



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES SILVESTRES DE *Bacopa monnieri* (L.)
WETTSTEIN EN MÉXICO POR MARCADORES MORFOLÓGICOS,
MOLECULARES Y LA DETECCIÓN DE COMPUESTOS FITOQUÍMICOS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

ANA PATRICIA REYES CORREA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARTHA MARTÍNEZ GARCÍA



LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO
2019



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.

AGRADECIMIENTOS

A Ma. De los Ángeles Correa García y Marco Antonio Reyes Vázquez, todos los valores y enseñanzas inculcados en mí se han materializado en este proyecto al cual los tres le hemos puesto mucha dedicación y esfuerzo. Este logro es suyo, y no tengo manera de agradecer todo lo que han sacrificado por nuestra familia. Felicidades a ustedes también.

A mi familia, los Reyes Correa. Todos ustedes son parte de este pequeño logro, por creer en mí, cuidarme y guiarme durante toda mi vida. Mónica, Óscar, Karina, Roxana y a mis sobrinos, a todos.

A mi asesora, la Dra. Martha Martínez García, por haberme recibido en un momento donde estaba muy dispersa y calmar inquietudes. Por alentarme siempre a adquirir muchas más habilidades, capacidades, por fomentar la creatividad científica y plantear nuevas preguntas de investigación, por los consejos, anécdotas, y por brindarme su confianza y amistad.

A mis constantes asesores: Dr. Víctor Manuel Salazar Rojas, Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras y al M. en C. Alejandro Cruz Monsalvo Reyes por tener siempre la disposición en resolver todas mis preguntas y auxiliarme durante el desarrollo experimental, gracias por su enorme paciencia y por compartir sus conocimientos.

A todos los involucrados para que este proyecto fuese posible, la Dra. María Margarita Canales Martínez y al laboratorio de Farmacognosia por su paciencia, dedicación y la disposición para colaborar y orientar siempre que era necesario, así como a la M. en C. Josefina Vázquez Medrano y al M. en C. Rafael Emiliano Quintanar Zúñiga por la disposición y la amabilidad; al M. en C. Luis Barbo Hernández Portilla por siempre tener disposición y paciencia para aclarar todas las dudas. A la M. en C. Gloria Garduño Solórzano por la confianza y la atenta colaboración durante todo el proyecto.

A mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica Molecular, que sin duda han hecho todo mucho más llevadero y agradable.

A mis mejores amigos Edna y Xavier. Por estar siempre. Ustedes saben qué lugar ocupan en mí.

A Alonso, por ser portavoz de la conciencia y la razón cada vez que es necesario, por apoyarme en todo sin titubear y por construir esto juntos.

Y por supuesto, agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México, por proveerme de herramientas para mi realización profesional y académica, siempre mi segunda casa.

*Bendita seas tú, áspera materia, gleba estéril, dura roca
tú que no cedés más que a la violencia
y nos obligas a trabajar si queremos comer.*

*Bendita seas, peligrosa materia, mar violenta
indomable pasión,
tú que nos devoras si no te encadenamos.*

*Benditas seas, poderosa materia,
evolución irresistible, realidad siempre naciente,
tú que haces estallar en cada momento nuestros esquemas
y nos obligas a buscar cada vez más lejos la verdad...*

HIMNO A LA MATERIA.
PIERRE TEILHARD DE CHARDIN.

Al hogar que siempre llevo conmigo, como caracol.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.	11
MARCO TEÓRICO.	12
MARCADORES GENÉTICOS PARA EL ANÁLISIS DE ESPECIES VEGETALES.	12
CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS, HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN DE <i>B. MONNIERI</i> .	15
CARACTERÍSTICAS FITOQUÍMICAS Y USO DE <i>B. MONNIERI</i> COMO PLANTA MEDICINAL EN EL SISTEMA MÉDICO TRADICIONAL AYURVEDA.	17
<i>BACOPA MONNIERI</i> (L.) WETTSTEIN EN EL CONTEXTO DE MÉXICO.	20
ANTECEDENTES.	22
OBJETIVOS.	25
GENERAL.	25
PARTICULARES.	25
MATERIAL Y MÉTODOS.	26
SITIOS DE ESTUDIO.	26
COLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO.	27
IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS.	28
ANÁLISIS DE CARACTERES VEGETATIVOS Y REPRODUCTIVOS.	30
DETECCIÓN DE COMPUESTOS FITOQUÍMICOS.	31
RESULTADOS.	33
IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS.	33
ANÁLISIS DE CARACTERES VEGETATIVOS Y REPRODUCTIVOS.	42
DETECCIÓN DE COMPUESTOS FITOQUÍMICOS.	46

DISCUSIÓN	53
IDENTIFICACIÓN, PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA SECUNDARIA Y ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS.	53
VARIACIÓN EN CARACTERES VEGETATIVOS Y REPRODUCTIVOS INTRA Y ENTRE POBLACIONES DE <i>B. MONNIERI</i> DE ESTE ESTUDIO.	55
DETECCIÓN DE BACÓSIDO A EN POBLACIONES SILVESTRES DE <i>B. MONNIERI</i> DENTRO DE ESTE ESTUDIO.	57
CONCLUSIONES.	61
BIBLIOGRAFÍA.	62
ANEXOS.	68
1. IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE <i>B. MONNIERI</i> .	68
1.1. MATRIZ DE DATOS DE CBCs.	68
2. MARCADORES MORFOLÓGICOS Y ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (APC).	69
2.1. OBSERVACIONES DE LOS 17 CARACTERES MORFOLÓGICOS EVALUADOS POR POBLACIÓN.	69
2.2. VECTORES <i>EIGEN</i> Y COMPONENTES PRINCIPALES.	71
3. DETECCIÓN DE COMPUESTOS FITOQUÍMICOS POR HPLC Y TAMIZAJE FITOQUÍMICO.	72
3.1. TÉCNICAS CUALITATIVAS DE TAMIZAJE FITOQUÍMICO.	72

ÍNDICE DE FIGURAS.

FIG. 1 y 2. <i>BACOPA MONNIERI</i>. FLORES Y ÓRGANOS VEGETATIVOS AÉREOS DE INDIVIDUOS DE <i>B. MONNIERI</i> DE LA POBLACIONES DE ESTUDIO EL GÉISER, TECOZAUTLA, HIDALGO (DER.) Y LOS REYES METZONTLA, ZAPOTITLÁN, PUEBLA (IZQ.).....	16
FIG. 3. DISTRIBUCIÓN ACTUAL E HISTÓRICA DE <i>B. MONNIERI</i>. DISTRIBUCIÓN ACTUAL E HISTÓRICA MUNDIAL DE <i>B. MONNIERI</i> , LA INTENSIDAD DE COLOR DE CADA UNO DE LOS PUNTOS REPRESENTA LAS OCURRENCIAS REGISTRADAS DE CADA REGIÓN, LOS PUNTOS EN COLOR MORADO SEÑALAN MENOR NÚMERO DE OCURRENCIAS MIENTRAS QUE EL COLOR NARANJA, MAYOR. MAPAS GENERADOS A PARTIR DE LA BASE DE DATOS DE GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY (2018).	17
FIG. 4. ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE BACÓSIDO A (IZQ.) Y BACÓSIDO B (DER.). DE ACUERDO A DEEPAK Y AMIT (2004), EL BACÓSIDO B ES SEMEJANTE EN ESTRUCTURA AL BACÓSIDO A PERO EN POSICIÓN DEXTRÓGIRA.	19
FIG. 5. DISTRIBUCIÓN HISTÓRICA Y ACTUAL DE <i>B. MONNIERI</i> EN LA REPÚBLICA MEXICANA. MAPA GENERADO A PARTIR DE LA BASE DE DATOS DE GBIF (2018); ALGUNAS OCURRENCIAS EN CIERTOS ESTADOS DE LA REPÚBLICA ANTERIORMENTE MENCIONADOS NO SE ENCUENTRAN EN EL PRESENTE MAPA YA QUE NO SE ENCONTRABAN COORDENADAS GEOGRÁFICAS EN DICHA BASE DE DATOS. (DATOS PROPIOS).	20
FIG. 6. ILUSTRACIÓN DE <i>B. MONNIERI</i> Y RASGOS MORFOLÓGICOS EVALUADOS EN ESTE ESTUDIO. LAS INICIALES ENTRE PARENTESIS INDICAN EL CÓDIGO USADO PARA IDENTIFICAR CADA RASGO.	31
FIG. 7. MODELO DE ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL ITS2 DE INDIVIDUOS DE <i>B. MONNIERI</i>. MODELO GENERAL DE ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL ITS2 Y CONSERVACIÓN DE MOTIVOS EN CONTRASTE CON EL CONSENSO, DONDE LAS ÁREAS VERDES INDICAN LO MÁS CONSERVADO Y LAS ÁREAS ROJAS LO MENOS CONSERVADO.....	36
FIG. 8. MODELO DE ESTRUCTURA SECUNDARIA – HÉLICE III. A) MODELO DE ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL ITS2, EN DONDE SE SEÑALAN LAS POSICIONES DONDE SE ENCONTRARON CAMBIOS DE UNA SOLA BASE. B) ESQUEMA DE CAMBIOS DE BASE PARA CADA UNA DE LAS ACCESIONES HALLADO EN EL ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS PROBLEMA Y LA SECUENCIA CONSENSO DE <i>B. MONNIERI</i> . EL GUIÓN (-) REPRESENTA LOS GAPS EN LA PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA.....	37
FIG. 9. MODELO DE ESTRUCTURA SECUNDARIA – HÉLICE IV. A) Y B) MODELO DE ESTRUCTURA SECUNDARIA, SE SEÑALAN LAS POSICIONES DONDE SE ENCONTRARON CAMBIOS RESPECTO AL CONSENSO. C) ESQUEMA DE CAMBIOS DE UNA SOLA BASE PARA CADA UNA DE LAS ACCESIONES HALLADO EN EL ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS PROBLEMA Y LA SECUENCIA CONSENSO DE <i>B. MONNIERI</i> . EL GUIÓN (-) REPRESENTA LOS GAPS EN LA PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA.	38
FIG. 10. MODELO DE ESTRUCTURA SECUNDARIA – REGIONES NO HELICOIDALES. A) MODELO DE ESTRUCTURA SECUNDARIA, SE SEÑALAN LAS POSICIONES DONDE SE ENCONTRARON CAMBIOS RESPECTO AL CONSENSO. B) ESQUEMA DE CAMBIOS DE UNA SOLA BASE PARA CADA UNA DE LAS ACCESIONES HALLADO EN EL ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS PROBLEMA Y LA SECUENCIA CONSENSO DE <i>B. MONNIERI</i> . EL GUIÓN (-) REPRESENTA LOS GAPS EN LA PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA.	39
	40
FIG. 11 y 12. COMPARACIÓN DE ÁRBOLES FILOGENÉTICOS POR MP EN SECUENCIA PRIMARIA Y ESTRUCTURA SECUNDARIA DE ITS2 DE LA TRIBU GRATIOLAE. A) ÁRBOL FILOGENÉTICO INFERIDO A PARTIR DEL MODELO GENERAL DE SUSTITUCIÓN GTR PARA LA SECUENCIAS PRIMARIAS Y B) ÁRBOL FILOGENÉTICO INFERIDO A PARTIR DEL MODELO GENERAL DE SUSTITUCIÓN GTR	

