; Chaouch-Hamada, R.; Landoulsi, A.; Sotomayor, J.A. Phenophase Effects on Sage (*Salvia Officinalis* L.) Yield and Composition of Essential Oil. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* **2016**, *3*, 87–93, doi:10.1016/j.jarmap.2016.02.001.
 16. Khashi u Rahman, M.; Zhou, X.; Wu, F. The Role of Root Exudates, CMNs, and VOCs in Plant–Plant Interaction. *J. Plant Interact.* **2019**, *14*, 630–636, doi:10.1080/17429145.2019.1689581.
 17. Fernández-Sestelo, M.; Carrillo, J. Environmental Effects on Yield and Composition of Essential Oil in Wild Populations of Spike Lavender (*Lavandula Latifolia* Medik.). *Agriculture* **2020**, *10*, 626, doi:10.3390/agriculture10120626.
 18. Jordán, M.J.; Quílez, M.; Luna, M.C.; Bekhradi, F.; Sotomayor, J.A.; Sánchez-Gómez, P.; Gil, M.I. Influence of Water Stress and Storage Time on Preservation of the Fresh Volatile Profile of Three Basil Genotypes. *Food Chem.* **2017**, *221*, 169–177, doi:10.1016/j.foodchem.2016.10.059.
 19. Sadgrove, N.J.; Padilla-González, G.F.; Phumthum, M. Fundamental Chemistry of Essential Oils and Volatile Organic Compounds, Methods of Analysis and Authentication. *Plants* **2022**, *11*, 789, doi:10.3390/plants11060789.
 20. Nde, D.B.; Anuanwen, C.F. Optimization Methods for the Extraction of Vegetable Oils: A Review. *Processes* **2020**, *8*, doi:10.3390/pr8020209.
 21. Aziz, Z.A.A.; Ahmad, A.; Setapar, S.H.M.; Karakucuk, A.; Azim, M.M.; Lokhat, D.; Rafatullah, M.; Ganash, M.; Kamal, M.A.; Ashraf, G.M. Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review. *Curr. Drug Metab.* **2018**, *19*, 1100–1110, doi:10.2174/1389200219666180723144850.
 22. Fahim, M.; Shrivastava, B.; Shrivastava, A.K.; Ibrahim, M.; Parveen, R.; Ahmad, S. Review on Extraction Methods, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Volatile Oils. *Ann. Phytomedicine An Int. J.* **2017**, *6*, 5–46, doi:10.21276/ap.2017.6.2.2.

23. Yildirim, A.; Cakir, A.; Mavi, A.; Yalcin, M.; Fauler, G.; Taskesenligil, Y. The Variation of Antioxidant Activities and Chemical Composition of Essential Oils of *Teucrium Orientale* L. Var. *Oriente* during Harvesting Stages. *Flavour Fragr. J.* **2004**, *19*, 367–372, doi:10.1002/ffj.1343.
24. Ciompi, S.; Gentili, E.; Guidi, L.; Soldatini, G.F. The Effect of Nitrogen Deficiency on Leaf Gas Exchange and Chlorophyll Fluorescence Parameters in Sunflower. **1996**, *118*, 177–184.
25. Nelson, G.C.; Rosegrant, M.W.; Koo, J.; Robertson, R.; Sulser, T.; Zhu, T.; Ringler, C.; Msangi, S.; Palazzo, A.; Batka, M.; et al. CAMBIO CLIMÁTICO: El Impacto En La Agricultura y Los Costos de Adaptación. *Cambio climático* **2009**, 30.
26. Sovová, H. Modeling the Supercritical Fluid Extraction of Essential Oils from Plant Materials. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1250*, 27–33, doi:10.1016/j.chroma.2012.05.014.
27. Lucchesi, M.E.; Chemat, F.; Smadja, J. Solvent-Free Microwave Extraction of Essential Oil from Aromatic Herbs: Comparison with Conventional Hydro-Distillation. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1043*, 323–327, doi:10.1016/j.chroma.2004.05.083.
28. Filly, A.; Fernandez, X.; Minuti, M.; Visinoni, F.; Cravotto, G.; Chemat, F. Solvent-Free Microwave Extraction of Essential Oil from Aromatic Herbs: From Laboratory to Pilot and Industrial Scale. *Food Chem.* **2014**, *150*, 193–198, doi:10.1016/j.foodchem.2013.10.139.
29. Jordán, M.J.; Lax, V.; Rota, M.C.; Lorán, S.; Sotomayor, J.A. Relevance of Carnosic Acid, Carnosol, and Rosmarinic Acid Concentrations in the in Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Rosmarinus Officinalis* (L.) Methanolic Extracts. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 9603–9608, doi:10.1021/jf302881t.
30. Panić, M.; Radić Stojković, M.; Kraljić, K.; Škevin, D.; Radojčić Redovniković, I.; Gaurina Srček, V.; Radošević, K. Ready-to-Use Green Polyphenolic Extracts from Food by-Products. *Food Chem.* **2019**, *283*, 628–636, doi:10.1016/j.foodchem.2019.01.061.
31. Šojić, B.; Pavlić, B.; Zeković, Z.; Tomović, V.; Ikonić, P.; Kocić-Tanackov, S.; Džinić, N. The Effect of Essential Oil and Extract from Sage (*Salvia Officinalis* L.) Herbal Dust (Food Industry by-Product) on the Oxidative and Microbiological Stability of Fresh Pork Sausages. *LWT - Food Sci. Technol.* **2018**, *89*, 749–755, doi:10.1016/j.lwt.2017.11.055.
32. Cedeño-Pinos, C.; Martínez-Tomé, M.; Jordán, M.J.; Bañón, S. Revalorisation of Sage (*Salvia Lavandulifolia* Vahl) By-Product Extracts as a Source of Polyphenol Antioxidants for Novel Jelly Candies. *Antioxidants* **2023**, *12*, 159, doi:https://

- doi.org/10.3390/antiox12010159.
33. Artuso-Ponte, V.; Pastor, A.; Andratsch, M. *The Effects of Plant Extracts on the Immune System of Livestock: The Isoquinoline Alkaloids Model*; Elsevier Inc., 2019; ISBN 9780128147016.
 34. Batiha, G.E.S.; Beshbishy, A.M.; Wasef, L.G.; Elewa, Y.H.A.; Al-Sagan, A.A.; El-Hack, M.E.A.; Taha, A.E.; Abd-Elhakim, Y.M.; Devkota, H.P. Chemical Constituents and Pharmacological Activities of Garlic (*Allium Sativum* L.): A Review. *Nutrients* **2020**, *12*, 1–21, doi:10.3390/nu12030872.
 35. Macari, A.; Sturza, R.; Lung, I.; Soran, M.L.; Opreș, O.; Balan, G.; Ghendov-Mosanu, A.; Vodnar, D.C.; Cojocari, D. Antimicrobial Effects of Basil, Summer Savory and Tarragon Lyophilized Extracts in Cold Storage Sausages. *Molecules* **2021**, *26*, 1–15, doi:10.3390/molecules26216678.
 36. Delfino, L.A.; Mattje, L.G.B.; Silva, M.; Araujo, M.C.; Tormen, L.; Bairy, E.M. Evaluation of Moringa and Lavandula Extracts as Natural Antioxidants in Tilapia Fish Burger. *J. Culinar. Sci. Technol.* **2021**, *00*, 1–16, doi:10.1080/15428052.2021.1883494.
 37. Socaci, S.A.; Fărcaș, A.C.; Tofană, M. Functional Ingredients Derived from Aromatic Plants. *Feed Addit. Aromat. Plants Herbs Anim. Nutr. Heal.* **2019**, 133–146, doi:10.1016/B978-0-12-814700-9.00008-X.
 38. Bianchi, A. The Mediterranean Aromatic Plants and Their Culinary Use. *Nat. Prod. Res.* **2015**, *29*, 201–206, doi:10.1080/14786419.2014.953495.
 39. Krigas, N.; Lazari, D.; Maloupa, E.; Stikoudi, M. Introducing Dittany of Crete (*Origanum Dictamnus* L.) to Gastronomy: A New Culinary Concept for a Traditionally Used Medicinal Plant. *Int. J. Gastron. Food Sci.* **2015**, *2*, 112–118, doi:10.1016/j.ijgfs.2015.02.001.
 40. Ghawi, S.K.; Rowland, I.; Methven, L. Enhancing Consumer Liking of Low Salt Tomato Soup over Repeated Exposure by Herb and Spice Seasonings. *Appetite* **2014**, *81*, 20–29, doi:10.1016/j.appet.2014.05.029.
 41. Beltrán de Heredia, M.R. *Farmacia profesional*. 2016, pp. 12–14.
 42. Carović-Stanko, K.; Petek, M.; Grdiša, M.; Pintar, J.; Bedeković, D.; Ćustić, M.H.; Satovic, Z. Medicinal Plants of the Family Lamiaceae as Functional Foods-A Review. *Czech J. Food Sci.* **2016**, *34*, 377–390, doi:10.17221/504/2015-CJFS.
 43. Maleš, I.; Pedisić, S.; Zorić, Z.; Elez-Garofulić, I.; Repajić, M.; You, L.; Vladimir-Knežević, S.;

- Butorac, D.; Dragović-Uzelac, V. The Medicinal and Aromatic Plants as Ingredients in Functional Beverage Production. *J. Funct. Foods* **2022**, *96*, 105210, doi:10.1016/j.jff.2022.105210.
44. Chakrabartty, I.; Mohanta, Y.K.; Nongbet, A.; Mohanta, T.K.; Mahanta, S.; Das, N.; Saravanan, M.; Sharma, N. Exploration of Lamiaceae in Cardio Vascular Diseases and Functional Foods: Medicine as Food and Food as Medicine. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 894814, doi:10.3389/fphar.2022.894814.
45. Novais, C.; Pereira, C.; Molina, A.K.; Liberal, Â.; Dias, M.I.; Añibarro-Ortega, M.; Alves, M.J.; Calhelha, R.C.; Ferreira, I.C.F.R.; Barros, L. Bioactive and Nutritional Potential of Medicinal and Aromatic Plant (Map) Seasoning Mixtures. *Molecules* **2021**, *26*, 1587, doi:10.3390/molecules26061587.
46. Dikme, T.G. Use of Medicinal and Aromatic Plants in Food. *Eurasian Clin. Anal. Med.* **2023**, *11*, 6–10, doi:DOI: 10.4328/ECAM.10039.
47. Filipčev, B. The Effects of Aromatic Plants and Their Extracts in Food Products. *Feed Addit. Aromat. Plants Herbs Anim. Nutr. Heal.* **2019**, 279–294, doi:10.1016/B978-0-12-814700-9.00016-9.
48. de Oliveira Monteschio, J.; de Vargas Junior, F.M.; da Silva, A.L.A.; das Chagas, R.A.; Fernandes, T.; Leonardo, A.P.; Kaneko, I.N.; de Moraes Pinto, L.A.; Guerrero, A.; de Melo Filho, A.A.; et al. Effect of Copaiba Essential Oil (*Copaifera Officinalis* L.) as a Natural Preservative on the Oxidation and Shelf Life of Sheep Burgers. *PLoS One* **2021**, *16*, 1–16, doi:10.1371/journal.pone.0248499.
49. Cedeño-Pinos, C.; Martínez-Tomé, M.; Mercatante, D.; Rodríguez-Estrada, M.T.; Bañón, S. Assessment of a Diterpene-Rich Rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) Extract as a Natural Antioxidant for Salmon Pâté Formulated with Linseed. *Antioxidants* **2022**, *11*, 1057, doi:10.3390/antiox11061057.
50. Jordán, M.J.; Lax, V.; Rota, M.C.; Lorán, S.; Sotomayor, J.A. Influence of the Bioclimatic Area on the Polyphenolic Composition, and Antioxidant and Bacteriostatic Activities of *Rosmarinus Officinalis*. *Nat. Prod. Commun.* **2013**, *8*, 817–822, doi:10.1177/1934578x1300800635.
51. European Parliament and Council Commission Regulation (EU) N° 1129/2011 of 11 November 2011 Amending Annex II to Regulation (EC) N° 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by Establishing a Union List of Food Additives. *Off. J. Eur.*

- Union* **2011**, L295, 1–177, doi:10.3000/19770677.L_2011.295.eng.
52. Chaudhari, A.K.; Singh, V.K.; Das, S.; Deepika; Prasad, J.; Dwivedy, A.K.; Dubey, N.K. Improvement of in Vitro and in Situ Antifungal, AFB1 Inhibitory and Antioxidant Activity of *Origanum Majorana* L. Essential Oil through Nanoemulsion and Recommending as Novel Food Preservative. *Food Chem. Toxicol.* **2020**, *143*, 111536, doi:10.1016/j.fct.2020.111536.
 53. Singh, B.K.; Tiwari, S.; Dubey, N.K. Essential Oils and Their Nanoformulations as Green Preservatives to Boost Food Safety against Mycotoxin Contamination of Food Commodities: A Review. *J. Sci. Food Agric.* **2021**, *101*, 4879–4890, doi:10.1002/jsfa.11255.
 54. Hyldgaard, M.; Mygind, T.; Meyer, R.L. Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 1–24, doi:10.3389/fmicb.2012.00012.
 55. Nguetack, J.; Tamgue, O.; Dongmo, J.B.L.; Dakole, C.D.; Leth, V.; Vismer, H.F.; Amvam Zollo, P.H.; Nkengfack, A.E. Synergistic Action between Fractions of Essential Oils from *Cymbopogon Citratus*, *Ocimum Gratissimum* and *Thymus Vulgaris* against *Penicillium Expansum*. *Food Control* **2012**, *23*, 377–383, doi:10.1016/j.foodcont.2011.08.002.
 56. Ribeiro-Santos, R.; Andrade, M.; Sanches-Silva, A. Application of Encapsulated Essential Oils as Antimicrobial Agents in Food Packaging. *Curr. Opin. Food Sci.* **2017**, *14*, 78–84, doi:10.1016/j.cofs.2017.01.012.
 57. Atarés, L.; Chiralt, A. Essential Oils as Additives in Biodegradable Films and Coatings for Active Food Packaging. *Trends Food Sci. Technol.* **2016**, *48*, 51–62, doi:10.1016/j.tifs.2015.12.001.
 58. Christaki, E.; Giannenas, I.; Bonos, E.; Florou-Paneri, P. *Innovative Uses of Aromatic Plants as Natural Supplements in Nutrition*; Elsevier Inc., 2019; ISBN 9780128147016.
 59. Saoudi, S.; Chammem, N.; Sifaoui, I.; Bouassida-Beji, M.; Jiménez, I.A.; Bazzocchi, I.L.; Silva, S.D.; Hamdi, M.; Bronze, M.R. Influence of Tunisian Aromatic Plants on the Prevention of Oxidation in Soybean Oil under Heating and Frying Conditions. *Food Chem.* **2016**, *212*, 503–511, doi:10.1016/j.foodchem.2016.05.186.
 60. Suntres, Z.E.; Coccimiglio, J.; Alipour, M. The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2015**, *55*, 304–318, doi:10.1080/10408398.2011.653458.

