



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Contribución a la monografía farmacopéica
de *Clinopodium macrostemum* (Moc. &
Sessé ex Benth.) Kuntze (LAMIACEAE)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

LUIS EDUARDO PÉREZ ROMERO



Director de tesis: Dr. Sol Cristians Niizawa

CIUDAD DE MÉXICO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Contribución a la monografía farmacopéica de *Clinopodium macrostemum* (Moc. & Sessé ex Benth.) Kuntze (LAMIACEAE).

Hoja de datos del jurado

1.- Datos del alumno.

Luis Eduardo Pérez Romero
5554030794
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología

4. Datos del sinodal 2

Dra. Helia Reyna Osuna Fernández
Profesora de Carrera Titular A
Departamento de ecología y Recursos Naturales
Universidad Nacional Autónoma de México
hrof@ciencias.unam.mx

2. Datos del tutor

Dr. Sol Cristians Niizawa
Profesor de Asignatura A
Laboratorio de Etnobotánica
Jardín Botánico
Instituto de Biología
Universidad Nacional Autónoma de México
scristians@ciencias.unam.mx

5. Datos del sinodal 3

M en C. Gabriel Sinué Fonseca Salazar
Profesor de asignatura A
Universidad Nacional Autónoma de México
gfonseca@ciencias.unam.mx

3. Datos del sinodal 1

Dr. Javier Andrés Juárez Díaz
Profesor de Carrera Asociado C
Laboratorio de Desarrollo en Plantas/Invernadero
Departamento de Biología Comparada
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Autónoma de México
j.a.juarezdiaz@ciencias.unam.mx

6. Datos del sinodal 4

Dra. Ángela Victoria Forero Forero
Profesor de asignatura B
Universidad Nacional Autónoma de México
angelaforero1976@hotmail.com

7. Datos del trabajo escrito

Contribución a la monografía farmacopéica de *Clinopodium macrostemum* (Moc. & Sessé ex Benth.) Kuntze (LAMIACEAE). 90 páginas

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Etnobotánica del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM, con asesoría y apoyo del Dr. Sol Cristians Niizawa.

Agradezco el apoyo de los siguientes proyectos y personas:

- Al proyecto de Investigación en plantas medicinales - 2016: Propagación y análisis farmacopéicos de té tochel, *Clinopodium macrostemum* (Moc. & Sessé ex Benth.) Kuntze (LAMIACEAE) y espinosilla, *Loeselia mexicana* (Lam.) Brand (POLEMONIACEAE). *Secretaría de Desarrollo Rural y Equidad para las Comunidades*, Ciudad de México
- Al Proyecto PAPIIT - UNAM IN202015
- Al Plan de Becas en Materiales interactivos del Programa de Becas de Formación en Tecnologías de Información.
- A los que nos ayudaron con las colectas en Santa Ana.
- A la M. en C. Virginia Evangelista Oliva por su asistencia técnica en el desarrollo de mapas de distribución actual y potencial.
- A la M. en C. Laura Márquez Valdelamar por su asistencia técnica en el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud.
- A la Dra. Lidia Cabrera Martínez por su asistencia técnica en el laboratorio de Sistemática Molecular Botánica.
- A mi tutor, Dr. Sol Cristians Niizawa, por su apoyo, asesoría, confianza y por todos los conocimientos compartidos conmigo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi tía Ana, a mi padre, a mi madre y a mis hermanos que me brindaron su apoyo durante la carrera y que me impulsaron a seguir adelante.

ÍNDICE

Índice	i
Índice de Figuras	iv
Índice de cuadros	vi
Índice de Anexos	vii
Abreviaturas	viii
Resumen	X
1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1 Nomenclatura botánica	3
2.1.1 Sinonimias	4
2.2 Nombres comunes	4
2.3 Descripción botánica	4
2.4 Distribución y ecología	5
2.5 Información histórica y usos tradicionales	5
2.6 Fitoquímica	7
2.7 Farmacología	7
2.7.1 Efecto farmacológico de los extractos orgánicos de <i>C. macrostemum</i>	7
2.7.2 Efecto farmacológico del aceite esencial	8
3. Justificación	9
4. Objetivos	10
4.1 Objetivo general	10
4.2 Objetivos particulares	10
5. Materiales y métodos	10

5.1 Material vegetal	10
5.2 Propagación	12
5.2.1 Propagación por estacas semileñosas	12
5.2.2 Crecimiento vegetativo y ciclo fenológico	14
5.3 Prueba de viabilidad	14
5.4 Mapa de distribución actual y potencial de <i>C. macrostemum</i>	15
5.5 Identidad Química	16
5.5.1 Obtención del aceite esencial y extracto orgánico	16
5.5.2 Análisis cromatográfico	16
5.6 Identidad Molecular	18
5.6.1 Extracción de DNA total y mplificación de los marcadores moleculares <i>matK, rbcL, rpL32-trnL, trnH-</i> <i>psbA e ITS2</i>	18
5.6.2 Secuenciación, edición y evaluación de las secuencias ...	20
5.6.3 Construcción del código de barras molecular	20
6. Resultados y discusión	21
6.1 Depósito de ejemplares de herbario	21
6.2 Propagación por estacas semileñosas	22
6.3 Ciclo fenológico	25
6.4 Prueba de viabilidad	26
6.5 Mapa de distribución actual y potencial de <i>C. macrostemum</i>	28
6.6 Identidad química	31
6.6.1 Elección del compuesto marcador	31

6.6.2	Evaluación de la identidad química de <i>C. macrostemum</i> contra muestras de mercado	32
6.7	Identidad molecular	33
6.7.1	Extracción de DNA total y amplificación de los marcadores moleculares	33
6.7.2	Evaluación de la capacidad discriminativa	36
6.7.2.1	Análisis filogenético y Barcoding gap	36
7.	Conclusiones	52
8.	Perspectivas	53
9.	Literatura citada	54
10.	Anexos	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Laminas correspondientes a <i>C. macrostemum</i>	6
Figura 2. Componentes mayoritarios en el aceite esencial y extracto hexánico de <i>C. macrostemum</i>	7
Figura 3. Diagrama de flujo de propagación por estacas semileñosas de <i>C. macrostemum</i>	13
Figura 4. Ejemplares de herbario depositados en la FCME	21
Figura 5. Porcentaje de enraizamiento por tratamiento	22
Figura 6. Registro del promedio semanal del alargamiento del tallo por localidad de origen del material	24
Figura 7. Tasa de alargamiento del tallo por localidad de origen del material vegetal	24
Figura 8 Porcentaje de germinación de las semillas de <i>C. macrostemum</i> en condiciones de fotoperiodo natural	27
Figura 9. Mapa de distribución actual de <i>C. macrostemum</i> en México	29
Figura 10. Mapa de distribución potencial de <i>C. macrostemum</i>	30
Figura 11. Perfil de identidad química por CCF, revelado con anisaldehído ..	32
Figura 12. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR de los marcadores moleculares evaluados	35
Figura 13. Cladograma empleando datos moleculares del marcador <i>matK</i> ...	37
Figura 14. Cladograma empleando datos moleculares del marcador <i>rbcL</i>	38
Figura 15. Cladograma empleando datos moleculares del marcador <i>trnH-psbA</i>	39

Figura 16. Cladograma empleando datos moleculares del marcador <i>rpL32-trnL</i>	41
Figura 17. Cladograma empleando datos moleculares del marcador <i>ITS2</i> ...	42
Figura 18. Cladograma empleando datos moleculares del marcador <i>matK</i> , incluyendo muestras de mercado	44
Figura 19. Cladograma empleando datos moleculares del marcador <i>rbcL</i> , incluyendo muestras de mercado	45
Figura 20. Cladograma empleando datos moleculares del marcador <i>rpL32-trnL</i> , incluyendo muestras de mercado.....	46
Figura 21. Cladograma empleando datos moleculares del marcador <i>ITS2</i> , incluyendo muestras de mercado	47
Figura 22. Cladograma empleando datos moleculares concatenados de los marcadores: <i>ITS2</i> , <i>rbcL</i> , y <i>rpL32-trnL</i>	48

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Marcadores moleculares usados para la evaluación de identidad molecular	18
Cuadro 2. Condiciones experimentales y concentraciones finales para la amplificación de los marcadores moleculares	19
Cuadro 3 Condiciones de temperatura para la PCR de los marcadores moleculares	19
Cuadro 4. Ciclo fenológico de <i>C. macrostemum</i>	25
Cuadro 5. Porcentaje de viabilidad de semillas de <i>C. macrostemum</i> determinada con cloruro de tetrazolio	27
Cuadro 6. Cuantificación de DNA total extraído de las muestras de <i>C. macrostemum</i>	34

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de DNA	60
Anexo 2. Secuencias de los marcadores moleculares usados	62
Anexo 3. Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) <i>matK</i>	71
Anexo 4. Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) <i>rbcL</i>	72
Anexo 5. Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) <i>trnH-psbA</i>	73
Anexo 6. Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) <i>rpl32-trnL</i>	74
Anexo 7. Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) <i>ITS2</i>	75

Abreviaturas

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CCI14	Chemokine (C-C motif) ligand 14
CCF	Cromatografía de capa fina
DL	Localidad Desierto de los Leones
DL1	Muestra 1 del Desierto de los Leones
DL2	Muestra 2 del Desierto de los Leones
DL3	Muestra 3 del Desierto de los Leones
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
ENBI	Centro nacional para la Información y biotecnología
FCME	Herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM
FHEUM	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
IMSSM	Herbario de plantas medicinales del Instituto Mexicano del Seguro Social
L	Linalol
M	Mentona
Maxent	Algoritmo de Máxima Entropía
Mer	Mercado de la Merced
MEXU	Herbario Nacional de México
MIC	Concentración mínima inhibitoria (por sus siglas en ingles)
MGA	Método General de Análisis
MT	Medicina tradicional
msnm	Metros sobre el nivel del mar
OMS	Organización Mundial de la Salud
P	Pulegona

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ppm	Partes por millón
R_f	Factor de retención
SA	Localidad Santa Anna Tlacotenco
SA2	Muestra 2 de Santa Ana Tlacotenco
SA3	Muestra 3 de Santa Ana Tlacotenco
Son	Mercado de Sonora

Resumen

Clinopodium macrostemum, conocido comúnmente como tabaquillo, es una planta medicinal ampliamente comercializada para aliviar y/o curar padecimientos gastrointestinales, siendo una fuente de ingresos para recolectores de recursos naturales y campesinos; sin embargo, actualmente se sigue extrayendo de poblaciones silvestres, lo que conlleva una disminución genética y poblacional.

El presente trabajo evaluó las condiciones experimentales apropiadas para la propagación vegetativa y sexual de *C. macrostemum* así como; se elaboraron los mapas de distribución actual y potencial a partir de ejemplares depositados en herbarios; de manera adicional, se aportaron parámetros preliminares de identidad química por cromatografía de capa fina e identidad molecular, utilizando marcadores moleculares de cloroplasto (*matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*, *rpl32-trnL*) y de núcleo (*ITS2*); ambos análisis enfocados al control de calidad de la droga vegetal para la adición de su monografía en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos.

El método de propagación más eficaz fue el vegetativo, utilizando estacas enraizadas con auxinas a concentraciones de 1500 y 10000 ppm. Las semillas presentaron fotoblastismo neutro y un porcentaje de viabilidad del 40%, sin la obtención de plántulas. Las estacas trasplantadas a suelo contiarán su ciclo de desarrollo fenológico normal.

Se generaron tanto el mapa de distribución actual como el primer mapa de distribución potencial de *C. macrostemum*, siendo un herramienta útil para futuros programas de conservación y reforestación enriquecida.

Se propusieron como compuestos marcadores químicos al linalol, a lomentona y a la pulegona presentes en el aceite esencial, siendo un parámetro de control de calidad de la droga cruda de *C. macrostemum* mediante al análisis químico por cromatografía en capa fina.

Finalmente, se planteó la generación de un código de barras molecular, concatenando a los marcadores *ITS2*, *rbcL* y *rpL32-trnL*, constituyendo una de las primeras propuestas de control de calidad molecular para plantas medicinales.

1. Introducción

La medicina tradicional (MT) es la suma de todos los conocimientos, las capacidades, las prácticas basadas en la teoría, las creencias y las experiencias propias de diferentes culturas, ya sean explicables o no, utilizadas para mejorar o tratar, diagnosticar y prevenir las enfermedades físicas y/o mentales (Organización Mundial de la Salud, 2013). Por ello, es posible decir que hay tantas prácticas de MT como grupos humanos existen, y que todos hacen uso de los recursos naturales que se tengan a su alcance.

Se estima que México cuenta con 4500 especies vegetales (Martínez, 1989) que se usan en la MT y de las cuales se tienen pocos registros científicos de carácter botánico, químico y mucho menos genético.

En el año de 1989, la Asamblea Mundial de la Salud en las resoluciones del apartado "WHA42.43 Medicina tradicional y asistencia sanitaria moderna" establece que los estados miembros (entre éstos México) efectúen, entre otros puntos, la evaluación completa de sus sistemas de MT; realizar un inventario sistemático y estudios preclínicos y clínicos de las plantas medicinales que son utilizadas; medidas de reglamento y control de los productos elaborados a partir de plantas medicinales, así como la inclusión de esta información en un formulario o una farmacopea nacional (Asamblea Mundial de la Salud, 1989).

Actualmente, la Estrategia de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre Medicina Tradicional 2014 – 2023 y, de acuerdo a lo establecido en la WHA 1989, tiene el propósito de reforzar el conocimiento, el uso y el mantenimiento de la salud de la población, planteando los siguientes objetivos:

- **Política:** integrar la MT en los sistemas nacionales de salud mediante el desarrollo y la aplicación de políticas y programas nacionales.
- **Acceso:** mejorar la disponibilidad y asequibilidad de la MT.
- **Uso racional:** promover el uso terapéutico racional de la MT entre los profesionales y los usuarios.
- **Seguridad, eficacia y calidad:** promover la seguridad, eficacia y calidad de la MT a través de la investigación que permita establecer normas reglamentarias y de garantía de la calidad.

Para cumplir con éstos, la OMS formula que el desarrollo de investigación y creación de conocimientos permitirá gestionar activamente la MT a partir de políticas nacionales idóneas, reconociendo el papel y las posibilidades de la MT; fortaleciendo los parámetros de calidad, seguridad, uso adecuado, eficacia e integración de la MT mediante la reglamentación, capacitación, y monitoreo constante; fomentando la cobertura sanitaria universal a través de la integración de la MT en la prestación de servicios y la autoatención de la salud (Organización Mundial de la Salud, 2013).

Actualmente, los Estados Miembros reglamentan los productos herbolarios, actualizando y aplicando reglas acordes a sus necesidades. Dichos enfoques se orientan a proteger la salud de los consumidores resguardando la calidad y seguridad de los productos (Organización Mundial de la Salud, 2013).

Como respuesta a lo anterior, la Secretaría de Salud publica la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM), este documento describe los métodos generales de análisis y especificaciones técnicas que deberán cumplir las plantas y sus derivados que se utilicen en la elaboración de medicamentos y remedios herbolarios (Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, 2013).

Actualmente, en la Ciudad de México, *Clinopodium macrostemum*, conocido comúnmente como tabaquillo, es una planta medicinal ampliamente comercializada para aliviar y/o curar padecimientos gastrointestinales, siendo una fuente de ingresos para recolectores de recursos naturales y campesinos; sin embargo, actualmente se sigue extrayendo de poblaciones silvestres, lo que conlleva una disminución considerable de sus individuos; aunado a esto, *C. macrostemum* no se encuentra descrita en la FHEUM.

El presente trabajo pretende establecer las condiciones experimentales apropiadas para la propagación vegetativa y sexual de *C. macrostemum*. De manera adicional, se aportarán parámetros preliminares que permitan realizar pruebas de identidad química y molecular a esta especie, enfocadas al control de calidad de la droga vegetal para la adición de su monografía en la FHEUM.

2 Marco teórico

2.1 Nomenclatura botánica

Orden: Lamiales Bromhead

Familia: Lamiaceae Martinov

Género: *Clinopodium* L.

Especie: *Clinopodium macrostemum* (Moc. & Sessé ex Benth.) Kuntze

(<http://www.tropicos.org>)

2.1.1 Sinonimias

Calaminta fuchsiifolia Gand., *Calamintha macrostema* (Moc. & Sessé ex Benth.) Benth., *Clinopodium laevigatum* Standl., *Melissa macrostema* Moc. & Sessé ex Benth., *Satureja laevigata* (Standl.) Standl., *Satureja macrostema* (Moc. & Sessé ex Benth.) Briq. y *Satureja macrostema* var. *laevigata* (Standl.) McVaugh. (Lara-Cabrera *et al.*, 2016; www.theplantlist.org).

2.2 Nombres comunes

Esta especie presenta distintos nombres dependiendo de la entidad federativa en la que se presente, entre estos se encuentran: té de monte, toché, atóchietl, nurité, tabaquillo, tabaquillo grande, hierba del borracho, poleo y toronjil (Rzedowski y Rzedowski, 2005; Villamar, 1994).

2.3 Descripción botánica

C. macrostemum es una lamiácea que se caracteriza por presentar crecimiento arbustivo, con olor a menta al estrujarla, de 1 a 2 m de alto; tallos erectos, ramas arqueadas, pubescentes; hojas con peciolo de 2 a 5 mm de largo, limbo ovado u oblongo a lanceolado, de 1 a 4 cm de largo por 0.6 a 1.5 cm de ancho, ápice agudo, margen aserrado y base redondeada. Las flores suelen presentarse solitarias o agrupadas de 2 o 3 en las axilas de las hojas, pedicelos de 2 a 6 mm de largo y pubescentes; cáliz bilabiado de 7 a 10 mm de largo, con garganta pilosa; corola anaranjada o roja que cambia a un tono blanquecino o rosado cuando está seca, mide de 2 a 3.5 cm de largo; muestra estambres exsertos, tecas de las anteras divergentes; el estilo saliente de la corola; mericarpios ovoides, lisos o reticulados (García-Zúñiga, 2005).

2.4 Distribución y ecología

En la Ciudad de México su distribución abarca las delegaciones de Cuajimalpa de Morelos, Tlalpan y Milpa Alta; en otros estados de la república se distribuye en Jalisco, Veracruz, Oaxaca, Guerrero, Colima, Michoacán, Puebla, Sinaloa, Durango (Arizaga, s.f); habita en climas cálidos, semicálidos y templados, entre los 200 y los 1200 metros sobre el nivel del mar (m snm). Las poblaciones se asocian a bosque tropical caducifolio y subcaducifolio, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña, bosque de encino y de pino (Rzedowski y Rzedowski, 2005; Ortega-Ortega y Vázquez-García, 2014; Villamar, 1994).

2.5 Información histórica y usos tradicionales

De acuerdo a lo publicado en los estudios actuales del *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* (Codice de la Cruz Badiano) en 1992. Se menciona que a la planta “Cuecuetzpahtli” la utilizaban para tratar dolor estomacal. Además, la lámina que se encuentra en este documento tiene gran similitud con nuestra especie de estudio.

Por otra parte, en la actual publicación hecha en el 2010, del volumen VII de La Real Expedición Botánica a Nueva España, 1787-1803. Se presentan tres láminas correspondientes a *C. macrostemum*, las cuales son nombradas con distinto género y epíteto específico cada una: *Dondisia integrifolia*, *Dondisia serrata* y *Salvia exserta* (Figura 1).

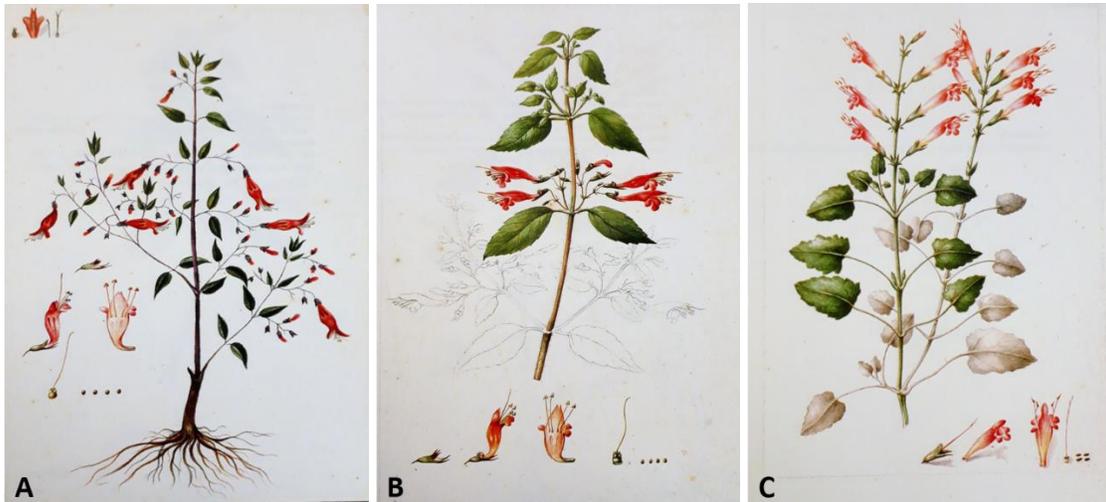


Figura 1. Láminas correspondientes a *Clinopodium macrostemum* tomadas del libro La Real Expedición Botánica de la Nueva España. (A) *Dondisia integrifolia*, (B) *Dondisia serrata* y (C) *Salvia exserta*. Figuras tomadas del libro en cuestión, (1787 – 1803)

Un siglo después se menciona en el tomo I de los Anales del Instituto Médico Nacional de 1894 a *C. macrostemum* como parte de un listado de la flora y la fauna que fueron objeto de análisis y experimentación con propósitos médicos para su futura aplicación en la medicina (Anales del Instituto Médico Nacional, 1984).

En reportes recientes de la MT destaca el uso de *C. macrostemum* contra el dolor de estómago (en los estados de Morelos, Ciudad de México y Puebla), contra la indigestión y cólicos, así como su empleo para baños postparto (Villamar, 1994).

Para su uso contra el dolor estomacal, se utilizan las partes aéreas, las cuales se colocan en agua hirviendo para consumirse como infusión (Bello, 2006). La elaboración de la infusión contra el dolor de estomacal se prepara agregando ramas con hojas secas o frescas en agua hirviendo, se dejan de 3 a 5 minutos. Se bebe una taza de la infusión antes de cada comida, hasta que desaparezcan las molestias (Villamar, 1994).

2.6 Fitoquímica

En un análisis de los componentes de *C. macrostemum* se reporta que los componentes mayoritarios en su aceite esencial son el linalol (1), mentona (2), isomentona (3), isopulegona (4) y piperitona (Hernández, 2003). Posteriormente, se reporta que en el aceite esencial, además, se encuentran más de 20 componentes volátiles, entre ellos, los mayoritarios son los compuestos linalol, mentona, óxido de piperitona (6) y la pulegona (7) (Villa-Ruano *et al.*, 2015).