PARA LA ESTRUCTURA SECUNDARIA. GRUPOS EXTERNOS BASADOS EN LO PROPUESTO POR OLMSTEAD Y COLABORADORES (2001).	40
FIG. 13. GRÁFICO DE DISPERSIÓN GENERADO A PARTIR DEL ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (ACP) DE INDIVIDUOS DE LAS POBLACIONES DE ESTUDIO DE <i>B. MONNIERI</i>. J = JALISCO, M = MICHOACÁN, H = HIDALGO, P = PUEBLA; CADA PUNTO REPRESENTA UNA OBSERVACIÓN (INDIVIDUO) DE LA POBLACIÓN DE PROCEDENCIA. EL GRÁFICO ESTÁ PRESENTADO EN TRES DIMENSIONES POR LA SELECCIÓN DE TRES COMPONENTES. LOS PUNTOS ROJOS SÓLIDOS SEÑALAN ALGUNAS OBSERVACIONES DE PUEBLA QUE SE ENCUENTRAN FUERA DEL GRUPO SEÑALADO EN COLOR MORADO.	44
FIG. 14. CROMATOGRAMA DE MIX DE BACÓSIDO A (ESTÁNDAR) – BACÓSIDO A3, BACOPÁSIDO II, BACOPÁSIDO X Y BACOPASAPONINCA C – POR HPLC.	50
FIG. 15 – 18. CROMATOGRAMAS DE LOS EXTRACTOS CRUDOS METANÓLICOS DE <i>B. MONNIERI</i>. 1. <i>B. MONNIERI</i> HIDALGO – DETECCIÓN DE BACOPÁSIDO II Y BACOPÁSIDO X; 2. <i>B. MONNIERI</i> JALISCO – DETECCIÓN DE BACOPÁSIDO II Y BACOPÁSIDO X; 3. <i>B. MONNIERI</i> MICHOACÁN – DETECCIÓN DE BACOPÁSIDO II Y BACOPÁSIDO X; 4. <i>BACOPA MONNIERI</i> PUEBLA – DETECCIÓN DE BACÓSIDO A3, BACOPÁSIDO II Y BACOPÁSIDO X.	51

ÍNDICE DE CUADROS.

CUADRO 1. INFORMACIÓN GEOGRÁFICA RECABADA A PARTIR DE LAS COLECTAS REALIZADAS EN LOS SITIOS SELECCIONADOS.	33
CUADRO 2. IDENTIDAD POR MARCADORES MOLECULARES (<i>MATK</i> , <i>RBCL</i> E <i>ITS2</i>) DE LOS EJEMPLARES COLECTADOS DE ESTE ESTUDIO.	34
CUADRO 3. MEDIA, RANGOS MÁXIMOS Y MÍNIMOS DE 17 CARACTERES VEGETATIVOS Y REPRODUCTIVOS DE LAS POBLACIONES DE ESTUDIO DE <i>B. MONNIERI</i>	42
CUADRO 4. MEDIAS Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR (DE) DE CADA RASGO MORFOLÓGICO EVALUADO EN ESTE ESTUDIO.	43
CUADRO 4. TAMIZAJE FITOQUÍMICO PARA DETECCIÓN DE FLAVONOIDES, FENOLES, ALCALOIDES Y SAPONINAS.	46
CUADRO 5. CUANTIFICACIÓN DE COMPONENTES DE BACÓSIDO A DEL ESTÁNDAR (SIGMA-ALDRICH®) – BACÓSIDO A3, BACOPÁSIDO II, BACOPÁSIDO X, BACOPASAPONINA C.	47
CUADRO 6. CUANTIFICACIÓN DE BACÓSIDOS DETECTADOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE LAS POBLACIONES DE ESTUDIO DE <i>B.</i> <i>MONNIERI</i> (HIDALGO, JALISCO Y MICHOACÁN).	48
CUADRO 7. CUANTIFICACIÓN DE BACÓSIDOS DETECTADOS EN EXTRACTO METANÓLICO DE <i>B. MONNIERI</i> PROCEDENTE DE PUEBLA.50	
CUADRO 8. CUANTIFICACIÓN DE BACÓSIDOS DETECTADOS Y PORCENTAJE TOTAL RESPECTO AL PESO SECO (PS) EN LAS POBLACIONES DE ESTUDIO.	52

Resumen.

Bacopa monnieri es una planta a la cual se le atribuyen propiedades medicinales y es utilizada en el Sistema Médico Ayurveda. Es utilizada en tratamientos contra desórdenes mentales como Alzheimer, demencia, epilepsia y otras enfermedades relacionadas al sistema nervioso central (SNC), al sistema respiratorio y digestivo. Estas propiedades son atribuidas a la actividad biológica de compuestos fitoquímicos denominados *Bacósidos*, una familia de glucósidos triterpenoides de los cuales el bacósido A y bacósido B son considerados las entidades químicas responsables de los efectos nootrópicos, ansiolíticos y antioxidantes. Esta planta está descrita como una herbácea perenne suculenta de hábitos procumbentes, hojas sésiles oblanceoladas y corola de 5 sépalos casi actinomorfa, las flores pueden ser color lila, morado o blanco. (Calderón y Rzedowski, 2005; Russo y Borelli, 2005). En este trabajo se caracterizaron cuatro poblaciones silvestres que se distribuyen en cuatro estados de la República Mexicana –Hidalgo, Jalisco, Puebla y Michoacán– a través de marcadores moleculares utilizados en el *barcoding* de plantas medicinales (*rbcL*, *matK*, e ITS2), marcadores morfológicos y la detección de compuestos fitoquímicos propios de la especie *B. monnieri* (bacósido A). Se identificaron ejemplares de todas las poblaciones, además fue posible hacer un análisis más extenso de la estructura secundaria del ITS2 que logra distinguir por cada lugar de procedencia, además el análisis de rasgos morfológicos (tanto vegetativos como reproductivos) a través de un Análisis de Componentes Principales revela la existencia de dos grupos separados principalmente por el tamaño de dichos rasgos morfológicos, siendo los individuos colectados en Puebla los que presentaron mayor tamaño en rasgos vegetativos y reproductivos respecto al resto de las poblaciones evaluadas, ya que Hidalgo, Jalisco y Michoacán presentaron rasgos vegetativos y reproductivos más pequeños, observando una posible relación por las ecorregiones donde se encuentran distribuidas. Por último, la detección del bacósido A fue exitosa en todos los extractos crudos elaborados, sin embargo, solamente se detectó y cuantificó el componente bacósido A₃ en el extracto crudo elaborado a partir de ejemplares de *B. monnieri* de Puebla.

Palabras clave: Bacósido A, *barcoding*, ITS2, *B. monnieri*.

Marco teórico.

Marcadores genéticos para el análisis de especies vegetales.

Durante el final del siglo XX surge el concepto de marcador genético, el cual se define como cualquier rasgo que represente una diferencia genética entre individuos o especies, aunque no representan a genes diana por sí mismos, sino como rasgos o caracteres "bandera". Existen tres tipos de marcadores genéticos: los marcadores bioquímicos, marcadores morfológicos y marcadores moleculares. Los marcadores morfológicos (o fenotipo) son detectados visualmente (ej.: características como color de la flor, forma de las semillas, hábitos de crecimiento, pigmentación, etc.), los marcadores bioquímicos (o isoenzimas) son variantes alélicas de enzimas en donde se busca detectar la diversidad y el nivel funcional del gen evaluado y por último, los marcadores moleculares en los cuales se realiza una búsqueda de cambios que puede haber en secuencias diana, ya sea de genes o de secuencias no codificantes (Winter y Kahl, 1995; Hayward y colaboradores, 2015; Kordrostami y Rahimi, 2015).

Dentro de la evaluación de los marcadores genéticos, los marcadores morfológicos y bioquímicos presentan algunas desventajas ya que son limitados en número y siempre están bajo influencia de factores ambientales e incluso estrechamente vinculados a la etapa de crecimiento y desarrollo del organismo, aunque no dejan de ser informativos en la caracterización de las especies, mientras que los marcadores moleculares (más utilizados en la actualidad) casi ilimitados e incluso los factores ambientales y la etapa de desarrollo del espécimen no son necesariamente determinantes para el análisis de los mismos (Jones, Ougham y Thomas, 1997).