61. Kamatou, G.P.P.; Vermaak, I.; Viljoen, A.M.; Lawrence, B.M. Menthol: A Simple Monoterpene with Remarkable Biological Properties. *Phytochemistry* **2013**, *96*, 15–25, doi:10.1016/j.phytochem.2013.08.005.
62. Aguilar, F.; Autrup, H.; Barlow, S.; Castle, L.; Crebelli, R.; Dekant, W.; Engel, K.-H.; Gontard, N.; Gott, D.; Grilli, S.; et al. Camphor in Flavourings and Other Food Ingredients with Flavouring Properties Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a Request from the Adopted on 22 May 2008. *EFSA J.* **2008**, *729*, 1–15.
63. Quílez, M.; Ferreres, F.; López-Miranda, S.; Salazar, E.; Jordán, M.J. Seed Oil from Mediterranean Aromatic and Medicinal Plants of the Lamiaceae Family as a Source of Bioactive Components with Nutritional. *Antioxidants* **2020**, *9*, 510, doi:10.3390/antiox9060510.
64. Ding, Y.; Lin, H.; Lin, Y.; Yang, D.; Yu, Y.; Chen, J.; Wang, S.; Chen, Y. Nutritional Composition in the Chia Seed and Its Processing Properties on Restructured Ham-like Products. *J. Food Drug Anal.* **2018**, *26*, 124–134, doi:10.1016/j.jfda.2016.12.012.
65. Christaki, E.; Giannenas, I.; Bonos, E. *Innovative Uses of Aromatic Plants as Natural Supplements in Nutrition*; Elsevier Inc., 2020; ISBN 9780128147009.
66. Diaz-Sanchez, S.; D'Souza, D.; Biswas, D.; Hanning, I. Botanical Alternatives to Antibiotics for Use in Organic Poultry Production. *Poult. Sci.* **2015**, *94*, 1419–1430, doi:10.3382/ps/pev014.
67. Christaki, E.; Giannenas, I.; Bonos, E.; Florou-Paneri, P. Chapter 2: Innovative Uses of Aromatic Plants as Natural Supplements in Nutrition. In *Feed Additives: Aromatic Plants and Herbs in Animal Nutrition and Health*; Florou-Paneri, P., Christaki, E., Giannenas, I., Eds.; Elsevier Inc., 2019; pp. 311–337 ISBN 9780128147009.
68. Puvača, N.; Stanačev, V.; Glamočić, D.; Lević, J.; Perić, L.; Stanačev, V.; Milić, D. Beneficial Effects of Phytoadditives in Broiler Nutrition. *Worlds. Poult. Sci. J.* **2013**, *69*, 27–34, doi:10.1017/S0043933913000032.
69. Stevanović, Z.D.; Bošnjak-Neumüller, J.; Pajić-Lijaković, I.; Raj, J.; Vasiljević, M. Essential Oils as Feed Additives—Future Perspectives. *Molecules* **2018**, *23*, doi:10.3390/molecules23071717.
70. Gadde, U.; Kim, W.H.; Oh, S.T.; Lillehoj, H.S. Alternatives to Antibiotics for Maximizing Growth Performance and Feed Efficiency in Poultry: A Review. *Anim. Heal. Res. Rev.*

- 2017**, *18*, 26–45, doi:10.1017/S1466252316000207.
71. Pourhossein, Z.; Qotbi, A.A.A.; Seidavi, A.; Laudadio, V.; Centoducati, G.; Tufarelli, V. Effect of Different Levels of Dietary Sweet Orange (*Citrus Sinensis*) Peel Extract on Humoral Immune System Responses in Broiler Chickens. *Anim. Sci. J.* **2015**, *86*, 105–110, doi:10.1111/asj.12250.
 72. Rivera-Gomis, J.; Rubio, C.P.; Conesa, C.M.; Salaverri, J.O.; Cerón, J.J.; Tortosa, D.E.; Pablo, M.J.C. Effects of Dietary Supplementation of Garlic and Oregano Essential Oil on Biomarkers of Oxidative Status, Stress and Inflammation in Postweaning Piglets. *Animals* **2020**, *10*, 1–17, doi:10.3390/ani10112093.
 73. Yang, C.; Zhang, L.; Cao, G.; Feng, J.; Yue, M.; Xu, Y.; Dai, B.; Han, Q.; Guo, X. Effects of Dietary Supplementation with Essential Oils and Organic Acids on the Growth Performance, Immune System, Fecal Volatile Fatty Acids, and Microflora Community in Weaned Piglets. *J. Anim. Sci.* **2019**, *97*, 133–143, doi:10.1093/jas/sky426.
 74. Harrington, D.; Hall, H.; Wilde, D.; Wakeman, W. *Application of Aromatic Plants and Their Extracts in the Diets of Laying Hens*; Elsevier Inc., 2019; ISBN 9780128147016.
 75. Lábaque, M.C.; Kembro, J.M.; Luna, A.; Marin, R.H. Effects of Thymol Feed Supplementation on Female Japanese Quail (*Coturnix Coturnix*) Behavioral Fear Response. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2013**, *183*, 67–72, doi:10.1016/j.anifeedsci.2013.04.018.
 76. Manuelian, C.L.; Pitino, R.; Simoni, M.; Mavrommatis, A.; De Marchi, M.; Righi, F.; Tsiplakou, E. Plant Feed Additives as Natural Alternatives to the Use of Synthetic Antioxidant Vitamins on Livestock Mammals' Performances, Health, and Oxidative Status: A Review of the Literature in the Last 20 Years. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1461, doi:10.3390/antiox10091461.
 77. Odhaib, K.J.; Al-Hajjar, Q.N.; Alallawee, M.H.A. Incorporation of Herbal Plants in the Diet of Ruminants: Effect on Meat Quality. *Iraqi J. Vet. Med.* **2021**, *45*, 22–30, doi:10.30539/ijvm.v45i1.1036.
 78. Sugiharto, S. Role of Nutraceuticals in Gut Health and Growth Performance of Poultry. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* **2016**, *15*, 99–111, doi:10.1016/j.jssas.2014.06.001.
 79. Alagawany, M.; Elnesr, S.S.; Farag, M.R.; Abd El-Hack, M.E.; Barkat, R.A.; Gabr, A.A.; Foda, M.A.; Noreldin, A.E.; Khafaga, A.F.; El-Sabrou, K.; et al. Potential Role of Important Nutraceuticals in Poultry Performance and Health - A Comprehensive Review. *Res. Vet.*

- Sci.* **2021**, *137*, 9–29, doi:10.1016/j.rvsc.2021.04.009.
80. Brenes, A.; Roura, E. Essential Oils in Poultry Nutrition: Main Effects and Modes of Action. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2010**, *158*, 1–14, doi:10.1016/j.anifeedsci.2010.03.007.
 81. Grashorn, M.A. Use of Phytobiotics in Broiler Nutrition - An Alternative to Infeed Antibiotics? *J. Anim. Feed Sci.* **2010**, *19*, 338–347, doi:10.22358/jafs/66297/2010.
 82. Matkowski, A. Plant in Vitro Culture for the Production of Antioxidants - A Review. *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26*, 548–560, doi:10.1016/j.biotechadv.2008.07.001.
 83. Salehi, B.; Mishra, A.P.; Shukla, I.; Sharifi-Rad, M.; Contreras, M. del M.; Segura-Carretero, A.; Fathi, H.; Nasrabadi, N.N.; Kobarfard, F.; Sharifi-Rad, J. Thymol, Thyme, and Other Plant Sources: Health and Potential Uses. *Phyther. Res.* **2018**, *32*, 1688–1706, doi:10.1002/ptr.6109.
 84. Oliveira, I.S.; Da Silva, F. V.; Viana, A.F.S.C.; Dos Santos, M.R.V.; Quintans-Júnior, L.J.; Martins, M.D.C.C.; Nunes, P.H.M.; Oliveira, F.D.A.; Oliveira, R.D.C.M. Gastroprotective Activity of Carvacrol on Experimentally Induced Gastric Lesions in Rodents. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **2012**, *385*, 899–908, doi:10.1007/s00210-012-0771-x.
 85. Sudhoff, H.; Klenke, C.; Greiner, J.F.W.; Müller, J.; Brotzmann, V.; Ebmeyer, J.; Kaltschmidt, B.; Kaltschmidt, C. 1,8-Cineol Reduces Mucus-Production in a Novel Human Ex Vivo Model of Late Rhinosinusitis. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–12, doi:10.1371/journal.pone.0133040.
 86. Bozkurt, M.; Tüzün, A.E. *Application of Aromatic Plants and Their Extracts in Diets of Turkeys*; Elsevier Inc., 2019; ISBN 9780128147016.
 87. Cai, J.; Yan, R.; Shi, J.; Chen, J.; Long, M.; Wu, W.; Kuca, K. Antifungal and Mycotoxin Detoxification Ability of Essential Oils: A Review. *Phyther. Res.* **2022**, *36*, 62–72, doi:10.1002/ptr.7281.
 88. Tian, F.; Lee, S.Y.; Chun, H.S. Comparison of the Antifungal and Antiaflatoxicogenic Potential of Liquid and Vapor Phase of *Thymus Vulgaris* Essential Oil against *Aspergillus Flavus*. *J. Food Prot.* **2019**, *82*, 2044–2048, doi:10.4315/0362-028X.JFP-19-016.
 89. López-Jiménez, A.; García-Caballero, M.; Medina, M.Á.; Quesada, A.R. Anti-Angiogenic Properties of Carnosol and Carnosic Acid, Two Major Dietary Compounds from Rosemary. *Eur. J. Nutr.* **2013**, *52*, 85–95, doi:10.1007/s00394-011-0289-x.
 90. Siddiqui, A.J.; Jahan, S.; Singh, R.; Saxena, J.; Ashraf, S.A.; Khan, A.; Choudhary, R.K.;

- Balakrishnan, S.; Badraoui, R.; Bardakci, F.; et al. Plants in Anticancer Drug Discovery: From Molecular Mechanism to Chemoprevention. *Biomed Res. Int.* **2022**, *2022*, doi:10.1155/2022/5425485.
91. Miao, Z.H.; Tang, T.; Zhang, Y.X.; Zhang, J.S.; Ding, J. Cytotoxicity, Apoptosis Induction and Downregulation of MDR-1 Expression by the Anti-Topoisomerase II Agent, Salvicine, in Multidrug-Resistant Tumor Cells. *Int. J. Cancer* **2003**, *106*, 108–115, doi:10.1002/ijc.11174.
 92. Bhalla, Y.; Gupta, V.K.; Jaitak, V. Anticancer Activity of Essential Oils : A Review. *J. Sci. Food Agric.* **2013**, *93*, 3643–3653, doi:10.1002/jsfa.6267.
 93. Nikolić, M.; Jovanović, K.K.; Marković, T.; Marković, D.; Gligorijević, N.; Radulović, S.; Soković, M. Chemical Composition , Antimicrobial , and Cytotoxic Properties of Five Lamiaceae Essential Oils Nevenka Gligorijevi c Sa Radulovi C. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *61*, 225–232, doi:10.1016/j.indcrop.2014.07.011.
 94. Privitera, G.; Luca, T.; Castorina, S.; Passanisi, R.; Ruberto, G.; Napoli, E. Anticancer Activity of Salvia Officinalis Essential Oil and Its Principal Constituents against Hormone-Dependent Tumour Cells. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2019**, *9*, 24–28, doi:10.4103/2221-1691.250266.
 95. Sharma, M.; Grewal, K.; Jandrotia, R.; Rani, D.; Pal, H.; Kumar, R. Essential Oils as Anticancer Agents : Potential Role in Malignancies , Drug Delivery Mechanisms , and Immune System Enhancement. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, *146*, 112514, doi:10.1016/j.biopha.2021.112514.
 96. Augustine, B.B.; Dash, S.; Lahkar, M.; Sarma, U.; Samudrala, P.K.; Thomas, J.M. Leucas Aspera Inhibits the Dalton’s Ascitic Lymphoma in Swiss Albino Mice: A Preliminary Study Exploring Possible Mechanism of Action. *Pharmacogn. Mag.* **2014**, *10*, 118–124, doi:10.4103/0973-1296.131022.
 97. Siddiqui, M.Z. Boswellia Serrata, A Potential Antiinflammatory Agent: An Overview. *Indian J. Pharm. Sci.* **2011**, *73*, 255–261, doi:10.4103/0250-474X.93507.
 98. Paul, A.K.; Jahan, R.; Paul, A.; Mahboob, T.; Bondhon, T.A.; Jannat, K.; Hasan, A.; Nissapatorn, V.; Wilairatana, P.; De Lourdes Pereira, M.; et al. The Role of Medicinal and Aromatic Plants against Obesity and Arthritis: A Review. *Nutrients* **2022**, *14*, 1–38, doi:10.3390/nu14050985.
 99. Puztai, R.; Abrantes, M.; Sherly, J.; Duarte, N.; Molnar, J.; Ferreira, M.J.U. Antitumor-

- Promoting Activity of Lignans: Inhibition of Human Cytomegalovirus IE Gene Expression. *Anticancer Res.* **2010**, *30*, 451–454.
100. Saha, A.; Basak, B.B. Scope of Value Addition and Utilization of Residual Biomass from Medicinal and Aromatic Plants. *Ind. Crop. Prod.* **2020**, *145*, 111979, doi:10.1016/j.indcrop.2019.111979.
 101. Anuradha; Bharadvaja, N. Aromatic Plants: A Multifaceted Asset. *Brazilian J. Bot.* **2023**, doi:10.1007/s40415-023-00882-z.
 102. Sharmeen, J.B.; Mahomoodally, F.M.; Zengin, G.; Maggi, F. Essential Oils as Natural Sources of Fragrance Compounds for Cosmetics and Cosmeceuticals. *Molecules* **2021**, *26*, 666, doi:https://doi.org/10.3390/molecules26030666.
 103. Kirimer, N.; Mokhtarzadeh, S.; Demirci, B.; Goger, F.; Khawar, K.M.; Demirci, F. Phytochemical Profiling of Volatile Components of *Lavandula Angustifolia* Miller Propagated under in Vitro Conditions. *Ind. Crops Prod.* **2017**, *96*, 120–125, doi:10.1016/j.indcrop.2016.11.061.
 104. Torras-Claveria, L.; Jauregui, O.; Bastida, J.; Codina, C.; Viladomat, F. Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Lavandin (*Lavandula x Intermedia* Emeric Ex Loiseleur) Waste. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 8436–8443.
 105. Carrasco, A.; Martinez-Gutierrez, R.; Tomas, V.; Tudela, J. *Lavandula Angustifolia* and *Lavandula Latifolia* Essential Oils from Spain: Aromatic Profile and Bioactivities. *Planta Med.* **2015**, *82*, 163–170, doi:10.1055/s-0035-1558095.
 106. Herraiz-Peñalver, D.; Cases, M.Á.; Varela, F.; Navarrete, P.; Sánchez-Vioque, R.; Usano-Alemany, J. Chemical Characterization of *Lavandula Latifolia* Medik. Essential Oil from Spanish Wild Populations. *Biochem. Syst. Ecol.* **2013**, *46*, 59–68, doi:10.1016/j.bse.2012.09.018.
 107. Adewinogo, S.O.; Sharma, R.; Africa, C.W.J.; Marnewick, J.L.; Hussein, A.A. Chemical Composition and Cosmeceutical Potential of the Essential Oil of *Oncosiphon Suffruticosum* (L.) Källersjö. *Plants* **2021**, *10*, 1315, doi:https://doi.org/10.3390/plants10071315.
 108. Sarkic, A.; Stappen, I. Essential Oils and Their Single Compounds in Cosmetics — A Critical Review. *Cosmetics* **2018**, *5*, 11, doi:https://doi.org/10.3390/cosmetics5010011.
 109. Park, Y.-L.; Tak, J.-H. Essential Oils for Arthropod Pest Management in Agricultural Production Systems. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*; Preedy,