En el extracto hexánico se reporta la presencia del linalol, mentona y pulegona (Carreón-Abud *et al.*, 2015) (Figura 2).

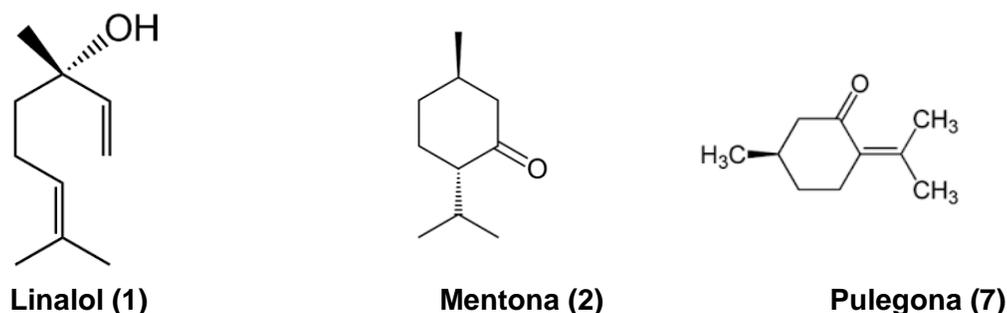


Figura 2. Componentes mayoritarios en el aceite esencial y extracto hexánico de *C. macrostemum*.

2.7 Farmacología

2.7.1 Efecto farmacológico de los extractos orgánicos de *C. macrostemum*

Se ha reportado el efecto antioxidante del extracto metanólico de partes aéreas de *C. macrostemum* mediante el ensayo de la inhibición del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), en el cual se usaron las concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 mg/mL del

extracto metanólico; donde el mayor efecto antioxidante se presentó con un 89.87 % a una concentración de 100 mg/mL de este extracto (Pérez-Gutiérrez y Gallardo-Navarro, 2010).

Por otra parte, el efecto hepatoprotector del extracto metanólico de las hojas de *C. macrostemum* se evaluó a las dosis de 200, 400, 600 mg/kg en ratas Wistar, a las cuales se les midieron los niveles de diversos marcadores bioquímicos: transaminasa glutámico-pirúvica, transaminasa gluámica-oxalacetato, fosfatasa alcalina, bilirrubina, lipoproteína de alta densidad, alanina aminotransferasa. En este trabajo encontraron que la dosis efectiva fue la de 200 mg/kg, disminuyendo los niveles de la actividad enzimática de los marcadores bioquímicos mencionados anteriormente (Pérez-Gutiérrez y Gallardo-Navarro, 2010).

Otros estudios revelan actividad nefroprotectora con las fracciones aisladas del extracto metanólico de *C. macrostemum*, usando ratones DC1 como modelo experimental, en donde las fracciones aisladas promueven la protección del riñón ante compuestos tóxicos como el CCl₄ a una concentración de 20 mg/kg obteniendo una disminución de la urea plasmática de 44.78 ± 4.87 y de la creatina con 0.67 ± 0.009 con respecto al control (Pérez-Gutiérrez y Gallardo-Navarro, 2010; Gutiérrez, 2012).

2.7.2 Efecto farmacológico del aceite esencial

Se ha reportado el efecto antioxidante del 60% con la prueba de DPPH en concentraciones que van de los 3 a los 4 mg/mL. Por otra parte, los ensayos enzimáticos de anti-lipasa, anti- α -glucosidasa y anti-acetilcolinesterasa se realizaron usando concentraciones de van de 0.2 a 2 mM; no se observaron diferencias significativas que validaran dichos efectos farmacológicos (Villa-Ruano *et al.*, 2015).

Por otra parte, la prueba contra actividad antimicrobiana se realizó con cepas de *Escherichia coli* DH5 α , *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404, *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000, *P. syringae* pv phaseolitica NPS3121, *P. syringae* pv glycinea, *Pseudomonas stewartii*, *Erwinia carotovora* y *Clavibacter michiganensis*. Se encontró que el aceite esencial inhibió el crecimiento de *E. carotovora* (MIC = 0.145 \pm 0.067), *A. tumefaciens* (MIC = 0.149 \pm 0.032), *C. michiganensis* (MIC = 0.184 \pm 0.016), *P. syringae* pv phaseolitica NPS3121 (MIC = 0.381 \pm 0.016), *P. syringae* pv glycinea (MIC = 0.437 \pm 0.024) y *E. coli* DH5 α (MIC = 0.515 \pm 0.011) (Villa-Ruano *et al.*, 2015).

Estos estudios no se han llevado a nivel clínico por lo tanto no se cuentan con investigaciones relacionadas a este nivel.

3 Justificación

La extracción indiscriminada de la flora produce la pérdida de diversidad biológica, por lo que es indispensable elaborar estrategias de conservación que ayuden a aminorar este panorama. Actualmente, *C. macrostemum* se comercializa como planta medicinal generando una reducción de su presencia en vida silvestre debido a la recolecta excesiva para su venta; este escenario nos lleva a crear un protocolo de propagación como estrategia de conservación y aprovechamiento sustentable de esta planta.

La actual edición de la FHEUM cuenta con la descripción de 51 monografías de drogas vegetales, 14 monografías de aceites esenciales y monografías extrafarmacopéicas dentro de las cuales no se contempla a *C. macrostemum*. Por tal motivo se pretende establecer pruebas preliminares de identidad química, molecular y botánica que ayuden a la elaboración de su monografía tipo FHEUM.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Establecer los protocolos de propagación de *C. macrostemum*, así como el análisis preliminar de identidad química y molecular que contribuyan a la elaboración de la monografía farmacopéica de la especie de estudio.

4.2 Objetivos particulares

- Establecer la metodología de propagación asexual por estacas y caracterizar las semillas de *C. macrostemum*.
- Describir el crecimiento vegetativo y ciclo fenológico.
- Generar los mapas de distribución actual y potencial de la especie de estudio.
- Generar los ensayos preliminares de identidad química por cromatografía en capa delgada que permitan la caracterización de la especie de estudio.
- Determinar el código de barras molecular de la especie de interés a partir de la secuenciación de marcadores moleculares de cloroplasto (*matk*, *rbcl*, *rpl32-trnL* y *trnH-psbA*) y de núcleo (*ITS2*).

5 Materiales y métodos

5.1 Material vegetal

Se colectó material vegetal de poblaciones silvestres de *C. macrostemum* en distintas fechas así como de distintas localidades distribuidas en la Ciudad de México, en los siguientes puntos:

Localidad: Santa Ana Tlacotenco.

Delegación: Milpa Alta

Fecha: 11 Agosto del 2016

Coordenadas: 19°11'16.7" N 99°02'5.7" O 2485 m snm

Material colectado: 35 estacas; muestras de tejido para la extracción de ADN; partes aéreas para el estudio de identidad química.

Localidad: Santa Rosa Xochiac. Parque Nacional del Desierto de los Leones.

Delegación: Álvaro Obregón

Fecha: 28 Agosto del 2016

Coordenadas: 19°18'17.3"N 99°17'46.3" O

Material colectado: 28 estacas; muestras de tejido para la extracción de ADN; hojas y ramas para el estudio de identidad química.

Adicionalmente se obtuvo material vegetal fresco y seco, a partir de su compra en distintas zonas así como de distinta fecha:

Procedencia: San José Villa de Allende, Estado de México

Lugar de compra: San Pablo Chimalpa, Cuajimalpa de Morelos

Primer fecha de compra: 24 Septiembre del 2016

Material colectado: 45 estacas; hojas y ramas para el estudio de identidad química.

Segunda fecha de compra: 12 Marzo del 2017

Material colectado: 130 semillas; hojas y ramas para el estudio de identidad química.

Procedencia: Desconocido

Lugar de compra: Mercado de la Merced

Fecha de compra: 21 Junio 2017

Material colectado: Ramo de Tabaquillo fresco para pruebas de identidad química aplicada.

Costo: 10 pesos mexicanos

Procedencia: Puebla

Lugar de compra: Mercado de Sonora

Fecha de compra: 21 Junio 2017

Material colectado: Ramo de Tabaquillo seco para pruebas de identidad química aplicada.

Costo: 25 pesos mexicanos

5.2 Propagación

5.2.1 Propagación por estacas semileñosas

La propagación por estacas semileñosas de *C. macrostemum* se realizó en los invernaderos del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM, ubicado en la Ciudad de México. Las condiciones al interior de éste son las siguientes: 40% de luz filtrada y una temperatura promedio dentro del invernadero de 23 °C en agosto, 21°C septiembre y 20°C en octubre. Cada muestra fue sometida a la metodología descrita en la Figura 3.

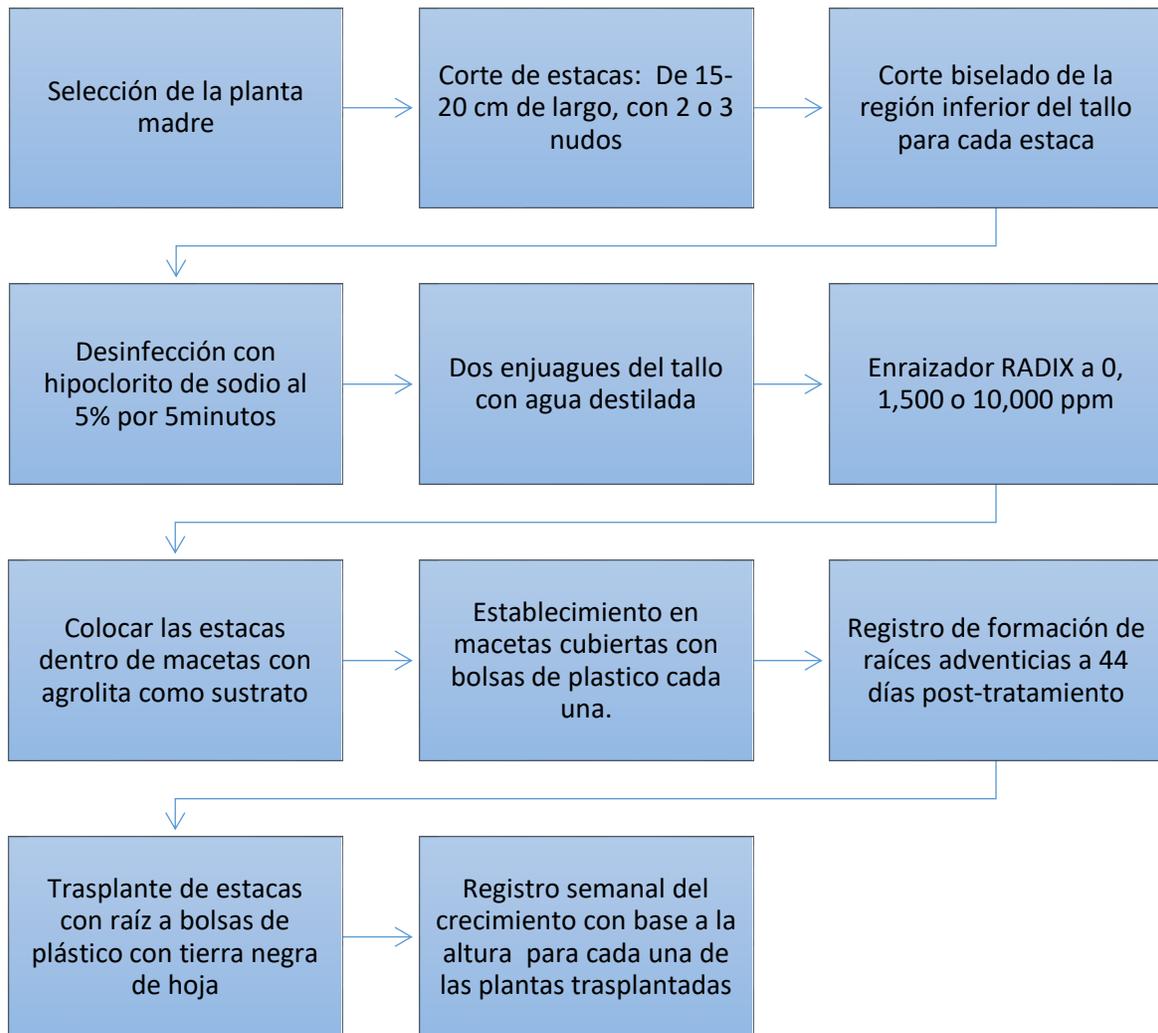


Figura 3. Diagrama de flujo de propagación por estacas semileñosas de *C. macrostemon*.

Debido a que el material vegetal no se colectó en las mismas fecha y de que no se obtuvo el mismo número de estacas para cada sitio de colecta, se decidió trabajar de la siguiente manera: en el caso de Santa Ana Tlacotenco se usó un grupo control con cinco estacas sin enraizador (grupo control) y un grupo experimental con 30 estacas con enraizador (ácido indolbutírico; RADIX) a 1,500 ppm; con respecto al Desierto de los

Leones se usaron 28 estacas con enraizador a 1,500 ppm y, finalmente, para las estacas provenientes de San José Villa de Allende se usaron 45 estacas con enraizador a 10,000 ppm.

5.2.2 Crecimiento vegetativo y ciclo fenológico

El crecimiento vegetativo se determinó mediante el registro semanal del alargamiento del tallo de cada una de las estacas que desarrollaron raíz y que se trasplantaron a tierra negra de hoja. Después se obtuvo el promedio general del alargamiento semanal del tallo para cada uno de los sitios de colecta durante las primeras seis semanas posteriores a su trasplante. Por otro lado, se describió el ciclo fenológico desde el establecimiento de las estacas hasta el desarrollo de botones florales y su antesis.

5.3 Prueba de viabilidad

Del poco número de semillas disponibles (96 semillas), se eligieron 10 al azar para realizar la prueba de viabilidad con cloruro de tetrazolio. Para ello se embebieron durante 24 h en agua destilada; posteriormente se sumergieron en una solución de cloruro de tetrazolio al 1% y se dejaron en una incubadora a 37°C durante 2.5 h. Finalmente, se revisaron bajo el microscopio estereoscópico, realizándoles un corte longitudinal para evaluar el grado de actividad metabólica mediante la coloración del embrión (Ruiz, 2009).

Para evaluar la viabilidad y caracterizar el fotoblastismo se realizó una prueba de germinación en la que se usaron 80 semillas elegidas al azar; posteriormente las semillas

sin ser sometidas a desinfección se colocaron en cajas de Petri previamente tapizadas con toallas multiuso (Scott) humedecidas con agua destilada y distribuidas en grupos de 10 semillas en cada una de estas cajas de Petri; cuatro cajas se cubrieron con aluminio y cuatro se dejaron expuestas a fotoperiodo natural (Flores y Jurado, 2011). A los seis días transcurridos se revisaron las cajas y se tomó registro del número de semillas que germinaron por tratamiento, considerando como germinación la protrusión de la radícula.

5.4 Mapa de distribución actual y potencial de *C. macrostemum*

Para la elaboración de los mapas, se consultaron los ejemplares del herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM (FCME), del herbario de plantas medicinales del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSSM) y, de manera adicional, se puso a nuestra disposición una base de datos del Herbario Nacional de México (MEXU) recopilada por la M. en C. Virginia Evangelista Oliva, del laboratorio de Etnobotánica, Jardín Botánico IB-UNAM. Con los registros obtenidos se generó una base de datos utilizando el programa Excel; dicha información se depuró para evitar dobles puntos de colecta y se georreferenciaron las localidades. Para la construcción del mapa de distribución actual se utilizó el software ArcGis; se introdujeron los puntos de colecta de *C. macrostemum* registrados en Excel como coordenadas, en el eje de las “X” la latitud y el eje de las “Y” la longitud, proyectadas sobre un mapa del territorio nacional para su visualización. En el caso del mapa de distribución potencial, se usó el algoritmo de Máxima Entropía (Maxent) para predecir las áreas de distribución no observadas. Se introdujo la información de la distribución inicial de la especie en formato “.csv” y, por otro lado, se introdujo información de variables ambientales (provenientes de WorldClim) dependientes de la especie en formato “.ascii”, obteniendo así datos cuantitativos en tablas y gráficas, así como un archivo “raster” descriptivo del mapa de distribución potencial.

5.5 Identidad química

5.5.1 Obtención del aceite esencial y del extracto hexánico

Las partes aéreas de *C. macrostemum*, se secaron a la sombra y a temperatura ambiente; se utilizó tanto el material recolectado como material vegetal comercializado en los mercados Sonora y Merced de la Ciudad de México. Posteriormente, se molieron las muestras por separado (silvestres y comerciales) hasta obtener un polvo fino utilizando un molino eléctrico.

La extracción del aceite esencial se realizó a partir de 16.9 g de hojas y tallo molidos extraídos por hidrodestilación en 200 mL de agua destilada. De este proceso se recuperaron 46 mL de la emulsión del aceite esencial y el agua condensada; enseguida se realizaron dos procesos de reparto usando 46 mL de acetato de etilo. Posteriormente se concentró a presión reducida la fase orgánica que contenía el aceite esencial y se almacenó en refrigeración en viales ámbar hasta su uso.

El extracto hexánico se realizó a partir 8 g de hojas y tallos molidos, los cuales se maceraron en 80 mL de hexano, dejándolos macerar durante cinco días a temperatura ambiente y protegiéndolos de la exposición directa a la luz (Carreón-Abud *et al.*, 2015). Posteriormente, la muestra se filtró y concentró a presión reducida.

5.5.2 Análisis cromatográfico

El análisis cromatográfico del aceite esencial y del extracto hexánico de *C. macrostemum*, se realizó por cromatografía de capa fina (CCF) basado en el Método General de Análisis (MGA) 050 de la FHEUM.

Se utilizaron cromatoplasmas de aluminio con sílica gel como fase estacionaria, se evaluaron dos fases móviles: tolueno:acetato de etilo 95:5 (v/v) y 90:10 (v/v). Se prepararon dos soluciones del extracto hexánico al 1%, una con hexano y la segunda con tolueno, mientras que el aceite esencial se evaluó sin diluir. Los estándares de referencia se prepararon en dilución con hexano en las siguientes concentraciones: linalol al 1%, mentona al 10%, pulegona al 1%, geraniol al 1%, estragol al 1% y eucaliptol al 10%; como control negativo se usó aceite esencial de *Agastache mexicana*, ya que a *C. macrostemum* se le conoce también con el nombre popular de toronjil, por lo que la comparación con *A. mexicana* puede ser considerado para evitar sustituciones o adulteraciones del material vegetal.

Las cromatoplasmas se observaron a las longitudes de onda de 254 nm y 365 nm, y se revelaron con una solución de anisaldehído; la solución reveladora se preparó de acuerdo a lo descrito en el MGA-FH 0210 de la FHEUM, 2013. Se registró el factor de retención (R_f) para cada compuesto de referencia, con la finalidad de identificarlos en el aceite esencial y extracto hexánico. Para obtener el R_f , se calculó el cociente de la distancia recorrida por el compuesto y la distancia del frente de elución de la fase móvil) como se muestra a continuación (Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, 2013):

$$R_f = \frac{a}{b}$$

donde:

a = la distancia recorrida entre el punto de aplicación y el centro del compuesto de referencia.

b = la distancia recorrida entre el punto de aplicación y el frente del disolvente.

5.6 Identidad molecular

5.6.1 Extracción de DNA total y Amplificación de los marcadores moleculares *matK*, *rbcL*, *rpl32-trnL*, *trnH-psbA* e *ITS2*

La extracción del DNA total se realizó utilizando un kit comercial, Plant DNeasy Mini Kit, QIAGEN, modificándose la metodología propuesta por el fabricante (Anexo 1). La evaluación del DNA total extraído se realizó por dos métodos: una prueba cuantitativa utilizando un método espectrofométrico (Nanodrop, Thermo Scientific); y una prueba cualitativa utilizando una electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

La amplificación de los marcadores moleculares se realizó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Cada uno de los marcadores usados contó con su propias condiciones de concentración de reactivos, condiciones de temperatura y tiempo en el termociclador (cuadro 1 - 3).

Cuadro 1. Marcadores moleculares usados para la evaluación de identidad molecular.

Región	Descripción	Primer	
		Foward	Revers
<i>matK</i>	Maturasa K - cloroplasto	matK-KIM1R	matK-KIM3F
<i>rbcL</i>	Subunidad mayor de RuBisCo -cloroplasto	rbcLa-F	rbcLa-R
<i>rpl32-trnL</i>	Espaciador intergénico - cloroplasto	trnL ^(UAG)	Rpl32-F
<i>trnH-psbA</i>	Espaciador intergénico - cloroplasto	psbAF	trnH2
<i>ITS2</i>	Segundo espaciador transcrito interno del cistrón ribosomal nuclear - núcleo	AB101	AB102

Cuadro 2. Condiciones experimentales y concentraciones finales para la amplificación de los marcadores moleculares.

Reactivos	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>	<i>rpl32-trnL</i>	<i>trnH-psbA</i>	<i>ITS2</i>
Agua					
Buffer KCl	1X	1X	1X	1X	1X
MgCl ₂	1.5 mM	1 mM	1.5 mM	0.66 mM	1.5 mM
d’NTP	0.2 mM	0.2 mM	0.4 mM	0.4 mM	0.4 mM
Oligo Fw	0.1 μM	0.1 μM	0.25 μM	0.25 μM	0.6 μM
Oligo Rv	0.1 μM	0.1 μM	0.25 μM	0.25 μM	0.6 μM
<i>TAq</i> polimerasa	0.625 u/μL	0.625 u/μL	1 u/μL	1 u/μL	1 u/μL
DNA	10 ng/μL	10 ng/μL	10 ng/μL	10 ng/μL	10 ng/μL

Cuadro 3. Condiciones de temperatura para la PCR de los marcadores moleculares.

	<i>matK y rbcL</i>			<i>rpl32</i>			<i>trnH-psbA</i>			<i>ITS2</i>		
		°C	Tiempo		°C	Tiempo		°C	Tiempo		°C	Tiempo
Etapa previa de Desnaturalización		94	2 min		95	2 min		94	2 min		95	5 min
Desnaturalización	29 Ciclos	94	30 seg	35 Ciclos	94	1 min	40 Ciclos	94	30 seg	40 Ciclos	94	30 seg
Alineamiento		52	40 seg		53	1 min		55	40 seg		56	30 seg
Extensión		72	40 seg		72	2 min		72	40 seg		72	45 seg
Etapa posterior a la extensión		72	5 min		72	10 min		72	5 min		72	1º min
Preservado		5	∞		5	∞		5	∞		5	∞

El análisis de los productos de amplificación se realizó a través de una electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

5.6.2 Secuenciación, edición y evaluación de las secuencias.

Los productos de la amplificación de los marcadores se enviaron al Laboratorio Nacional de la Secuenciación Genómica y de la Salud, UNAM.