Para poner en contexto, un marcador molecular es un fragmento de ADN que está asociado a cierta localización dentro del genoma, y algunos de estos fragmentos se utilizan y se aplican de manera específica como en el diagnóstico de desórdenes genéticos, afinidad taxonómica (filogenética) así como identificación de especies, este último denominado *DNA Barcoding* (código de barras de ADN) (Doveri, Maheswaran y Powell, 2008).

El código de barras tiene como objetivo ayudar a la identificación taxonómica de un espécimen dado, a través de la selección de una secuencia corta de ADN – el código de barras – proveniente de un fragmento estandarizado del genoma (ya sea de una región o gen específico); dicha región corta del genoma es ubicua en los linajes y posee suficiente variación a nivel de secuencia para discriminar entre las especies. El código de barras se genera a partir de una secuencia de ADN proveniente de una región estándar tomada de un fragmento de tejido del organismo desconocido, posteriormente la secuencia “muestra” es comparada con bases de datos de secuencias de referencia de individuos de identidad conocida (Hajibabaei y colaboradores, 2007).

De tal manera que el ejemplar es identificado si la secuencia coincide con alguna de la base de datos de referencia. Si no, el nuevo registro podría conducir a una nueva secuencia de código de barras de una especie dada (por ejemplo: un nuevo haplotipo o variante geográfica) o incluso puede sugerir la existencia de una nueva especie. Idealmente, un código de barras debería permitir la identificación inequívoca de especies al tener una variación a nivel secuencia suficiente y una baja variación infraespecífica. La aplicación universal incluye la amplificación por PCR punto final y secuenciación de los fragmentos obtenidos (Kress y Erickson, 2007; Hajibabaei y colaboradores, 2007).

La premisa del Barcode of Life Systems es que solamente a través de una región estándar del genoma se pueda identificar a cualquier organismo de la escala filogenética, sin embargo, en la actualidad el término “barcoding” (código de barras, por su traducción al español) se refiere a un sistema que puede ser construido de un locus o varios loci en conjunto como una unidad complementaria. Particularmente, en plantas es el Plant Working Group del CBOL (Consortium for the Barcode of Life), el que ha propuesto diferentes loci, incluyendo genes codificantes y regiones espaciadoras no codificantes en el genoma de plástidos y núcleo: *psbA-trnH*, ITS, *rbcL*, *matK* e ITS2. Estos últimos tres han sido tendencia para la identificación de especies vegetales (Kress y Erickson, 2007; CBOL Plant Working Group, 2009; Yao y colaboradores, 2010).

En concreto, el locus ITS es un cistrón nuclear ribosomal del ADN que juega un papel muy importante en la síntesis de ribosomas, su principal función es posicionar las subunidades

del rRNA y dirigir su separación del transcrito primario. El cistrón consiste en dos espaciadores de secuencias hipervariables (ITS1 e ITS2) y la región conservada 5.8S. El análisis de este locus ha permitido desarrollar comparaciones evolutivas, construir filogenias y evaluar especies con potencial de entrecruzamiento de diferentes especies, pero especialmente el análisis de la estructura secundaria del ITS2 puede ser muy informativa ya que en algunos taxa distingue individuos de regiones geográficamente distantes, aunque el estudio de estructuras secundarias del ITS (especialmente el ITS2) es relativamente escaso en angiospermas. (Goertzen y colaboradores, 2003; Coleman, 2007; Zhang, 2017).

Así mismo, el gen *rbcL* codifica para la subunidad grande de la enzima ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa oxidasa (RuBisCO), enzima responsable de fijar el CO₂ a carbono orgánico por medio del Ciclo de Calvin y que está presente en la mayoría de los organismos fotosintéticos (como plantas, proteobacterias, cianobacterias y algas). También el gen *matK* se encuentra en la mayoría de las angiospermas y se localiza dentro del intrón *trnK*; funcionalmente está relacionado con los intrones de *splicing* grupo II codificando para tRNALys. Investigación reciente sugiere y hace especial énfasis en la aplicación de técnicas de código de barras basada en la combinación de marcadores moleculares para plantas (Hilu y colaboradores, 2003; Krishnamurthy y Francis, 2012; Mondal, Shit y Kundu, 2013).

No obstante, aunque el código de barras es una importante ayuda en la identificación de especímenes a nivel específico, no es un reemplazo para el análisis taxonómico integral. Por ejemplo, cuando un espécimen desconocido no coincide con ninguno de los registros de bases de datos de secuencias de referencia de código de barras, no califica directamente como una nueva especie, sino que estos especímenes son procesados a través de análisis taxonómicos. De esta forma, en el contexto del proceso de análisis taxonómico integral y tradicional –que usualmente toma mucho más tiempo comparado con el análisis de código de barras– los organismos desconocidos guardan un gran potencial como registro de una nueva especie (Hajibabaei y colaboradores, 2007).

Desde la implementación del *barcoding* en 1998, las técnicas de secuenciación de ADN e identificación por código de barras han sido más sencillas y menos costosas, hasta 2016 el Grupo de Filogenia de Angiospermas (APG, por sus siglas en inglés *Angiosperm Phylogeny*

Group) reconoce 416 familias y alrededor de 390 mil especies de plantas con flor. Aunque muchas de las relaciones entre familias de plantas basadas en datos morfológicos fueron confirmadas por análisis de ADN, el uso de datos moleculares también ha conducido a un avance progresivo en el entendimiento de relaciones evolutivas en casi todos los grupos de plantas vasculares e incluso en especies vegetales extintas (Kress y Erickson, 2007; Chase y colaboradores, 2016).

En general, el *barcoding* representa una importante técnica para la correcta y rápida identificación de especies vegetales, y en lo particular, ha sido una herramienta sumamente útil en la identificación precisa y asequible de especies de plantas medicinales. Y es que, los medicamentos herbales y los remedios a base de dichas plantas son parte de complejos sistemas médicos tradicionales, tales como el Sistema Médico Tradicional Chino o el Sistema Médico Ayurveda (originario de India) por mencionar algunos. Estos medicamentos siguen siendo utilizados por gran parte de la población mundial como primera opción en el tratamiento de enfermedades. A gran escala, esto representa un reto para los gobiernos de dichos países, ya que estos medicamentos deben ser propiamente regulados por instituciones que aseguren la calidad de estos productos y que su procedencia sea de la planta medicinal correspondiente y no sean medicamentos adulterados con otras especies que puedan poner en riesgo la salud de la población, o simplemente que los efectos esperados de estos medicamentos herbales no sean los deseados por los consumidores. Solamente con la identificación precisa de las especies empleadas para la elaboración de remedios y medicamentos herbales, se asegura de que se consumen productos de procedencia legítima (World Health Organization, 2014; Bodeker y colaboradores, 2015; State of the World Plants KEW, 2017).

Características botánicas, hábitat y distribución de *B. monnieri*.

Bacopa monnieri se caracteriza por ser una planta herbácea perenne glabra de hábitos procumbentes, hojas sésiles oblanceoladas y con succulencia de color verde claro con margen entero uninervadas y pueden medir entre 0.5 a 2.5 cm de largo y están dispuestas en pares opuestos en el nudo. Puede florecer en primavera y otoño, aunque la fenología no es del todo

clara, ya que puede dar flores y frutos en cualquier época del año. Las flores poseen una corola de casi simetría radial de 8 a 10 mm de largo, con un lóbulo externo ligeramente más largo que el resto de los lóbulos. La corola puede ser color blanco, lila, lavanda pálido o morado. La morfología de esta especie puede ser observada en las figuras 1 y 2. (Barrett y Strother, 1978; Rzedowski y Calderón, 2005; Sosa, Moroni y O'Leary, 2018).

Esta planta está descrita como hidrófita libremente flotadora (hlf) o como hidrófita enraizada emergente (hee), ambas formas de vida son determinadas de acuerdo con el descriptor de la especie y por sus características; la diferencia en la descripción de ambas formas de vida radica en el establecimiento del sistema radicular de los individuos, mientras que las hidrófitas libremente flotadoras se establecen en las partes con profundidad de hasta 5 m dentro del cuerpo de agua, las hidrófitas enraizadas emergentes se asientan preferentemente en los bordes del cuerpo de agua los cuales alcanzan poca profundidad. Esta especie está asociada a bosques tropicales caducifolios, bosques tropicales perennifolios, humedales y pastizales, y se desarrolla en temperaturas de templadas a cálido-húmedas, entre los 18° a 25° C e incluso superiores, en estos hábitats prevalece en forma de manchones pequeños y medianos y dichos manchones se presumen pueden ser individuos dispersos los cuales no ocupan grandes extensiones de territorio. No presenta asociación a un nivel de altitud específico, ya que se ha encontrado desde el nivel del mar hasta más de los 3,500 msnm (Lot y Novelo, 1988; Rojas y Novelo, 1995; Sosa, Moroni y O'Leary, 2018).



FIG. 1 Y 2. *BACOPA MONNIERI*. FLORES Y ÓRGANOS VEGETATIVOS AÉREOS DE INDIVIDUOS DE *B. MONNIERI* DE LA POBLACIONES DE ESTUDIO EL GÉISER, TECOZAUTLA, HIDALGO (DER.) Y LOS REYES METZONTLA, ZAPOTITLÁN, PUEBLA (IZQ.).