- V.R., Ed.; Elsevier Inc., 2016; pp. 61–70 ISBN 9780124166417.
110. Koul, O.; Singh, R.; Kaur, B.; Kanda, D. Comparative Study on the Behavioral Response and Acute Toxicity of Some Essential Oil Compounds and Their Binary Mixtures to Larvae of *Helicoverpa Armigera*, *Spodoptera Litura* and *Chilo Partellus*. *Ind. Crop. Prod.* **2013**, *49*, 428–436, doi:10.1016/j.indcrop.2013.05.032.
 111. Ngegba, P.M.; Cui, G.; Khalid, M.Z.; Zhong, G. Use of Botanical Pesticides in Agriculture as an Alternative to Synthetic Pesticides. *Agriculture* **2022**, *12*, 600, doi:https://doi.org/10.3390/agriculture12050600.
 112. López, M.D.; Cantó-Tejero, M.; Pascual-Villalobos, M.J. New Insights Into Biopesticides : Solid and Liquid Formulations of Essential Oils and Derivatives. *Front. Agron.* **2021**, *3*, 763530, doi:10.3389/fagro.2021.763530.
 113. Isman, M.B. Commercial Development of Plant Essential Oils and Their Constituents as Active Ingredients in Bioinsecticides. *Phytochem. Rev.* **2019**, *19*, 235–241, doi:10.1007/s11101-019-09653-9.
 114. Taghouti, I.; Cristobal, R.; Brenko, A.; Stara, K.; Markos, N.; Chapelet, B.; Hamrouni, L.; Buršič, D.; Bonet, J.-A. The Market Evolution of Medicinal and Aromatic Plants : A Global Supply Chain Analysis and an Application of the Delphi Method in the Mediterranean Area. *Forests* **2022**, *13*, 808, doi:https://doi.org/10.3390/f13050808.
 115. Barbieri, C.; Borsotto, P. Essential Oils: Market and Legislation. In *Potential of Essential Oils*; Intech Open, 2018; pp. 107–127 ISBN 978-1-78923-780-1.
 116. Sánchez Gómez, P.; Guerra Montes, J.; Jiménez Martínez, J.F.; Cánovas Rubio, J.L.; Torrente Paños, P.; Sotomayor Sánchez, J.A.; Jordán Bueso, M.J. *Guía de Las Plantas Aromático-Medicinales y Otras Especies de Interés Económico Del Noroeste de La Región de Murcia*; First.; Integral. Sociedad para el desarrollo rural, 2016;
 117. Silva, L.R.R. da; Ferreira, O.O.; Cruz, J.N.; Franco, C. de J.P.; Anjos, T.O. dos; Cascaes, M.M.; Costa, W.A. da; Andrade, E.H. de A.; Oliveira, M.S. de Lamiaceae Essential Oils, Phytochemical Profile, Antioxidant, and Biological Activities. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2021**, *2021*, 6748052, doi:10.1155/2021/6748052.
 118. Sim, L.Y.; Rani, N.Z.A.; Husain, K. Lamiaceae: An Insight on Their Anti-Allergic Potential and Its Mechanisms of Action. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, doi:10.3389/fphar.2019.00677.
 119. Kokkini, S.; Karousou, R.; Hanlidou, E. Herbs of the Labiatae. In *Encyclopedia of Food*

- Sciences and Nutrition*; Caballero, B., Ed.; Academic Press, 2003; pp. 3082–3090 ISBN 9780122270550.
120. Hernández, M.D.; Sotomayor, J.A.; Hernández, Á.; Jordán, M.J. Rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) Oils. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*; Elsevier Inc., 2016; pp. 677–688 ISBN 9780124166448.
 121. Karpiński, T.M. Essential Oils of Lamiaceae Family Plants as Antifungals. *Biomolecules* **2020**, *10*, 103, doi:doi:10.3390/biom10010103.
 122. Cáceres-Cevallos, G.; Martínez-Conesa, C.; Romero-Espinar, P.; Quílez, M.; García-Aledo, I.; Jordán, M.J. ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE MICROPROPAGACIÓN DE DOS ECOTIPOS DE ESPLIEGO (*Lavandula Latifolia* Medik.) DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA. In *Proceedings of the XIV REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CULTIVO IN VITRO DE TEJIDOS VEGETALES ALIMENTARIA*; Barceló, A., Sánchez, P., Antón, T., Eds.; Semillero Laimund S.L.: Almería, 2021; p. 140.
 123. Alonso, C.; Pérez, R.; Bazaga, P.; Medrano, M.; Herrera, C.M. Within-Plant Variation in Seed Size and Inflorescence Fecundity Is Associated with Epigenetic Mosaicism in the Shrub *Lavandula Latifolia* (Lamiaceae). *Ann. Bot.* **2018**, *121*, 153–160, doi:10.1093/aob/mcx140.
 124. López González, G.A. *Los Árboles y Arbustos de La Península Ibérica e Islas Baleares - Tomo II (Especies Silvestres y Las Principales Cultivadas)*; López González, G.A., Ed.; Primera.; Ediciones Mundi-Prensa: Madrid, 2001; ISBN 84-7114-995-8.
 125. Sotomayor, J.A.; Martínez, R.M.; García, A.J.; Jordán, M.J. Thymus *Zygis* Subsp. *Gracilis*: Watering Level Effect on Phytomass Production and Essential Oil Quality. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5418–5424, doi:10.1021/jf0496245.
 126. Sánchez-Gómez, P.; Guerra Montes, J.; Carrión Vilches, M.Á.; Coy Gómez, E.; Fernández Jiménez, S.; Hernández González, A.; Jiménez Martínez, J.F.; López Espinoza, J.A.; Vera Pérez, J.B. *Nueva Flora de Murcia -PLANTAS VASCULARES*; Sánchez-Gómez, P., Guerra-Montes, J., Eds.; Tercera.; DM: Murcia, 2011; ISBN 84-8425-289-2.
 127. Rota, M.C.; Herrera, A.; Martínez, R.M.; Sotomayor, J.A.; Jordán, M.J. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of *Thymus Vulgaris*, *Thymus Zygis* and *Thymus Hyemalis* Essential Oils. *Food Control* **2008**, *19*, 681–687, doi:10.1016/j.foodcont.2007.07.007.
 128. Silva, A.M.; Martins-Gomes, C.; Souto, E.B.; Schäfer, J.; Santos, J.A.; Bunzel, M.; Nunes,

- F.M. Thymus Zygis Subsp. Zygis an Endemic Portuguese Plant: Phytochemical Profiling, Antioxidant, Anti-Proliferative and Anti-Inflammatory Activities. *Antioxidants* **2020**, *9*, 482, doi:10.3390/antiox9060482.
129. Coimbra, A.; Miguel, S.; Ribeiro, M.; Coutinho, P.; Silva, L.; Duarte, A.P.; Ferreira, S. Thymus Zygis Essential Oil: Phytochemical Characterization, Bioactivity Evaluation and Synergistic Effect with Antibiotics against Staphylococcus Aureus. *Antibiotics* **2022**, *11*, doi:10.3390/antibiotics11020146.
130. Jordán, M.J.; Martínez, R.M.; Martínez, C.; Moñino, I.; Sotomayor, J.A. Polyphenolic Extract and Essential Oil Quality of Thymus Zygis Ssp. Gracilis Shrubs Cultivated under Different Watering Levels. *Ind. Crops Prod.* **2009**, *29*, 145–153, doi:10.1016/j.indcrop.2008.04.021.
131. Chai, Q.; Gan, Y.; Zhao, C.; Xu, H.L.; Waskom, R.M.; Niu, Y.; Siddique, K.H.M. Regulated Deficit Irrigation for Crop Production under Drought Stress. A Review. *Agron. Sustain. Dev.* **2016**, *36*, 1–21, doi:10.1007/s13593-015-0338-6.
132. Agrimonti, C.; Lauro, M.; Visioli, G. Smart Agriculture for Food Quality: Facing Climate Change in the 21st Century. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2021**, *61*, 971–981, doi:10.1080/10408398.2020.1749555.
133. Anderson, R.; Bayer, P.E.; Edwards, D. Climate Change and the Need for Agricultural Adaptation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2020**, *56*, 197–202, doi:10.1016/j.pbi.2019.12.006.
134. Teixeira, E.I.; Fischer, G.; van Velthuizen, H.; Walter, C.; Ewert, F. Global Hot-Spots of Heat Stress on Agricultural Crops Due to Climate Change. *Agric. For. Meteorol.* **2013**, *170*, 206–215, doi:10.1016/j.agrformet.2011.09.002.
135. Gupta, A.; Rico-Medina, A.; Caño-Delgado, A.I. The Physiology of Plant Responses to Drought. *Science (80-.)*. **2020**, *368*, 266–269, doi:10.1126/science.aaz7614.
136. Shahzad, A.; Ullah, S.; Dar, A.A.; Sardar, M.F.; Mehmood, T.; Tufail, M.A.; Shakoob, A.; Haris, M. Nexus on Climate Change: Agriculture and Possible Solution to Cope Future Climate Change Stresses. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2021**, *28*, 14211–14232, doi:10.1007/s11356-021-12649-8.
137. Iglesias, A.; Garrote, L.; Quiroga, S.; Moneo, M. A Regional Comparison of the Effects of Climate Change on Agricultural Crops in Europe. *Clim. Change* **2012**, *112*, 29–46, doi:10.1007/s10584-011-0338-8.
138. Naguib, N.Y.M. Organic vs Chemical Fertilization of Medicinal Plants: A Concise Review of

- Researches. *Adv. Environ. Biol.* **2011**, *5*, 394–400.
139. Azcón-Bieto, J.; Talón, M. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*; 2003; ISBN 978-84-481-9293-8.
140. Jablonski, L.M.; Wang, X.; Curtis, P.S. Plant Reproduction under Elevated CO₂ Conditions: A Meta-Analysis of Reports on 79 Crop and Wild Species. *New Phytol.* **2002**, *156*, 9–26, doi:10.1046/j.1469-8137.2002.00494.x.
141. Zavala, J.A.; Casteel, C.L.; DeLucia, E.H.; Berenbaum, M.R. Anthropogenic Increase in Carbon Dioxide Compromises Plant Defense against Invasive Insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 5129–5133, doi:10.1073/pnas.0805247105.
142. Dusenge, M.E.; Duarte, A.G.; Way, D.A. Plant Carbon Metabolism and Climate Change: Elevated CO₂ and Temperature Impacts on Photosynthesis, Photorespiration and Respiration. *New Phytol.* **2019**, *221*, 32–49, doi:10.1111/nph.15283.
143. Reineke, A.; Selim, M. Elevated Atmospheric CO₂ Concentrations Alter Grapevine (*Vitis Vinifera*) Systemic Transcriptional Response to European Grapevine Moth (*Lobesia Botrana*) Herbivory. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–12, doi:10.1038/s41598-019-39979-5.
144. Gornall, J.; Betts, R.; Burke, E.; Clark, R.; Camp, J.; Willett, K.; Wiltshire, A. Implications of Climate Change for Agricultural Productivity in the Early Twenty-First Century. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2010**, *365*, 2973–2989, doi:10.1098/rstb.2010.0158.
145. García-Caparrós, P.; Romero, M.J.; Llanderal, A.; Cermeño, P.; Lao, M.T.; Segura, M.L. Effects of Drought Stress on Biomass, Essential Oil Content, Nutritional Parameters, and Costs of Production in Six Lamiaceae Species. *Water* **2019**, *11*, 1–12, doi:10.3390/w11030573.
146. Gaspar, T.; Franck, T.; Bisbis, B.; Kevers, C.; Jouve, L.; Hausman, J.F.; Dommes, J. Concepts in Plant Stress Physiology. Application to Plant Tissue Cultures. *Plant Growth Regul.* **2002**, *37*, 263–286, doi:10.1023/A:1020835304842.
147. Bhar, A.; Chakraborty, A.; Roy, A. Plant Responses to Biotic Stress: Old Memories Matter. *Plants* **2022**, *11*, 1–13, doi:https://doi.org/10.3390/plants11010084.
148. Thakur, M.; Bhattacharya, S.; Khosla, P.K.; Puri, S. Improving Production of Plant Secondary Metabolites through Biotic and Abiotic Elicitation. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* **2019**, *12*, 1–12, doi:10.1016/j.jarmap.2018.11.004.
149. Ramachandra Rao, S.; Ravishankar, G. a. Plant Cell Cultures: Chemical Factories of

- Secondary Metabolites. *Biotechnol. Adv.* **2002**, *20*, 101–153, doi:10.1016/S0734-9750(02)00007-1.
150. Devireddy, A.R.; Zandalinas, S.I.; Fichman, Y.; Mittler, R. Integration of Reactive Oxygen Species and Hormone Signaling during Abiotic Stress. *Plant J.* **2021**, *105*, 459–476, doi:10.1111/tpj.15010.
 151. Sharma, A.; Shahzad, B.; Rehman, A.; Bhardwaj, R.; Landi, M.; Zheng, B. Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. *Molecules* **2019**, *24*, 1–22, doi:10.3390/molecules24132452.
 152. Ramakrishna, A.; Ravishankar, G.A. Influence of Abiotic Stress Signals on Secondary Metabolites in Plants. *Plant Signal. Behav.* **2011**, *6*, 1720–1731, doi:10.4161/psb.6.11.17613.
 153. Takahashi, F.; Kuromori, T.; Urano, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. Drought Stress Responses and Resistance in Plants: From Cellular Responses to Long-Distance Intercellular Communication. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 1–14, doi:10.3389/fpls.2020.556972.
 154. Hasanuzzaman, M.; Hossain, M.A.; da Silva, J.A.T.; Fujita, M. *Crop Stress and Its Management Perspectives and Strategies*; Venkateswarlu, B., Shanker, A., Shanker, C., Mherswari, M., Eds.; Springer Netherlands, 2012; Vol. 1; ISBN 9788578110796.
 155. Ginzburg, D.N.; Klein, J.D. LED Pre-Exposure Shines a New Light on Drought Tolerance Complexity in Lettuce (*Lactuca Sativa*) and Rocket (*Eruca Sativa*). *Environ. Exp. Bot.* **2020**, *180*, 104240, doi:10.1016/j.envexpbot.2020.104240.
 156. Osmolovskaya, N.; Shumilina, J.; Kim, A.; Didio, A.; Grishina, T.; Bilova, T.; Keltsieva, O.A.; Zhukov, V.; Tikhonovich, I.; Tarakhovskaya, E.; et al. Methodology of Drought Stress Research: Experimental Setup and Physiological Characterization. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, doi:10.3390/ijms19124089.
 157. Gong, Z.; Xiong, L.; Shi, H.; Yang, S.; Herrera-Estrella, L.R.; Xu, G.; Chao, D.Y.; Li, J.; Wang, P.Y.; Qin, F.; et al. Plant Abiotic Stress Response and Nutrient Use Efficiency. *Sci. China Life Sci.* **2020**, *63*, 635–674, doi:10.1007/s11427-020-1683-x.
 158. Fang, Y.; Xiong, L. General Mechanisms of Drought Response and Their Application in Drought Resistance Improvement in Plants. *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72*, 673–689, doi:10.1007/s00018-014-1767-0.
 159. Caser, M.; D’Angiolillo, F.; Chitarra, W.; Lovisolò, C.; Ruffoni, B.; Pistelli, L.; Pistelli, L.;

- Scariot, V. Ecophysiological and Phytochemical Responses of *Salvia Sinaloensis* Fern. to Drought Stress. *Plant Growth Regul.* **2018**, *84*, 383–394, doi:10.1007/s10725-017-0349-1.
160. Chaves, M.M.; Maroco, J.P.; Pereira, J.S. Understanding Plant Responses to Drought - From Genes to the Whole Plant. *Funct. Plant Biol.* **2003**, *30*, 239–264, doi:10.1071/FP02076.
161. Reddy, A.R.; Chaitanya, K.V.; Vivekanandan, M. Drought-Induced Responses of Photosynthesis and Antioxidant Metabolism in Higher Plants. *J. Plant Physiol.* **2004**, *161*, 1189–1202, doi:10.1016/j.jplph.2004.01.013.
162. Sade, B.; Soyulu, S.; Yetim, E. Drought and Oxidative Stress. *African J. Biotechnol.* **2011**, *10*, 11102–11109, doi:10.5897/AJB11.1564.
163. Fahad, S.; Bajwa, A.A.; Nazir, U.; Anjum, S.A.; Farooq, A.; Zohaib, A.; Sadia, S.; Nasim, W.; Adkins, S.; Saud, S.; et al. Crop Production under Drought and Heat Stress: Plant Responses and Management Options. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1147, doi:10.3389/fpls.2017.01147.
164. Cáceres-Cevallos, G.J.; Quílez, M.; Elguea-Culebras, G.O. de; Sánchez-Vioque, R.; Jordán, M.J. Agronomic Evaluation and Chemical Characterization of *Lavandula Latifolia* Medik. under the Semiarid Conditions of the Spanish Southeast. *Plants* **2023**, *12*, 1986, doi:https://doi.org/10.3390/plants12101986.
165. Hasanuzzaman, M.; Bhuyan, M.H.M.B.; Zulfiqar, F.; Raza, A.; Mohsin, S.M.; Mahmud, J. Al; Fujita, M.; Fotopoulos, V. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. *Antioxidants* **2020**, *9*, 681, doi:doi:10.3390/antiox9080681.
166. Luna, M.C.; Bekhradi, F.; Ferreres, F.; Jordán, M.J.; Delshad, M.; Gil, M.I. Effect of Water Stress and Storage Time on Anthocyanins and Other Phenolics of Different Genotypes of Fresh Sweet Basil. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 9223–9231, doi:10.1021/acs.jafc.5b04131.
167. Dietz, K.; Zörb, C.; Geilfus, C.-M. Drought and Crop Yield. *Plant Biol.* **2021**, *23*, 881–893, doi:10.1111/plb.13304.
168. Gervais, T.; Creelman, A.; Li, X.Q.; Bizimungu, B.; De Koeyer, D.; Dahal, K. Potato Response to Drought Stress: Physiological and Growth Basis. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 1–10, doi:10.3389/fpls.2021.698060.