Las secuencias obtenidas se alinearon y editaron para generar la secuencia consenso para cada uno de los productos de amplificación; la edición y curado se realizó con programas de edición especializados tales como DNADynamo y Sequencher. La verificación de las secuencias obtenidas se realizó mediante la comparación de la base de datos GeneBank (NCBI) a través de la herramienta de búsqueda Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

Para evaluar la capacidad discriminativa de los marcadores se compararon contra las secuencias depositadas en el GeneBank para los mismos marcadores amplificados pero de distintas especies del género *Clinopodium*, con ellas se realizaron árboles filogenéticos de máxima verosimilitud con el software MEGA (Tamura *et al.*, 2013). También se realizó un análisis de distancia del código de barras (barcoding gap) con el programa ABGD (Puillandre *et al.*, 2012) para ver si existe una separación significativa entre las distancias intra- e interespecíficas que permita reconocer a los taxa evaluados.

5.6.3 Construcción del código de barras molecular

Con la finalidad de incrementar el nivel de discriminación de cada marcador evaluado por separado, se generó una sola secuencia concatenada, la cual será

6.2 Propagación por estacas semileñosas

El mayor porcentaje de enraizamiento lo presentó el grupo de estacas tratadas con enraizador a 1,500 ppm obteniendo un 44.16%; mientras que el grupo de estacas tratadas con enraizador a 10,000 ppm presentó un 28.06% y por último el grupo control no desarrolló raíces adventicias (Figura 5).

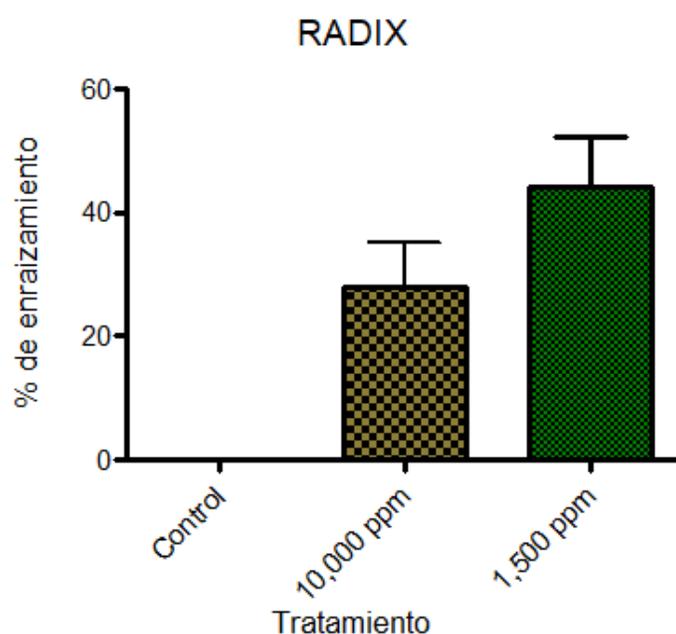


Figura 5. Porcentaje de enraizamiento por tratamiento (IBA a 1,500 ppm n= 12; IBA a 10,000 ppm n=8; control n= 5.). Se indica el error estándar de cada medición ($p \leq 0.05$; prueba de t)

El análisis estadístico de las medias (prueba de t , $p \leq 0.05$) arrojó un valor $p=0.2056$, indicando que a un valor de significancia de 0.05 la media de enraizamiento por tratamiento parece no tener diferencias significativas entre usar cualquiera de las dos concentraciones de enraizador (IBA; Figura 5). Los resultados obtenidos concuerdan con lo descrito por Bello *et al.* (2013). Quienes describen que no hay diferencias significativas

en usar distintas concentraciones de auxinas (grupo testigo, 200, 400, 600 y 1,500 ppm). Aunado a esto, también mencionan que no es necesario el empleo de enraizadores para la propagación por estacas; sin embargo, la diferencia de enraizamiento de estacas sin auxinas que ellos obtuvieron (55%) y en contraste con lo que se observó en este proyecto (0%) puede deberse a distintos factores, como el estado de la planta madre de donde se obtuvieron las estacas, el tipo de corte, la madurez del material vegetal, el sustrato, así como las condiciones ambientales, como lo son la cantidad de luz y la temperatura durante el proceso de propagación (Sisaro y Hagiwara, 2016).

Con respecto al crecimiento vegetativo, éste no mostró diferencias significativas en cuanto al promedio del alargamiento del tallo, ya que el análisis de la varianza (ANOVA; $p \leq 0.05$) arrojó un valor $p = 0.5987$, indicando que el crecimiento de las plantas no presenta diferencias significativas en relación al lugar de origen del material vegetal y al desfase de fechas de su propagación. Dado que en todos los tratamientos las estacas se obtuvieron durante el verano, es posible que la estación en la que se obtuvo el material vegetal sea la causa por la que no se observaron diferencias significativas con respecto al alargamiento del tallo (Figura 6 y 7).

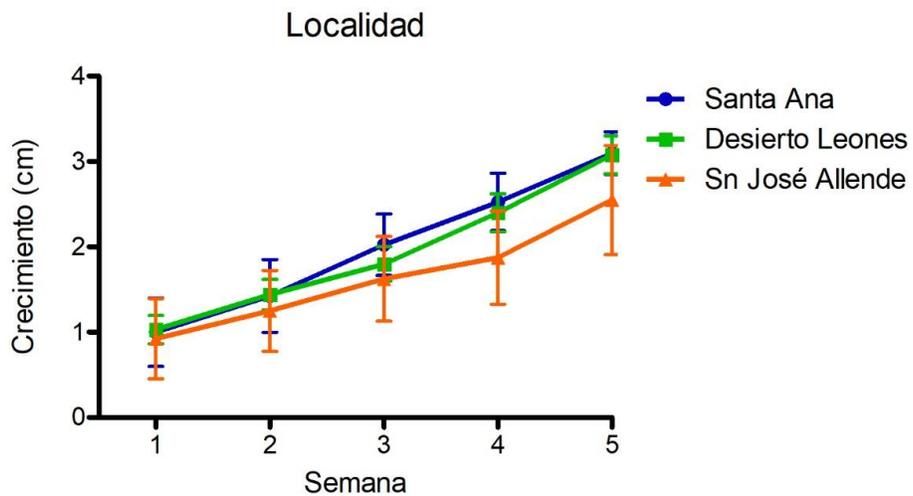


Figura 6. Registro del promedio semanal del alargamiento del tallo por localidad de origen del material: Santa Ana Tlacotenco n=4; Desierto de los Leones n=10; San José Allende n=4.

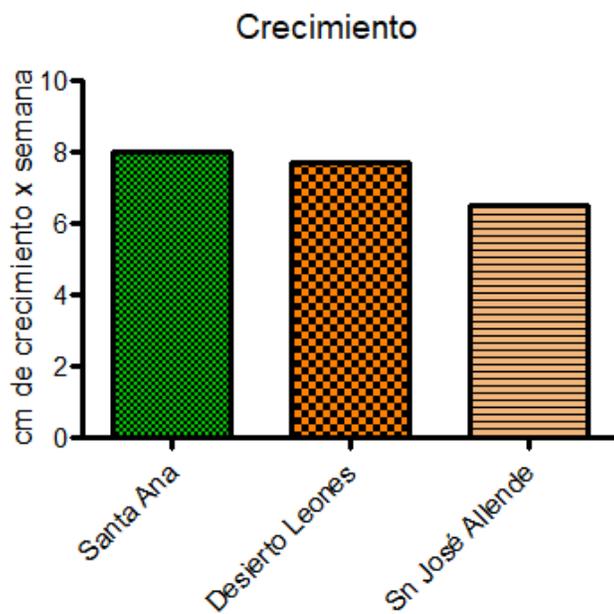


Figura 7. Tasa de alargamiento del tallo por localidad de origen del material vegetal: Santa Ana Tlacotenco n=4; Desierto de los Leones n=10; San José Allende n=4.

6.3 Ciclo fenológico

El desarrollo de las plantas a partir de la propagación por estacas semileñosas comprendió cuatro periodos registrados: (1) el desarrollo de raíces adventicias, el cual duró 44 días para su formación; (2) el crecimiento vegetativo, con 104 días de duración; (3) el desarrollo de la flor, que corresponde a 46 días; y (4) la senescencia de la flor que comprende un periodo de 10 días (Cuadro 4).

Cuadro 4. Ciclo fenológico de *C. macrostemum*. Desarrollo de las plantas a partir de la propagación por estacas semileñosas.

Desarrollo de las plantas	Duración (días)	Mes	Descripción
Enraizamiento	44	Agosto-Septiembre	Desarrollo de raíz post inducción por auxinas
Crecimiento vegetativo	104	Septiembre-Octubre- Noviembre- Diciembre	Crecimiento dado a partir del trasplante de las estacas
Desarrollo de flor	46	Enero	Desarrollo del botón floral hasta su antesis.
Senescencia de la flor	10	Enero	Duración de la flor sin polinizar

Los periodos de crecimiento vegetativo y floración concuerdan con el ciclo fenológico natural del tabaquillo, debido a que el primero (crecimiento vegetativo) se da durante el verano, iniciando en junio y terminando en noviembre (periodo de lluvias); el segundo, la floración, inicia en el invierno en el mes de diciembre y se extiende hasta la primavera en el mes de mayo (Aguilar-Ramírez y Manzanilla-Bolio, s.f.). Por otro lado, no fue posible obtener registros de la duración del desarrollo de semillas, ya que las flores no pudieron ser polinizadas; sin embargo, la información obtenida indica que las plantas propagadas por estacas son capaces de producir flores durante el periodo de floración habitual, las cuales pueden ser polinizadas para obtener semillas y con ello poderlas propagar por medio de éstas. Teniendo en cuenta lo anterior y de acuerdo a lo mencionado por Aguilar-Ramírez y Manzanilla-Bolio, es posible sugerir que el periodo de fructificación inicia en el meses de enero y concluye en el mes mayo.

6.4 Prueba de viabilidad

De las semillas que fueron objeto de la prueba de viabilidad con tetrazolio, sólo el 40% mostró una coloración rosa-roja del embrión al momento de realizar cortes (Cuadro 5), indicando que tienen la capacidad potencial para germinar (Ruíz, 2009). En relación a la prueba de germinación, el mayor porcentaje se obtuvo con el tratamiento de luz/oscuridad a fotoperiodo natural (40%), mientras que el tratamiento con solo oscuridad presentó una germinación del 20% (Figura 8).

Cuadro 5. Porcentaje de viabilidad de semillas de *C. macrostemum* determinada con cloruro de tetrazolio

Porcentaje de viabilidad		
Semillas	Porcentaje	Registro fotográfico
Viables	40%	
No viables	60%	

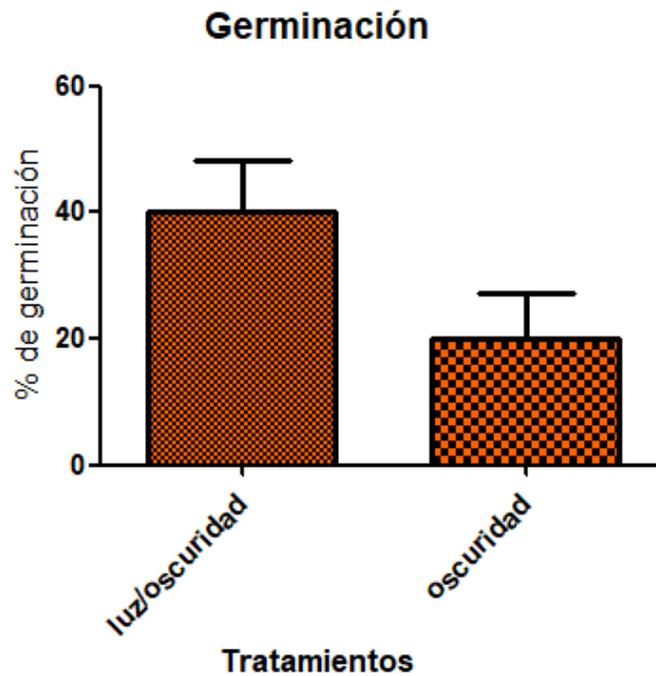


Figura 8. Porcentaje de germinación de las semillas de *C. m.acrostemum* en condiciones de fotoperiodo natural (luz/oscuridad) y oscuridad. n=40 para cada tratamiento.

El análisis estadístico del porcentaje de germinación (prueba de t , $p \leq 0.05$) de los dos tratamientos arrojó un valor $p=0.2010$, indicando que la media de germinación para ambos tratamientos no es distinta, es decir, las semillas germinan tanto en luz como en oscuridad por lo que son fotoblásticas neutras (Baskin y Baskin, 1989). El porcentaje de germinación que se obtuvo coincide con los resultados de la prueba de viabilidad, indicando que la información que se obtuvo es confiable.

6.5 Mapa de distribución actual y potencial de *C. macrostemum*

El total de datos de herbario registrados y usados para la construcción de los mapas fueron 234 puntos de colecta.

De acuerdo al mapa de puntos de *C. macrostemum*, elaborado a partir de los registros de herbario, se observa que su distribución abarca los estados de Sinaloa, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Puebla, Estado de México, Querétaro, Morelos, Ciudad de México y Veracruz (Figura 9).

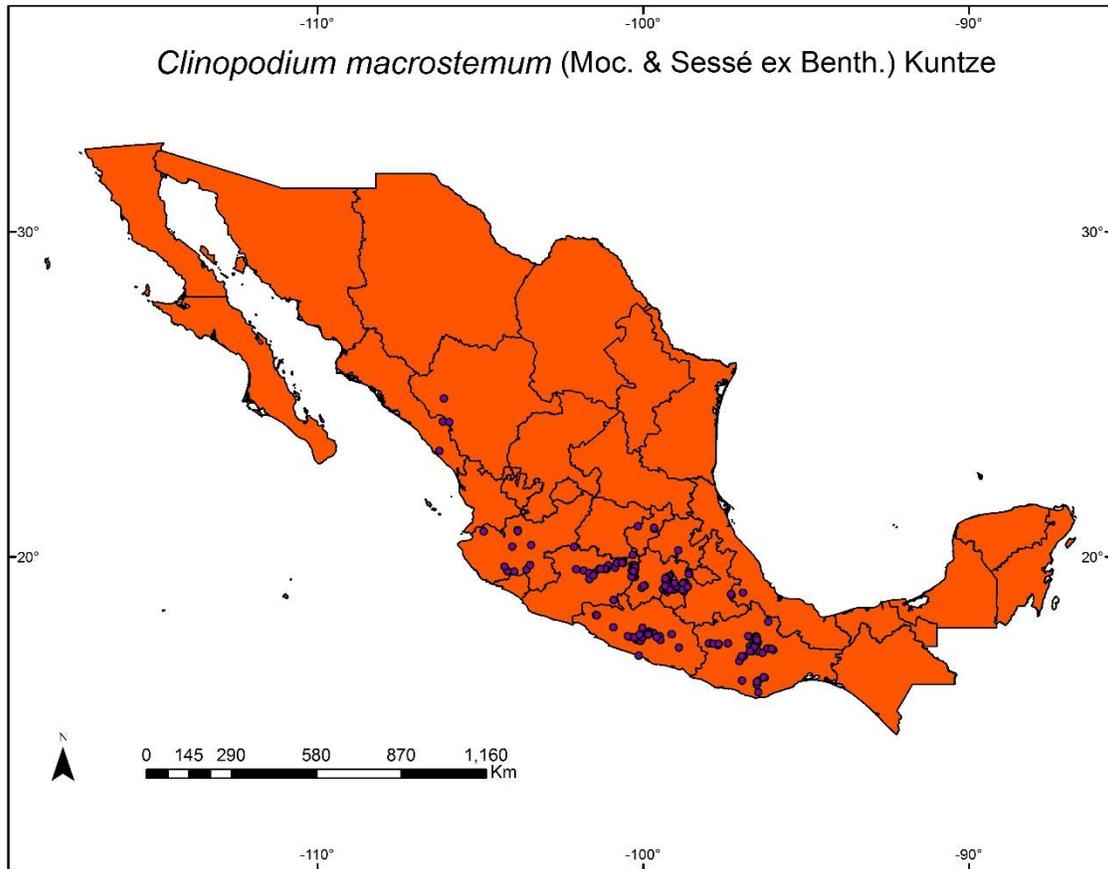


Figura 9. Mapa de distribución actual de *C. macrostemum* en México. En color morado se muestran los puntos de colecta de cada uno de los ejemplares de herbario de *C. macrostemum*.

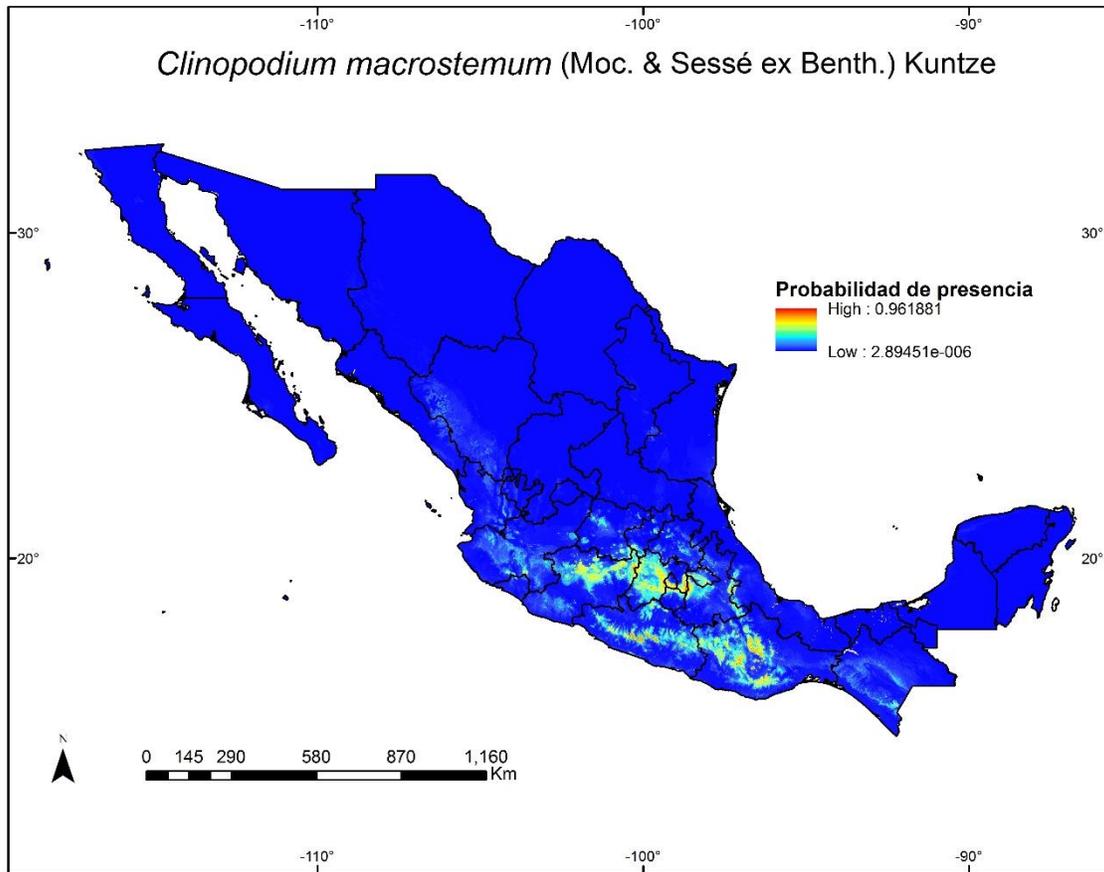


Figura 10. Mapa de distribución potencial de *C. macrostemum*. Las tonalidades que van del azul al rojo indican la probabilidad de presencia de la planta en una región del país, indicando de una baja hasta una alta probabilidad de presencia, respectivamente.

El mapa de probabilidad de presencia de *C. macrostemum* (Figura 10) muestra que esta especie puede distribuirse principalmente a lo largo del eje neovolcánico transversal; lo anterior se debe al número de sitios de colecta registrados de los ejemplares. Por otra parte, la variable que al parecer influye más en la distribución de esta especie es la capa "BIO₅= temperatura máxima del mes más cálido), seguido de ésta está la "BIO10= temperatura media del trimestre más cálido", enseguida está la capa de altitud y por último, "BIO4= estacionalidad en la temperatura". Esto indica que la distribución de *C. macrostemum* depende tanto de la temperatura como de la altitud. Debido a esto el mapa muestra que la planta podría distribuirse en el estado de Chiapas, aunque con baja probabilidad, ya que su presencia se describe en los sistemas montañosos del occidente del país cuyo clima es templado (Rzedowski y Rzedowski, 2005).

6.6 Identidad química.

6.6.1 Elección del compuesto marcador

De la extracción del aceite esencial se obtuvieron 0.273 mL con un rendimiento del 1.61%, mientras que la extracción con hexano se obtuvo 0.119 g de extracto con un rendimiento del 1.48%. Como se observa en la cromatoplaqueta (Figura 11) del aceite esencial de *C. macrostemum* (C+), usado como control positivo, el cual contiene los tres compuestos químicos de referencia pulegona (P), linalol (L) y mentona (M) con un factor de retención (R_f) de 0.52, 0.39 y 0.32, respectivamente. Por otro lado, el aceite esencial de *A. mexicana* (C-) usado como control negativo, no presentó ninguno de los compuestos de referencia. El extracto orgánico solo permitió visualizar la presencia de pulegona, ya que en éste solo se visualizó una banda que corrió a la misma distancia que el compuesto de referencia; tanto la pulegona como la mentona no se logran visualizar en

la cromatopla. Finalmente se descartó el uso del extracto hexánico para el análisis de identidad química, ya que contuvo poca concentración de los compuestos de interés para dicho ensayo, provocando que su visualización en la cromatopla resultara dificultosa.