Aunque se desconoce el centro de origen de esta especie, algunos autores afirman que este podría encontrarse entre el sur de Estados Unidos a América del Sur y las Antillas, además de tener un área de distribución secundaria en los trópicos del viejo mundo. Su estatus migratorio en estas regiones se establece como nativa, aunque en las Islas Caimán está considerada como especie invasora (Villaseñor y Figueroa, 1998; Varnham, 2006; Lansdown, Knees y Patzelt, 2013).

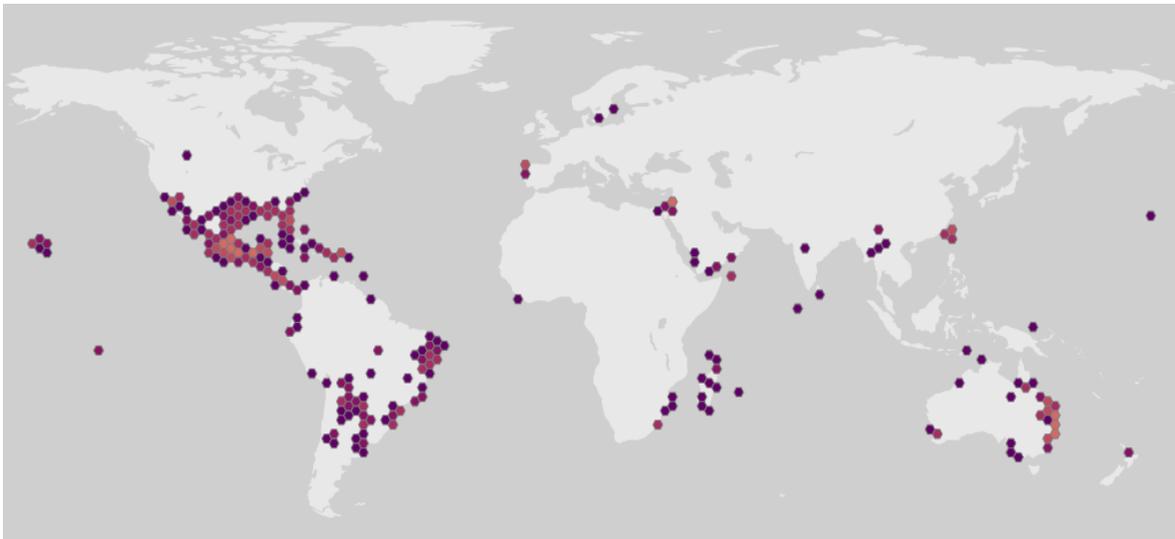


FIG. 3. DISTRIBUCIÓN ACTUAL E HISTÓRICA DE *B. MONNIERI*. DISTRIBUCIÓN ACTUAL E HISTÓRICA MUNDIAL DE *B. MONNIERI*, LA INTENSIDAD DE COLOR DE CADA UNO DE LOS PUNTOS REPRESENTA LAS OCURRENCIAS REGISTRADAS DE CADA REGIÓN, LOS PUNTOS EN COLOR MORADO SEÑALAN MENOR NÚMERO DE OCURRENCIAS MIENTRAS QUE EL COLOR NARANJA, MAYOR. MAPAS GENERADOS A PARTIR DE LA BASE DE DATOS DE GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY (2018).

Características fitoquímicas y uso de *B. monnieri* como planta medicinal en el Sistema Médico Tradicional Ayurveda.

Durante décadas *B. monnieri* ha sido utilizada como una planta medicinal en uno de los sistemas médicos tradicionales más antiguos del mundo: El Sistema Ayurveda. Es originado en la India entre 6,450 y 3,550 años antes del presente y se caracteriza por englobar aspectos de filosofía, ciencia y religión. El objetivo de Ayurveda es lograr longevidad, inteligencia, óptima fuerza física y sensorial, habilidad y mejoramiento de la memoria y el lenguaje obteniéndose a través de un régimen de vida en general, conducta social, comportamiento, dietas y el uso de remedios específicos, sin embargo en lo particular el Sistema Ayurveda compete 8 categorías específicas para padecimientos relacionados con estadios de edad u órganos en particular, una

de ellas denominada *Rasayana* se dedica al cuidado de personas de la 3era edad. En Rasayana, *B. monnieri* se ha usado de manera tradicional desde el siglo XVI, es empleada como un tónico nervioso en personas que presentan síndromes asociados al envejecimiento (y otros factores de riesgo) como lo es la demencia, la cual se caracteriza por el deterioro de la función cognitiva, es decir, la capacidad para procesar el pensamiento. La demencia afecta a la memoria, el pensamiento, la orientación, el cálculo, la capacidad de aprendizaje, el lenguaje y el juicio. (Manyam, 1999; Adams, Gmünder y Hamburger, 2007; Howes y Perry, 2011; Organización Mundial de la Salud, 2018).

El tratamiento de este padecimiento se basa en el retraso o en la lenta progresión de los síntomas asociados, y es que el uso de *B. monnieri* por parte de usuarios del Sistema Ayurveda ha sido capaz de promover la longevidad e incrementar la memoria, además de mejorar otras condiciones como ansiedad, falta de concentración, y cognición débil en pacientes que sufren de este síndrome. Es tal la trascendencia de la especie en Ayurveda y en La India que ocupa el segundo lugar en nivel de importancia y su producción asciende en las mil toneladas por año. Por tal motivo, el estudio de *B. monnieri* ha sido tendencia en décadas recientes, y se le atribuyen efectos neurofarmacológicos, nootrópicos, antidepresivos, antioxidantes, anticancerígenos y ansiolíticos, por mencionar algunos. (Manyam, 1999; Consejo Nacional de Plantas Medicinales y Departamento de Ciencia y Tecnología del Gobierno de La India, 2007; Russo y Borelli, 2005; Rajani, 2008; Rajan, Preethi y Singh, 2015).

Dichos efectos son adjudicados a diferentes compuestos fitoquímicos encontrados en extractos metanólicos y etanólicos, tales como glucósidos, alcaloides, flavonoides, cucurbitacinas, fenoles y saponinas. Las principales entidades fitoquímicas se denominan *bacósidos*, una familia de glucósidos triterpenoides semejantes al dammarano; los más estudiados y a los que se les atribuyen las propiedades antes mencionadas son el bacósido A y bacósido B (Fig. 4). El bacósido A está compuesto de bacósido A₃, bacósido II, bacósido X y bacopasaponina C, mientras que el bacósido B está conformado por bacopásido N1, bacopásido N2, bacopásido IV y bacopásido V; no es clara la función de los bacósidos en la biología de esta especie pero se postula que la biosíntesis de estos compuestos está mediado por diversos factores bióticos (herbivoría y daño por patógenos) y abióticos (cambios en

temperatura, estrés salino, estrés hídrico, etc.) (Deepak y Amit, 2004; Sivaramakrishna *et. al.*, 2005; Williams, Sorribas y Howes, 2011; Rajan, Preethi y Singh, 2015; Gupta *et. al.*, 2017).

Entre otros compuestos, se encuentran las cucurbitacinas aisladas de extractos de *B. monnieri*: bacobitacina A, B, C y D y cucurbitacina E, dichos compuestos han sido estudiados por su actividad antiinflamatoria, antioxidante, hepatoprotectora, citotóxica y recientemente se ha reportado que posee efectos inhibitorios sobre el crecimiento de líneas celulares de cáncer de colon, pulmón, pecho y de Sistema Nervioso Central. También se han aislado alcaloides específicos denominados Brahmina y Herpestina siendo los primeros compuestos caracterizados de extractos etanólicos de *B. monnieri*, aunque no es clara su función en general los alcaloides cumplen funciones dentro del desarrollo y crecimiento de la planta, defensa contra herbivoría e incluso fungen como reservorios de nitrógeno (Marcano y Hasegawa, 2001; Bhandari, *et. al.*, 2012).

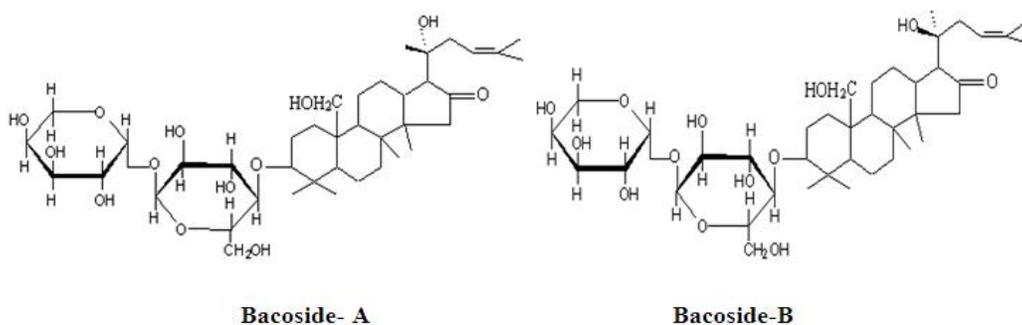


FIG. 4. ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE BACÓSIDO A (IZQ.) Y BACÓSIDO B (DER.). DE ACUERDO A DEEPAK Y AMIT (2004), EL BACÓSIDO B ES SEMEJANTE EN ESTRUCTURA AL BACÓSIDO A PERO EN POSICIÓN DEXTRÓGIRA.

Por todas las características anteriormente mencionadas, esta planta está incluida y reconocida de manera oficial en las Farmacopeas del Reino Unido, Estados Unidos y la India, así como en Atlas de Plantas Medicinales de Argentina, Sudáfrica, Jordania, Nepal, Australia, algunos países de Latinoamérica, y por supuesto del Sistema Ayurveda (Medicinal Plant Names Services, 2017).