169. Zehra, A.; Choudhary, S.; Naeem, M.; Masroor, M.; Khan, A.; Aftab, T. A Review of Medicinal and Aromatic Plants and Their Secondary Metabolites Status under Abiotic Stress. *J. Med. Plants Stud.* **2019**, *7*, 99–106.
170. Mahajan, M.; Kuiry, R.; Pal, P.K. Understanding the Consequence of Environmental Stress for Accumulation of Secondary Metabolites in Medicinal and Aromatic Plants. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* **2020**, *18*, doi:10.1016/j.jarmap.2020.100255.
171. Manukyan, A. Effect of Growing Factors on Productivity and Quality of Lemon Catmint, Lemon Balm and Sage under Soilless Greenhouse Production: I. Drought Stress. *Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol.* **2011**, *5*, 119–125.
172. Szekely-Varga, Z.; González-Orenga, S.; Cantor, M.; Jucan, D.; Boscaiu, M.; Vicente, O. Effects of Drought and Salinity on Two Commercial Varieties of *Lavandula Angustifolia* Mill. *Plants* **2020**, *9*, 637, doi:10.3390/plants9050637.
173. Gill, S.S.; Tuteja, N. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Machinery in Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Plant Physiol. Biochem. Biochem.* **2010**, *48*, 909–930, doi:10.1016/j.plaphy.2010.08.016.
174. Pintó-Marijuan, M.; Munné-Bosch, S. Photo-Oxidative Stress Markers as a Measure of Abiotic Stress-Induced Leaf Senescence: Advantages and Limitations. *J. Exp. Bot.* **2014**, *65*, 3845–3857, doi:10.1093/jxb/eru086.
175. Taiz, L.; Zeiger, E. *Plant Physiology, Fifth Edition*; Sinauer Associates Inc., P., Ed.; Fifth.; Sunderland, Massachusetts U.S.A., 2010; Vol. 1; ISBN 9780878938667 (casebound) 0878938664 (casebound) 9780878935659 (hbk.) 0878935657 (hbk.).
176. Nikolaeva, M.K.; Maevskaya, S.N.; Shugaev, A.G.; Bukhov, N.G. Effect of Drought on Chlorophyll Content and Antioxidant Enzyme Activities in Leaves of Three Wheat Cultivars Varying in Productivity. *Russ. J. Plant Physiol.* **2010**, *57*, 87–95, doi:10.1134/S1021443710010127.
177. Boojar, M.M.A.; Goodarzi, F. The Copper Tolerance Strategies and the Role of Antioxidative Enzymes in Three Plant Species Grown on Copper Mine. *Chemosphere* **2007**, *67*, 2138–2147, doi:10.1016/j.chemosphere.2006.12.071.
178. Mohammadi, H.; Saeedi, S.; Hazrati, S.; Brestic, M. Physiological and Phytochemical Responses of Lemon Balm (*Melissa Officinalis* L.) to Pluramin Application and Inoculation with *Pseudomonas Fluorescens* PF-135 under Water-Deficit Stress. *Russ. J. Plant Physiol.* **2021**, *68*, 909–922, doi:10.1134/S1021443721050125.

179. Chiappero, J.; Cappellari, L. del R.; Palermo, T.B.; Giordano, W.; Khan, N.; Banchio, E. Antioxidant Status of Medicinal and Aromatic Plants under the Influence of Growth-Promoting Rhizobacteria and Osmotic Stress. *Ind. Crops Prod.* **2021**, *167*, doi:10.1016/j.indcrop.2021.113541.
180. Varela, M.C.; Arslan, I.; Reginato, M.A.; Cenzano, A.M.; Luna, M.V. Phenolic Compounds as Indicators of Drought Resistance in Shrubs from Patagonian Shrublands (Argentina). *Plant Physiol. Biochem.* **2016**, *104*, 81–91, doi:10.1016/j.plaphy.2016.03.014.
181. Zhang, J.; Nguyen, H.T.; Blum, A. Genetic Analysis of Osmotic Adjustment in Crop Plants. *J. Exp. Bot.* **1999**, *50*, 291–302, doi:10.1093/jxb/50.332.291.
182. Huang, L.; Xiao, Y.; Ran, J.; Wei, L.; Li, Z.; Li, Y.; Zhang, X.; Liao, L.; Wang, D.; Zhao, X.; et al. Drought Tolerance of Faba Bean (*Vicia Faba L.*) Can Be Improved by Specific LED Light Wavelengths. *Photosynthetica* **2020**, *58*, 1040–1052, doi:10.32615/ps.2020.052.
183. Wu, M.; Kubota, C. Effects of Electrical Conductivity of Hydroponic Nutrient Solution on Leaf Gas Exchange of Five Greenhouse Tomato Cultivars. *Hortechology* **2008**, *18*, 271–277.
184. Marthandan, V.; Geetha, R.; Kumutha, K.; Renganathan, V.G.; Karthikeyan, A.; Ramalingam, J. Seed Priming: A Feasible Strategy to Enhance Drought Tolerance in Crop Plants. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1–23, doi:10.3390/ijms21218258.
185. Sah, S.K.; Reddy, K.R.; Li, J. Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 571, doi:10.3389/fpls.2016.00571.
186. Devnarain, N.; Crampton, B.G.; Chikwamba, R.; Becker, J.V.W.; O’Kennedy, M.M. Physiological Responses of Selected African Sorghum Landraces to Progressive Water Stress and Re-Watering. *South African J. Bot.* **2016**, *103*, 61–69, doi:10.1016/j.sajb.2015.09.008.
187. Gorgini Shabankareh, H.; Khorasaninejad, S.; Soltanloo, H.; Shariati, V. Physiological Response and Secondary Metabolites of Three Lavender Genotypes under Water Deficit. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1–22, doi:10.1038/s41598-021-98750-x.
188. Giannakoula, A.; Moustakas, M.; Mylona, P.; Papadakis, I.; Yupsanis, T. Aluminum Tolerance in Maize Is Correlated with Increased Levels of Mineral Nutrients, Carbohydrates and Proline, and Decreased Levels of Lipid Peroxidation and Al Accumulation. *J. Plant Physiol.* **2008**, *165*, 385–396, doi:10.1016/j.jplph.2007.01.014.
189. Yang, X.; Lu, M.; Wang, Y.; Wang, Y.; Liu, Z.; Chen, S. Response Mechanism of Plants to

- Drought Stress. *Horticulturae* **2021**, *7*, doi:10.3390/horticulturae7030050.
190. Mirzaee, M.; Moieni, A.; Ghanati, F. Effects of Drought Stress on the Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzyme Activities in Two Canola (*Brassica Napus* L.) Cultivars. *J. Agric. Sci. Technol.* **2013**, *15*, 593–602, doi:http://jast.modares.ac.ir/article-23-9016-en.html.
 191. Asghari, B.; Khademian, R.; Sedaghati, B. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) Confer Drought Resistance and Stimulate Biosynthesis of Secondary Metabolites in Pennyroyal (*Mentha Pulegium* L.) under Water Shortage Condition. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **2020**, *263*, 109132, doi:10.1016/j.scienta.2019.109132.
 192. Chiappero, J.; Cappellari, L. del R.; Sosa Alderete, L.G.; Palermo, T.B.; Banchio, E. Plant Growth Promoting Rhizobacteria Improve the Antioxidant Status in *Mentha Piperita* Grown under Drought Stress Leading to an Enhancement of Plant Growth and Total Phenolic Content. *Ind. Crops Prod.* **2019**, *139*, 111553, doi:10.1016/j.indcrop.2019.111553.
 193. Agami, R.; Medani, R.A.; Abd El-Mola, I.A.; Taha, R.S. Exogenous Application with Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) or Proline Induces Stress Tolerance in Basil Plants (*Ocimum Basilicum* L.) Exposed to Water Stress. *Int. J. Environ. Agric. Res.* **2016**, *2*, 78–92.
 194. Armada, E.; Roldán, A.; Azcon, R. Differential Activity of Autochthonous Bacteria in Controlling Drought Stress in Native *Lavandula* and *Salvia* Plants Species Under Drought Conditions in Natural Arid Soil. *Microb. Ecol.* **2014**, *67*, 410–420, doi:10.1007/s00248-013-0326-9.
 195. Bayat, H.; Moghadam, A.N. Drought Effects on Growth, Water Status, Proline Content and Antioxidant System in Three *Salvia Nemorosa* L. Cultivars. *Acta Physiol. Plant.* **2019**, *41*, 149, doi:10.1007/s11738-019-2942-6.
 196. Rajput, V.D.; Harish; Singh, R.K.; Verma, K.K.; Sharma, L.; Quiroz-Figueroa, F.R.; Meena, M.; Gour, V.S.; Minkina, T.; Sushkova, S.; et al. Recent Developments in Enzymatic Antioxidant Defence Mechanism in Plants with Special Reference to Abiotic Stress. *Biology (Basel)*. **2021**, *10*, doi:10.3390/biology10040267.
 197. Soares, C.; Carvalho, M.E.A.; Azevedo, R.A.; Fidalgo, F. Plants Facing Oxidative Challenges — A Little Help from the Antioxidant Networks. *Environ. Exp. Bot.* **2019**, *161*, 4–25, doi:10.1016/j.envexpbot.2018.12.009.
 198. Dumanović, J.; Nepovimova, E.; Natić, M.; Kuča, K.; Jačević, V. The Significance of

- Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense System in Plants: A Concise Overview. *Front. Plant Sci.* **2021**, *11*, 552969, doi:10.3389/fpls.2020.552969.
199. Rasul, F.; Gupta, S.; Olas, J.J.; Gechev, T.; Sujeeth, N.; Mueller-Roeber, B. Priming with a Seaweed Extract Strongly Improves Drought Tolerance in Arabidopsis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1–28, doi:10.3390/ijms22031469.
 200. Hasanuzzaman, M.; Bhuyan, M.H.M.B.; Anee, T.I.; Parvin, K.; Nahar, K.; Mahmud, J. Al; Fujita, M. Regulation of Ascorbate-Glutathione Pathway in Mitigating Oxidative Damage in Plants under Abiotic Stress. *Antioxidants* **2019**, *8*, 384, doi:doi:10.3390/antiox8090384.
 201. Hasanuzzaman, M.; Bhuyan, M.H.M.B.; Anee, T.I.; Parvin, K.; Nahar, K.; Mahmud, J. Al; Fujita, M. Regulation of Ascorbate-Glutathione Pathway in Mitigating Oxidative Damage in Plants under Abiotic Stress. *Antioxidants* **2019**, *8*, 384, doi:doi:10.3390/antiox8090384.
 202. Nowicka, B.; Gruszka, J.; Kruk, J. Function of Plastochromanol and Other Biological Prenyllipids in the Inhibition of Lipid Peroxidation — A Comparative Study in Model Systems. *BBA - Biomembr.* **2013**, *1828*, 233–240, doi:10.1016/j.bbamem.2012.08.018.
 203. Kumar, A.; Prasad, A.; Pospíšil, P. Formation of α -Tocopherol Hydroperoxide and α -Tocopheroxyl Radical: Relevance for Photooxidative Stress in Arabidopsis. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–12, doi:10.1038/s41598-020-75634-0.
 204. Vincent, C.; Mesa, T.; Munne-Bosch, S. Identification of a New Variety of Avocados (*Persea Americana* Mill. Cv. Bacon) with High Vitamin e and Impact of Cold Storage on Tocochromanols Composition. *Antioxidants* **2020**, *9*, 1–13, doi:10.3390/antiox9050403.
 205. Miret, J.A.; Munné-Bosch, S. Redox Signaling and Stress Tolerance in Plants: A Focus on Vitamin E. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2015**, *1340*, 29–38, doi:10.1111/nyas.12639.
 206. Sadiq, M.; Akram, N.A.; Ashraf, M.; Al-Qurainy, F.; Ahmad, P. Alpha-Tocopherol-Induced Regulation of Growth and Metabolism in Plants Under Non-Stress and Stress Conditions. *J. Plant Growth Regul.* **2019**, *38*, 1325–1340, doi:10.1007/s00344-019-09936-7.
 207. Lushchak, V.I.; Semchuk, N.M. Tocopherol Biosynthesis: Chemistry, Regulation and Effects of Environmental Factors. *Acta Physiol. Plant.* **2012**, *34*, 1607–1628, doi:10.1007/s11738-012-0988-9.
 208. Gruszka, J.; Pawlak, A.; Kruk, J. Tocochromanols , Plastoquinol, Iand Other Biological Prenyllipids as Singlet Oxygen Quenchers — Determination of Singlet Oxygen Quenchng

- Rate Constants and Oxidation Products. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *45*, 920–928, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.06.025.
209. Szymańska, R.; Kruk, J. Identification of Hydroxy-Plastochromanol in Arabidopsis Leaves. *Acta Biochim. Pol.* **2010**, *57*, 105–108, doi:10.18388/abp.2010_2380.
210. Kruk, J.; Szymańska, R.; Cela, J.; Munné-Bosch, S. Plastochromanol-8 : Fifty Years of Research. *Phytochemistry* **2014**, *108*, 9–16, doi:10.1016/j.phytochem.2014.09.011.
211. Niu, Y.; Zhang, Q.; Wang, J.; Li, Y.; Wang, X.; Bao, Y. Vitamin E Synthesis and Response in Plants. *Front. Plant Sci.* **2022**, *8*, 1–9, doi:10.3389/fpls.2022.994058.
212. Cáceres-Cevallos, G.J.; Albacete-Moreno, A.A.; Ferreres, F.; Gil-Izquierdo, Á.; Jordán, M.J. Evaluation of the Physiological Parameters in Lavandula Latifolia Medik. under Water Deficit for Preselection of Elite Drought-Resistant Plants. *Ind. Crop. Prod.* **2023**, *199*, 116742, doi:10.1016/j.indcrop.2023.116742.
213. Barros, L.; Heleno, S.A.; Carvalho, A.M.; Ferreira, I.C.F.R. Lamiaceae Often Used in Portuguese Folk Medicine as a Source of Powerful Antioxidants: Vitamins and Phenolics. *LWT - Food Sci. Technol.* **2010**, *43*, 544–550, doi:10.1016/j.lwt.2009.09.024.
214. Marchica, A.; Cotrozzi, L.; Detti, R.; Lorenzini, G.; Pellegrini, E.; Petersen, M.; Nali, C. The Biosynthesis of Phenolic Compounds Is an Integrated Defence Mechanism to Prevent Ozone Injury in Salvia Officinalis. *Antioxidants* **2020**, *9*, 1–16, doi:10.3390/antiox9121274.
215. Namdeo, A.G. Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites : A Review. *Pharmacogn. Rev.* **2007**, *1*, 69–79.
216. Verma, N.; Shukla, S. Impact of Various Factors Responsible for Fluctuation in Plant Secondary Metabolites. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* **2015**, *2*, 105–113, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.09.002.
217. Andrés-Lacueva, C.; Medina-Rejon, A.; Llorach, R.; Urpi-Sarda, M.; Khan, N.; Chiva-Blanch, G.; Zamora-Ros, R.; Rotches-Ribalta, M.; Lamuela-Raventós, R.M. Phenolic Compounds: Chemistry and Occurrence in Fruits and Vegetables. In *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value, and Stability*; de la Rosa, L.A., Alvarez-Parrilla, E., González-Aguilar, G.A., Eds.; 2009; Vol. 08028, pp. 53–88 ISBN 9780813803203.
218. Bantis, F.; Ouzounis, T.; Radoglou, K. Artificial LED Lighting Enhances Growth Characteristics and Total Phenolic Content of Ocimum Basilicum, but Variably Affects