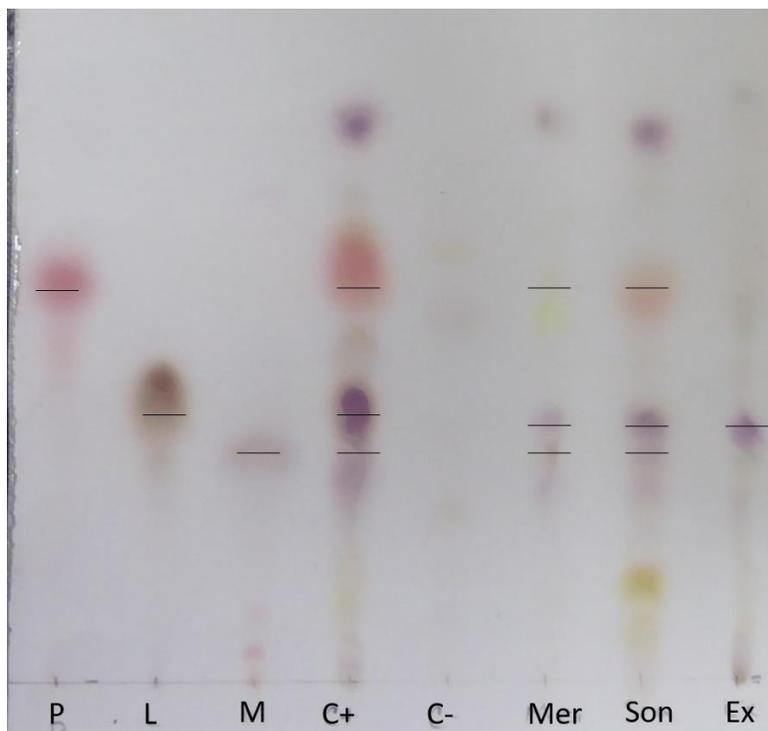


Figura 11. Perfil de identidad química por CCF, revelado con anisaldehído. Cromatopla con los estándares de referencia, aceite esencial y extracto hexánico. **P=** pulegona, R_f 0.52; **L=** linalol, R_f 0.39; **M=** mentona, R_f 0.32; **C+=** aceite esencial de *C. macrostemum*, **C- =** aceite esencial de *Agastache mexicana*; **Mer =** aceite esencial de muestra del mercado de la Merced; **Son =** aceite esencial de muestra del mercado de Sonora; **Ex=** extracto hexánico de *C. macrostemum*.

6.6.2 Evaluación de la identidad química de *C. macrostemum* contra muestras de mercado

Las dos muestras del aceite esencial de mercado de la Merced (Mer) y de Sonora (Son) presentaron los tres compuestos de referencia: pulegona, linalol y mentona (Figura 11), ya sea a distinta cantidad, como lo es el caso de la muestra de la Merced, la cual

presentó menor presencia de los compuestos mencionados. A pesar de esto se concluyó que ambas muestras pertenecen a la especie *C. macrostemum* (C+).

Cabe destacar que la abundancia de los compuestos seleccionados varía en proporción quizá al lugar del cual proviene el material vegetal ya que la disponibilidad de nutrientes puede modificar la presencia de compuestos volátiles, al igual que la cantidad de luz y la temperatura (Peñuelas y Llusia, 2001; Torres-Martínez *et al.*, 2014). Además, el perfil químico de las muestras del aceite esencial provee información sobre la composición del material vegetal (Mohammad *et al.*, 2010) por lo que la huella química del material analizado debe ser de fácil identificación. Por tal motivo, la cromatografía en capa fina es una herramienta útil y usada frecuentemente para la elaboración e identificación de material vegetal y sus derivados (World Health Organization, 1998).

6.7 Identidad molecular

6.7.1 Extracción de DNA total y amplificación de los marcadores moleculares

Se realizaron 16 extracciones de DNA (Cuadro 6), de las cuales 8 correspondieron a los individuos del Desierto de los Leones (DL); 4 extracciones correspondientes a los individuos de Santa Anna Tlacotenco (SA); 2 de las muestras de mercado de la Merced y 2 del mercado de Sonora.

Cuadro 6. Cuantificación del DNA total extraído de las muestras de *C. macrosternum*. Se muestra la concentración del DNA (ng/μL); el cociente de contaminación (A_{260}/A_{280}) y el cociente de pureza (A_{260}/A_{230}); DL: muestras de individuos del Desierto de los Leones; SA: muestras de individuos de Santa Ana Tlacotenco Merced: muestra del ramo de Tabaquillo del mercado de La Merced; Sonora: muestra del ramo de Tabaquillo del mercado de Sonora.

Muestras extraídas por individuos	Concentración de DNA ng/ μL	Cociente de contaminación A_{260}/A_{280}	Cociente de Pureza A_{260}/A_{280}
DL 1	7.7	1.47	1.30
DL 1 (segunda extracción)	7.7	1.54	0.88
DL 2	5.2	1.47	1.52
DL 3	2.9	1.36	1.29
DL 5	33.4	1.34	0.46
DL 6	6.4	0.98	0.58
DL 7	9.4	1.46	0.63
DL 8	12	1.49	1.23
SA 1	8	1.76	2.31
SA 1 (segunda extracción)	8.7	1.63	0.92
SA 2	3.8	1.58	1.85
SA 3	3.8	0.80	0.51
Merced	107.5	1.84	1.45
Sonora	74.2	1.91	1.72

La amplificación por PCR de los marcadores moleculares a partir de las muestras de DNA no se logró con éxito a partir de todas las muestras, a pesar de que algunas de ellas presentaron coeficientes de pureza (A_{260}/A_{280}) y contaminación (A_{260}/A_{230}) adecuados (pureza: 1.8 – 2 y contaminación: 1.5-2.2). Por lo que del total de las 16 extracciones realizadas solo se usaron 7 de ellas: DL1, DL2, DL3, SA2, SA3, Mer y Son. En la figura 12 se presentan los resultados de los análisis por electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación de los marcadores por PCR de DL y SA. Las amplificaciones de las muestras del mercado de la Merced y del mercado de Sonora no se presentan.

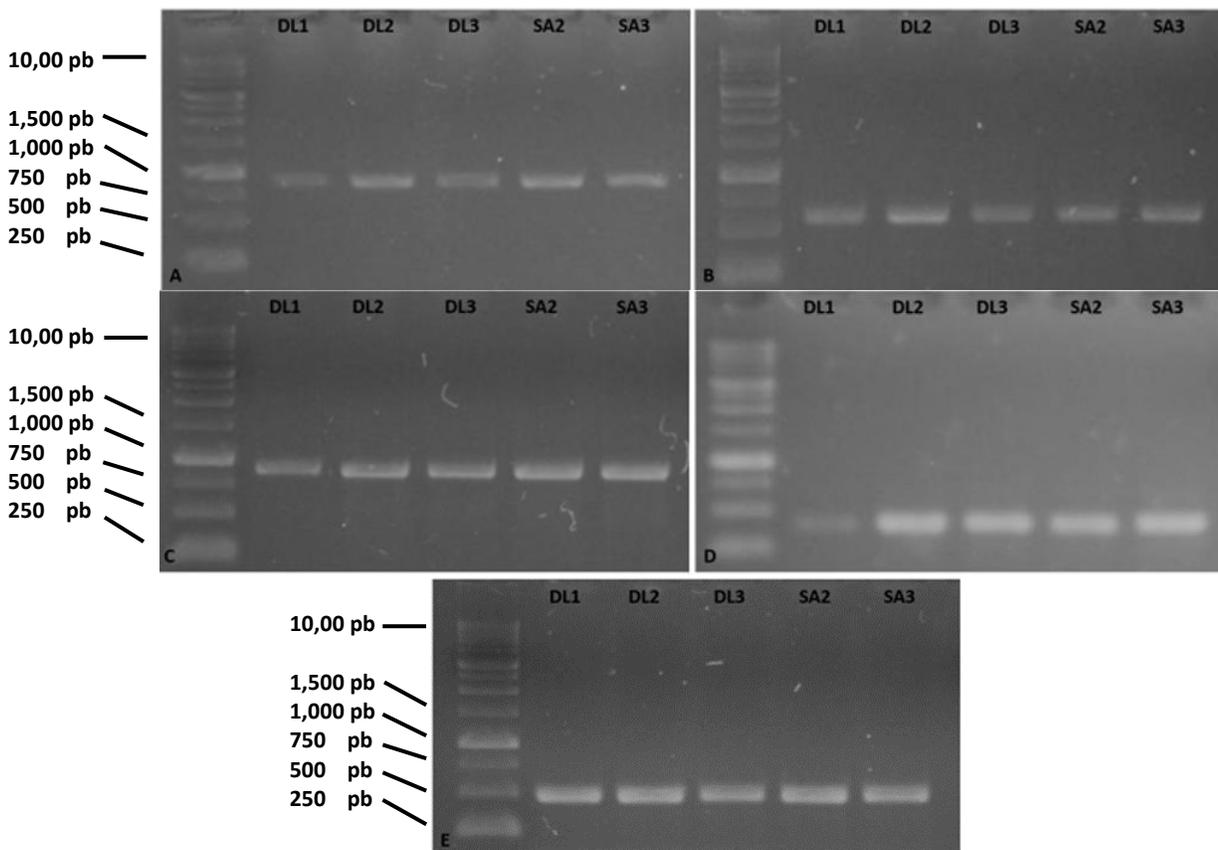


Figura 12. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR de los marcadores moleculares evaluados. Muestras DL1, DL2, DL3, SA2 y SA3. **A.** Productos de PCR del marcador *matK*, ≈800 pb. **B.** Productos de PCR de marcador *rcbL*, ≈600 pb. **C.** Productos de PCR del marcador *rpL32 trnL*, ≈800 pb. **D.** Productos de PCR del marcador *trnL-psbA*, ≈350 pb. **E.** Producto de PCR del marcador *ITS2*, ≈500 pb.

6.7.2 Evaluación de la capacidad discriminativa

6.7.2.1 Análisis filogenético y Barcoding gap

Los árboles filogenéticos obtenidos a partir de las secuencias de nucleótidos de los marcadores moleculares *matK*, *rbcl*, *rpL32-trnL*, *trnH-psbA* e *ITS2* provenientes de secuencias del GenBank y de las secuencias obtenidas de las muestras de DL y SA (Anexo 2) se muestran a continuación.

En el caso de *matK*, este logra discriminar a nivel de especie a las secuencias de *C. macrostemum* del resto de las especies usadas (*Clinopodium acinos*, *Clinopodium alpinus* subsp *orontium*, *Clinopodium chinense*, *Clinopodium pulegium*, *Clinopodium vulgare*) agrupándolas en dos clados distintos. Incluso se logró diferenciar a individuos de distintas localidades (DL y SA) siendo éstos la misma especie (Figura 13).

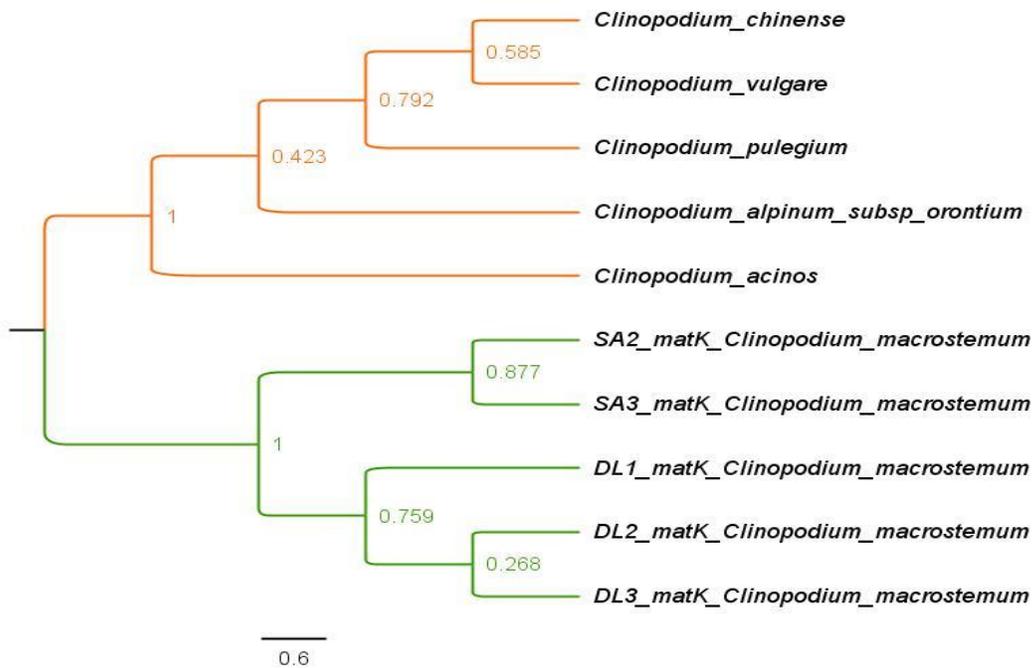


Figura 13. Cladograma empleando datos moleculares del marcador *matK*. En verde se muestra el clado formado por ejemplares de *C. macrostemum* provenientes de DL y SA, en anaranjado se muestra el clado formado por las especies ajenas a *C. macrostemum*. DL= Desierto de los leones; SA= Santa Ana Tlacotenco. Alineación de la secuencia utilizando el algoritmo MUSCLE, construcción del árbol de máxima verosimilitud utilizando el modelo Tamura 3–parámetros; los números debajo de cada nodo representan el porcentaje de 1,000 iteraciones por el método de bootstrap.

El análisis de distancia del código de barras (Barcoding Gap) mediante el programa Automatic Barcoding Gap Discovery (ABGD) agrupa a las secuencias de DL y SA en el Grupo 1, mientras que *C. acinos*, *C. alpinum* ssp. *orontium*, *C. chinense* y *C. pulegium*, las agrupa en el Grupo 2; sin embargo, no reconoce la totalidad de taxa evaluados como grupos independientes, sino que los une en un mismo grupo, llegando a reconocer hasta tres grupos independientes, aun cambiando el límite de divergencia (Anexo 3). Los resultados demuestran que si bien se reconoce a *C. macrostemum* como una especie distinta, no es capaz de discernir toda la diversidad de especies del género; esto se puede explicar por haber utilizado un solo individuo de las demás especies, siendo una muestra insuficiente.

En el caso del marcador *rbcL*, logró discriminar a nivel de especie a las secuencias de *C. macrostemum* del resto de las especies del género (*C. acinos*, *C. chinense* y *C. vulgare*), agrupándolas en dos clados distintos bien definidos (Figura 14).

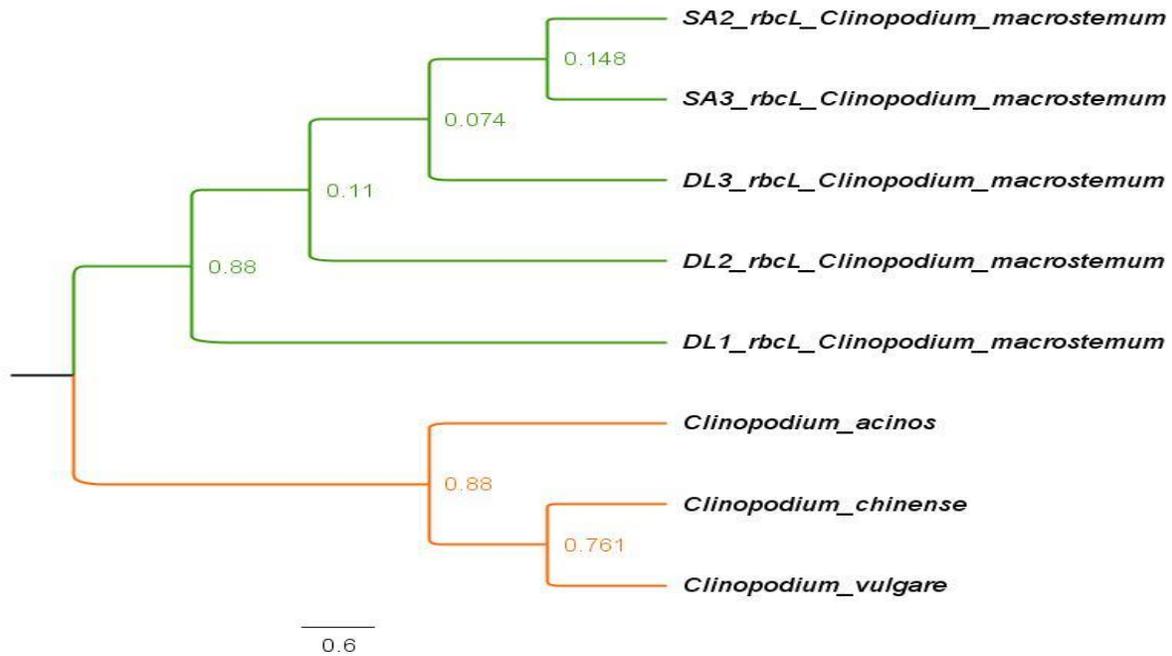


Figura 14. Cladograma empleando datos moleculares del marcador *rbcL*. En verde se muestra el clado formado por los ejemplares de *C. macrostemum* provenientes de DL y SA, en anaranjado se muestra el clado formado por otras especies del género *Clinopodium*. DL= Desierto de los Leones; SA= Santa Ana Tlacotenco. Alineación de la secuencia utilizando el algoritmo MUSCLE, construcción del árbol de máxima verosimilitud utilizando el modelo Jukes-Cantor; los números debajo de cada nodo representan el porcentaje de 1,000 iteraciones por el método de bootstrap.

En cuanto al análisis por ABGD usando un límite de divergencia “P” establecido entre 0.001 y 0.028, pudo reconocer hasta 3 grupos. El primero de ellos (Grupo 1) lo conforman los individuos: DL1, DL2, DL3, SA2 y SA3; el Grupo 2: *C. acinos*, y el Grupo 3: *C. chinense* y *C. vulgare*. La información mostró que las secuencias de DL y SA corresponden a un solo grupo, coincidiendo con su identidad taxonómica; mientras que los demás ejemplares se separaron en dos grupos distintos (Anexo 4). Los resultados

demuestran que el número de grupos es muy parecido a lo observado en el análisis filogenético.

El uso del marcador *trnH-psbA*, no logró discriminar a nivel de especie a las secuencias de *C. macrostemum* del resto de las especies usadas; si bien coloca a *C. chinense* junto con *Clinopodium ashei* en un solo clado, el siguiente clado contiene a los individuos de *C. macrostemum* de la localidad de Desierto de los Leones junto con *C. dentatum*, *C. georgianum* y *C. vulgare*, asociando dicho clado a los individuos de *C. macrostemum* colectados en la localidad de Santa Ana (Figura 15).

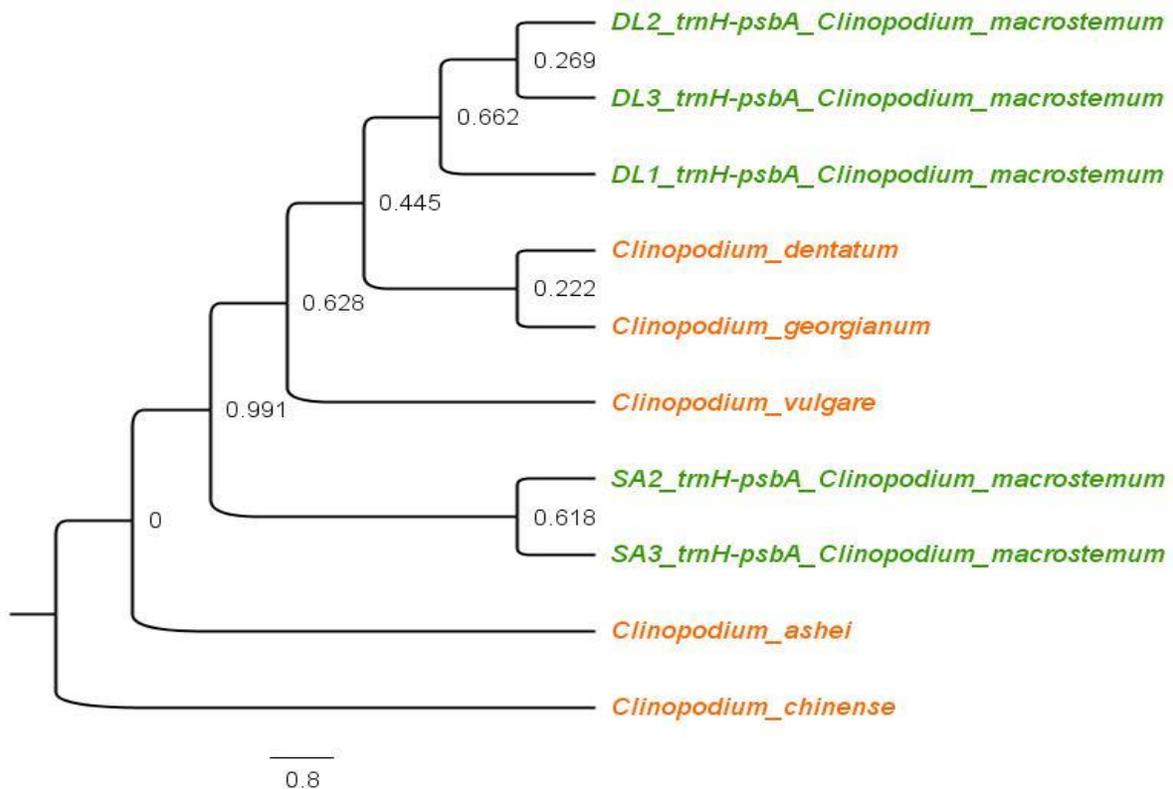


Figura 15. Cladograma empleando datos moleculares del marcador *trnH-psbA*. En verde se muestran los ejemplares de *C. macrostemum* provenientes de DL y SA, en anaranjado se muestran otras especies del género *Clinopodium*. DL= Desierto de los Leones; Santa Ana Tlacotenco. Alineación de la secuencia utilizando el algoritmo MUSCLE, construcción del árbol de máxima verosimilitud utilizando el modelo Tamura 3-parámetros; los números debajo de cada nodo representan el porcentaje de 1,000 iteraciones por el método de bootstrap.

Por otra parte, el análisis de distancia de código de barras mediante ABGD mostró 6 grupos conformados de la siguiente manera: Grupo 1: DL1, DL2 y DL3; Grupo 2: SA2 y SA3; Grupo 3: *C. ashei*; Grupo 4: *C. chinense*; Grupo 5: *C. dentatum* y *C. georgianum*; Grupo 6: *C. vulgare*. Las secuencias de DL y SA presentaron variaciones ya que se agruparon en dos grupos distintos, pero no se mezclaron con otros taxa; en cuanto a las secuencias de las demás especies usadas, las unió en un tercero, cuarto, quinto y sexto grupo. Lo anterior usando un límite de divergencia entre 0.001 y 0.028. Los resultados arrojaron que el número de grupos creado es bastante cercano (Anexo 5) al número de particiones de grupos esperados de acuerdo a las secuencias empleadas y a lo observado en el análisis filogenético.

El marcador *rpL32-trnL* logró discriminar a nivel de especie a las secuencias de *C. macrostemum* del resto de las cinco especies usadas (*C. arkansanum*, *C. ashei*, *C. dalmaticum*, *C. taxifolium* y *C. vulgare*). Incluso hizo distinción entre individuos de la misma especie de distinta zona de colecta (DL y SA), esto de acuerdo al análisis filogenético (Figura 16).