***Bacopa monnieri* (L.) Wettstein en el contexto de México.**

La distribución histórica de *B. monnieri* data de 1848 con los primeros ejemplares colectados en el país. La distribución actual está reconocida por casi todo el país en diversos listados taxonómicos, se extiende a lo largo del país y se ha registrado en los siguientes estados de la República: Aguascalientes, Baja California, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Coahuila, Colima, Ciudad de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán y Zacatecas (Figura 5) (Villaseñor, 2016; Global Biodiversity Information Facility, 2018).

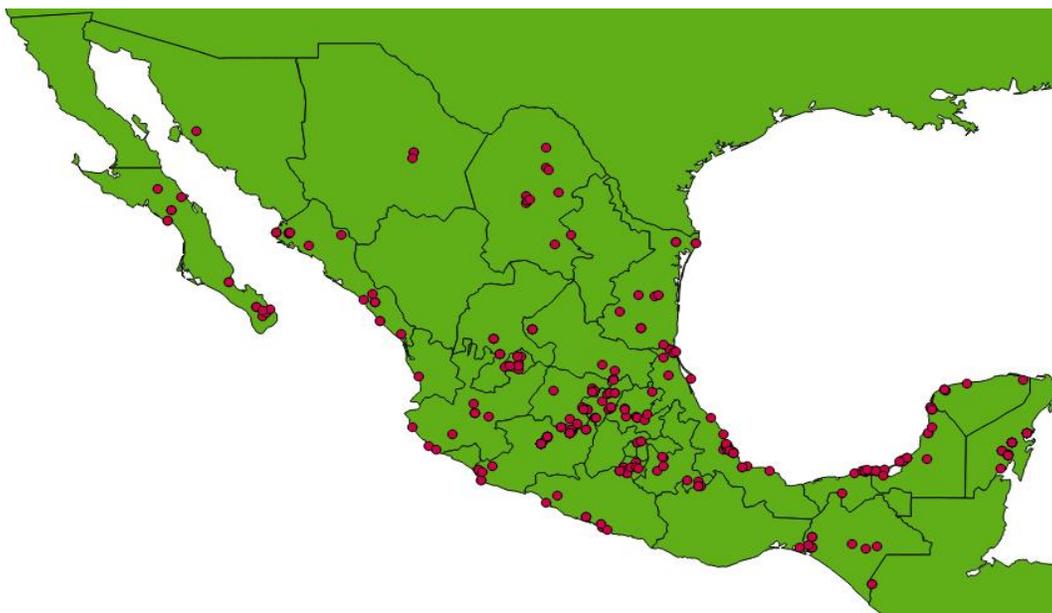


FIG. 5. DISTRIBUCIÓN HISTÓRICA Y ACTUAL DE *B. MONNIERI* EN LA REPÚBLICA MEXICANA. MAPA GENERADO A PARTIR DE LA BASE DE DATOS DE GBIF (2018); ALGUNAS OCURRENCIAS EN CIERTOS ESTADOS DE LA REPÚBLICA ANTERIORMENTE MENCIONADOS NO SE ENCUENTRAN EN EL PRESENTE MAPA YA QUE NO SE ENCONTRABAN COORDENADAS GEOGRÁFICAS EN DICHA BASE DE DATOS. (DATOS PROPIOS).

Aunque ha sido bien documentada la distribución histórica de *B. monnieri* en el territorio nacional, no hay información disponible sobre el uso y consumo de la especie. Datos y documentos consultados como el Herbario de Instituto Mexicano del Seguro Social, la Farmacopea Mexicana y la Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana no poseen información sobre la utilización de este recurso, donde a diferencia de otros países, ha adquirido importancia por las propiedades fitoquímicas y su uso en el Sistema Médico

Ayurveda. Existe registro de uso en la Medicina Tradicional Mexicana de la especie *Bacopa procumbens* (Miller) Greenm (la especie está señalada como una sinonimia de otra especie de la familia Plantaginaceae: *Mecardonia procumbens* Ruiz & Pavón) en la región sureste del país, la cual se utiliza para tratar anemia, fatiga muscular, desórdenes biliares y en otros casos es empleada como antiséptico, no obstante no existen estudios químicos o farmacológicos que convaliden sus usos medicinales tradicionales (Del Amo, 1979; Duke, 2008; Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2018; Trópicos, 2018).

De la misma manera, *B. monnieri* ha sido reportada como una especie arvense, es decir puede limitar el desarrollo de algunos cultivos temporales (por ejemplo, el maíz) ya que compiten por agua, luz y nutrientes. Como se menciona anteriormente, en algunos países son consideradas como malezas perjudiciales y registradas con algún grado de nocividad. Sin embargo, esto hace alusión a estudios realizados en la última década del siglo XX y no existen registros o documentos que avalen a *B. monnieri* como una especie de utilidad en la actualidad (Holm, 1979; Sánchez-Blanco y Guevara-Féfer, 2013).

Es por ello que en el presente trabajo pretende aportar conocimiento actual respecto a las características de interés de la especie a través del estudio de marcadores moleculares, tales como secuencia y estructura secundaria del espaciador intergénico ITS2, estudio de marcadores morfológicos, como son los órganos vegetativos y reproductivos y la información que pudiesen aportar a la identificación y mejor entendimiento de las condiciones fisiológicas, así como el estudio de características fitoquímicas, las cuales implican la detección y determinación de compuestos principales como los bacósidos para su uso en la biotecnología y biomedicina.

Antecedentes.

Barcoding en plantas medicinales. A partir de la introducción del *Barcoding* en el 2003, existen un sinnúmero de estudios relacionados la selección de secuencias adecuadas para la identificación de especies, en particular en especies de plantas medicinales existen los siguientes antecedentes:

El Plant Working Group del Consortium for the Barcode of Life (CBOL) (2009) compararon siete candidatos para marcadores (*matK*, *rbcl*, *rpoC1*, *ropB*, *psbA-trnH*, *psbK-psbK*, y *atpF-atpH*) en 907 muestras representando 550 especies y sugieren el uso de *matK* y *rbcl* como los marcadores estándar para el desarrollo del código de barras para plantas. Así mismo el grupo apoya el uso de las regiones ITS/ITS2 y el gen *psbA-trnH* como complemento para la identificación de plantas.

Así mismo, Chen y colaboradores (2010) utilizaron siete regiones (*psbA-trnH*, *matK*, *rbcl*, *rpoC1*, *ycf5*, ITS2 e ITS) para evaluar su efectividad en la identificación de diferentes especies de plantas medicinales estrechamente relacionadas filogenéticamente, detectando una alta variabilidad y discriminación al usar ITS2 con el cual se identificaron 92.7% de las especies estudiadas que se obtuvieron de 6,600 muestras de 4,800 especies en 752 géneros. Así, los autores proponen a la región ITS2 como marcador molecular esencial para la identificación de plantas medicinales por código de barras.

Y en particular, para la identificación por *barcoding* del género *Bacopa*, Tungphatthong y colaboradores (2018) evaluaron seis regiones (ITS, *matK*, *rbcl*, *ycf1*, *psbA-trnH*, y *trnL-F*) en tres especies *B. monnieri*, *B. caroliniana* y *B. floribunda* así como en seis productos comerciales que utilizaban como único ingrediente a la especie *B. monnieri*, todas las especies y los productos evaluados fueron identificados de manera precisa y correcta con todos los marcadores utilizados, encontrando además que el ITS mostró una alta divergencia interespecífica del 10.2%-19.6% de rango; así mismo, se evaluó el gen *trnL-F* en Bar-HRM (*barcoding*-disociación de alta resolución, *Bar-Melting High Resolution* por sus siglas en inglés), demostrando que dicha técnica es altamente eficaz para la identificación de plantas y adulterantes en tiempo real.

Marcadores morfológicos. Pocos estudios se han realizado respecto a la caracterización entre individuos de la especie a través de marcadores morfológicos, principalmente por que las tendencias en la investigación de *B. monnieri* están orientadas a explicar el mecanismo de acción de los bacósidos en células animales, sin embargo, existe un antecedente principal:

Mathur y colaboradores (2003) realizaron un estudio del germoplasma de accesiones colectadas en La India con el objetivo de conservar aquellos ecotipos y genotipos con características deseables para su domesticación y cultivo y para lograrlo se caracterizó morfológicamente y químicamente 27 accesiones, en dichas accesiones se evaluaron caracteres vegetativos y reproductivos así como rendimiento de peso seco y fresco así como el contenido de bacósido A, los autores identifican tres grupos donde la variación es significativa de los cuales un primer grupo presentó alto contenido en bacósidos, plantas de tamaño más pequeño (respecto al grupo con plantas de mayor tamaño) pero menor rendimiento en biomasa, un segundo grupo de características intermedias, y el tercer grupo el cual presentó bajo contenido de bacósido A, plantas de mayor tamaño respecto al resto y con mayor rendimiento en biomasa. Dicho análisis de grupos se atribuye a las condiciones ambientales de cada población y por la biología de la especie, el genotipo pudiera estar relacionado con las interacciones de los microambientes vinculados al hábitat de desarrollo donde se encuentra *B. monnieri* hindú. Dichos grupos pueden ser seleccionados para ser incluidos en programas biotecnológicos para crear cepas de *B. monnieri* con las características a desear.