- Transplant Success. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **2016**, *198*, 277–283, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.11.014.
219. Bettaieb, I.; Hamrouni-Sellami, I.; Bourgou, S.; Limam, F.; Marzouk, B. Drought Effects on Polyphenol Composition and Antioxidant Activities in Aerial Parts of *Salvia Officinalis* L. *Acta Physiol. Plant.* **2011**, *33*, 1103–1111, doi:10.1007/s11738-010-0638-z.
220. Németh-Zámbori, É.; Pluhár, Z.; Sxabó, K.; Malekzadeh, M.; Radácsi, P.; Inotai, K.; Komáromi, B.; Seidler-Lozykowska, K. Effect of Water Supply on Growth and Polyphenols of Lemon Balm (*Melissa Officinalis* L.) And Thyme (*Thymus Vulgaris* L.). *Acta Biol. Hung.* **2016**, *67*, 64–74, doi:10.1556/018.67.2016.1.5.
221. Di Ferdinando, M.; Brunetti, C.; Agati, G.; Tattini, M. Multiple Functions of Polyphenols in Plants Inhabiting Unfavorable Mediterranean Areas. *Environ. Exp. Bot.* **2014**, *103*, 107–116, doi:10.1016/j.envexpbot.2013.09.012.
222. Caser, M.; Chitarra, W.; D’Angiolillo, F.; Perrone, I.; Demasi, S.; Lovisolò, C.; Pistelli, L.; Pistelli, L.; Scariot, V. Drought Stress Adaptation Modulates Plant Secondary Metabolite Production in *Salvia Dolomitica* Codd. *Ind. Crops Prod.* **2019**, *129*, 85–96, doi:10.1016/j.indcrop.2018.11.068.
223. Zhang, D.P. *Abscisic Acid: Metabolism, Transport and Signaling*; Zhang, D.-P., Ed.; Springer, 2014; ISBN 978-94-017-9424-4.
224. Vishwakarma, K.; Upadhyay, N.; Kumar, N.; Yadav, G.; Singh, J.; Mishra, R.K.; Kumar, V.; Verma, R.; Upadhyay, R.G.; Pandey, M.; et al. Abscisic Acid Signaling and Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Review on Current Knowledge and Future Prospects. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1–12, doi:10.3389/fpls.2017.00161.
225. López-Carbonell, M.; Gabasa, M.; Jáuregui, O. Enhanced Determination of Abscisic Acid (ABA) and Abscisic Acid Glucose Ester (ABA-GE) in *Cistus Albidus* Plants by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Tandem Mode. *Plant Physiol. Biochem.* **2009**, *47*, 256–261, doi:10.1016/j.plaphy.2008.12.016.
226. Lopez-Carbonell, M.; Alegre, L.; Pastor, A.; Prinsen, E.; Van Onckelen, H. Variations in Abscisic Acid, Indole-3-Acetic Acid and Zeatin Riboside Concentrations in Two Mediterranean Shrubs Subjected to Water Stress. *Plant Growth Regul.* **1996**, *20*, 271–277, doi:10.1007/BF00043318.
227. Liu, F.; Jensen, C.R.; Shahanzari, A.; Andersen, M.N.; Jacobsen, S.-E. ABA Regulated Stomatal Control and Photosynthetic Water Use Efficiency of Potato (*Solanum*

- Tuberosum L.) during Progressive Soil Drying. *Plant Sci.* **2005**, *168*, 831–836, doi:10.1016/j.plantsci.2004.10.016.
228. Lim, C.W.; Baek, W.; Jung, J.; Kim, J.H.; Lee, S.C. Function of ABA in Stomatal Defense against Biotic and Drought Stresses. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 15251–15270, doi:10.3390/ijms160715251.
229. Zhang, J.; Jia, W.; Yang, J.; Ismail, A.M. Role of ABA in Integrating Plant Responses to Drought and Salt Stresses. *F. Crop. Res.* **2006**, *97*, 111–119, doi:10.1016/j.fcr.2005.08.018.
230. Zollinger, N.; Kjellgren, R.; Cerny-Koenig, T.; Kopp, K.; Koenig, R. Drought Responses of Six Ornamental Herbaceous Perennials. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **2006**, *109*, 267–274, doi:10.1016/j.scienta.2006.05.006.
231. Sharma, A.; Kumar, V.; Shahzad, B.; Ramakrishnan, M.; Singh, P.G.S.; Bali, A.S.; Handa, N.; Kapoor, D.; Yadav, P.; Khanna, K.; et al. Photosynthetic Response of Plants Under Different Abiotic Stresses: A Review. *J. Plant Growth Regul.* **2020**, *39*, 509–531, doi:10.1007/s00344-019-10018-x.
232. Hu, X.; Gu, T.; Khan, I.; Zada, A.; Jia, T. Research Progress in the Interconversion, Turnover and Degradation of Chlorophyll. *Cells* **2021**, *10*, doi:10.3390/cells10113134.
233. Masuda, T.; Fujita, Y. Regulation and Evolution of Chlorophyll Metabolism. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 1131–1149, doi:10.1039/b807210h.
234. Khodadadi, F.; Shahriari, F.; Talebi, M.; Moshtaghi, N.; Matkowski, A.; Szumny, A.; Rahimmalek, M. Essential Oil Composition, Physiological and Morphological Variation in *Salvia Abrotanoides* and *S. Yangii* under Drought Stress and Chitosan Treatments. *Ind. Crop. Prod.* **2022**, *187*, 115429, doi:10.1016/j.indcrop.2022.115429.
235. Oliván, A.; Munné-bosch, S. Diurnal Patterns of α -Tocopherol Accumulation in Mediterranean Plants. *J. Arid Environ.* **2010**, *74*, 1572–1576, doi:10.1016/j.jaridenv.2010.05.003.
236. Zheng, X.; Yang, Y.; Al-babili, S. Exploring the Diversity and Regulation of Apocarotenoid Metabolic Pathways in Plants. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 787049, doi:10.3389/fpls.2021.787049.
237. Cazzonelli, C.I. Carotenoids in Nature: Insights from Plants and Beyond. *Funct. Plant Biol.* **2011**, *38*, 833–847, doi:http://dx.doi.org/10.1071/FP11192.

238. Jahns, P.; Latowski, D.; Strzalka, K. Mechanism and Regulation of the Violaxanthin Cycle: The Role of Antenna Proteins and Membrane Lipids. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2009**, *1787*, 3–14, doi:10.1016/j.bbabi.2008.09.013.
239. Shao, H.B.; Chu, L.Y.; Jaleel, C.A.; Zhao, C.X. Water-Deficit Stress-Induced Anatomical Changes in Higher Plants. *Comptes Rendus - Biol.* **2008**, *331*, 215–225, doi:10.1016/j.crv.2008.01.002.
240. Abobatta, W.F. Drought Adaptive Mechanisms of Plants – a Review. *Adv. Agric. Environ. Sci.* **2019**, *2*, 62–65, doi:10.30881/aaeo.00022.
241. Aslam, M.M.; Waseem, M.; Jakada, B.H.; Okal, E.J.; Lei, Z.; Sohaib, H.; Saqib, A.; Yuan, W.; Xu, W.; Zhang, Q. Mechanisms of Abscisic Acid-Mediated Drought Stress Responses in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1084.
242. Ilyas, M.; Nisar, M.; Khan, N.; Hazrat, A.; Khan, A.H.; Hayat, K.; Fahad, S.; Khan, A.; Ullah, A. Drought Tolerance Strategies in Plants: A Mechanistic Approach. *J. Plant Growth Regul.* **2021**, *40*, 926–944, doi:10.1007/s00344-020-10174-5.
243. Li, C.; Mo, Y.; Wang, N.; Xing, L.; Qu, Y.; Chen, Y.; Yuan, Z.; Ali, A.; Qi, J.; Fernández, V.; et al. The Overlooked Functions of Trichomes: Water Absorption and Metal Detoxication. *Plant Cell Environ.* **2023**, *46*, 669–687, doi:10.1111/pce.14530.
244. Xue, D.; Zhang, X.; Lu, X.; Chen, G.; Chen, Z.H. Molecular and Evolutionary Mechanisms of Cuticular Wax for Plant Drought Tolerance. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1–12, doi:10.3389/fpls.2017.00621.
245. Lopez-Iglesias, B.; Villar, R.; Poorter, L. Functional Traits Predict Drought Performance and Distribution of Mediterranean Woody Species. *Acta Oecologica* **2014**, *56*, 10–18, doi:10.1016/j.actao.2014.01.003.
246. Munné-Bosch, S.; Alegre, L. Die and Let Live: Leaf Senescence Contributes to Plant Survival under Drought Stress. *Funct. Plant Biol.* **2004**, *31*, 203–216, doi:10.1071/FP03236.
247. Brandán, J.P.; Curti, R.N.; Acreche, M.M. Phenological Growth Stages in Chia (*Salvia Hispanica* L.) According to the BBCH Scale. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **2019**, *255*, 292–297, doi:10.1016/j.scienta.2019.05.043.
248. Palacio, S.; Millard, P.; Maestro, M.; Montserrat-Martí, G. Non-Structural Carbohydrates and Nitrogen Dynamics in Mediterranean Sub-Shrubs: An Analysis of the Functional Role of Overwintering Leaves. *Plant Biol.* **2007**, *9*, 49–58, doi:10.1055/s-2006-924224.

249. Chaves, M.M.; Flexas, J.; Pinheiro, C. Photosynthesis under Drought and Salt Stress: Regulation Mechanisms from Whole Plant to Cell. *Ann. Bot.* **2009**, *103*, 551–560, doi:10.1093/aob/mcn125.
250. Ashraf, M.; Harris, P.J.C. Photosynthesis under Stressful Environments: An Overview. *Photosynthetica* **2013**, *51*, 163–190, doi:10.1007/s11099-013-0021-6.
251. Dehigaspitiya, P.; Milham, P.; Ash, G.J.; Arun-Chinnappa, K.; Gamage, D.; Martin, A.; Nagasaka, S.; Seneweera, S. Exploring Natural Variation of Photosynthesis in a Site-Specific Manner: Evolution, Progress, and Prospects. *Planta* **2019**, *250*, 1033–1050, doi:10.1007/s00425-019-03223-1.
252. Li, L.; Zhang, Q.; Huang, D. A Review of Imaging Techniques for Plant Phenotyping. *Sensors* **2014**, *14*, 20078–20111, doi:10.3390/s141120078.
253. Pieruschka, R.; Schurr, U. Plant Phenotyping: Past, Present, and Future. *Plant Phenomics* **2019**, *2019*, 7507131, doi:https://doi.org/10.34133/2019/7507131 Perspective.
254. Dhondt, S.; Wuyts, N.; Inzé, D. Cell to Whole-Plant Phenotyping: The Best Is yet to Come. *Trends Plant Sci.* **2013**, *18*, 428–439, doi:10.1016/j.tplants.2013.04.008.
255. Lazarević, B.; Šatović, Z.; Nimac, A.; Vidak, M.; Gunjača, J.; Politeo, O.; Carović-Stanko, K. Application of Phenotyping Methods in Detection of Drought and Salinity Stress in Basil (*Ocimum Basilicum* L.). *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 1–13, doi:10.3389/fpls.2021.629441.
256. Kumar, A.; Gautam, R.D.; Singh, S.; Chauhan, R.; Kumar, M.; Kumar, D.; Kumar, A.; Singh, S. Phenotyping Floral Traits and Essential Oil Profiling Revealed Considerable Variations in Clonal Selections of Damask Rose (*Rosa Damascena* Mill.). *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 1–14, doi:10.1038/s41598-023-34972-5.
257. Chalvin, C.; Drevensek, S.; Chollet, C.; Gilard, F.; Šolić, E.M.; Dron, M.; Bendahmane, A.; Boualem, A.; Cornille, A. Study of the Genetic and Phenotypic Variation among Wild and Cultivated Clary Sages Provides Interesting Avenues for Breeding Programs of a Perfume, Medicinal and Aromatic Plant. *PLoS One* **2021**, *16*, 1–13, doi:10.1371/journal.pone.0248954.
258. George, E.; Hall, M.; De Klerk, G.-J. *Plant Propagation by Tissue Culture*; 3rd ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, Netherlands, 2008; ISBN 9781402050046.
259. Adlak, T.; Tiwari, S.; Tripathi, M.K.; Gupta, N.; Sahu, V.K.; Bhawar, P.; Kandalkar, V.S. Biotechnology: An Advanced Tool for Crop Improvement. *Curr. J. Appl. Sci. Technol.* **2019**, *33*, 1–11, doi:10.9734/cjast/2019/v33i130081.

260. Vanisree, M.; Lee, C.; Lo, S.; Nalawade, S.M.; Lin, C.Y.; Tsay, H. Studies on the Production of Some Important Secondary Metabolites from Medicinal Plants by Plant Tissue Cultures. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **2004**, *45*, 1–22.
261. Grigoriadou, K.; Krigas, N.; Sarropoulou, V.; Papanastasi, K.; Tsoktouridis, G.; Maloupa, E. In Vitro Propagation of Medicinal and Aromatic Plants: The Case of Selected Greek Species with Conservation Priority. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* **2019**, *55*, 635–646, doi:10.1007/s11627-019-10014-6.
262. Singh, R.K.; Prasad, A.; Muthamilarasan, M.; Parida, S.K.; Prasad, M. Breeding and Biotechnological Interventions for Trait Improvement: Status and Prospects. *Planta* **2020**, *252*, 1–18, doi:10.1007/s00425-020-03465-4.
263. Singh, R.K.; Prasad, M. Advances in Agrobacterium Tumefaciens-Mediated Genetic Transformation of Graminaceous Crops. *Protoplasma* **2016**, *253*, 691–707, doi:10.1007/s00709-015-0905-3.
264. Shelepova, O. V.; Baranova, E.N.; Tkacheva, E. V.; Evdokimenkova, Y.B.; Ivanovskii, A.A.; Konovalova, L.N.; Gulevich, A.A. Aromatic Plants Metabolic Engineering: A Review. *Agronomy* **2022**, *12*, 1–16, doi:10.3390/agronomy12123131.
265. Adal, A.M.; Binson, E.; Remedios, L.; Mahmoud, S.S. Expression of Lavender AGAMOUS-like and SEPALLATA3-like Genes Promote Early Flowering and Alter Leaf Morphology in Arabidopsis Thaliana. *Planta* **2021**, *254*, 1–12, doi:10.1007/s00425-021-03703-3.
266. Mendoza-Poudereux, I.; Muñoz-Bertomeu, J.; Navarro, A.; Arrillaga, I.; Segura, J. Enhanced Levels of S-Linalool by Metabolic Engineering of the Terpenoid Pathway in Spike Lavender Leaves. *Metab. Eng.* **2014**, *23*, 136–144, doi:10.1016/j.ymben.2014.03.003.
267. Muñoz-Bertomeu, J.; Arrillaga, I.; Ros, R.; Segura, J. Up-Regulation of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Synthase Enhances Production of Essential Oils in Transgenic Spike Lavender. *Plant Physiol.* **2006**, *142*, 890–900, doi:10.1104/pp.106.086355.
268. Tsuru, M.; Asada, S. Differential Expression of Limonene Synthase Gene Affects Production and Composition of Essential Oils in Leaf and Floret of Transgenic Lavandin (*Lavandula × Intermedia* Emeric Ex Loisel.). *Plant Biotechnol. Rep.* **2014**, *8*, 193–201, doi:10.1007/s11816-013-0309-9.
269. Tsuru, M.; Tomomatsu, K.; Inukai, C.; Tujii, S.; Asada, S. RNAi Targeting the Gene for 1,8-Cineole Synthase Induces Recomposition of Leaf Essential Oil in Lavandin (*Lavandula ×*