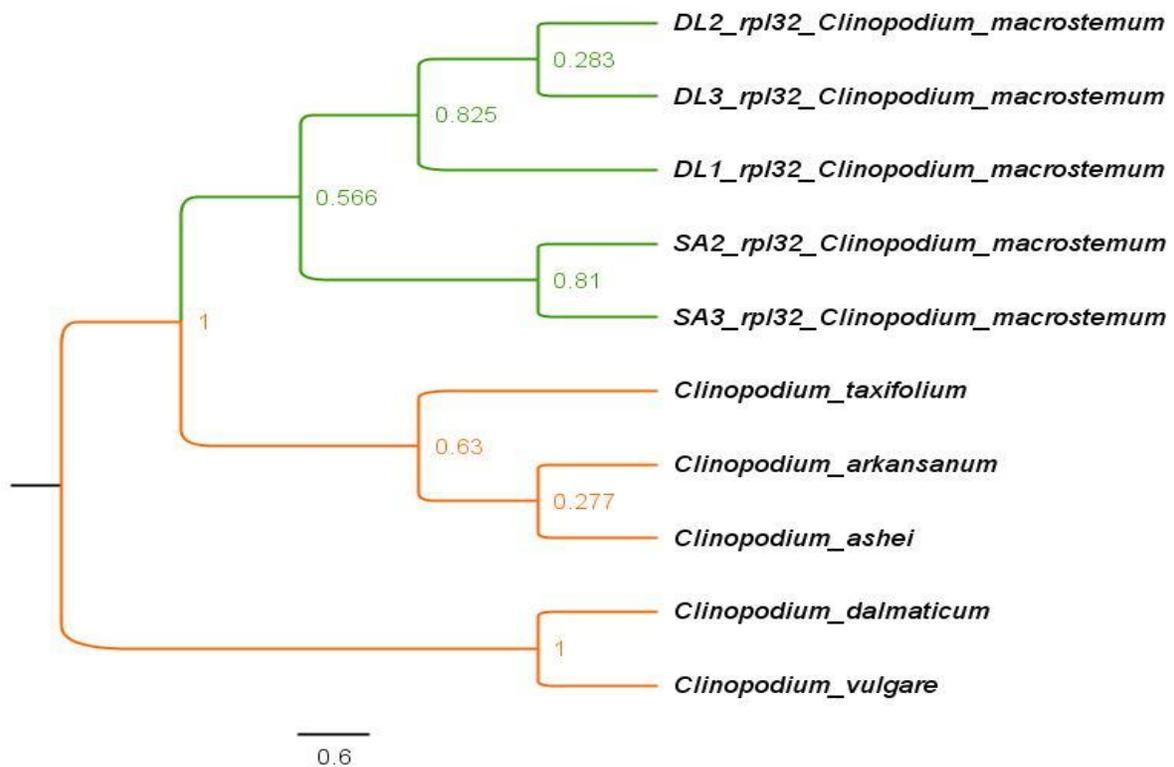


Figura 16. Cladograma empleando datos moleculares del marcador *rpl32-trnL*. En verde se muestran los ejemplares de *C. macrostemum* provenientes de DL y SA, en anaranjado se muestran otras especies del género *Clinopodium*. DL= Desierto de los Leones; Santa Ana Tlacotenco. Alineación de la secuencia utilizando el algoritmo MUSCLE, construcción del árbol de máxima verosimilitud utilizando el modelo Tamura 3-parametros; los números debajo de cada nodo representan el porcentaje de 1,000 iteraciones por el método de bootstrap.

A su vez, el análisis de Barcoding Gap mediante ABGD mostró cinco grupos: Grupo 1: DL1, DL2 y DL3; Grupo 2: SA2, SA3 y *C. ashei*; Grupo 3: *C. arkansanum*; Grupo 4: *C. dalmaticum* y *C. vulgare*; y Grupo 5: *C. taxifolium*. Las secuencias de *C. macrostemum* originarias de DL y SA presentaron variaciones en sus secuencias que las agrupó en dos grupos distintos, pero llegó a incluir dentro de los individuos de SA a la especie *C. ashei*; en cuanto a las secuencias de las demás especies las dividió en tres grupos más. Lo anterior usando un límite de divergencia de 0.001. El Grupo 2, al incluir a una especie distinta, difiere a lo observado en el análisis filogenético (Anexo 6).

En relación al marcador molecular *ITS2*, éste agrupó en dos clados distintos a los individuos de DL y SA con respecto al resto de las especies analizadas (*C. ashei*, *C. fasciculatum* y *C. sericeum*). DL y SA formaron un clado interno, el cual pertenece a un clado más grande, constituido por las tres especies de *Clinopodium* distintas a *C. macrostemum* (Figura 17).

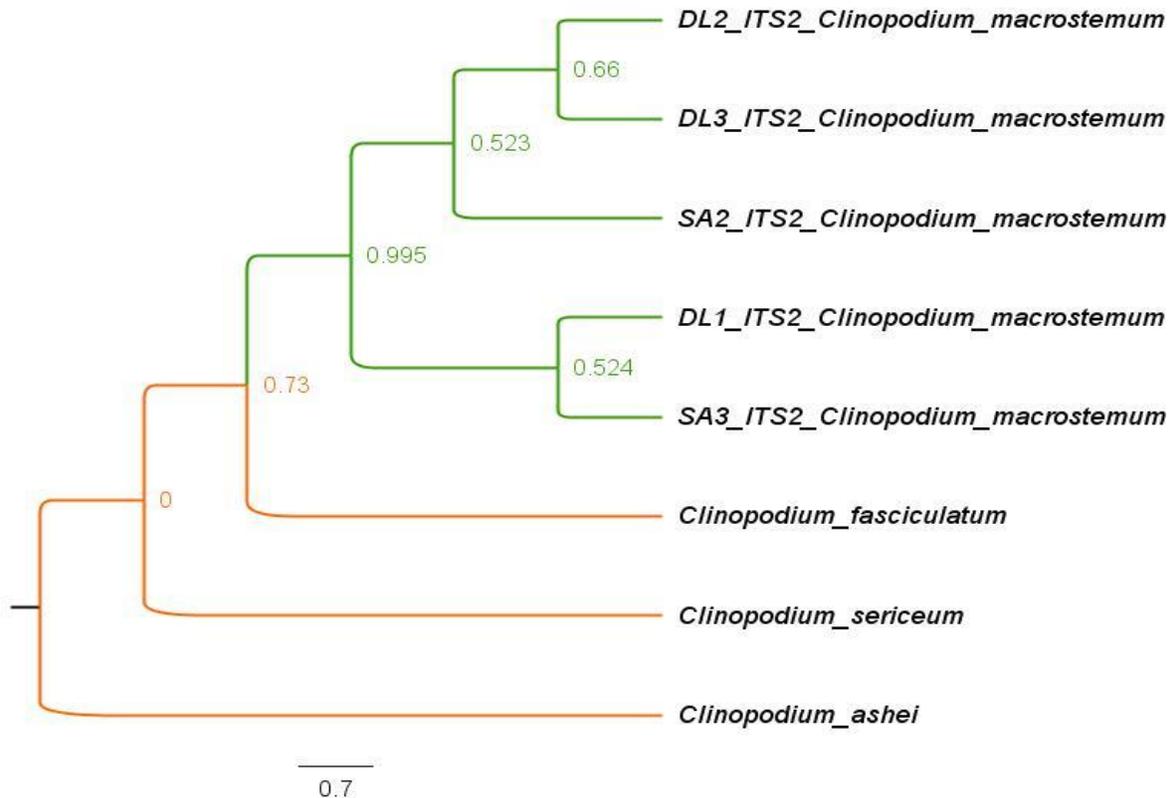


Figura 17. Cladograma empleando datos moleculares del marcador *ITS2*. En verde se muestra los ejemplares de *C. macrostemum* provenientes del DL y SA, en anaranjado se muestran otras especies de *Clinopodium*. Alineación de la secuencia utilizando el algoritmo MUSCLE, construcción del árbol de máxima verosimilitud utilizando el modelo Tamura 3–parámetros; los números debajo de cada nodo representan el porcentaje de 1,000 iteraciones por el método de bootstrap.

El análisis de distancia de código de barras (Barcoding Gap) con un límite de divergencia “P” establecido de 0.001 a 0.12, mostró que las secuencias de DL y SA corresponden a una sola especie uniéndolas en el Grupo 1, mientras que las demás secuencias las agrupa en el Grupo 2: *C. ashei*, *C. fasciculatum* y *C. sericeum* (Anexo 7). Los resultados permiten diferenciar a *C. macrostemum* del resto de las especies, pero no

diferencia a las especies restantes entre sí, probablemente debido al reducido número de individuos analizados.

De acuerdo a los resultados obtenidos a partir de los árboles filogenéticos y, parcialmente apoyados, por el análisis de Barcoding Gap, se tomó la decisión de usar 4 de los 5 marcadores propuestos, ya que sólo *matK*, *rbcL*, *rpL32-trnL* e *ITS2* lograron discriminar la secuencia de *C. macrostemum* del resto de las secuencias de distintas especies obtenidas de GenBank; por este motivo se excluyó a *trnH-psbA*.

Posteriormente, los cuatro marcadores anteriormente mencionados fueron puestos a prueba contra dos muestras provenientes de los mercados de la Merced y de Sonora (una muestra por cada uno de los mercados), las cuales previamente fueron identificadas como *C. macrostemum* de acuerdo a las pruebas de identidad química por CCF realizadas. Con el fin de corroborar la eficacia de los marcadores moleculares, se elaboraron nuevos árboles filogenéticos en los cuales se incluyeron las secuencias descargadas de GenBank y las secuencias obtenidas de DL, SA, mercado de Sonora y de la Merced. A continuación se muestran los resultados de dicho análisis.

En el caso del segundo árbol filogenético construido para *matK*, reveló que no es un buen marcador molecular como se había pensado previamente, debido a que el arreglo del cladograma las muestras de los mercados de la Merced y de Sonora están más relacionadas a *C. chinense*, *C. vulgare*, *C. pulegium*, *C. acinos* y *C. alpinum* ssp. *orontium* que con las muestras de DL y SA (Figura 18).

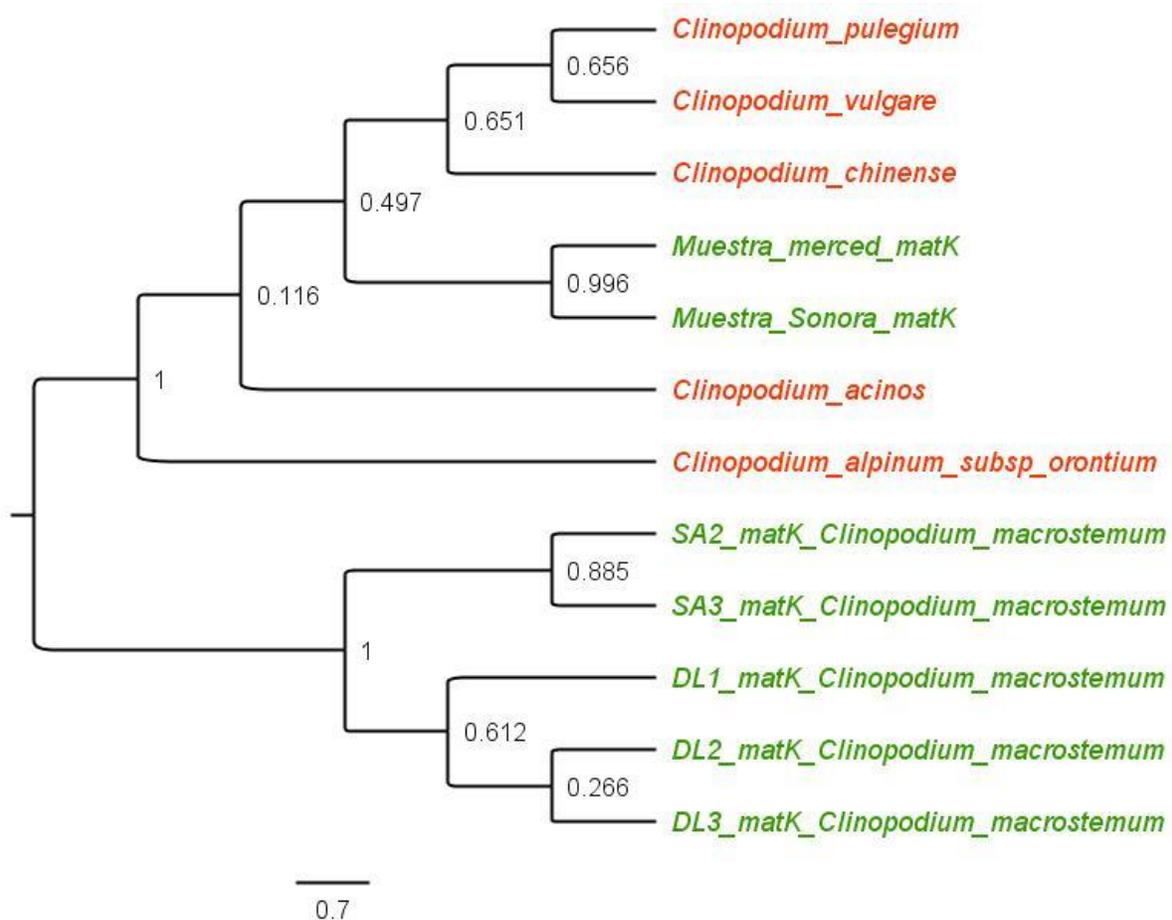


Figura 18. Cladograma empleando datos moleculares del marcador *matK*, incluyendo muestras de mercado. En verde se muestran los ejemplares de *C. macrostemum* provenientes de DL, SA y de mercado; en anaranjado se muestran otras especies distintas de *Clinopodium*. DL= Desierto de los leones; SA= Santa Ana Tlacotenco. Alineación de la secuencia utilizando el algoritmo MUSCLE, construcción del árbol de máxima verosimilitud utilizando el modelo Tamura 3-parametros; los números debajo de cada nodo representan el porcentaje de 1,000 iteraciones por el método de bootstrap.

En cuanto al marcador *rbcL*, al incorporar las secuencias de las muestras de mercado, el cladograma construido sigue agrupando a las secuencias de *C. macrostemum* en un clado mientras mantiene agrupando en otro clado a otras especies de *Clinopodium* (Figura 19)

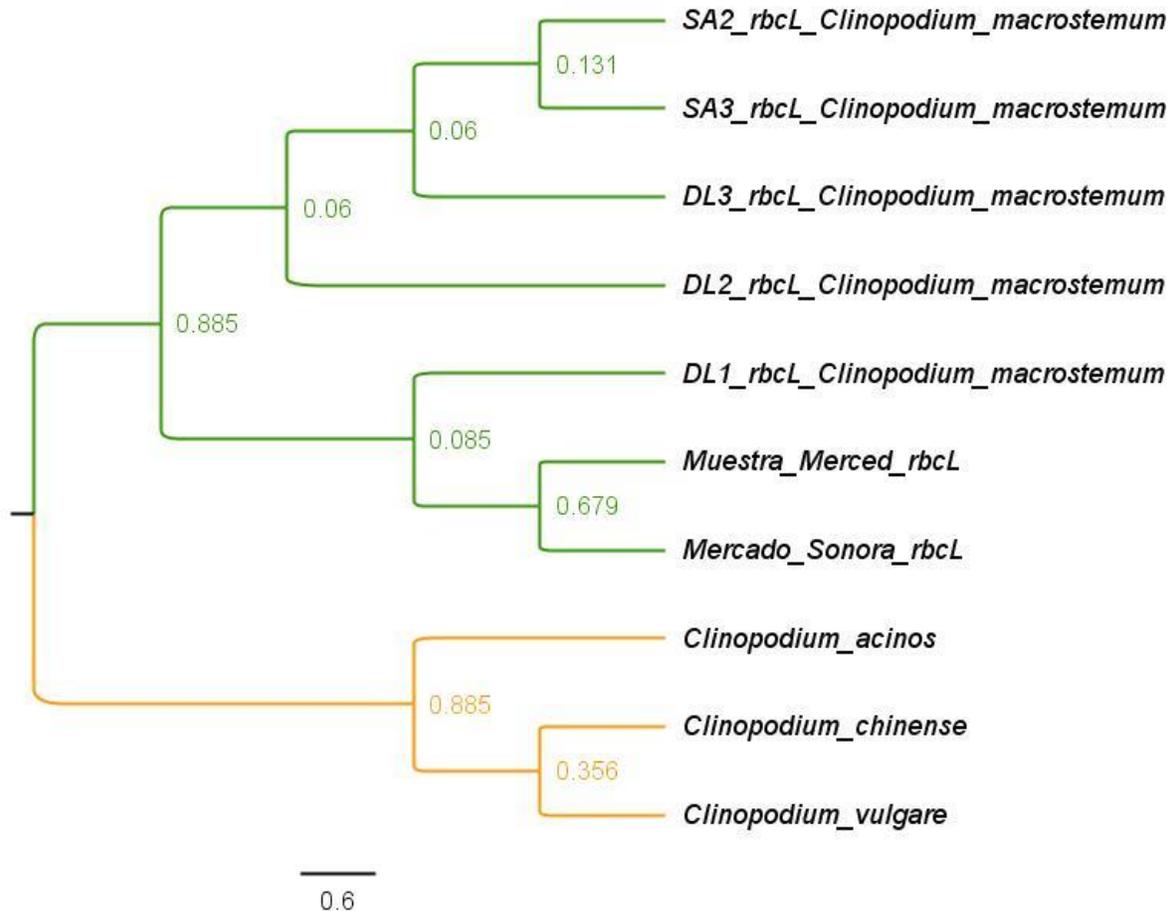


Figura 19. Cladograma empleando datos moleculares del marcador *rbcL*, incluyendo muestras de mercado. En verde se muestran los ejemplares de *C. macrostemum* provenientes de DL, SA y de mercado; en anaranjado se muestran otras especies de *Clinopodium* DL= Desierto de los leones; SA= Santa Ana Tlacotenco. Alineación de la secuencia utilizando el algoritmo MUSCLE, construcción del árbol de máxima verosimilitud utilizando el modelo Jukes-Cantor; los números debajo de cada nodo representan el porcentaje de 1,000 iteraciones por el método de bootstrap.

El cladograma construido con las secuencias de *rpL32-trnL* mostró que las secuencias de *C. macrostemum* de SA son más parecidas a las de *C. arkansanum*, *C. taxifolium* y *C. ashei*, debido a que las agrupa en un clado. Por otra parte las secuencias de DL y mercado las agrupa en un solo clado por su parentesco en la secuencia de nucleótidos (Figura 20).

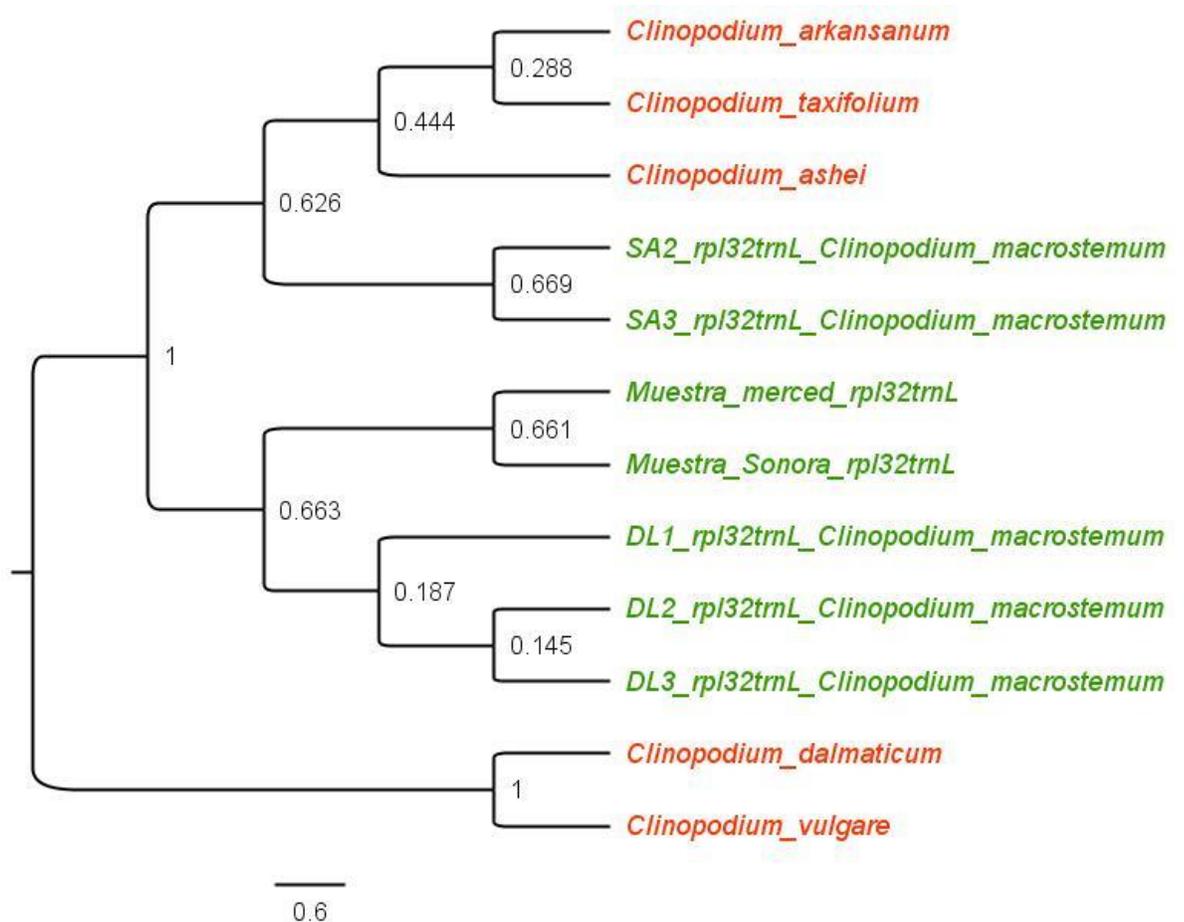


Figura 20. Cladograma empleando datos moleculares del marcador *rpl32-trnL*, incluyendo muestras de mercado. En verde se muestran los ejemplares de *C. macrostemum* provenientes de DL, SA y de mercado; en anaranjado se muestran otras especies de *Clinopodium*. DL= Desierto de los leones; SA= Santa Ana Tlacotenco. Alineación de la secuencia utilizando el algoritmo MUSCLE, construcción del árbol de máxima verosimilitud utilizando el modelo Tamura 3-parametros; los números debajo de cada nodo representan el porcentaje de 1,000 iteraciones por el método de bootstrap.

Por último, el marcador molecular *ITS2* mantuvo agrupadas a las secuencias de DL, SA, mercado de la Merced y Sonora en un solo clado; mientras que agrupa a *C. fasciculatum*, *C. ashei* y *C. sericeum* en un clado distinto (Figura 21).