Bacósidos. El estudio de los bacósidos ha sido extenso por parte de la comunidad científica, la cual va desde su caracterización estructural que confirma la identidad de los bacósidos A y B (Deepak y colaboradores, 2004; Deepak y colaboradores, 2005; Sivaramakrishna y colaboradores, 2005; Agrawal, y colaboradores, 2006) hasta bioensayos que confirman las propiedades ansiolíticas y nootrópicas atribuidas a dichos compuestos fitoquímicos (Roodenrys y colaboradores, 2002; Abhishek y colaboradores, 2010; Rajan, Preethi y Singh, 2015; Mannan y colaboradores, 2015; Ramasamy y colaboradores, 2015; Hosamani, Krishna y Moralidhara, 2016; Muszyńska y colaboradores, 2016; Bansal, Reddy y Kumar, 2016),

no obstante, hay pocos antecedentes respecto a la cuantificación de bacósidos y la comparativa entre poblaciones de estudio. Existen dos principales antecedentes:

Christopher y colaboradores (2017) realizaron un estudio de comparación entre 60 genotipos (previamente identificados) provenientes de La India, evaluando en cada uno el contenido de Bacósido A y Bacopasido I, todos los genotipos fueron cultivados bajo las mismas condiciones para asegurar que la variación obtenida fuese determinada por las características propias del genotipo/quimiotipo y no por las condiciones ambientales, demostrando que no existe correlación entre los factores ecológicos del cual provenían los genotipos y la biosíntesis de bacósidos, es decir, las condiciones ambientales no fueron críticas para la síntesis de dichos compuestos, encontrando 3 genotipos élite con un porcentaje >5.5% de contenido de bacósidos (respecto al resto evaluado), con la finalidad de utilizar dichos genotipos para programas de mejoramiento de cultivos y así evitar la sobreexplotación de poblaciones silvestres para extraer los compuestos de interés.

Así mismo, Bansal, Reddy y Kumar (2016) llevaron a cabo un estudio comparativo entre 14 accesiones colectadas de distintos agroecosistemas de La India y cultivadas en igualdad de condiciones durante un año, durante el segundo año se tomaron muestras de tejido vegetal en las diferentes estaciones del año (primavera, verano, otoño e invierno) y de los cuales se evaluaron los principales componentes del bacósido A –bacósido A3, Bacopasido II y Bacopasaponina C– demostrando que el periodo de máximo contenido de bacósido A, es en verano en todos los componentes evaluados mientras que en invierno se registró el mínimo contenido de cada uno de ellos en todas las accesiones. A su vez, reportan que el índice de cosecha y la tasa de crecimiento relativa son altos en todas las accesiones en verano respecto a las otras estaciones, lo cual sugiere que el rendimiento máximo es durante dicho periodo, de esta manera seleccionando genotipos élite.

Objetivos.

General.

Evaluar los marcadores morfológicos, moleculares y fitoquímicos de la especie *Bacopa monnieri* (L.) Wettstein de cuatro poblaciones silvestres de la zona central de México que puedan ser informativos para diferenciar poblaciones distribuidas en México.

Particulares.

Identificar a la especie *B. monnieri* a través del análisis de marcadores moleculares (*matK*, *rbcL* e ITS2) de cada población silvestre de estudio.

Analizar y comparar los caracteres morfológicos (vegetativos y reproductivos) de individuos de las poblaciones de estudio.

Detectar y cuantificar los compuestos fitoquímicos principales (Bacósido A3, Bacopasido II, Bacopasido X y Bacopasaponina C) de extractos elaborados a partir poblaciones silvestres de estudio.

Material y métodos.

Sitios de estudio.

Fueron seleccionados cuatro sitios para realizar este estudio, dos pertenecen a la región occidental (Jalisco y Michoacán) y dos a la región oriental (Hidalgo y Puebla) del país. Los municipios y localidades se enlistan en el siguiente apartado:

Tecozautla, Hidalgo. Se encuentra entre los paralelos 20° 25' y 20° 40' latitud norte y los meridianos -99° 26' y -99° 51', pertenece a la provincia del Eje Neovolcánico en las Sierras y Llanuras de Hidalgo, la temperatura media oscila entre los 14 a 20°C y se presenta una precipitación pluvial anual de 500 a 600 mm. El municipio pertenece a la región hidrológica del Río Pánuco y la principal cuenca es el río Moctezuma, el clima de esta localidad es semiseco semicálido y la vegetación dominante es Matorral Xerófilo (Compendio de Información Geográfica Municipal – Tecozautla INEGI, 2010).

Los Reyes Metzontla, Zapotitlán, Puebla. Este municipio se encuentra entre los paralelos 18° 07' y 18° 25' de latitud norte y en los meridianos -97° 24' y -97° 41', pertenece a la provincia de la Sierra Madre del Sur en las Sierras del sur de Puebla; la temperatura media oscila entre los 14 y 22°C y el rango de precipitación anual está entre los 400 a 700 mm. El municipio pertenece a la región hidrológica del Papaloapan-Balsas y la principal cuenca es el río Papaloapan, el clima de la localidad es semiseco templado y la vegetación dominante es el Matorral Xerófilo (Compendio de Información Geográfica Municipal – Zapotitlán INEGI, 2010).

Araró, Zinapécuaro, Michoacán. El municipio se localiza entre los paralelos 19° 44' y 19° 59' de latitud norte y los meridianos -100° 35' y -100° 59', pertenece a la provincia del Eje Neovolcánico dentro de la subprovincia de Sierras y Bajíos Michoacanos; la temperatura media anual oscila entre 10 y 20°C el rango de precipitación pluvial va entre 700 a 1,600 mm. El municipio corresponde a la

región hidrológica de Lerma-Santiago donde la principal cuenca es el Lago de Cuitzeo, el clima del sitio es templado subhúmedo con lluvias en verano y humedad media mientras que la vegetación dominante es el Bosque tropical caducifolio (Compendio de Información Geográfica Municipal – Zinapécuaro INEGI, 2010).

San Nicolás de Acuña, Tuxcueca, Jalisco. Este municipio se localiza entre los paralelos 20° 03' y 20° 14' de latitud norte y los meridianos -103° 08' y -103° 23', pertenece a la provincia del Eje Neovolcánico dentro de la subprovincia de Chapala; la temperatura media anual va desde 16 a 22°C, el rango de precipitación pluvial es desde 600-1,000 mm. El municipio corresponde a la región hidrológica Lerma-Santiago y la principal cuenca hidrológica es el Lago de Chapala, el clima de este sitio es semicálido subhúmedo con lluvias en verano de humedad media mientras que la vegetación dominante es el Bosque Tropical Caducifolio (Compendio de Información Geográfica Municipal – Tuxcueca INEGI, 2010).

Colecta de material biológico.

Para la obtención de los ejemplares de *B. monnieri* se llevaron a cabo colectas en el periodo de octubre de 2017 a junio de 2018 en los sitios de estudio descritos en la sección anterior, para ello se seleccionaron individuos en etapa reproductiva de cada una de las poblaciones y se nombraron de acuerdo al sitio de origen -BM Hidalgo, BM Jalisco, BM Puebla, BM Michoacán-, separando individuos para análisis posteriores *ex situ* los cuales consisten en: identificación y análisis moleculares, análisis de caracteres vegetativos y reproductivos y la detección de compuestos fitoquímicos.

Así mismo, se realizó la herborización de al menos cuatro ejemplares por sitio para su posterior identificación. En cada sitio se tomaron coordenadas geográficas (GSM), y altitud, estos dos últimos obtenidos con ayuda de una aplicación móvil GPS Estatus® y ratificadas en Google Earth Pro®. Los análisis *ex situ* se llevaron a cabo en el Laboratorio de Bioquímica Molecular de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Identificación y análisis de secuencias.

Los individuos herborizados fueron determinados a nivel específico por el Herbario IZTA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala y añadidos a su respectiva colección. Posteriormente se realizó la identificación por extracción de ADN y PCR punto final usando marcadores moleculares específicos para plantas, para ello, los individuos colectados en los sitios de estudio fueron preservados en nitrógeno líquido y en la solución RNA Later®, posterior a la preservación *in situ* se realizó la extracción de ADN genómico, se seleccionaron 100 mg de tallos y hojas y se maceraron en nitrógeno líquido, el contenido obtenido fue depositado en tubos con solución para lisis celular del kit de extracción PowerPlant® siguiendo el protocolo del proveedor (MO BIO) obteniendo un volumen final de elución de ~75 µL por muestra.

Para comprobar la calidad del ADN genómico extraído se llevó a cabo una electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1%, empleando como intercalante Midori Green® (NIPPON Genetics) (0.2 µg/µL) a 80V por 30 minutos, utilizando como buffer Tris-Acetato-EDTA 0.5X. Por cada muestra se usaron 5µL de ADN genómico y 1µL de Midori Green Direct®; para comprobar el peso molecular del ADN genómico se utilizó como referencia el marcador de peso molecular Lambda DNA-HindIII® de 24 Kb. Una vez que se ha verificado la correcta extracción de ADN genómico, se hizo una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) siguiendo el protocolo de MyTaq™ DNA Polymerase (5 u/µL) (BIOLINE®) para reacciones con un volumen final de 25µL; los tres primers utilizados en las reacciones son marcadores moleculares diseñados específicamente para plantas: *rbcl* el cual amplifica la región que codifica la subunidad grande de la enzima RuBisCO, *matK*, primer que amplifica la región que codifica la enzima Maturasa y por último, ITS el cual amplifica un espaciador entre los genes 5.8S y 28S de rRNA, set de primers seleccionado con base en las recomendaciones del CBOL Plant Working Group (2009). Una vez preparadas las reacciones con cada uno de los marcadores moleculares, se procedió a la amplificación empleando un termociclador T100™ (BIO-RAD) con el siguiente programa: 95°C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos de 95°C por 15 segundos; las temperaturas de alineamiento fueron distintas para cada marcador molecular empleado (*rbcl*, 55°C por 15 segundos, *matK*, 57°C por 15 segundos e ITS, 53°C por 15

segundos), y la extensión de 72°C por 10 segundos, para finalizar con la elongación a 72°C por 5 minutos.