- Intermedia Emeric). *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* **2019**, *55*, 165–171, doi:10.1007/s11627-018-09949-z.
270. Zhang, D.; Zhang, Z.; Unver, T.; Zhang, B. CRISPR/Cas: A Powerful Tool for Gene Function Study and Crop Improvement. *J. Adv. Res.* **2021**, *29*, 207–221, doi:10.1016/j.jare.2020.10.003.
271. Ahmad, S.; Sheng, Z.; Jalal, R.S.; Tabassum, J.; Ahmed, F.K.; Hu, S.; Shao, G.; Wei, X.; Abd-El salam, K.A.; Hu, P.; et al. *CRISPR-Cas Technology towards Improvement of Abiotic Stress Tolerance in Plants*; Abd-El salam, K.A., Lim, K.-T., Eds.; INC, 2021; ISBN 9780128219102.
272. Dey, A. CRISPR/Cas Genome Editing to Optimize Pharmacologically Active Plant Natural Products. *Pharmacol. Res.* **2021**, *164*, 105359, doi:10.1016/j.phrs.2020.105359.
273. Laura, M.; Forti, C.; Barberini, S.; Ciorba, R.; Mascarello, C.; Giovannini, A.; Pistelli, L.; Pieracci, Y.; Lanteri, A.P.; Ronca, A.; et al. Highly Efficient CRISPR/Cas9 Mediated Gene Editing in *Ocimum Basilicum* ‘FT Italiko’ to Induce Resistance to *Peronospora Belbahrii*. *Plants* **2023**, *12*, 2395, doi:10.3390/plants12132395.
274. Zhang, X.; Zhuang, L.; Liu, Y.; Yang, Z.; Huang, B. Protein Phosphorylation Associated with Drought Priming-Enhanced Heat Tolerance in a Temperate Grass Species. *Hortic. Res.* **2020**, *7*, 1–12, doi:10.1038/s41438-020-00440-8.
275. Wang, X.; Liu, F. lai; Jiang, D. Priming: A Promising Strategy for Crop Production in Response to Future Climate. *J. Integr. Agric.* **2017**, *16*, 2709–2716, doi:10.1016/S2095-3119(17)61786-6.
276. Ben Abdallah, M.; Methenni, K.; Nouairi, I.; Zarrouk, M.; Youssef, N. Ben Drought Priming Improves Subsequent More Severe Drought in a Drought-Sensitive Cultivar of Olive Cv. Chétoui. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **2017**, *221*, 43–52, doi:10.1016/j.scienta.2017.04.021.
277. Chinnusamy, V.; Zhu, J.K. Epigenetic Regulation of Stress Responses in Plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2009**, *12*, 133–139, doi:10.1016/j.pbi.2008.12.006.
278. Rotondo, J.C.; Mazziotta, C.; Lanzillotti, C.; Tognon, M.; Martini, F. Epigenetic Dysregulations in Merkel Cell Polyomavirus-Driven Merkel Cell Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms222111464.
279. Guo, Y.; Zhao, X.; Li, Y.; Li, Z.; Xiao, Q.; Wang, Y.; Zhang, X.; Ni, Y. Environment-Driven Adaptations of Leaf Cuticular Waxes Are Inheritable for *Medicago Ruthenica*. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, doi:10.3389/fpls.2021.620245.

280. Kahveci, H.; Bilginer, N.; Diraz-Yildirim, E.; Kulak, M.; Yazar, E.; Kocacinar, F.; Karaman, S. Priming with Salicylic Acid, β -Carotene and Tryptophan Modulates Growth, Phenolics and Essential Oil Components of *Ocimum Basilicum* L. Grown under Salinity. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **2021**, *281*, 109964, doi:10.1016/j.scienta.2021.109964.
281. Moori, S.; Ahmadi-Lahijani, M.J. Hormopriming Instigates Defense Mechanisms in Thyme (*Thymus Vulgaris* L.) Seeds under Cadmium Stress. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* **2020**, *19*, 100268, doi:10.1016/j.jarmap.2020.100268.
282. Fantini, E.; Facella, P. Cryptochromes in the Field: How Blue Light Influences Crop Development. *Physiol. Plant.* **2020**, *169*, 336–346, doi:10.1111/ppl.13088.
283. Sachdev, S.; Ansari, S.A.; Ansari, M.I.; Fujita, M.; Hasanuzzaman, M. Abiotic Stress and Reactive Oxygen Species: Generation, Signaling, and Defense Mechanisms. *Antioxidants* **2021**, *10*, 277, doi:https://doi.org/10.3390/antiox10020277.
284. Ahmadi, T.; Shabani, L.; Sabzalian, M.R. LED Light Mediates Phenolic Accumulation and Enhances Antioxidant Activity in *Melissa Officinalis* L. under Drought Stress Condition. *Protoplasma* **2020**, *257*, 1231–1242, doi:10.1007/s00709-020-01501-4.
285. Han, S.; Park, Y.; Park, C. Light Priming of Thermotolerance Development in Plants. *Plant Signal. Behav.* **2019**, *14*, 1–3, doi:10.1080/15592324.2018.1554469.
286. Loi, M.; Villani, A.; Paciolla, F.; Mulè, G.; Paciolla, C. Challenges and Opportunities of Light-Emitting Diode (Led) as Key to Modulate Antioxidant Compounds in Plants. a Review. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1–35, doi:10.3390/antiox10010042.
287. Zhang, S.; Ma, J.; Zou, H.; Zhang, L.; Li, S.; Wang, Y. The Combination of Blue and Red LED Light Improves Growth and Phenolic Acid Contents in *Salvia Miltiorrhiza* Bunge. *Ind. Crops Prod.* **2020**, *158*, 112959, doi:10.1016/j.indcrop.2020.112959.
288. Ahmadi, T.; Shabani, L.; Sabzalian, M.R. LED Light Sources Improved the Essential Oil Components and Antioxidant Activity of Two Genotypes of Lemon Balm (*Melissa Officinalis* L.). *Bot. Stud.* **2021**, *62*, doi:10.1186/s40529-021-00316-7.
289. Nguyen, T.K.L.; Oh, M.M. Physiological and Biochemical Responses of Green and Red *Perilla* to LED-Based Light. *J. Sci. Food Agric.* **2021**, *101*, 240–252, doi:10.1002/jsfa.10636.
290. Nguyen, T.L.; Saleh, M.A. Effect of Exposure to Light Emitted Diode (LED) Lights on Essential Oil Composition of Sweet Mint Plants. *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.* **2019**, *54*, 435–440,

- doi:10.1080/10934529.2018.1562810.
291. Kumar, N.; Reddy, M.P. In Vitro Plant Propagation: A Review. *J. For. Environ. Sci.* **2011**, *27*, 61–72.
 292. Aqeel, U.; Aftab, T.; Khan, M.M.A.; Naeem, M. Regulation of Essential Oil in Aromatic Plants under Changing Environment. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* **2023**, *32*, 100441, doi:10.1016/j.jarmap.2022.100441.
 293. Jordán, M.J.; Lax, V.; Rota, M.C.; Lorán, S.; Sotomayor, J.A. Effect of Bioclimatic Area on the Essential Oil Composition and Antibacterial Activity of *Rosmarinus Officinalis* L. *Food Control* **2013**, *30*, 463–468, doi:10.1016/j.foodcont.2012.07.029.
 294. Muñoz-Bertomeu, J.; Arrillaga, I.; Segura, J. Essential Oil Variation within and among Natural Populations of *Lavandula Latifolia* and Its Relation to Their Ecological Areas. *Biochem. Syst. Ecol.* **2007**, *35*, 479–488, doi:10.1016/j.bse.2007.03.006.
 295. Farhat, M. Ben; Chaouch-Hamada, R.; Sotomayor, J.A.; Landoulsi, A.; Jordán, M.J. Antioxidant Potential of *Salvia Officinalis* L. Residues as Affected by the Harvesting Time. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *54*, 78–85, doi:10.1016/j.indcrop.2014.01.001.
 296. Ahmadi, T.; Shabani, L.; Sabzalian, M.R. Improvement in Drought Tolerance of Lemon Balm, *Melissa Officinalis* L. under the Pre-Treatment of LED Lighting. *Plant Physiol. Biochem.* **2019**, *139*, 548–557, doi:10.1016/j.plaphy.2019.04.021.
 297. Scholander, P.F.; Hammel, H.T.; Bradstreet, E.D.; Hemmingsen, E.A. Sap Pressure in Vascular Plants. *Science (80-)*. **1965**, *148*, 339–346, doi:10.1126/science.148.3668.339.
 298. Ábrahám, E.; Hourton-Cabassa, C.; Erdei, L.; Szabados, L. Methods for Determination of Proline in Plants. In *Plant Stress Tolerance*; Humana Press, 2010; Vol. 639, pp. 1–14 ISBN 978-1-60761-701-3.
 299. Albacete, A.; Ghanem, M.E.; Martínez-Andújar, C.; Acosta, M.; Sánchez-Bravo, J.; Martínez, V.; Lutts, S.; Dodd, I.C.; Pérez-Alfocea, F. Hormonal Changes in Relation to Biomass Partitioning and Shoot Growth Impairment in Salinized Tomato (*Solanum Lycopersicum* L.) Plants. *J. Exp. Bot.* **2008**, *59*, 4119–4131, doi:10.1093/jxb/ern251.
 300. Gruszka, J.; Kruk, J. RP-LC for Determination of Plastochromanol, Tocotrienols and Tocopherols in Plant Oils. *Chromatographia* **2007**, *66*, 909–913, doi:10.1365/s10337-007-0416-2.
 301. Botsoglou, N.A.; Fletouris, D.J.; Papageorgiou, G.E.; Vassilopoulos, V.N.; Mantis, A.J.;

- Trakatellis, A.G. Rapid, Sensitive, and Specific Thiobarbituric Acid Method for Measuring Lipid Peroxidation in Animal Tissue, Food, and Feedstuff Samples. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1931–1937, doi:10.1021/jf00045a019.
302. Moselhy, H.F.; Reid, R.G.; Yousef, S.; Boyle, S.P. A Specific, Accurate, and Sensitive Measure of Total Plasma Malondialdehyde by HPLC. *J. Lipid Res.* **2013**, *54*, 852–858, doi:10.1194/jlr.D032698.
303. Bekhradi, F.; Luna, M.C.; Delshad, M.; Jordan, M.J.; Sotomayor, J.A.; Martínez-Conesa, C.; Gil, M.I. Effect of Deficit Irrigation on the Postharvest Quality of Different Genotypes of Basil Including Purple and Green Iranian Cultivars and a Genovese Variety. *Postharvest Biol. Technol.* **2015**, *100*, 127–135, doi:10.1016/j.postharvbio.2014.09.017.
304. Lichtenthaler, H.K.; Buschmann, C. Extraction of Photosynthetic Tissues: Chlorophylls and Carotenoids. *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.* **2001**, *1*, F4.2.1–F4.2.6, doi:10.1002/0471142913.faf0402s01.
305. Jordán, M.J.; Lax, V.; Rota, M.C.; Lorán, S.; Sotomayor, J.A. Effect of the Phenological Stage on the Chemical Composition, and Antimicrobial and Antioxidant Properties of *Rosmarinus Officinalis* L Essential Oil and Its Polyphenolic Extract. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *48*, 144–152, doi:10.1016/j.indcrop.2013.04.031.
306. Jordán, M.J.; Sánchez-Gómez, P.; Jiménez, J.F.; Quílez, M.; Sotomayor, J.A. Chemical Composition and Antiradical Activity of Essential Oil from *Satureja intricata*, *S. obovata* and Their Hybrid *Satureja x Delpozoi* María. *Nat. Prod. Commun.* **2010**, *5*, 629–634.
307. Lesage-Meessen, L.; Bou, M.; Sigoillot, J.C.; Faulds, C.B.; Lomascolo, A. Essential Oils and Distilled Straws of Lavender and Lavandin: A Review of Current Use and Potential Application in White Biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 3375–3385, doi:10.1007/s00253-015-6511-7.
308. Emami Bistgani, Z.; Siadat, S.A.; Bakhshandeh, A.; Ghasemi Pirbalouti, A.; Hashemi, M. Interactive Effects of Drought Stress and Chitosan Application on Physiological Characteristics and Essential Oil Yield of *Thymus daenensis* Celak. *Crop J.* **2017**, *5*, 407–415, doi:10.1016/j.cj.2017.04.003.
309. Ekren, S.; Sönmez, Ç.; Özçakal, E.; Kurttaş, Y.S.K.; Bayram, E.; Gürgülü, H. The Effect of Different Irrigation Water Levels on Yield and Quality Characteristics of Purple Basil (*Ocimum basilicum* L.). *Agric. Water Manag.* **2012**, *109*, 155–161, doi:10.1016/j.agwat.2012.03.004.

310. Avramova, Z. Transcriptional “memory” of a Stress: Transient Chromatin and Memory (Epigenetic) Marks at Stress-Response Genes. *Plant J.* **2015**, *83*, 149–159, doi:10.1111/tpj.12832.
311. Tátrai, Z.A.; Sanoubar, R.; Pluhár, Z.; Mancarella, S.; Orsini, F.; Gianquinto, G. Morphological and Physiological Plant Responses to Drought Stress in Thymus Citriodorus. *Int. J. Agron.* **2016**, *2016*, doi:10.1155/2016/4165750.
312. Shariat, A.; Karimzadeh, G.; Assareh, M.H.; Hadian, J. Metabolite Profiling and Molecular Responses in a Drought-Tolerant Savory, *Satureja Rechingeri* Exposed to Water Deficit. *3 Biotech* **2018**, *8*, 0, doi:10.1007/s13205-018-1491-9.
313. Ashrafi, M.; Azimi-Moqadam, M.-R.; MohseniFard, E.; Shekari, F.; Jafary, H.; Moradi, P.; Pucci, M.; Abate, G.; Mastinu, A. Physiological and Molecular Aspects of Two Thymus Species Differently Sensitive to Drought Stress. *BioTech* **2022**, *11*, 8, doi:10.3390/biotech11020008.
314. Lamacque, L.; Charrier, G.; dos Santos Farnese, F.; Lemaire, B.; Améglio, T.; Herbette, S. Drought-Induced Mortality : Branch Diameter Variation Reveals a Point of No Recovery in Lavender Species. *Plant Physiol.* **2020**, *183*, 1638–1649, doi:10.1104/pp.20.00165.
315. Saunier, A.; Ormeño, E.; Moja, S.; Fernandez, C.; Robert, E.; Dupouyet, S.; Despinasse, Y.; Baudino, S.; Nicolè, F.; Bousquet-Mélou, A. Lavender Sensitivity to Water Stress: Comparison between Eleven Varieties across Two Phenological Stages. *Ind. Crops Prod.* **2022**, *177*, doi:10.1016/j.indcrop.2022.114531.
316. Olmos, E.; Ferrández, T.; Alarcón, J.J. Subcellular Effects of Drought Stress in *Rosmarinus Officinalis*. *Plant Biol.* **2007**, *9*, 77–84, doi:10.1055/s-2006-924488.
317. Mahdavi, A.; Moradi, P.; Mastinu, A. Variation in Terpene Profiles of *Thymus Vulgaris* in Water Deficit Stress Response. *Molecules* **2020**, *25*, 1–17, doi:10.3390/molecules25051091.
318. Abate, E.; Azzarà, M.; Trifilò, P. When Water Availability Is Low , Two Mediterranean *Salvia* Species Rely on Root Hydraulics. *Plants* **2021**, *10*, 1888, doi:https://doi.org/10.3390/plants10091888.
319. Ghosh, U.K.; Islam, M.N.; Siddiqui, M.N.; Khan, M.A.R. Understanding the Roles of Osmolytes for Acclimatizing Plants to Changing Environment: A Review of Potential Mechanism. *Plant Signal. Behav.* **2021**, *16*, doi:10.1080/15592324.2021.1913306.
320. Casadesús, A.; Arabia, A.; Pujolriu, R.; Munn, S. Differential Accumulation of