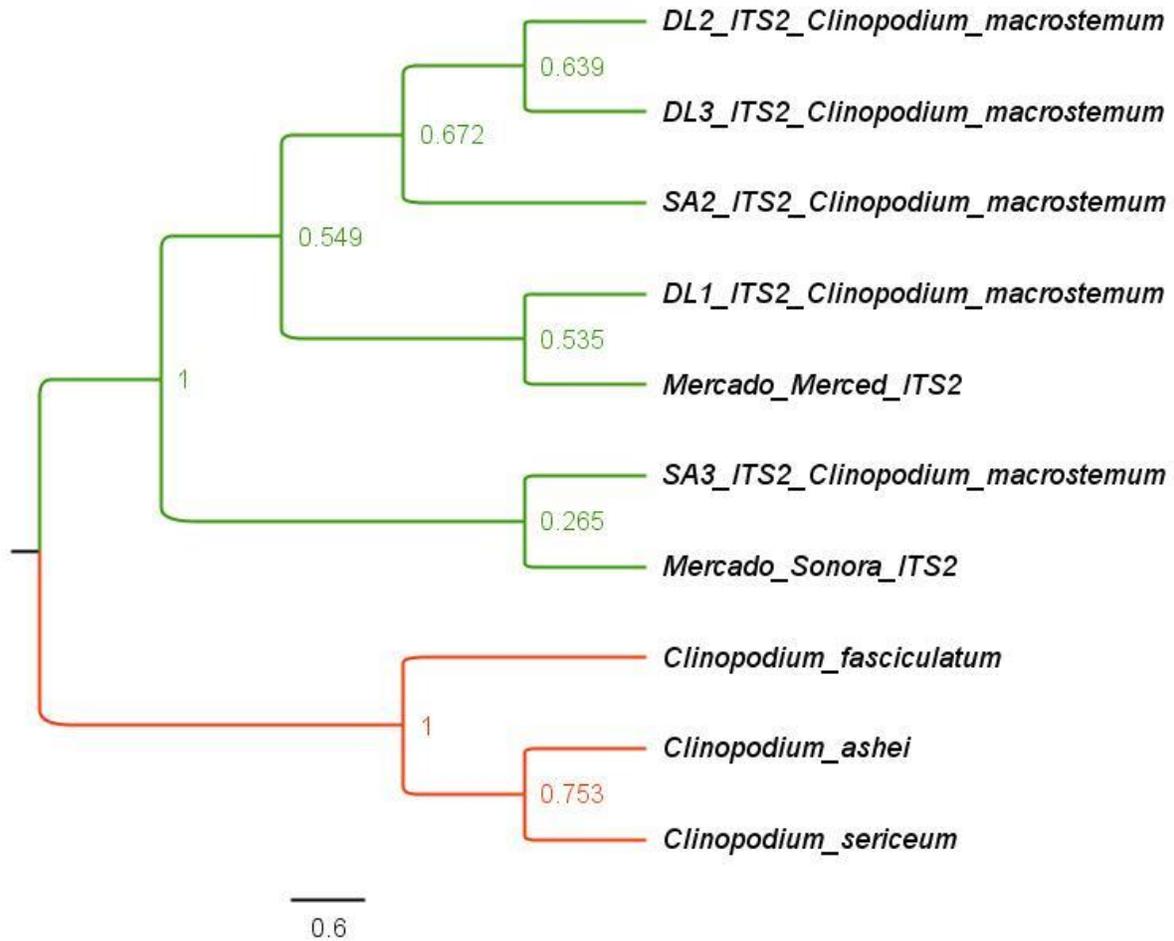


Figura 21. Cladograma empleando datos moleculares del marcador *ITS2*, incluyendo muestras de mercado. En verde se muestran los ejemplares de *C. macrostemum* provenientes de DL, SA y de mercado, en anaranjado se muestran otras especies de *Clinopodium*. DL= Desierto de los leones; SA= Santa Ana Tlacotenco. Alineación de la secuencia utilizando el algoritmo MUSCLE, construcción del árbol de máxima verosimilitud utilizando el modelo Tamura 3–parámetros; los números debajo de cada nodo representan el porcentaje de 1,000 iteraciones por el método de bootstrap.

Debido a que los marcadores moleculares *trnH-psbA* y *matK* no lograron discriminar las secuencias de *C. macrostemum*, se decidió no contemplarlos como candidatos para la elaboración del código de barras. Por lo tanto, los marcadores elegidos para elaborar el código de barras fueron los siguientes: *ITS2*, *rbcL* y *rpL32-trnL*.

Finalmente, el cladograma general mostró un arreglo con dos clados, uno correspondiente a los individuos del Desierto de los Leones y otro correspondiente a los individuos de Santa Ana Tlacotenco (Figura 22).

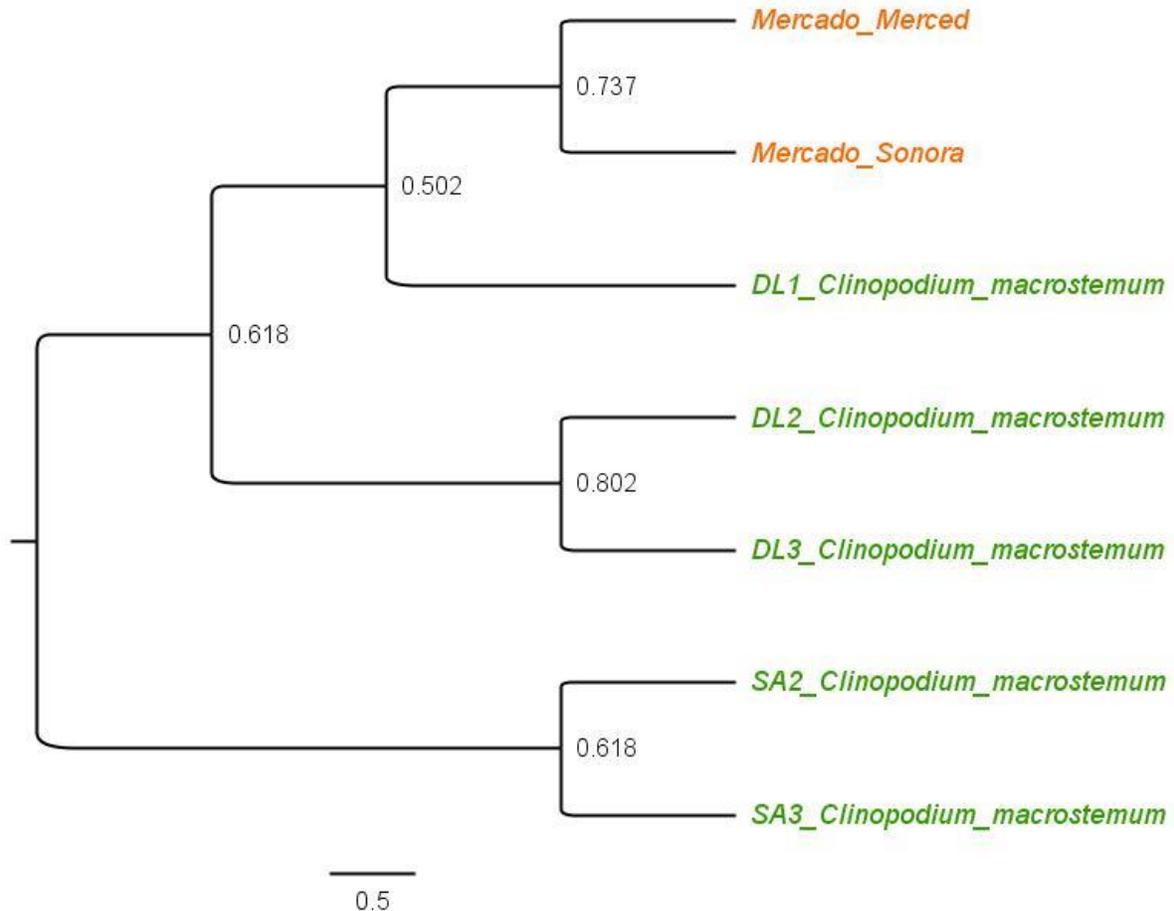


Figura 22. Cladograma empleando datos moleculares concatenados de los marcadores: *ITS2*, *rbcl*, y *rpL32-trnL*. DL= Desierto de los leones; SA= Santa Ana Tlacotenco. Alineación de la secuencia utilizando el algoritmo MUSCLE, construcción del árbol de máxima verosimilitud utilizando el modelo Tamura 3–parámetros; los números debajo de cada nodo representan el porcentaje de 1,000 iteraciones por el método de bootstrap.

Se ha descrito que *matK* muestra una alta discriminación de especies, por ello se postula como un marcador molecular para plantas (Chase *et al.*, 2007); sin embargo, su uso en la elaboración del código de barras para esta especie no resultó ser adecuado, ya que, como se ha mencionado, no distingue correctamente entre las especies del género *Clinopodium* usadas en este trabajo. Existe la propuesta de usar *matK* junto con *trnH-psbA* y otros marcadores para elaborar códigos de barras estandarizados para plantas usándolos en combinación con otras regiones de DNA (Chase *et al.*, 2007).

En cuanto a *rbcL*, ha demostrado en estudios de identificación de plantas vasculares un porcentaje del 80% de identificación a nivel de género (Braukmann *et al.*, 2017). En este trabajo, *rbcL* fue un buen candidato para su uso como código de barras para el género *Clinopodium* al lograr discriminar a la especie *C. macrostemum* del resto de las especies usadas. Además, *rbcL* es un marcador usado en combinación con algunos otros marcadores para la distinguir especies pertenecientes a la familia Lamiaceae (Zahra y Shinwari, 2016).

El marcador molecular *rpl32-trnL* (Shaw *et al.*, 2007), hizo distinción entre secuencias de la especie *C. macrostemum*; sin embargo, su eficacia varía un poco al no separar en grupos distintos a algunos ejemplares de *Clinopodium*. Este marcador es relativamente nuevo y poco explorado, aun así ofrece una fuerte variación informativa en su secuencia, por lo que es postulado como una región que puede ser útil para estudios moleculares de identificación de especies a bajo nivel taxonómico (Shaw *et al.*, 2007).

A pesar de que *trnH-psbA* es uno de los marcadores más usados y postulados como una secuencia útil en la elaboración de un código de barras en plantas debido a que posee un alto grado de discriminación a nivel de especie (Kress *et al.*, 2005), no fue adecuado su uso en este trabajo, ya que el grado de discriminación en el género *Clinopodium*, no fue el esperado debido a que agrupó a los distintos ejemplares de *C. macrostemum* con otras especie del mismo género. Por esta razón, su uso en la elaboración del código de barras de *C. macrostemum* no es de utilidad, ya que se requiere que pueda diferenciar a nivel de especie y no a nivel de género como se ha reportado en otros trabajos; posiblemente pueda usarse como un código de barras complementario para la identificación de especies (Lahaye *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010).

En cuanto al marcador molecular *ITS2*, éste logró distinguir entre especies del mismo género *Clinopodium*. Se ha reportado que *ITS2* posee un alto grado de éxito en la

identificación de taxones de plantas no solo a nivel de familia, sino que es capaz de distinguir taxa estrechamente relacionados a nivel de género y especie (Chen *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2012). Por ello, este marcador es un potencial código de barras universal y como tal, es un buen candidato para identificar distintos taxones de plantas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas que se usan en la MT (Chen *et al.*, 2010; Yao *et al.*, 2010).

Con respecto al análisis de distancia del código de barras (Barcoding Gap), éste es un análisis obligado para el estudio de código de barras que brinda una aproximación sobre el parentesco de los taxa utilizados para el análisis. Sin embargo, dicha predicción cae en el problema de no ser lo suficientemente confiable si no se cuenta con un gran número de muestras (Wiemers y Fiedler, 2007), lo que provoca predicciones erróneas al agrupar especies sin relación taxonómica suficientemente cercana. Es por esto que se omitió su uso durante las evaluaciones posteriores de los marcadores moleculares al usar las muestras de mercado.

C. macrostemum, forma parte del conjunto de plantas usadas en la MT mexicana. Es sabido que en nuestro país, el uso de plantas medicinales para aliviar o curar enfermedades ha existido desde la época precolombina y ha permanecido hasta nuestros días; en cada uno de los mercados populares del territorio nacional, se encuentran expendios de plantas medicinales (Figueroa-Hernández, 2009) y en ellas se encuentra *C. macrostemum*. Se estima que existen alrededor de 4000 especies de plantas usadas en la MT en nuestro país y que los estudios de investigación que validan la actividad química, farmacológica y biomédica de los principios activos se han llevado a cabo solo en el 5 % de estas especies (Ocegueda *et al.*, 2005).

Con los resultados obtenidos del presente estudio de *C. macrostemum*, y con la información que ya se tiene sobre estudios etnobotánicos, fenológicos, fitoquímicos y

farmacológicos que validan su uso actual en distintas regiones del país así como algunos de los principios activos que se le han reportado, su integración a la FHEUM es cada vez más cerca. Sin embargo aún es indispensable realizar estudios a nivel clínico que den más peso y reflejen el uso seguro de esta planta para su futura incorporación a dicho documento.

7. Conclusiones

- El método de propagación por estacas enraizadas con auxinas a concentraciones de 1,500 y 10,000 ppm de *C. macrostemum* fue eficaz.
- Las semillas presentaron fotoblastismo neutro y un porcentaje del 40% de viabilidad.
- Las estacas trasplantadas a tierra fértil continuaron su ciclo de desarrollo fenológico habitual, como en las poblaciones silvestres.
- Se generaron los mapas de distribución actual y el primer mapa de distribución potencial de *C. macrostemum*, siendo una herramienta para futuros programas de propagación y reforestación enriquecida.
- Se proponen como compuestos marcadores al linalol, a la mentona y a la pulegona, presentes en el aceite esencial, siendo un parámetro de control de calidad de *C. macrostemum*.
- Se propone como código de barras molecular concatenado a los marcadores *ITS2*, *rbcL* y *rpL32-trnL*, generando una de las primeras propuestas de control de calidad molecular para plantas medicinales.

8. Perspectivas

La realización de un manual del protocolo de propagación de *C. macrostemum* para agricultores y colectores de plantas medicinales para su producción y venta.

Evaluar el efecto del aceite esencial y de los extractos orgánicos de *C. macrostemum* en estudios de farmacología que no han sido contemplados, por ejemplo: actividad antimicrobiana contra tuberculosis y otras enfermedades infecciosas no evaluadas.

Evaluación de los marcadores moleculares y químicos en productos preparados derivados de *C. macrostemum* para el control de calidad.

Literatura citada

- Aguilar-Ramírez, M. y Manzanilla-Bolio, H. Sin fecha. Fenología del té nurite (*Satureja macrostema*). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias.CEFAP-Uruapan.Michoacán. México
- Anales del Instituto Médico Nacional. 1894. Continuación de El estudio. Tomo 1.
- Arizaga, Santiago. Sin fecha. Estudio y Colección Viva de Plantas Medicinales Nativas y Formación de un Banco de Germoplasma del Estado de Michoacán. Centro de investigaciones en Ecosistemas.
- Asamblea Mundial de la Salud, 42.1989. 42ª Asamblea Mundial de la Salud, ginebra, 8-19 de mayo de 1989: actas resumidas de las comisiones. Organización mundial de la salud 308 paginas.
- Baskin, J. M. y Baskin, C.C. (1989). Physiology of dormancy and germination in relation to seed bank ecology. In M.A Leck, V.T. Parker and R. L. Simpson (Eds). Ecology of soil Seed Banks. Academic Press. San Diego, CA. USA. pp: 53-66
- Bello, G. M. A. (2006). Catálogo de plantas medicinales de la comunidad Indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán. México. Campo Experimental Uruapan. CIRPAC. INIFAP. Michoacán, México. Libro Técnico.
- Bello, G. M. A., Salgado, G. R. y Carmona, F. J. (2013). Propagación y crecimiento de *Satureja macrostema* Briq. (Lamiaceae) bajo condiciones controladas en Uruapan, Michoacán. México. Ciencia Nicolaita No. 58
- Braukmann, T., Kuzmina, M., Sills, J., Zakharov, E., & Hebert, P..(2017). Testing the Efficacy of DNA Barcodes for Identifying the Vascular Plants of Canada. *PLOS ONE*, 12(1), e0169515. doi: 10.1371/journal.pone.0169515
- Carreón-Abud Y., Torres Martínez R., Farfán Soto B., Hernández García A., Bello González Ma., Martínez Trujillo M. y Salgado Garciglia R. (2015). Arbuscular

mycorrhizal symbiosis increases the content of volatile terpenes and plant performance in *Satureja macrostema* (Benth.) Briq. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 14 (4): 273-279

- Chase, M.W., Cowan, R.S., Hollingsworth, P.M., Van Den Berg, C., Madriñán, S., Petersen, G., Seberg, O., Jorgensen, T., Cameron, K.M., Carine, M., Pedersen, N., Hedderson, T.A.J., Conrad, F., Salazar, G.A., Richardson, J.E., Hollingsworth, M.L., Barraclough, T.G., Kelly, L., Wilkinson, M. (2007). A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon*, 56(2), 295-299.
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., Zhu, Y., Ma, X., Gao, T., Pang, X., Luo, K., Li, Y., Li, X., Jia, X., Lin, Y., ... Leon, C. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PloS one*, 5(1), e8613. doi:10.1371/journal.pone.0008613
- Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. 2013. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Segunda Edición. 372 páginas.
- Figueroa, Hernández José Luis. (2009). ***Reflexiones respecto a plantas medicinales y su enseñanza en medicina***. Revista Digital Universitaria. Vol. 10, No. 9. ISSN: 1607-6079.
- Flores, Joel y Jurado, Enrique. (2011). Germinación de especies de cactáceas en categoría de riesgo del desierto chihuahuense. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 2(8), 59-70.
- García Z., A. 2005. Labiatae en Rzedowski, G.C. de y J. Rzedowski y colaboradores, Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán. (Edición digital: INECOL 2010). 644 pp.

- Gutierrez, R. (2012). Antihepatotoxic, nephroprotective, and antioxidant activities of phenolic compounds from *Satureja macrostema* leaves against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in mice. *Medicinal Chemistry Research*, 22(4), pp.1846-1855.
- Han, J., Shi, L. , Chen, X. and Lin, Y. (2012), Comparison of four DNA barcodes in identifying certain medicinal plants of Lamiaceae. *Journal of Systematics and Evolution*, 50: 227-234. doi:10.1111/j.1759-6831.2012.00184.x
- Hernaández O. S. (2003). Estudio fitoquímico de *Satureja mexicana* y *Satureja macrostema* kunth. Universidad Nacional Autonoma de México
- Kress, W., Wurdack, K., Zimmer, E., Weigt, L., & Janzen, D. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 102(23), 8369-8374. doi: 10.1073/pnas.0503123102
- Kress, W. J., y Erickson, D. L. (2012). DNA Barcodes: Methods and Protocols. *DNA Barcodes Methods in Molecular Biology*, 3-8. Doi: 10.1007/978-1-61779-591-6_1
- Kumate, J. Coordinador; Estudios Actuales sobre el *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*; Secretaría de Salud, México, 1992.
- Lahaye, R., van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., & Gigot, G. et al. (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 105(8), 2923-2928. doi: 10.1073/pnas.0709936105
- Lara-Cabrera, S. I., Bedolla-Garcia B. Y., Zamudio, S. y Domínguez-Vazquez, G. (2016). Diversidad de *Lamiaceae* en el estado de Michoacán, México. *Acta Botánica mexicana*, (116),107. doi: 10.21829/abrn116.2016.1120

- Martínez, Maximino. 1989. *Las plantas medicinales de México*. Editorial Botas (México). 656 páginas.
- Mohammad, A., Bhawani, Showkat y Sharma, S. (2010). Analysis of herbal products by thin-layer chromatography: A review. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 1.
- Mociño, José Mariano. La real expedición botánica a Nueva España Volumen VII / por José Marano Mociño y Martín de Sessé; Ilustraciones de Atanasio Echeverría Y Godoy y Juan de Dios Vicente de la Cerda. Mexico: Siglo XXI, 2010 432p., 206 láms
- Ocegueda, S., Moreno, E. y Koleff, P. (2005). Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. *CONABIO. Biodiversitas* 62:12-15
- Organización Mundial de la Salud, 2013. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Ginebra. 75 pp.
- Ortega-Ortega, T. and Vázquez-García, V. (2014). Satureja macrostema: situación ambiental, conocimiento local y roles de género. *Madera y Bosques*, 20(2), p.71.
- Penuelas, Josep & Llusia, Joan. (2001). The Complexity of Factors Driving Volatile Organic Compound Emissions by Plants. *Biologia Plantarum*. 44. 481-487. 10.1023/A:1013797129428.
- Pérez-Gutiérrez, R. y Gallardo-Navarro, Y. (2010). Antioxidant and hepatoprotective effects of the methanol extract of the leaves of Satureja macrostema. *Pharmacognosy Magazine*, 6(22), p.125.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S. and Achaz, G. (2011). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21(8), pp.1864-1877.

- Ruíz, María de los Ángeles. (2009). El análisis de tetrazolio en el control de calidad de semillas. Caso de estudio: cebadilla chaqueña. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Publicación técnica n° 77. ISSN 0325-2132
- Rzedowski, G. C. de, J. Rzedowski y colaboradores. (2005). Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán. (Edición digital: INECOL 2010)
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-9.
- ***The Plant List (2013). Version 1.1. Published on the Internet;***
<http://www.theplantlist.org/> (accessed 1st January).
- Torres-Martínez, Rafael, Bello-González, Miguel Ángel, Molina-Torres, Jorge, Ramírez-Chávez, Enrique, García-Rodríguez, Yolanda, Fulgencio-Negrete, Rodolfo, García-Hernández, Alejandra, López-Gómez, Rodolfo, Martínez-Pacheco, Mauro Manuel, Lara Chávez, Blanca Nieves, y Salgado-Garciglia, Rafael. (2014). Efecto de la fertilización sobre el crecimiento y contenido de compuestos volátiles en *Satureja macrostema* (Benth) Briq.. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 5(21), 122-134
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 1 Nov 2018
<http://www.tropicos.org/Name/50220095>
- Shaw, J., Lickey, E., Schilling, E., y Small, R. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal Of Botany*, 94(3), 275-288. doi: 10.3732/ajb.94.3.275

- Sisaro, Damián y Hagiwara, J. C. (2016). Propagación vegetativa por medio de estacas de tallo. Ed. Hurlingham, Buenos Aires: Ediciones INTA.
- Villa-Ruano, N., Pacheco-Hernández, Y., Cruz-Durán, R. and Lozoya-Gloria, E. (2015). Volatiles and seasonal variation of the essential oil composition from the leaves of *Clinopodium macrostemum* var. *laevigatum* and its biological activities. *Industrial Crops and Products*, 77, pp.741-747.
- Villamar, A. A. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. México. Instituto nacional indigenista
- Wiemers, M., & Fiedler, K. (2007). Does the DNA barcoding gap exist? - a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Frontiers in zoology*, 4, 8. doi:10.1186/1742-9994-4-8
- World Health Organization. (1998). Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva: World Health Organization. 115p
- Yao, H., Song, J., Liu, C., Luo, K., Han, J., Li, Y., Pang, X., Xu, H., Zhu, Y., Xiao, P., ... Chen, S. (2010). Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PloS one*, 5(10), e13102. doi:10.1371/journal.pone.0013102
- Zahra, N.B., & Shinwari, Z.K. (2016). DNA barcoding: a tool for standardization of herbal medicinal products (HMPS) of lamiaceae from pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 48(5), 2167-2174.