Las muestras con las regiones amplificadas fueron secuenciadas por Secuenciación Sanger automatizada, usando el set de primers anteriormente señalado, las secuencias fueron resueltas en un secuenciador automático de 16 capilares Applied Biosystems-Hitachi 3130XL® en dirección 5' – 3'. Posterior a la resolución de secuencias, se analizaron y editaron en el software Geneious® versión 9.1.6 y para la determinación a nivel específico se empleó el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) integrada en el mismo software y ratificada a través de la misma herramienta por medio de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) considerando aquellas que presentaron un porcentaje de identidad mayor al 98%.

Una vez confirmada la identidad de la especie, se identificó la región del ITS2 y se delimitó por el modelo Hidden Markov (HMMs), así mismo las secuencias primarias de cada individuo colectado fueron modeladas para estructura secundaria a través del sitio <http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/> (Keller y colaboradores, 2009), se recopilaron secuencias primarias y estructura secundaria de otros géneros (de la misma familia) filogenéticamente cercanos basado en filogenia construida de la tribu Gratiolae por Albach (2005) y alineadas a través del mismo sitio web (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>) y por medio del software 4SALE® 1.5 (Seibel y colaboradores, 2006) para comparar las estructuras secundarias.

El compendio de secuencias fue alineado a través del MEGAX (Kumar y colaboradores, 2018) por el algoritmo ClustalW de la secuencia primaria, para la estructura secundaria se realizó el alineamiento a través del software 4SALE® con el complemento ClustalW (Seibel y colaboradores, 2006) para posteriormente realizar un dendrograma por el modelo general de sustitución reversible en el tiempo (GTR, por sus siglas en inglés) a través del software MrBayes® (Ronquist y Huelsenbeck, 2003) todo lo anterior de acuerdo con la metodología propuesta por Zhang y colaboradores (2015) con algunas modificaciones.

Análisis de caracteres vegetativos y reproductivos.

Previo al análisis de caracteres vegetativos y reproductivos, se seleccionaron individuos de cada población de estudio que se encontraban en floración, para ello la selección *in situ* se realizó de la siguiente manera: se identificaron aquellos individuos con flores turgentes y que no presentaran daño en los tejidos, seguidamente se tomaron fotos para registrar la coloración de las flores, posteriormente se hizo un corte diez nudos por debajo del pedicelo floral y así dichos individuos se dispusieron por separado en solución preservadora específica para tejidos reproductivos, cada uno se etiquetó respectivamente con los datos de colecta para así ser transportados al Laboratorio de Bioquímica Molecular donde se almacenaron a 4°C en oscuridad para su posterior disección y medición, todo lo anterior de acuerdo con el protocolo propuesto por Salazar-Rojas y colaboradores (2010).

Los caracteres evaluados se seleccionaron de acuerdo con las observaciones propuestas por Trease y Evans (2009), en relación con el análisis de caracteres macroscópicos, así como en el diseño del protocolo de Mathur y colaboradores (2003), en total se evaluaron 17 caracteres divididos en 8 caracteres vegetativos (altura de la planta, número de nodos por planta, largo de los entrenudos, largo de hoja, ancho de hoja, relación ancho/largo de la hoja, diámetro del tallo y área de hoja) y 9 caracteres reproductivos (largo del pedicelo floral, largo de flor, largo de bractéolas, largo del sépalo más grande, largo del sépalo externo, largo del sépalo interno, largo de pistilo, largo de anteras cortas y largo de anteras largas). Para el análisis de los caracteres anteriormente mencionados, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés), donde se tomaron en cuenta 14 observaciones de cada carácter evaluado por población. Los vectores propios y los valores obtenidos se encuentran en el Anexo 2.2. A su vez, se realizó un análisis de varianza ANOVA de dos vías con el programa GraphPad Prism 8®, cada rasgo morfológico tuvo 14 repeticiones y se compararon los promedios de cada rasgo morfológico y cada población por la prueba de Tukey a $P \leq 0.05$ de acuerdo con el procedimiento propuesto por Bansal, Reddy y Kumar (2016). Los rasgos evaluados en este estudio se muestran en la figura 6.

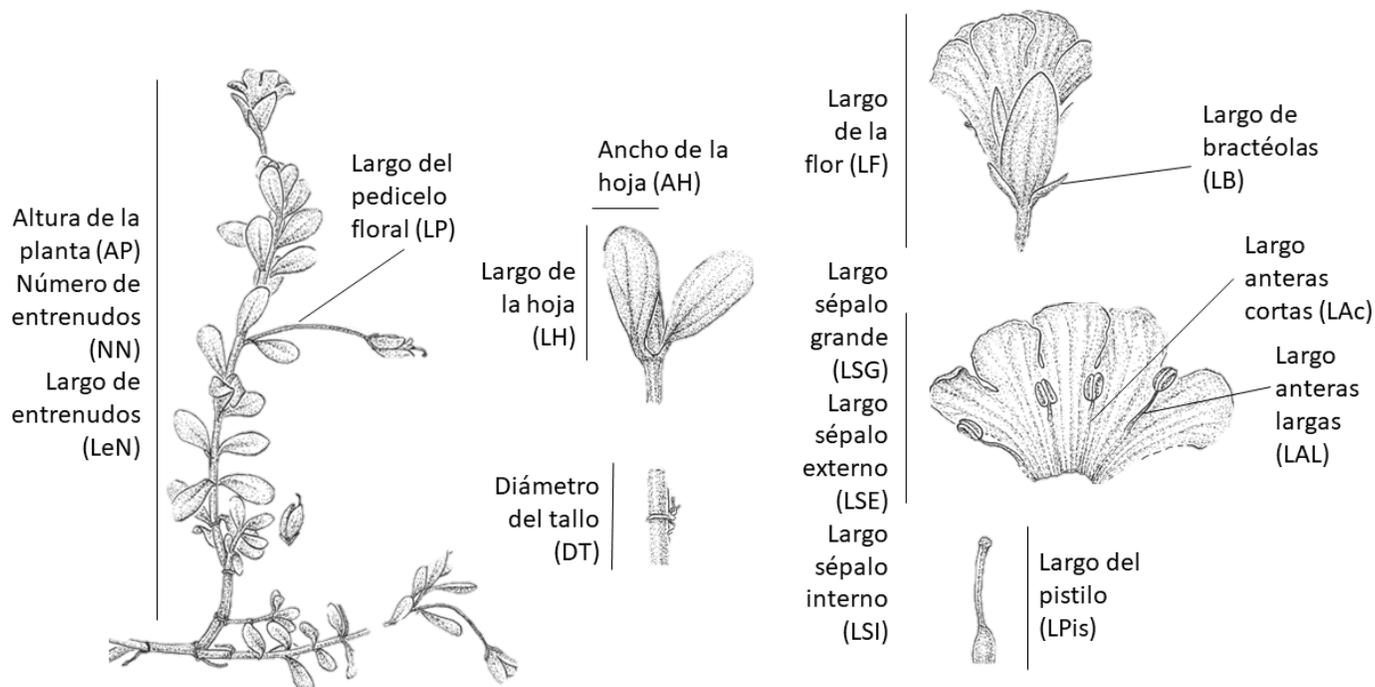


FIG. 6. ILUSTRACIÓN DE *B. MONNIERI* Y RASGOS MORFOLÓGICOS EVALUADOS EN ESTE ESTUDIO. LAS INICIALES ENTRE PARENTESIS INDICAN EL CÓDIGO USADO PARA IDENTIFICAR CADA RASGO.

Detección de compuestos fitoquímicos.

Los individuos seleccionados para la determinación de compuestos fitoquímicos fueron dispuestos en bolsas de papel para su transportación. Para elaborar los extractos metanólicos de cada población de estudio, fueron pesados en promedio 25 g de peso fresco los cuales fueron secados a temperatura ambiente hasta retirar la humedad de los tejidos para calcular el rendimiento posterior al secado. El peso seco obtenido fue puesto en un matraz Erlenmeyer de 500 mL y se añadió 400 mL de metanol (CH_3OH) grado reactivo (Sigma®) donde el contenido fue sometido a agitación cada 18 horas durante 15 días, evitando la exposición a la luz. Posteriormente, se procedió al filtrado del extracto con ayuda de papel filtro Whatman no.1; el solvente fue removido por destilación al vacío, y el rendimiento obtenido fue dispuesto en un recipiente para remover el remanente del solvente mediante evaporación a temperatura ambiente de dos a tres días. El extracto crudo obtenido fue pesado y almacenado a -20°C .

Para la detección cualitativa de grupos funcionales (tamizaje fitoquímico) en los extractos metanólicos elaborados, se tomaron 10 mg de extracto crudo de cada población de estudio de *B. monnieri* y se diluyeron en 1 mL de agua milliQ por separado, cada muestra fue evaluada para detectar alcaloides, flavonoides, fenoles y saponinas a través de reacciones colorimétricas. Los protocolos en extenso se encuentran en el Anexo 3.1 de este trabajo, y se basaron en las metodologías propuestas por Martínez y Cuellar (2001) y López y Colombat (2002).