- Tocochromanols in Photosynthetic and Non-Photosynthetic Tissues of Strawberry Plants Subjected to Reiterated Water Deficit. *Plant Physiol. Biochem.* **2020**, *155*, 868–876, doi:10.1016/j.plaphy.2020.06.038.
321. Nowicka, B.; Trela-Makowej, A.; Latowski, D.; Strzalka, K.; Szymańska, R. Antioxidant and Signaling Role of Plastid-Derived Isoprenoid Quinones and Chromanols. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2950, doi:https://doi.org/10.3390/ijms22062950.
322. Casadesús, A.; Polo, J.; Munné-bosch, S. Hormonal Effects of an Enzymatically Hydrolyzed Animal Protein-Based Biostimulant (Pepton) in Water-Stressed Tomato Plants. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 758, doi:10.3389/fpls.2019.00758.
323. Fleta-Soriano, E.; Munné-Bosch, S. Enhanced Plastochromanols-8 Accumulation during Reiterated Drought in Maize (*Zea Mays* L .). *Plant Physiol. Biochem.* **2017**, *112*, 283–289, doi:10.1016/j.plaphy.2017.01.016.
324. Nxele, X.; Klein, A.; Ndimba, B.K. Drought and Salinity Stress Alters ROS Accumulation, Water Retention, and Osmolyte Content in Sorghum Plants. *South African J. Bot.* **2017**, *108*, 261–266, doi:10.1016/j.sajb.2016.11.003.
325. Saeedfar, S.; Negahban, M.; Mahmoodi Soorestani, M. The Effect of Drought Stress on the Essential Oil Content and Some of the Biochemical Characteristics of Anise Hyssop (*Agastache Foeniculum* [Pursh] Kuntze). *Eur. J. Mol. Biotechnol.* **2015**, *8*, 103–114, doi:10.13187/ejmb.2015.8.103.
326. Munné-Bosch, S.; Cela, J. Effects of Water Deficit on Photosystem II Photochemistry and Photoprotection during Acclimation of Lyreleaf Sage (*Salvia Lyrata* L .) Plants to High Light. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2006**, *85*, 191–197, doi:10.1016/j.jphotobiol.2006.07.007.
327. Mohammadi, H.; Akhondzadeh, M.; Ghorbanpour, M.; Aghaee, A. Physiological Responses and Secondary Metabolite Ingredients in Sage Plants Induced by 24-Epibrassinolide Foliar Application under Different Water Deficit Regimes. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **2020**, *263*, 109139, doi:10.1016/j.scienta.2019.109139.
328. Emrahi, R.; Morshedloo, M.R.; Ahmadi, H.; Javanmard, A.; Maggi, F. Intraspecific Divergence in Phytochemical Characteristics and Drought Tolerance of Two Carvacrol-Rich *Origanum Vulgare* Subspecies: Subsp. *Hirtum* and Subsp. *Gracile*. *Ind. Crop. Prod.* **2021**, *168*, 113557, doi:10.1016/j.indcrop.2021.113557.
329. Alrifai, O.; Hao, X.; Marccone, M.F.; Tsao, R. Current Review of the Modulatory Effects of

- LED Lights on Photosynthesis of Secondary Metabolites and Future Perspectives of Microgreen Vegetables. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 6075–6090, doi:10.1021/acs.jafc.9b00819.
330. Dobros, N.; Zawada, K.; Paradowska, K. Phytochemical Profile and Antioxidant Activity of *Lavandula Angustifolia* and *Lavandula x Intermedia* Cultivars Extracted with Different Methods. *Antioxidants* **2022**, *11*, 711, doi:10.3390/antiox11040711.
331. Torras-Claveria, L.; Jauregui, O.; Bastida, J.; Codina, C.; Viladomat, F. Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Lavandin (*Lavandula x Intermedia* Emeric Ex Loiseleur) Waste. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 8436–8443, doi:10.1021/jf070236n.
332. Omid, H.; Shams, H.; Seif Sahandi, M.; Rajabian, T. Balangu (*Lallemantia* Sp.) Growth and Physiology under Field Drought Conditions Affecting Plant Medicinal Content. *Plant Physiol. Biochem.* **2018**, *130*, 641–646, doi:10.1016/j.plaphy.2018.08.014.
333. Albergaria, E.T.; Oliveira, A.F.M.; Albuquerque, U.P. The Effect of Water Deficit Stress on the Composition of Phenolic Compounds in Medicinal Plants. *South African J. Bot.* **2020**, *131*, 12–17, doi:10.1016/j.sajb.2020.02.002.
334. Khosh-Khui, M.; Ashiri, F.; Saharkhiz, M. Effects of Irrigation Regimes on Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Thyme (*Thymus Vulgaris* L.). *Med. Aromat. Plants* **2012**, *1*, 1000114, doi:10.4172/2167-0412.1000114.
335. Figueroa-Pérez, M.G.; Rocha-Guzmán, N.E.; Pérez-Ramírez, I.F.; Mercado-Silva, E.; Reynoso-Camacho, R. Metabolite Profile, Antioxidant Capacity, and Inhibition of Digestive Enzymes in Infusions of Peppermint (*Mentha Piperita*) Grown under Drought Stress. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 12027–12033, doi:10.1021/jf503628c.
336. Salido, S.; Altarejos, J.; Nogueras, M.; Sánchez, A.; Luque, P. Chemical Composition and Seasonal Variations of Spike Lavender Oil from Southern Spain. *J. Essent. Oil Res.* **2004**, *16*, 206–210, doi:10.1080/10412905.2004.9698698.
337. Mendoza-Poudereux, I.; Kutzner, E.; Huber, C.; Segura, J.; Arrillaga, I.; Eisenreich, W. Dynamics of Monoterpene Formation in Spike Lavender Plants. *Metabolites* **2017**, *7*, doi:10.3390/metabo7040065.
338. Chamkhi, I.; Benali, T.; Aanniz, T.; El Menyiy, N.; Guaouguau, F.-E.; El Omari, N.; Zengin, G.; Bouyahya, A.; El-shazly, M. Plant-Microbial Interaction : The Mechanism and the Application of Microbial Elicitor Induced Secondary Metabolites Biosynthesis in Medicinal Plants. *Plant Physiol. Biochem.* **2021**, *167*, 269–295,

- doi:10.1016/j.plaphy.2021.08.001.
339. Angioni, A.; Barra, A.; Coroneo, V.; Dessi, S.; Cabras, P. Chemical Composition , Seasonal Variability , and Antifungal Activity of Lavandula Stoechas L . Ssp . Stoechas Essential Oils from Stem / Leaves and Flowers. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4364–4370, doi:10.1021/jf0603329 CCC:
 340. Aprotosoai, A.C.; Gille, E.; Trifan, A.; Luca, V.S.; Miron, A. Essential Oils of Lavandula Genus: A Systematic Review of Their Chemistry. *Phytochem. Rev.* **2017**, *16*, 761–799, doi:10.1007/s11101-017-9517-1.
 341. Farhat, M. Ben; Jordán, M.J.; Chaouech-Hamada, R.; Landoulsi, A.; Sotomayor, J.A. Variations in Essential Oil, Phenolic Compounds, and Antioxidant Activity of Tunisian Cultivated Salvia Officinalis L. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 10349–10356, doi:10.1021/jf901877x.
 342. Méndez-Tovar, I.; Novak, J.; Sponza, S.; Herrero, B.; Asensio-S-Manzanera, M.C. Variability in Essential Oil Composition of Wild Populations of Labiatae Species Collected in Spain. *Ind. Crops Prod.* **2016**, *79*, 18–28, doi:10.1016/j.indcrop.2015.10.009.
 343. Tuttolomondo, T.; Iapichino, G.; Licata, M.; Virga, G.; Leto, C.; La Bella, S. Agronomic Evaluation and Chemical Characterization of Sicilian Salvia Sclarea L. Accessions. *Agronomy* **2020**, *10*, 1–21, doi:10.3390/agronomy10081114.
 344. Kirakosyan, A.; Seymour, E.; Kaufman, P.B.; Warber, S.; Bolling, S.; Chang, S.C. Antioxidant Capacity of Polyphenolic Extracts from Leaves of Crataegus Laevigata and Crataegus Monogyna (Hawthorn) Subjected to Drought and Cold Stress. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3973–3976, doi:10.1021/jf030096r.
 345. Kumarappan, C.T.; Thilagam, E.; Mandal, S.C. Antioxidant Activity of Polyphenolic Extracts of Ichnocarpus Frutescens. *Saudi J. Biol. Sci.* **2012**, *19*, 349–355, doi:10.1016/j.sjbs.2012.04.004.
 346. Ben Farhat, M.; Jordán, M.J.; Chaouch-Hamada, R.; Landoulsi, A.; Sotomayor, J.A. Changes in Phenolic Profiling and Antioxidant Capacity of Salvia Aegyptiaca L. by-Products during Three Phenological Stages. *LWT - Food Sci. Technol.* **2015**, *63*, 791–797, doi:10.1016/j.lwt.2015.03.015.
 347. Pourreza, N. Phenolic Compounds as Potential Antioxidant. *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.* **2013**, *8*, 149–150, doi:10.17795/jjnpp-15380.
 348. Farías, G.; Brutti, O.; Grau, R.; Di Leo Lira, P.; Retta, D.; van Baren, C.; Vento, S.; Bandoni,

- A.L. Morphological, Yielding and Quality Descriptors of Four Clones of *Origanum* Spp. (Lamiaceae) from the Argentine Littoral Region Germplasm Bank. *Ind. Crops Prod.* **2010**, *32*, 472–480, doi:10.1016/j.indcrop.2010.06.019.
349. Council of Europe, E.P.C. and E.D. for the Q. of M.& H. *European Pharmacopoeia*; 7rd ed.; Healthcare, Council Of Europe : European Directorate for the Quality of Medicines and: Strasbourg, 2010;
350. Chrysargyris, A.; Skaltsa, H.; Konstantopoulou, M. Medicinal and Aromatic Plants (MAPs): The Connection between Cultivation Practices and Biological Properties. *Agronomy* **2022**, *13*, 3108, doi:10.3390/agronomy12123108.
351. Sintaha, M.; Man, C.K.; Yung, W.S.; Duan, S.; Li, M.W.; Lam, H.M. Drought Stress Priming Improved the Drought Tolerance of Soybean. *Plants* **2022**, *11*, doi:10.3390/plants11212954.
352. Najar, B.; Pistelli, L.; Ferri, B.; Angelini, L.G.; Tavarini, S. Crop Yield and Essential Oil Composition of Two *Thymus Vulgaris* Chemotypes along Three Years of Organic Cultivation in a Hilly Area of Central Italy. *Molecules* **2021**, *26*, 5109, doi:https://doi.org/10.3390/molecules26165109.
353. Méndez-Tovar, I.; Herrero, B.; Pérez-Magariño, S.; Pereira, J.A.; Asensio-S.-Manzanera, M.C. By-Product of *Lavandula Latifolia* Essential Oil Distillation as Source of Antioxidants. *J. Food Drug Anal.* **2015**, *23*, 225–233, doi:10.1016/j.jfda.2014.07.003.
354. Dobros, N.; Zawada, K.D.; Paradowska, K. Phytochemical Profiling, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of Plants Belonging to the *Lavandula* Genus. *Molecules* **2023**, *28*, doi:10.3390/molecules28010256.
355. Nurzyńska-Wierdak, R. Phenolic Compounds from New Natural Sources — Plant Genotype and Ontogenetic Variation. *Molecules* **2023**, *28*, 1731, doi:https://doi.org/10.3390/molecules28041731.
356. Gunnaiah, R.; Kushalappa, A.C.; Duggavathi, R.; Fox, S.; Somers, D.J. Integrated Metabolo-Proteomic Approach to Decipher the Mechanisms by Which Wheat Qtl (Fhb1) Contributes to Resistance against *Fusarium Graminearum*. *PLoS One* **2012**, *7*, doi:10.1371/journal.pone.0040695.
357. Agati, G.; Azzarello, E.; Pollastri, S.; Tattini, M. Flavonoids as Antioxidants in Plants: Location and Functional Significance. *Plant Sci.* **2012**, *196*, 67–76, doi:10.1016/j.plantsci.2012.07.014.

358. Afonso, A.F.; Pereira, O.R.; Válega, M.; Silva, A.M.S.; Cardoso, S.M. Metabolites and Biological Activities of *Thymus Zygis*, *Thymus Pulegioides*, and *Thymus Fragrantissimus* Grown under Organic Cultivation. *Molecules* **2018**, *23*, doi:10.3390/molecules23071514.
359. Kleinwächter, M.; Paulsen, J.; Bloem, E.; Schnug, E.; Selmar, D. Moderate Drought and Signal Transducer Induced Biosynthesis of Relevant Secondary Metabolites in Thyme (*Thymus Vulgaris*), Greater Celandine (*Chelidonium Majus*) and Parsley (*Petroselinum Crispum*). *Ind. Crops Prod.* **2015**, *64*, 158–166, doi:10.1016/j.indcrop.2014.10.062.
360. Hasan, M.M.; Bashir, T.; Ghosh, R.; Lee, S.K.; Bae, H. An Overview of LEDs' Effects on the Production of Bioactive Compounds and Crop Quality. *Molecules* **2017**, *22*, 1–12, doi:10.3390/molecules22091420.
361. Brito, C.; Ferreira, H.; Dinis, L.-T.; Trindade, H.; Marques, D.; Correia, C.M.; Moutinho-Pereira, J. Different LED Light Intensity and Quality Change Perennial Ryegrass (*Lolium Perenne* L.) Physiological and Growth Responses and Water and Energy Consumption. *Front. Plant Sci.* **2023**, *14*, 1160100, doi:10.3389/fpls.2023.1160100.
362. Barták, M.; Hájek, J.; Halıcı, M.G.; Bednaříková, M.; Casanova-Katny, A.; Peter, V.; Puhovkin, A.; Mishra, K.B.; Giordano, D. Resistance of Primary Photosynthesis to Photoinhibition in Antarctic Lichen *Xanthoria Elegans* : Photoprotective Mechanisms Activated during a Short Period of High Light Stress. **2023**, 1–15.
363. Erickson, E.; Wakao, S.; Niyogi, K.K. Light Stress and Photoprotection in *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Plant J.* **2015**, *82*, 449–465, doi:10.1111/tpj.12825.
364. Borbély, P.; Gasperl, A.; Pálmai, T.; Ahres, M.; Asghar, M.A.; Galiba, G.; Müller, M.; Kocsy, G. Light Intensity-and Spectrum-Dependent Redox Regulation of Plant Metabolism. *Antioxidants* **2022**, *11*, 1–37, doi:10.3390/antiox11071311.
365. Ganguly, D.R.; Stone, B.A.B.; Bowerman, A.F.; Eichten, S.R.; Pogson, B.J. Excess Light Priming in *Arabidopsis Thaliana* Genotypes with Altered DNA Methylomes. *G3 Genes, Genomes, Genet.* **2019**, *9*, 3611–3621, doi:10.1534/g3.119.400659.
366. Müller-Xing, R.; Xing, Q.; Goodrich, J. Footprints of the Sun: Memory of UV and Light Stress in Plants. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 1–12, doi:10.3389/fpls.2014.00474.
367. Lima, C.S.; Ferreira-Silva, S.L.; Carvalho, F.E.L.; Lima Neto, M.C.; Aragão, R.M.; Silva, E.N.; Sousa, R.M.J.; Silveira, J.A.G. Antioxidant Protection and PSII Regulation Mitigate Photo-Oxidative Stress Induced by Drought Followed by High Light in Cashew Plants. *Environ. Exp. Bot.* **2018**, *149*, 59–69, doi:10.1016/j.envexpbot.2018.02.001.