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de DNA

- 1.- Selección del tejido de muestra: pesar 20 mg de hojas jóvenes y colocar en tubos eppendorf a -70 °C por lo menos 4 h.
- 2.-Pulverizar durante dos minutos a 50 oscilaciones por segundo en el Tissuelyser, QIAGEN. De ser necesario pulverizar una segunda vez.
- 3.- Centrifugar la muestra durante un minuto a $8,000 \times g$
- 4.- Adicionar 400 μL de buffer AP1, enseguida colocar 4 μL de ARNasa y mezclar con vortex, centrifugar por 10 segundos.
- 5.- Incubar 15 min a 65°C, mezclar por inversión cada 3 minutos.
- 6.-Añadir 130 μL de buffer P3. Mezclar con vortex e incubar 5 minutos en hielo.
- 7.-Centrifugar la muestra 5 minutos a $16873 \times g$.
- 8.-Retirar el sobrenadante y colocarlo en una columna QIAshedder mini spin colocada en un tubo colector de 2 mL. Centrifugar 2 min a $16873 \times g$.
- 9.- Transferir el filtrado a un tubo nuevo, 450 μL aproximadamente, sin perturbar el pellet formado.
- 11.-Agregar 1.5 volúmenes, e.g. 675 μL de buffer AW1. Mezclar por pipeteo.
- 12.- Transferir, incluso con precipitado), 650 μL a una columna DNeasy mini spin colocada previamente en un tubo colector de 2 mL
- 13.- Centrifugar 1 min a $8000 \times g$.
- 14.- Colocar la columna en un nuevo tubo colector de 2 mL y adicionar 500 μL de buffer AW2. Centrifugar 1 min a $8000 \times g$ y descartar el filtrado. Rpetir los pasos 13 y 14 con el resto de la muestra y descartar el filtrado.

15.- Añadir 500 μL más de buffer AW2. Centrifugar 5 minutos a $16873 \times g$.

16.-Transferir la columna a un nuevo tubo colector de 2 mL.

17.- Adicionar 50 μL de buffer AE, incubar 15 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente centrifugar 1 minuto a $8,000 \times g$.

18.- Añadir 75 μL de buffer AE, incubar 15 minutos a temperatura ambiente y centrifugar 1 minuto a $8000 \times g$.

Anexo 2. Secuencias de los marcadores moleculares usados

Alineamientos de las secuencias de *C. macrostemum* para cada uno de los marcadores moleculares usados, mediante CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8)

matK

```
Muestra_merced_matK      CGCCCAGGGTACAGATGTTTCTTTTACATTCATTACGGGTCTTTCTCAACGAATATTG
Muestra_Sonora_matK      CGCCCAGGGTACAGATGTTTCTTTTACATTCATTACGGGTCTTTCTCAACGAATATTG
SA2_matK_Clinopodium_macrostemum  AGCACAGAGAGTCAAGTATATACTTT--ATTCGATAC-----
SA3_matK_Clinopodium_macrostemum  AGCACAGAGAGTCAAGTATATACTTT--ATTCGATAC-----
DL1_matK_Clinopodium_macrostemum  AGC-CAGAGAGTCAAGTATATACTTT--ATTCGATAC-----
DL3_matK_Clinopodium_macrostemum  AGC-CAGAGAGTCAAGTATATACTTT--ATTCGATAC-----
DL2_matK_Clinopodium_macrostemum  AGC-CAGAGAGTCAAGTATATACTTT--ATTCGATAC-----
* * * * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Muestra_merced_matK      GAATTGGAATAGTCTTCTTACTCCAAAGAAAGTCAGCTTCTCTTTGTCAAAAAGAAATCA
Muestra_Sonora_matK      GAATTGGAATAGTCTTCTTACTCCAAAGAAAGTCAGCTTCTCTTTGTCAAAAAGAAATCA
SA2_matK_Clinopodium_macrostemum  -----AAACTCCTTTTTTTGCA-----AGATCCGCTATGATAATGAGAAA---
SA3_matK_Clinopodium_macrostemum  -----AAACTCCTTTTTTTGCA-----AGATCCGCTATGATAATGAGAAA---
DL1_matK_Clinopodium_macrostemum  -----AAACTCCTTTTTTTGCA-----AGATCCGCTATGATAATGAGAAA---
DL3_matK_Clinopodium_macrostemum  -----AAACTCCTTTTTTTGCA-----AGATCCGCTATGATAATGAGAAA---
DL2_matK_Clinopodium_macrostemum  -----AAACTCCTTTTTTTGCA-----AGATCCGCTATGATAATGAGAAA---
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Muestra_merced_matK      AAGGTTATTTTTTTTCTTATATAATTCTCATGTATGTGAATACGAATC-----TATTTTC
Muestra_Sonora_matK      AAGGTTATTTTTTTTCTTATATAATTCTCATGTATGTGAATACGAATC-----TATTTTC
SA2_matK_Clinopodium_macrostemum  -----TATTTCT-----GCATATACGCGAAAATCGGTCAATAATATTAGA
SA3_matK_Clinopodium_macrostemum  -----TATTTCT-----GCATATACGCGAAAATCGGTCAATAATATTAGA
DL1_matK_Clinopodium_macrostemum  -----TATTTCT-----GCATATACGCGAAAATCGGTCAATAATATTAGA
DL3_matK_Clinopodium_macrostemum  -----TATTTCT-----GCATATACGCGAAAATCGGTCAATAATATTAGA
DL2_matK_Clinopodium_macrostemum  -----TATTTCT-----GCATATACGCGAAAATCGGTCAATAATATTAGA
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Muestra_merced_matK      GTCTTTCTACGTAACC--AATCTTTTCATTTACGA-----TCAACATCTTCTGGAGTCC
Muestra_Sonora_matK      GTCTTTCTACGTAACC--AATCTTTTCATTTACGA-----TCAACATCTTCTGGAGTCC
SA2_matK_Clinopodium_macrostemum  ATCTGATAACTCAGCCCGAATCGGCTTACTAATGGGATGCCCCAATACGTTACAAAATTT
SA3_matK_Clinopodium_macrostemum  ATCTGATAACTCAGCCCGAATCGGCTTACTAATGGGATGCCCCAATACGTTACAAAATTT
DL1_matK_Clinopodium_macrostemum  ATCTGATAACTCAGCCCGAATCGGCTTACTAATGGGATGCCCCAATACGTTACAAAATTT
DL3_matK_Clinopodium_macrostemum  ATCTGATAACTCAGCCCGAATCGGCTTACTAATGGGATGCCCCAATACGTTACAAAATTT
DL2_matK_Clinopodium_macrostemum  ATCTGATAACTCAGCCCGAATCGGCTTACTAATGGGATGCCCCAATACGTTACAAAATTT
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Muestra_merced_matK      TTCTTGAACGAATCT-----ATTTCTATAGAAAAATAGAATGTCTTATG
Muestra_Sonora_matK      TTCTTGAACGAATCT-----ATTTCTATAGAAAAATAGAATGTCTTATG
SA2_matK_Clinopodium_macrostemum  AGCTTTAGCCAATTCGCAATCAGAGGAATAATTGGAACAAGAGTATCGAGCTTCTTAAT
SA3_matK_Clinopodium_macrostemum  AGCTTTAGCCAATTCGCAATCAGAGGAATAATTGGAACAAGAGTATCGAGCTTCTTAAT
DL1_matK_Clinopodium_macrostemum  AGCTTTAGCCAATTCGCAATCAGAGGAATAATTGGAACAAGAGTATCGAGCTTCTTAAT
DL3_matK_Clinopodium_macrostemum  AGCTTTAGCCAATTCGCAATCAGAGGAATAATTGGAACAAGAGTATCGAGCTTCTTAAT
DL2_matK_Clinopodium_macrostemum  AGCTTTAGCCAATTCGCAATCAGAGGAATAATTGGAACAAGAGTATCGAGCTTCTTAAT
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```


DL1_rbcL_Clinopodium_macrostemum	ACCGATGGACTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGGCGATGCTACCACATTGAGCCCGTT
DL2_rbcL_Clinopodium_macrostemum	ACCGATGGACTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGGCGATGCTACCACATTGAGCCCGTT
DL3_rbcL_Clinopodium_macrostemum	ACCGATGGACTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGGCGATGCTACCACATTGAGCCCGTT
SA2_rbcL_Clinopodium_macrostemum	ACCGATGGACTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGGCGATGCTACCACATTGAGCCCGTT
SA3_rbcL_Clinopodium_macrostemum	ACCGATGGACTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGGCGATGCTACCACATTGAGCCCGTT
Muestra_Merced_rbcL	ACCGATGGACTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGGCGATGCTACCACATTGAGCCCGTT
Mercado_Sonora_rbcL	ACCGATGGACTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGGCGATGCTACCACATTGAGCCCGTT

DL1_rbcL_Clinopodium_macrostemum	CCTGGAGAAAAAGATCAATATATCTGTTATGTAGCTTACCCTTTAGACCTTTTGAAGAA
DL2_rbcL_Clinopodium_macrostemum	CCTGGAGAAAAAGATCAATATATCTGTTATGTAGCTTACCCTTTAGACCTTTTGAAGAA
DL3_rbcL_Clinopodium_macrostemum	CCTGGAGAAAAAGATCAATATATCTGTTATGTAGCTTACCCTTTAGACCTTTTGAAGAA
SA2_rbcL_Clinopodium_macrostemum	CCTGGAGAAAAAGATCAATATATCTGTTATGTAGCTTACCCTTTAGACCTTTTGAAGAA
SA3_rbcL_Clinopodium_macrostemum	CCTGGAGAAAAAGATCAATATATCTGTTATGTAGCTTACCCTTTAGACCTTTTGAAGAA
Muestra_Merced_rbcL	CCTGGAGAAAAAGATCAATATATCTGTTATGTAGCTTACCCTTTAGACCTTTTGAAGAA
Mercado_Sonora_rbcL	CCTGGAGAAAAAGATCAATATATCTGTTATGTAGCTTACCCTTTAGACCTTTTGAAGAA

DL1_rbcL_Clinopodium_macrostemum	GGGTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTAGGAAATGTATTTGGATTCAAAGCCCTA
DL2_rbcL_Clinopodium_macrostemum	GGGTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTAGGAAATGTATTTGGATTCAAAGCCCTA
DL3_rbcL_Clinopodium_macrostemum	GGGTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTAGGAAATGTATTTGGATTCAAAGCCCTA
SA2_rbcL_Clinopodium_macrostemum	GGGTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTAGGAAATGTATTTGGATTCAAAGCCCTA
SA3_rbcL_Clinopodium_macrostemum	GGGTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTAGGAAATGTATTTGGATTCAAAGCCCTA
Muestra_Merced_rbcL	GGGTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTAGGAAATGTATTTGGATTCAAAGCCCTA
Mercado_Sonora_rbcL	GGGTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTAGGAAATGTATTTGGATTCAAAGCCCTA

DL1_rbcL_Clinopodium_macrostemum	CGTGCTCTACGCTGGAAGATCTGCGAATTCCTGTTGCTTATGTTAAAACCTTCCAAGGC
DL2_rbcL_Clinopodium_macrostemum	CGTGCTCTACGCTGGAAGATCTGCGAATTCCTGTTGCTTATGTTAAAACCTTCCAAGGC
DL3_rbcL_Clinopodium_macrostemum	CGTGCTCTACGCTGGAAGATCTGCGAATTCCTGTTGCTTATGTTAAAACCTTCCAAGGC
SA2_rbcL_Clinopodium_macrostemum	CGTGCTCTACGCTGGAAGATCTGCGAATTCCTGTTGCTTATGTTAAAACCTTCCAAGGC
SA3_rbcL_Clinopodium_macrostemum	CGTGCTCTACGCTGGAAGATCTGCGAATTCCTGTTGCTTATGTTAAAACCTTCCAAGGC
Muestra_Merced_rbcL	CGTGCTCTACGCTGGAAGATCTGCGAATTCCTGTTGCTTATGTTAAAACCTTCCAAGGC
Mercado_Sonora_rbcL	CGTGCTCTACGCTGGAAGATCTGCGAATTCCTGTTGCTTATGTTAAAACCTTCCAAGGC

DL1_rbcL_Clinopodium_macrostemum	CCGCCTCATGGGATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCTCTGCTG
DL2_rbcL_Clinopodium_macrostemum	CCGCCTCATGGGATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCTCTGCTG
DL3_rbcL_Clinopodium_macrostemum	CCGCCTCATGGGATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCTCTGCTG
SA2_rbcL_Clinopodium_macrostemum	CCGCCTCATGGGATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCTCTGCTG
SA3_rbcL_Clinopodium_macrostemum	CCGCCTCATGGGATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCTCTGCTG
Muestra_Merced_rbcL	CCGCCTCATGGGATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCTCTGCTG
Mercado_Sonora_rbcL	CCGCCTCATGGGATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCTCTGCTG

DL1_rbcL_Clinopodium_macrostemum	GGCTGTACTATTAACC TAAATTGGGGTTATCTGCTAAAAACTACGGTAGAGCGGTTT
DL2_rbcL_Clinopodium_macrostemum	GGCTGTACTATTAACC TAAATTGGGGTTATCTGCTAAAAACTACGGTAGAGCGGTTT
DL3_rbcL_Clinopodium_macrostemum	GGCTGTACTATTAACC TAAATTGGGGTTATCTGCTAAAAACTACGGTAGAGCGGTTT
SA2_rbcL_Clinopodium_macrostemum	GGCTGTACTATTAACC TAAATTGGGGTTATCTGCTAAAAACTACGGTAGAGCGGTTT
SA3_rbcL_Clinopodium_macrostemum	GGCTGTACTATTAACC TAAATTGGGGTTATCTGCTAAAAACTACGGTAGAGCGGTTT
Muestra_Merced_rbcL	GGCTGTACTATTAACC TAAATTGGGGTTATCTGCTAAAAACTACGGTAGAGCGGTTT
Mercado_Sonora_rbcL	GGCTGTACTATTAACC TAAATTGGGGTTATCTGCTAAAAACTACGGTAGAGCGGTTT

SA2_rpl32trnL_Clinopodium_macros CGCAAAACACTTAATGAAAATATTCTAGATAAATATGTGTGAATTTTTAATAATCTAAA
SA3_rpl32trnL_Clinopodium_macros CGCAAAACACTTAATGAAAATATTCTAGATAAATATGTGTGAATTTTTAATAATCTAAA
DL1_rpl32trnL_Clinopodium_macros CGCAAAACACTTAATGAAAATATTCTAGATAAATATGTGTGAATTTTTAATAATCTAAA
DL2_rpl32trnL_Clinopodium_macros CGCAAAACACTTAATGAAAATATTCTAGATAAATATGTGTGAATTTTTAATAATCTAAA
DL3_rpl32trnL_Clinopodium_macros CGCAAAACACTTAATGAAAATATTCTAGATAAATATGTGTGAATTTTTAATAATCTAAA
Muestra_merced_rpl32trnL CGCAAAACACTTAATGAAAATATTCTAGATAAATATGTGTGAATTTTTAATAATCTAAA
Muestra_Sonora_rpl32trnL CGCAAAACACTTAATGAAAATATTCTAGATAAATATGTGTGAATTTTTAATAATCTAAA

SA2_rpl32trnL_Clinopodium_macros ATATTTTTTGTTCATTGATAAAAAGTATTTTTGGTTGCACATTTTTAAAAATCGAATAAA
SA3_rpl32trnL_Clinopodium_macros ATATTTTTTGTTCATTGATAAAAAGTATTTTTGGTTGCACATTTTTAAAAATCGAATAAA
DL1_rpl32trnL_Clinopodium_macros ATATTTTTTGTTCATTGATAAAAAGTATTTTTGGTTGCACATTTTTAAAAATCGAATAAA
DL2_rpl32trnL_Clinopodium_macros ATATTTTTTGTTCATTGATAAAAAGTATTTTTGGTTGCACATTTTTAAAAATCGAATAAA
DL3_rpl32trnL_Clinopodium_macros ATATTTTTTGTTCATTGATAAAAAGTATTTTTGGTTGCACATTTTTAAAAATCGAATAAA
Muestra_merced_rpl32trnL ATATTTTTTGTTCATTGATAAAAAGTATTTTTGGTTGCACATTTTTAAAAATCGAATAAA
Muestra_Sonora_rpl32trnL ATATTTTTTGTTCATTGATAAAAAGTATTTTTGGTTGCACATTTTTAAAAATCGAATAAA

SA2_rpl32trnL_Clinopodium_macros TCAAAACGGTAAATAAAAAAATGTTTTTTGGGGGGGCTTAATTCATAGTAAGACTGGCC
SA3_rpl32trnL_Clinopodium_macros TCAAAACGGTAAATAAAAAAATGTTTTTTGGGGGGGCTTAATTCATAGTAAGACTGGCC
DL1_rpl32trnL_Clinopodium_macros TCAAAACGGTAAATAAAAAAATGTTTTTTGGGGGGGCTTAATTCATAGTAAGACTGGCC
DL2_rpl32trnL_Clinopodium_macros TCAAAACGGTAAATAAAAAAATGTTTTTTGGGGGGGCTTAATTCATAGTAAGACTGGCC
DL3_rpl32trnL_Clinopodium_macros TCAAAACGGTAAATAAAAAAATGTTTTTTGGGGGGGCTTAATTCATAGTAAGACTGGCC
Muestra_merced_rpl32trnL TCAAAACGGTAAATAAAAAAATGTTTTTTGGGGGGGCTTAATTCATAGTAAGACTGGCC
Muestra_Sonora_rpl32trnL TCAAAACGGTAAATAAAAAAATGTTTTTTGGGGGGGCTTAATTCATAGTAAGACTGGCC

SA2_rpl32trnL_Clinopodium_macros CGTTTTAGAAAGAGCTCAAGCGGAGAAGAGTCTAAAATCCACAATAAACTAAAACCTAA
SA3_rpl32trnL_Clinopodium_macros CGTTTTAGAAAGAGCTCAAGCGGAGAAGAGTCTAAAATCCACAATAAACTAAAACCTAA
DL1_rpl32trnL_Clinopodium_macros TGTTTTAGAAAGAGCTCAAGCGGAGAAGAGTCTAAAATCCACAATAAACTAAAACCTAA
DL2_rpl32trnL_Clinopodium_macros TGTTTTAGAAAGAGCTCAAGCGGAGAAGAGTCTAAAATCCACAATAAACTAAAACCTAA
DL3_rpl32trnL_Clinopodium_macros TGTTTTAGAAAGAGCTCAAGCGGAGAAGAGTCTAAAATCCACAATAAACTAAAACCTAA
Muestra_merced_rpl32trnL TGTTTTAGAAAGAGCTCAAGCGGAGAAGAGTCTAAAATCCACAATAAACTAAAACCTAA
Muestra_Sonora_rpl32trnL TGTTTTAGAAAGAGCTCAAGCGGAGAAGAGTCTAAAATCCACAATAAACTAAAACCTAA

SA2_rpl32trnL_Clinopodium_macros ACTAAAATAATGAACCTTCAAGTACATATTTGAACAAATTTTTATTTCATCCATTTGAATC
SA3_rpl32trnL_Clinopodium_macros ACTAAAATAATGAACCTTCAAGTACATATTTGAACAAATTTTTATTTCATCCATTTGAATC
DL1_rpl32trnL_Clinopodium_macros ACTAAAATAATGAACCTTCAAGTACATATTTGAACAAATTTTTATTTCATCCATTTGAATC
DL2_rpl32trnL_Clinopodium_macros ACTAAAATAATGAACCTTCAAGTACATATTTGAACAAATTTTTATTTCATCCATTTGAATC
DL3_rpl32trnL_Clinopodium_macros ACTAAAATAATGAACCTTCAAGTACATATTTGAACAAATTTTTATTTCATCCATTTGAATC
Muestra_merced_rpl32trnL ACTAAAATAATGAACCTTCAAGTACATATTTGAACAAATTTTTATTTCATCCATTTGAATC
Muestra_Sonora_rpl32trnL ACTAAAATAATGAACCTTCAAGTACATATTTGAACAAATTTTTATTTCATCCATTTGAATC

SA2_rpl32trnL_Clinopodium_macros TTTCTAGAAAATATTGCACCCAATTGAATTCCTAAATCTAGACGATTTTT
SA3_rpl32trnL_Clinopodium_macros TTTCTAGAAAATATTGCACCCAATTGAATTCCTAAATCTAGACGATTTTT
DL1_rpl32trnL_Clinopodium_macros TTTCTAGAAAATATTGCACCCAATTGAATTCCTAAATCTAGACGATTTTT
DL2_rpl32trnL_Clinopodium_macros TTTCTAGAAAATATTGCACCCAATTGAATTCCTAAATCTAGACGATTTTT
DL3_rpl32trnL_Clinopodium_macros TTTCTAGAAAATATTGCACCCAATTGAATTCCTAAATCTAGACGATTTTT
Muestra_merced_rpl32trnL TTTCTAGAAAATATTGCACCCAATTGAATTCCTAAATCTAGACGATTTTT
Muestra_Sonora_rpl32trnL TTTCTAGAAAATATTGCACCCAATTGAATTCCTAAATCTAGACGATTTTT

DL1_ITS2 GTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCACCCTCGCGCATCGGCGGGCGGTT
Mercado_Merced_ITS2 GTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCACCCTCGCGCATCGGCGGGCGGTT
SA3_ITS2 GTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCACCCTCGCGCATCGGCGGGCGGTT
Mercado_Sonora_ITS2 GTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCACCCTCGCGCATCGGCGGGCGGTT
DL3_ITS2 GTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCACCCTCGCGCATCGGCGGGCGGTT
DL2_ITS2 GTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCACCCTCGCGCATCGGCGGGCGGTT
SA2_ITS2 GTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCACCCTCGCGCATCGGCGGGCGGTT

DL1_ITS2 GGGGGCGGACACTGGCCTCCCGTGCCTCGGCGTGC GGCCG GCCCAAATGAGATCCCCG
Mercado_Merced_ITS2 GGGGGCGGACACTGGCCTCCCGTGCCTCGGCGTGC GGCCG GCCCAAATGAGATCCCCG
SA3_ITS2 GGGGGCGGACACTGGCCTCCCGTGCCTCGGCGTGC GGCCG GCCCAAATGAGATCCCCG
Mercado_Sonora_ITS2 GGGGGCGGACACTGGCCTCCCGTGCCTCGGCGTGC GGCCG GCCCAAATGAGATCCCCG
DL3_ITS2 GGGGGCGGACACTGGCCTCCCGTGCCTCGGCGTGC GGCCG GCCCAAATGAGATCCCCG
DL2_ITS2 GGGGGCGGACACTGGCCTCCCGTGCCTCGGCGTGC GGCCG GCCCAAATGAGATCCCCG
SA2_ITS2 GGGGGCGGACACTGGCCTCCCGTGCCTCGGCGTGC GGCCG GCCCAAATGAGATCCCCG

DL1_ITS2 GGCGATTGGCGTCGCGACAAGTGGTGGTTGAACATCTCAATCTCTCTCGTGGTCTGTCGG
Mercado_Merced_ITS2 GGCGATTGGCGTCGCGACAAGTGGTGGTTGAACATCTCAATCTCTCTCGTGGTCTGTCGG
SA3_ITS2 GGCGATTGGCGTCGCGACAAGTGGTGGTTGAACATCTCAATCTCTCTCGTGGTCTGTCGG
Mercado_Sonora_ITS2 GGCGATTGGCGTCGCGACAAGTGGTGGTTGAACATCTCAATCTCTCTCGTGGTCTGTCGG
DL3_ITS2 GGCGATTGGCGTCGCGACAAGTGGTGGTTGAACATCTCAATCTCTCTCGTGGTCTGTCGG
DL2_ITS2 GGCGATTGGCGTCGCGACAAGTGGTGGTTGAACATCTCAATCTCTCTCGTGGTCTGTCGG
SA2_ITS2 GGCGATTGGCGTCGCGACAAGTGGTGGTTGAACATCTCAATCTCTCTCGTGGTCTGTCGG

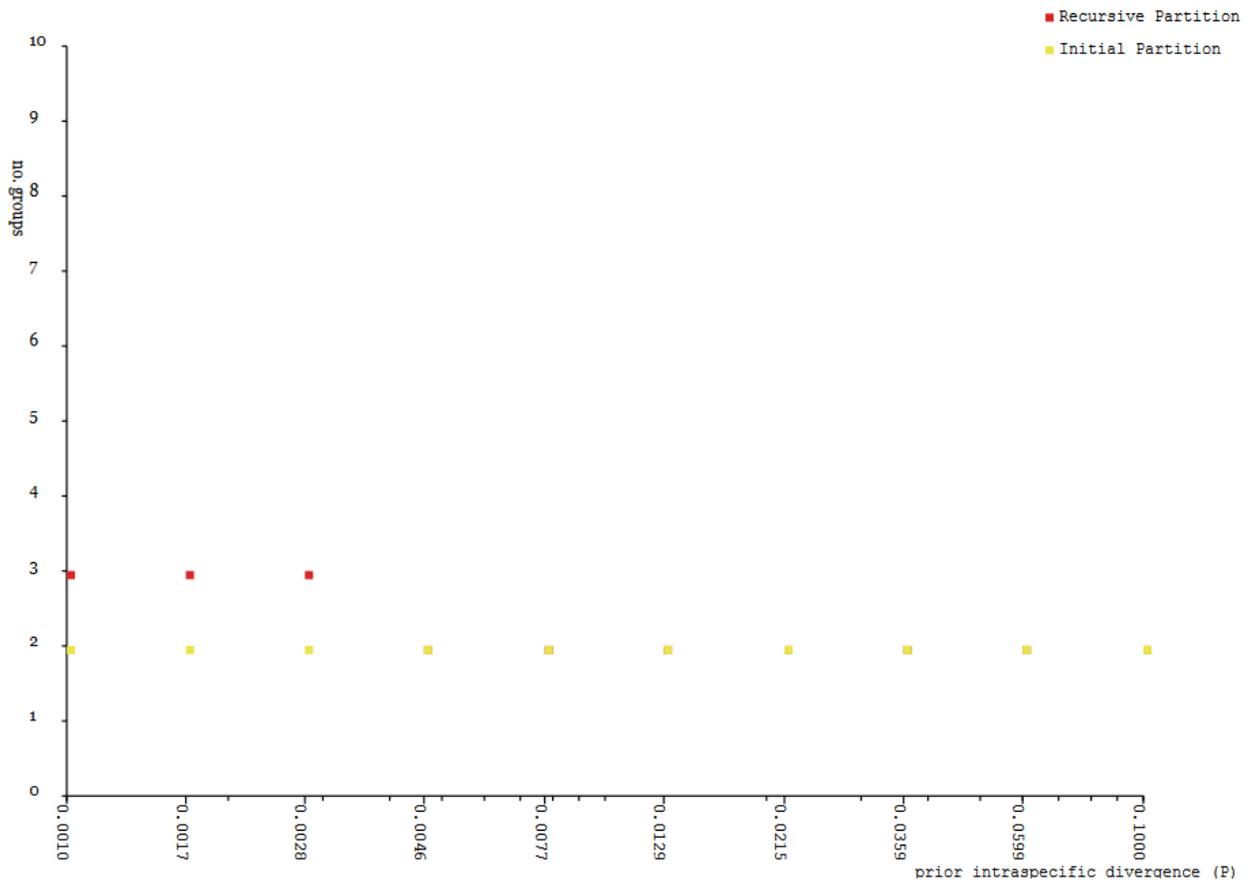
DL1_ITS2 CCGTGTCTGCCGTACGGGAATCGAAAATGACCCAACGGTGCACGGCGCGAACAGCGTCT
Mercado_Merced_ITS2 CCGTGTCTGCCGTACGGGAATCGAAAATGACCCAACGGTGCACGGCGCGAACAGCGTCT
SA3_ITS2 CCGTGTCTGCCGTACGGGAATCGAAAATGACCCAACGGTGCACGGCGCGAACAGCGTCT
Mercado_Sonora_ITS2 CCGTGTCTGCCGTACGGGAATCGAAAATGACCCAACGGTGCACGGCGCGAACAGCGTCT
DL3_ITS2 CCGTGTCTGCCGTACGGGAATCGAAAATGACCCAACGGTGCACGGCGCGAACAGCGTCT
DL2_ITS2 CCGTGTCTGCCGTACGGGAATCGAAAATGACCCAACGGTGCACGGCGCGAACAGCGTCT
SA2_ITS2 CCGTGTCTGCCGTACGGGAATCGAAAATGACCCAACGGTGCACGGCGCGAACAGCGTCT

DL1_ITS2 CACCTTCGACCGCGACCCAGGTCAGGCGGGATTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATA
Mercado_Merced_ITS2 CACCTTCGACCGCGACCCAGGTCAGGCGGGATTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATA
SA3_ITS2 CACCTTCGACCGCGACCCAGGTCAGGCGGGATTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATA
Mercado_Sonora_ITS2 CACCTTCGACCGCGACCCAGGTCAGGCGGGATTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATA
DL3_ITS2 CACCTTCGACCGCGACCCAGGTCAGGCGGGATTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATA
DL2_ITS2 CACCTTCGACCGCGACCCAGGTCAGGCGGGATTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATA
SA2_ITS2 CACCTTCGACCGCGACCCAGGTCAGGCGGGATTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATA

DL1_ITS2 AGCGGAGGAAAAGAAACTTACAAGGATTCCTTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGAAAAGC
Mercado_Merced_ITS2 AGCGGAGGAAAAGAAACTTACAAGGATTCCTTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGAAAAGC
SA3_ITS2 AGCGGAGGAAAAGAAACTTACAAGGATTCCTTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGAAAAGC
Mercado_Sonora_ITS2 AGCGGAGGAAAAGAAACTTACAAGGATTCCTTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGAAAAGC
DL3_ITS2 AGCGGAGGAAAAGAAACTTACAAGGATTCCTTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGAAAAGC
DL2_ITS2 AGCGGAGGAAAAGAAACTTACAAGGATTCCTTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGAAAAGC
SA2_ITS2 AGCGGAGGAAAAGAAACTTACAAGGATTCCTTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGAAAAGC

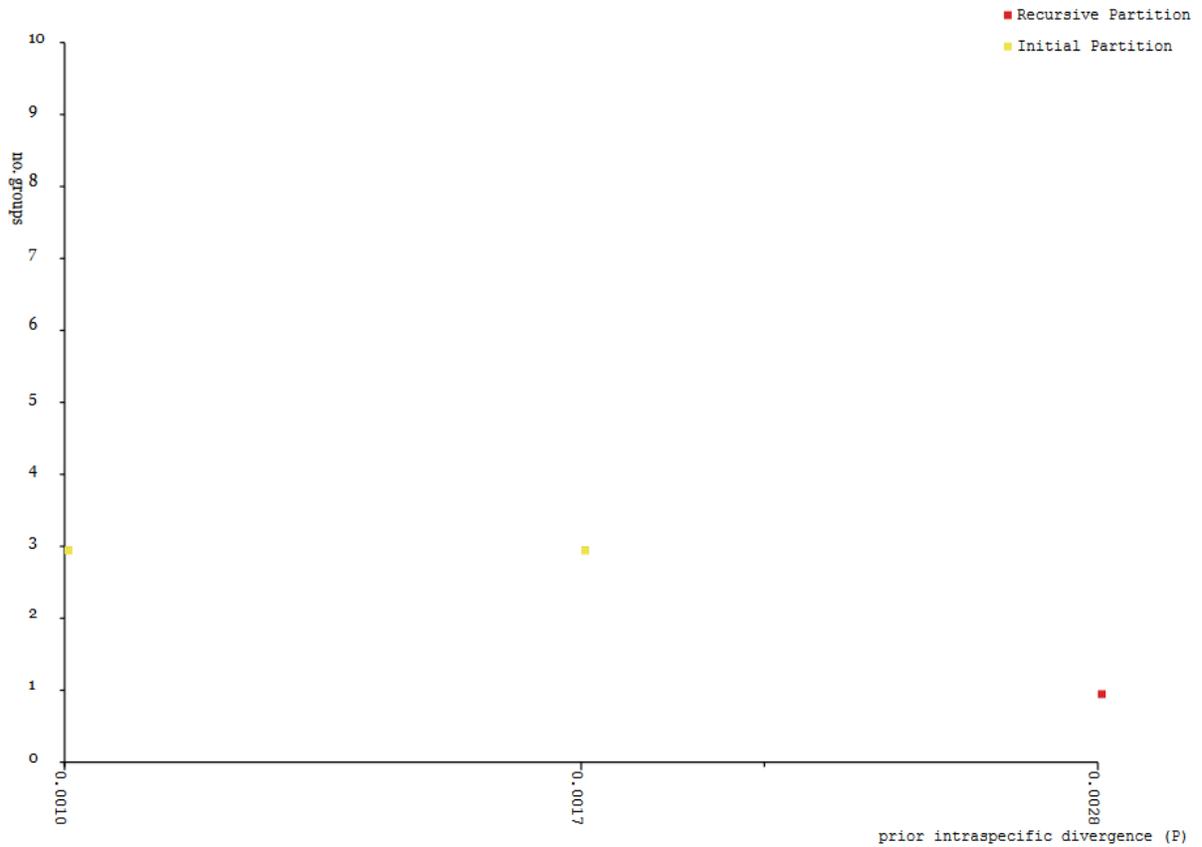
```
DL1_ITS2          CCAACTTGAGAATCGGGCGGCCAC
Mercado_Merced_ITS2 CCAACTTGAGAATCGGGCGGCCAC
SA3_ITS2          CCAACTTGAGAATCGGGCGGCCAC
Mercado_Sonora_ITS2 CCAACTTGAGAATCGGGCGGCCAC
DL3_ITS2          CCAACTTGAGAATCGGGCGGCCAC
DL2_ITS2          CCAACTTGAGAATCGGGCGGCCAC
SA2_ITS2          CCAACTTGAGAATCGGGCGGCCAC
*****
```

Anexo 3. Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) *matK*



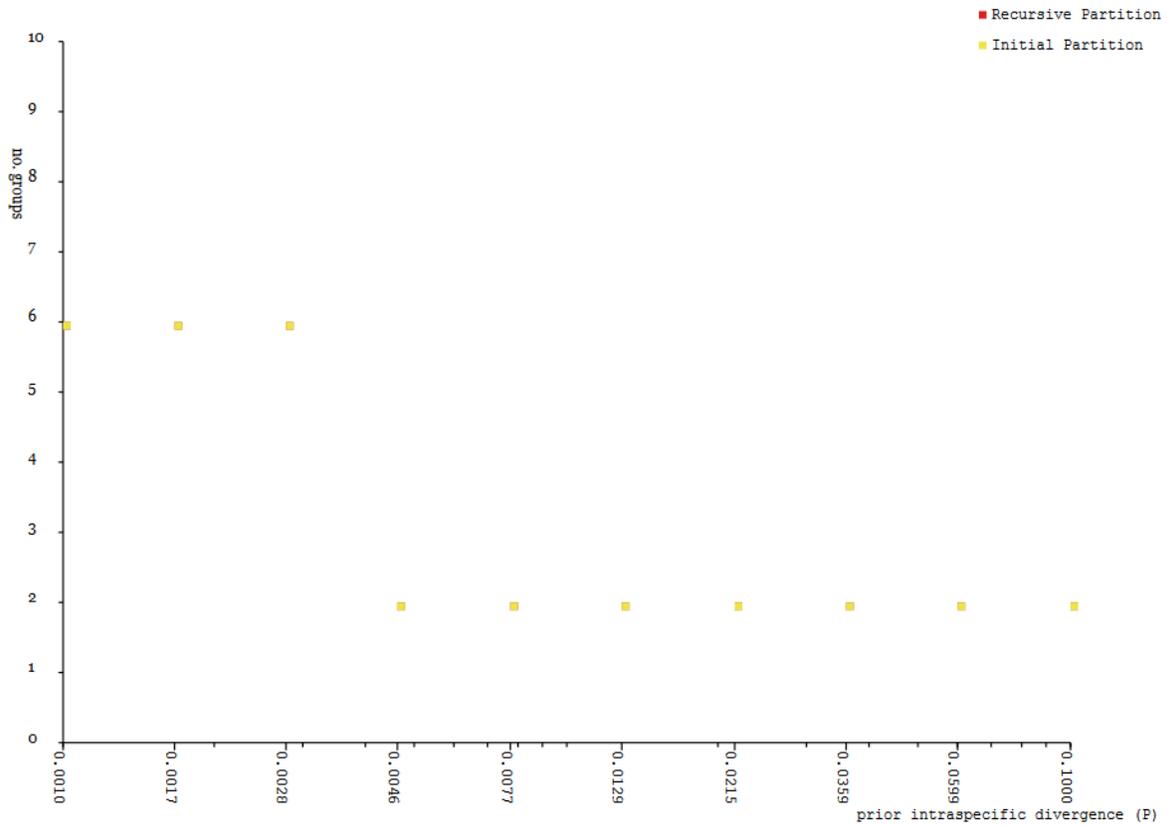
Anexo 3. Partición obtenida por Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) para los datos del marcador *matK*. Se presenta el número de grupos reconocidos dentro de las particiones (primarias y recursivas) en función del límite previo entre la divergencia intraespecies e interespecies. Jukes Cantor distance.

Anexo 4. Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) *rbcL*



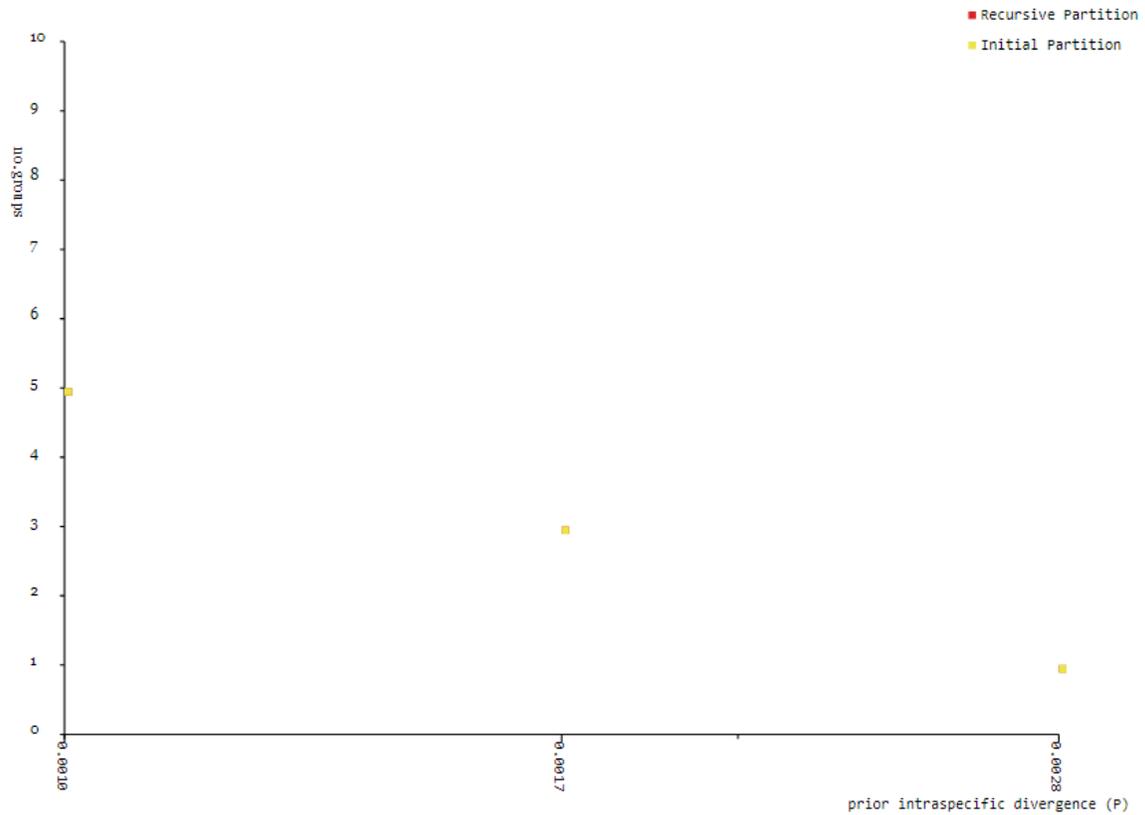
Anexo 4. Partición obtenida por Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) para los datos del marcador *rbcL*. Se presenta el número de grupos reconocidos dentro de las particiones (primarias y recursivas) en función del límite previo entre la divergencia intraespecies e interespecies. Jukes Cantor distance.

Anexo 5. Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) *trnH-psbA*



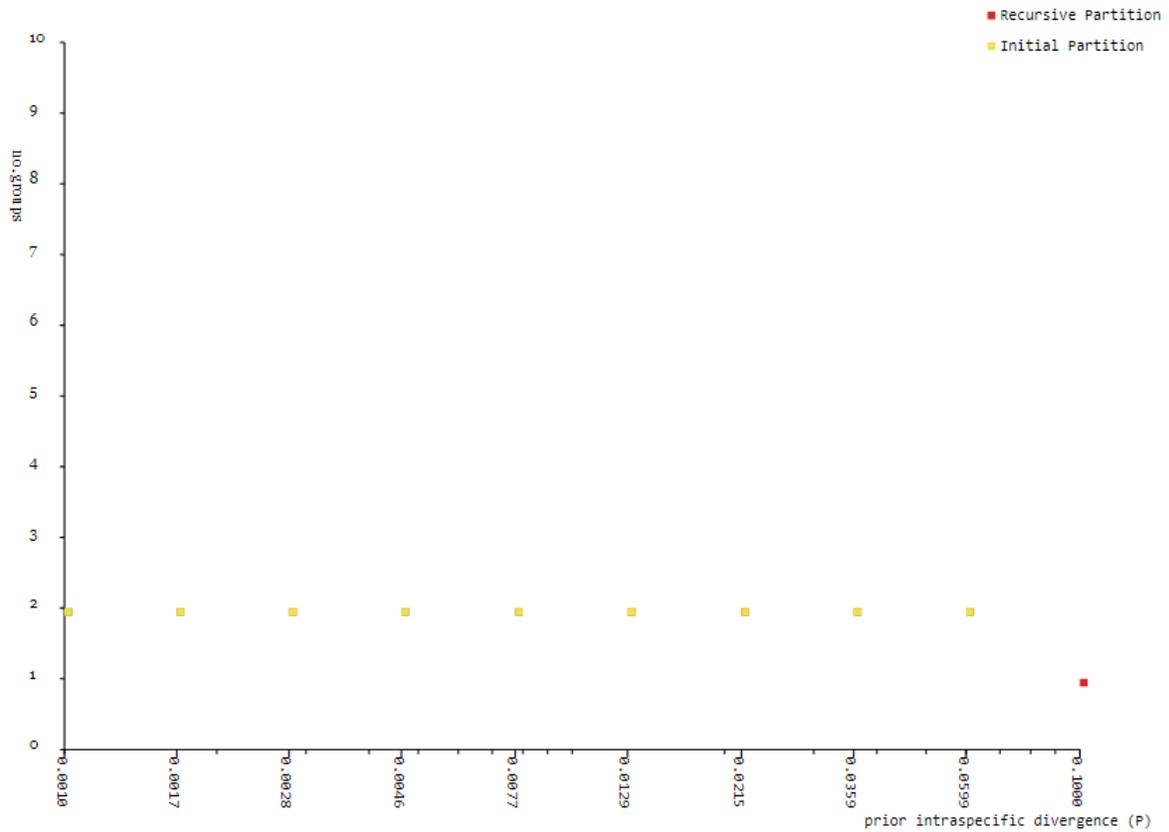
Anexo 5. Partición obtenida por Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) para los datos del marcador *trnH-psbA*. Se presenta el número de grupos reconocidos dentro de las particiones (primarias y recursivas) en función del límite previo entre la divergencia intraespecies e interespecies. Jukes Cantor distance.

Anexo 6. Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) *rpL32-trnL*



Anexo 6. Partición automática por Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) para los datos moleculares de *rpL32-trnL*. Se presenta el número de grupos dentro de las particiones (primarias y recursivas) en función del límite previo entre la divergencia intraespecies e interespecies. Jukes Cantor distance.

Anexo 7. Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) *ITS2*



Anexo 7. Partición obtenida por Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) para los datos del marcador *ITS2*. Se presenta el número de grupos reconocidos dentro de las particiones (primarias y recursivas) en función del límite previo entre la divergencia intraespecies e interespecies. Jukes Cantor distance.