368. Murashige, T.; Skoog, F. Murashige1962Revised.Pdf. *Physiol. Plant.* **1962**, *15*, 474–497.
369. Rafeie, M.; Shabani, L.; Sabzalian, M.R.; Gharibi, S. Pretreatment with LEDs Regulates Antioxidant Capacity and Polyphenolic Profile in Two Genotypes of Basil under Salinity Stress. *Protoplasma* **2022**, *259*, 1567–1583, doi:10.1007/s00709-022-01746-1.
370. Asensi-Fabado, M.A.; Oliván, A.; Munné-Bosch, S. A Comparative Study of the Hormonal Response to High Temperatures and Stress Reiteration in Three Labiatae Species. *Environ. Exp. Bot.* **2013**, *94*, 57–65, doi:10.1016/j.envexpbot.2012.05.001.
371. Kulak, M. Recurrent Drought Stress Effects on Essential Oil Profile of Lamiaceae Plants: An Approach Regarding Stress Memory. *Ind. Crops Prod.* **2020**, *154*, 1–17, doi:10.1016/j.indcrop.2020.112695.
372. Gyugos, M.; Ahres, M.; Gulyás, Z.; Szalai, G.; Darkó, É.; Mednyánszky, Z.; Dey, N.; Kar, R.K.; Simon-Sarkadi, L.; Kocsy, G. Light Spectrum Modifies the Drought-induced Changes of Glutathione and Free Amino Acid Levels in Wheat. *Acta Physiol. Plant.* **2021**, *43*, 90, doi:10.1007/s11738-021-03253-x.
373. Lv, B.S.; Ma, H.Y.; Li, X.W.; Wei, L.X.; Lv, H.Y.; Yang, H.Y.; Jiang, C.J.; Liang, Z.W. Proline Accumulation Is Not Correlated with Saline-Alkaline Stress Tolerance in Rice Seedlings. *Agron. J.* **2015**, *107*, 51–60, doi:10.2134/agronj14.0327.
374. Volkova, L.; Tausz, M.; Bennett, L.T.; Dreyer, E. Interactive Effects of High Irradiance and Moderate Heat on Photosynthesis, Pigments, and Tocopherol in the Tree-Fern *Dicksonia Antarctica*. *Funct. Plant Biol.* **2009**, *36*, 1046–1056, doi:10.1071/FP09098.
375. Samuolienė, G.; Urbonavičiūtė, A.; Brazaitytė, A.; Šabajevienė, G.; Sakalauskaitė, J.; Duchovskis, P. The Impact of LED Illumination on Antioxidant Properties of Sprouted Seeds. *Cent. Eur. J. Biol.* **2011**, *6*, 68–74, doi:10.2478/s11535-010-0094-1.
376. Takahashi, S.; Badger, M.R. Photoprotection in Plants: A New Light on Photosystem II Damage. *Trends Plant Sci.* **2011**, *16*, 53–60, doi:10.1016/j.tplants.2010.10.001.
377. Pintó-Marijuan, M.; Cotado, A.; Fleta-Soriano, E.; Munné-Bosch, S. Drought Stress Memory in the Photosynthetic Mechanisms of an Invasive CAM Species, *Aptenia Cordifolia*. *Photosynth. Res.* **2017**, *131*, 241–253, doi:10.1007/s11120-016-0313-3.
378. Chowdhury, J.; Karim, M.; Khaliq, Q.; Ahmed, A. Effect of Drought Stress on Bio-Chemical Change and Cell Membrane Stability of Soybean Genotypes. *Bangladesh J. Agric. Res.* **2017**, *42*, 475–485, doi:10.3329/bjar.v42i3.34506.

379. Avasiloaiei, D.I.; Calara, M.; Brezeanu, P.M.; Murariu, O.C.; Brezeanu, C. On the Future Perspectives of Some Medicinal Plants within Lamiaceae Botanic Family Regarding Their Comprehensive Properties and Resistance against Biotic and Abiotic Stresses. *Genes (Basel)*. **2023**, *14*, 955, doi:<https://doi.org/10.3390/genes14050955>.
380. Zervoudakis, G.; Salahas, G.; Kaspiris, G.; Konstantopoulou, E. Influence of Light Intensity on Growth and Physiological Characteristics of Common Sage (*Salvia Officinalis* L.). *Brazilian Arch. Biol. Technol.* **2012**, *55*, 89–95, doi:<https://doi.org/10.1590/S1516-89132012000100011>.
381. Araújo, D.X.; Rocha, T.T.; de Carvalho, A.A.; Bertolucci, S.K.V.; Medeiros, A.P.R.; Ribeiro, F.N.S.; Barbosa, S.M.; Pinto, J.E.B.P. Photon Flux Density and Wavelength Influence on Growth, Photosynthetic Pigments and Volatile Organic Compound Accumulation in *Aeollanthus Suaveolens* (Catinga-de-Mulata) under in Vitro Conditions. *Ind. Crops Prod.* **2021**, *168*, doi:10.1016/j.indcrop.2021.113597.
382. Wu, X.; Khan, R.; Gao, H.; Liu, H.; Zhang, J.; Ma, X. Low Light Alters the Photosynthesis Process in Cigar Tobacco via Modulation of the Chlorophyll Content, Chlorophyll Fluorescence, and Gene Expression. *Agric.* **2021**, *11*, 755, doi:10.3390/agriculture11080755.
383. Young, A.J. The Photoprotective Role of Carotenoids in Higher Plants. *Physiol. Plant.* **1991**, *83*, 702–708, doi:10.1111/j.1399-3054.1991.tb02490.x.
384. Beisel, K.G.; Jahnke, S.; Hofmann, D.; Köppchen, S.; Schurr, U.; Matsubara, S. Continuous Turnover of Carotenes and Chlorophyll a in Mature Leaves of *Arabidopsis* Revealed by ¹⁴CO₂ Pulse-Chase Labeling. *Plant Physiol.* **2010**, *152*, 2188–2199, doi:10.1104/pp.109.151647.
385. Nicolas-Espinosa, J.; Garcia-Ibañez, P.; Lopez-Zaplana, A.; Yepes-Molina, L.; Albaladejo-Marico, L.; Carvajal, M. Confronting Secondary Metabolites with Water Uptake and Transport in Plants under Abiotic Stress. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 2826, doi:<https://doi.org/10.3390/ijms24032826>.
386. Appolloni, E.; Pennisi, G.; Zauli, I.; Carotti, L.; Paucek, I.; Quaini, S.; Orsinia, F.; Gianquinto, G. Beyond Vegetables: Effects of Indoor LED Light on Specialized Metabolite Biosynthesis in Medicinal and Aromatic Plants, Edible Flowers, and Microgreens. *J. Sci. Food Agric.* **2021**, *102*, 472–487, doi:10.1002/jsfa.11513.
387. Hcini, K.; Bahi, A.; Zarroug, M.B.; Farhat, M. Ben; Lozano-Pérez, A.A.; Cenis, J.L.;

- Stambouli-Essassi, S.; Jordán, M.J. Polyphenolic Profile of Tunisian Thyme (*Thymbra Capitata* L.) Post-Distilled Residues: Evaluation of Total Phenolic Content and Phenolic Compounds and Their Contribution to Antioxidant Activity. *Molecules* **2022**, *27*, 8791, doi:<https://doi.org/10.3390/molecules27248791>.
388. Holopainen, J.K.; Gershenzon, J. Multiple Stress Factors and the Emission of Plant VOCs. *Trends Plant Sci.* **2010**, *15*, 176–184, doi:10.1016/j.tplants.2010.01.006.
389. Šamec, D.; Karalija, E.; Šola, I.; Vujčić Bok, V.; Salopek-Sondi, B. The Role of Polyphenols in Abiotic Stress Response: The Influence of Molecular Structure. *Plants* **2021**, *10*, 1–24, doi:10.3390/plants10010118.
390. Askary, M.; Behdani, M.A.; Parsa, S.; Mahmoodi, S.; Jamialahmadi, M. Water Stress and Manure Application Affect the Quantity and Quality of Essential Oil of *Thymus Daenensis* and *Thymus Vulgaris*. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *111*, 336–344, doi:10.1016/j.indcrop.2017.09.056.
391. Yousefzadeh, K.; Houshmand, S.; Shiran, B.; Mousavi-Fard, S.; Zeinali, H.; Nikoloudakis, N.; Gheisari, M.M.; Fanourakis, D. Joint Effects of Developmental Stage and Water Deficit on Essential Oil Traits (Content, Yield, Composition) and Related Gene Expression: A Case Study in Two *Thymus* Species. *Agronomy* **2022**, *12*, doi:10.3390/agronomy12051008.

Capítulo 11 Anexos

Annexes



Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops & Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop



Evaluation of the physiological parameters in *Lavandula latifolia* Medik. under water deficit for preselection of elite drought-resistant plants

Gustavo J. Cáceres-Cevallos^{a,*}, Alfonso A. Albacete-Moreno^{a,b,c}, Federico Ferreres^d, Ángel Gil-Izquierdo^e, María J. Jordán^a

^a Research Group on Rainfed Agriculture for Rural Development, Department of Rural Development, Oenology and Sustainable Agriculture, Murcia Institute of Agri-Food and Environmental Research (IMIDA), La Alberca de las Torres, 30150 Murcia, Spain

^b Plant Nutrition Group, CEBAS (CSIC), Campus University Espinardo, P.O. Box 164, 30100 Murcia, Spain

^c Crop Production and Agrotechnology Department, Murcia Institute of Agri-Food and Environmental Research (IMIDA), La Alberca de las Torres, 30150 Murcia, Spain

^d Department of Food Technology and Nutrition, Molecular Recognition and Encapsulation (REM) Group, Universidad Católica de Murcia. UCAM, Campus Los Jerónimos, s/n., 30107 Murcia, Spain

^e Research Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods, Department of Food Science and Technology, CEBAS (CSIC), Campus University Espinardo, P.O. Box 164, 30100 Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Spike lavender
Drought
Plastochromanol-8
Malondialdehyde
Abscisic acid
Polyphenolic profile

ABSTRACT

Lavandula latifolia Medik. is an aromatic-medicinal plant, native to the Mediterranean region, for which economic interest is mainly focused on the production of essential oil. In the Mediterranean area, the negative effects of climate change, with increasingly frequent extreme heatwaves and drought episodes, have led to the need to select plants with greater tolerance of such scenarios for the future development of this rainfed crop. In the current study, young plants of spike lavender were subjected to a first episode of water deprivation. Subsequently, clones from the surviving ecotypes (SL1 to SL8) were assigned randomly to two homogeneous groups. One group was irrigated to field capacity (as a control) and the other was subjected to water stress for two months. In the leaves of control and stressed plants, physiological parameters including relative water content (% RWC), hydric potential (ΨWP), proline, and abscisic acid were measured. The plant antioxidant defense system was also explored, through analysis of non-enzymatic antioxidants (α -tocopherol, plastochromanol-8), lipid peroxidation (MDA), and photosynthetic pigments (chlorophylls a and b, and carotenoids). The polyphenolic profile was determined and its corresponding antioxidant activity was analyzed for the first time in the early growth stages of this species. Under the drought treatment, the values of the physiological parameters were similar in all ecotypes and changed as the dehydration advanced. However, the response of the antioxidant defense to drought was variable depending on the ecotype under study. As a general pattern, there was a reduction in the concentration of photosynthetic pigments. Although, no statistical differences were detected in α -tocopherol and PC-8, in most cases, the MDA values increased significantly after the drought episode. In the polyphenolic profile identified, *p*-coumaric acid glycoside and rosmarinic acid-3-O-glucoside were the major components quantified, salivianic acid and *O*-coumaric acid being described for the first time in this species. Regarding the response of these chemical components to water stress, the concentrations of most polyphenols decreased, with the exception of rosmarinic acid, whose concentration after the stress was higher in three of the eight ecotypes under study. This increment was reflected in a higher *in vitro* antioxidant capacity. These findings suggest that *L. latifolia* was affected by drought, even though it showed some strategies to counteract the negative effects of dehydration. The intraspecific variation in the response to dehydration can be considered a useful tool for the preselection of ecotypes with greater resistance to this stress.

* Corresponding author.

E-mail address: gustavoj.caceres@carm.es (G.J. Cáceres-Cevallos).

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116742>

Received 3 February 2023; Received in revised form 5 April 2023; Accepted 15 April 2023

Available online 25 April 2023

0926-6690/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.



Article

Agronomic Evaluation and Chemical Characterization of *Lavandula latifolia* Medik. under the Semiarid Conditions of the Spanish Southeast

Gustavo J. Cáceres-Cevallos ¹, María Quílez ¹, Gonzalo Ortiz de Elguea-Culebras ², Enrique Melero-Bravo ², Raúl Sánchez-Vioque ² and María J. Jordán ^{1,*}

¹ Research Group on Rainfed Agriculture for Rural Development, Department of Rural Development, Oenology and Sustainable Agriculture, Murcia Institute of Agri-Food and Environmental Research (IMIDA), La Alberca de las Torres, 30150 Murcia, Spain; gustavoj.caceres@carm.es (G.J.C.-C.); maria.quilez@carm.es (M.Q.)

² Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal de Castilla La Mancha (IRIAF), CIAF de Albaladejito, Carretera Toledo-Cuenca km 174, 16194 Cuenca, Spain; gonzaloo@jccm.es (G.O.d.E.-C.); emelerob@jccm.es (E.M.-B.); rsanchezv@jccm.es (R.S.-V.)

* Correspondence: mariaj.jordan@carm.es

Abstract: *Lavandula latifolia* is one of the main rainfed crops of aromatic and medicinal plants produced in Spain. As a global concern, the agronomic productivity of this aromatic crop is also threatened by the consequences of imminent climate change. On this basis, the study of the agronomic production of two drought-tolerant ecotypes, after three years of cultivations practices, constitutes the main objective of the present study. For this trial, clones of the two pre-selected ecotypes, along with clones from two commercial plants (control), were grown in an experimental plot. The main results confirmed an increase in biomass and essential oil production with plant age. The essential oil chemotype defined by 1,8-cineol, linalool, and camphor was maintained over time, but a decrease in 1,8-cineol in the benefit of linalool was detected. In the phenolic profile, 14 components were identified, with salvianic acid and a rosmarinic acid derivate being the main compounds quantified. These phenolic extracts showed potent in vitro antioxidant capacity, and after the second year of cultivation practices, both phenolic compounds and antioxidant capacity remained stable. Thus, under semiarid conditions, *L. latifolia* drought-tolerant ecotypes reach a good level of production after the second year of crop establishment.

Keywords: *Lavandula latifolia*; agronomical yield; essential oil; phenolic profile; antioxidant activity



Citation: Cáceres-Cevallos, G.J.; Quílez, M.; Ortiz de Elguea-Culebras, G.; Melero-Bravo, E.; Sánchez-Vioque, R.; Jordán, M.J. Agronomic Evaluation and Chemical Characterization of *Lavandula latifolia* Medik. under the Semiarid Conditions of the Spanish Southeast. *Plants* **2023**, *12*, 1986. <https://doi.org/10.3390/plants12101986>

Academic Editors: Stephen O. Amoo and William N. Setzer

Received: 29 March 2023

Revised: 28 April 2023

Accepted: 13 May 2023

Published: 15 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Global climate change associated with increasing temperatures will lead to more prolonged and severe drought episodes producing damages such as decreased growth and yield in commercial crops [1]. Therefore, selecting and studying drought-resistant aromatic-medicinal plants that can maintain growth and optimal agronomical yield in essential oils (EOs) under these conditions is a work of great importance [2]. In this sense, previous breeding studies performed by the authors allowed for the obtaining of drought-resistant elite individuals in early stages [3] that could be considered to analyze their EO yield and quality in Mediterranean semiarid field conditions. EOs are an important product of aromatic-medicinal plants (AMP), being found in exclusive families such as *Alliaceae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Myrtaceae*, *Poaceae*, *Rutaceae*, and *Lamiaceae* and being of outstanding value in the medicinal and pharmaceutical industries [4]. It is estimated that the global market for EOs is approximately USD 7.6 billion and could reach USD 15.1 billion by the year 2026 [5].

Within the *Lamiaceae* family, *Lavandula latifolia*, also known as spike lavender, is an aromatic shrub that grows wild in large areas of the Mediterranean region where the climate