Para la detección y determinación del bacósido A, se llevó a cabo una Cromatografía Líquida de Alta Resolución – Detector de Arreglo de Diodos (HPLC-DAD, por sus siglas en inglés) en los extractos crudos metanólicos de *B. monnieri* de cada población de estudio, para cumplir este objetivo se utilizó el equipo Agilent series 1100 con bomba cuaternaria y detector de arreglo de diodos y se empleó una columna Kinetex 2.6 μ , C1800Å (150 x 2.1 mm) (Phenomenex), la fase móvil en gradiente de dos líneas (solvente A y B) consistió en acetonitrilo (A) y agua con ácido ortofosfórico 0.05% (v/v) (B), el programa de elución fue no-isocrático, de 0-25 min desde 30:70 (A:B) a 40:60, y de 25-35 min desde 40:60 a 60:40. La elución fue a un flujo promedio de 1.5 mL/ min y la detección fue a 205 nm; como estándar de referencia se adquirió el Mix de Bacósido A (Bacósido A3, Bacopasido II, Bacopasido X, Bacopasaponina C) (Sigma-Aldrich ®) de los cuales se usaron concentraciones desde 1 mg/mL-4 mg/mL disuelto en metanol grado HPLC (Sigma ®) bajo las mismas condiciones del programa de elución usado para las muestras problema. El volumen inyectado a la columna de cada muestra problema y la muestra de estándar fue de 30 μ L. Los cromatogramas obtenidos (tiempos de retención y espectrofotometría UV) fueron analizados a través del software ChemStation A.09.03. Para el análisis cuantitativo, se calculó la concentración de cada compuesto de acuerdo con la cantidad inyectada (mg) respecto a las áreas de los picos correspondientes (mAbs) registradas en cada cromatograma. La concentración de cada compuesto del bacósido A se encuentra expresada en miligramos por cada gramo de peso seco (mg/ g de PS) convertida para cada peso seco obtenido de cada muestra problema, todo esto de acuerdo con el protocolo propuesto por Deepak *et. al.* (2005).

Resultados.

Identificación y análisis de secuencias.

Los sitios de colecta de ejemplares de la especie en cuestión se encuentran en el siguiente cuadro, donde se especifica las coordenadas del sitio exacto, la altitud donde la población se encontraba al momento de la colecta, y si la especie presentaba registro de uso o de algún nombre común con que se reconoce a la especie dentro de las inmediaciones de la localidad.

CUADRO 1. INFORMACIÓN GEOGRÁFICA RECABADA A PARTIR DE LAS COLECTAS REALIZADAS EN LOS SITIOS SELECCIONADOS.

Nombre	Nombre común	Localidad	Coordenadas	Altura
Bacopa monnieri <i>Hidalgo</i>	NR	El Géiser, Tecozautla, Hidalgo.	20° 31' 67" N, -99° 41' 56" O	1,650 msnm
Bacopa monnieri <i>Jalisco</i>	NR	San Nicolás Acuña, Tuxcueca, Jalisco.	20° 11' 15" N, -103° 14' 56" O	1,530 msnm
Bacopa monnieri <i>Puebla</i>	NR	Los Reyes Metzontla, Zapotitlán, Puebla.	18° 16' 22" N, -97° 29' 14" O	1,606 msnm
Bacopa monnieri <i>Michoacán</i>	"Golondrina"	Araró, Zinapécuaro, Michoacán.	19° 54' 31" N, -100° 49' 92" O	1,857 msnm

*NR, SIN REGISTRO DE NOMBRE COMÚN EN LA LOCALIDAD DE ESTUDIO.

Posterior a la obtención de secuencias de cada individuo por población, se llevó a cabo el BLAST® a través del software Geneious® y se determinaron a nivel específico todos los individuos colectados con el uso del *barcoding*, en el cuadro 2 se especifican las secuencias de referencia depositadas en GenBank; el porcentaje de identidad se estableció con el número de bases correspondientes de cada gen en comparación con las secuencias referencia. Para corroborar la identificación taxonómica, se encuentra el número de acceso proporcionado por el Herbario IZTA.

CUADRO 2. IDENTIDAD POR MARCADORES MOLECULARES (*MATK*, *RBCL* E *ITS2*) DE LOS EJEMPLARES COLECTADOS DE ESTE ESTUDIO.

Población	matK			rbcL			ITS2		
	%ID	Nombre ID	Origen geográfico	%ID	Nombre ID	Origen geográfico	%ID	Nombre ID	Origen geográfico
<i>BM Hidalgo</i>	99.9	KP844739	Hidalgo, México	99.1	KP844743	Puebla, México	94.6	KP844738	Hidalgo, México
<i>BM Jalisco</i>	98.5	AY667458	Bonn, Alemania	99.3	KX807134	Maharashtra, India	91.9	KR215626	Karnataka, India
<i>BM Puebla</i>	98.6	KP844739	Hidalgo, México	98.6	KP844743	Puebla, México	99.8	KP844738	Hidalgo, México
<i>BM Michoacán</i>	98.6	AY667458	Bonn, Alemania	99.5	KF381102	Maharashtra, India	98.7	KR215626	Karnataka, India

*%ID, PORCENTAJE DE RESIDUOS IDÉNTICOS EN EL ALINEAMIENTO INCLUYENDO GAPS DE LAS SECUENCIAS PROBLEMA Y LAS SECUENCIAS CONSENSO; NOMBRE ID, ACCESO QUE PUEDE CONSULTARSE EN LA BASE DE DATOS DEL NCBI – GENBANK.

Predicción de estructura secundaria y alineamiento de secuencias de ITS2.

La estructura secundaria (ES) del ITS2 de los individuos de este estudio, tuvo una estructura típica de cuatro hélices, donde la hélice IV fue la más variable en todas las secuencias problema, así mismo se encontraron cambios de una sola base en la hélice III y en las regiones no helicoidales 0, 321-322 y 324-329 respecto al consenso, las cuales se ilustran en las figuras 7, 8 y 9. El largo del alineamiento de las secuencias primarias (SP) problema con la secuencia consenso fue de 256 bases de las cuales 8 residuos presentan cambios de una sola base respecto al consenso, lo cual representa 96.8% de residuos conservados (sin tomar en cuenta los gaps), mientras que en la estructura secundaria el largo del alineamiento fue de 275 bases, los cuales se visualizan en el modelo general de la estructura secundaria en la figura 6.

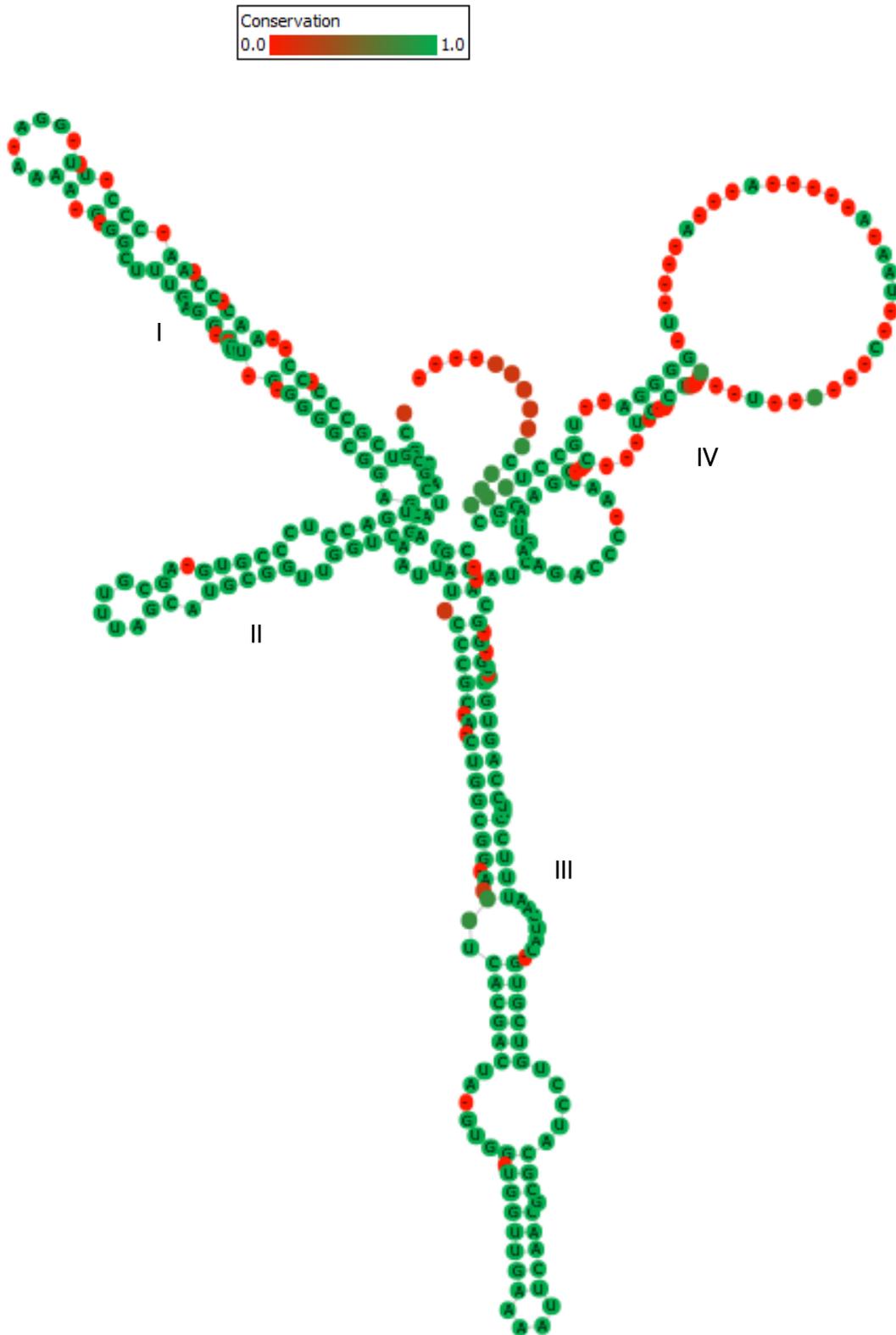


FIG. 7. MODELO DE ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL ITS2 DE INDIVIDUOS DE *B. MONNIERI*. MODELO GENERAL DE ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL ITS2 Y CONSERVACIÓN DE MOTIVOS EN CONTRASTE CON EL CONSENSO, DONDE LAS ÁREAS VERDES INDICAN LO MÁS CONSERVADO Y LAS ÁREAS ROJAS LO MENOS CONSERVADO.

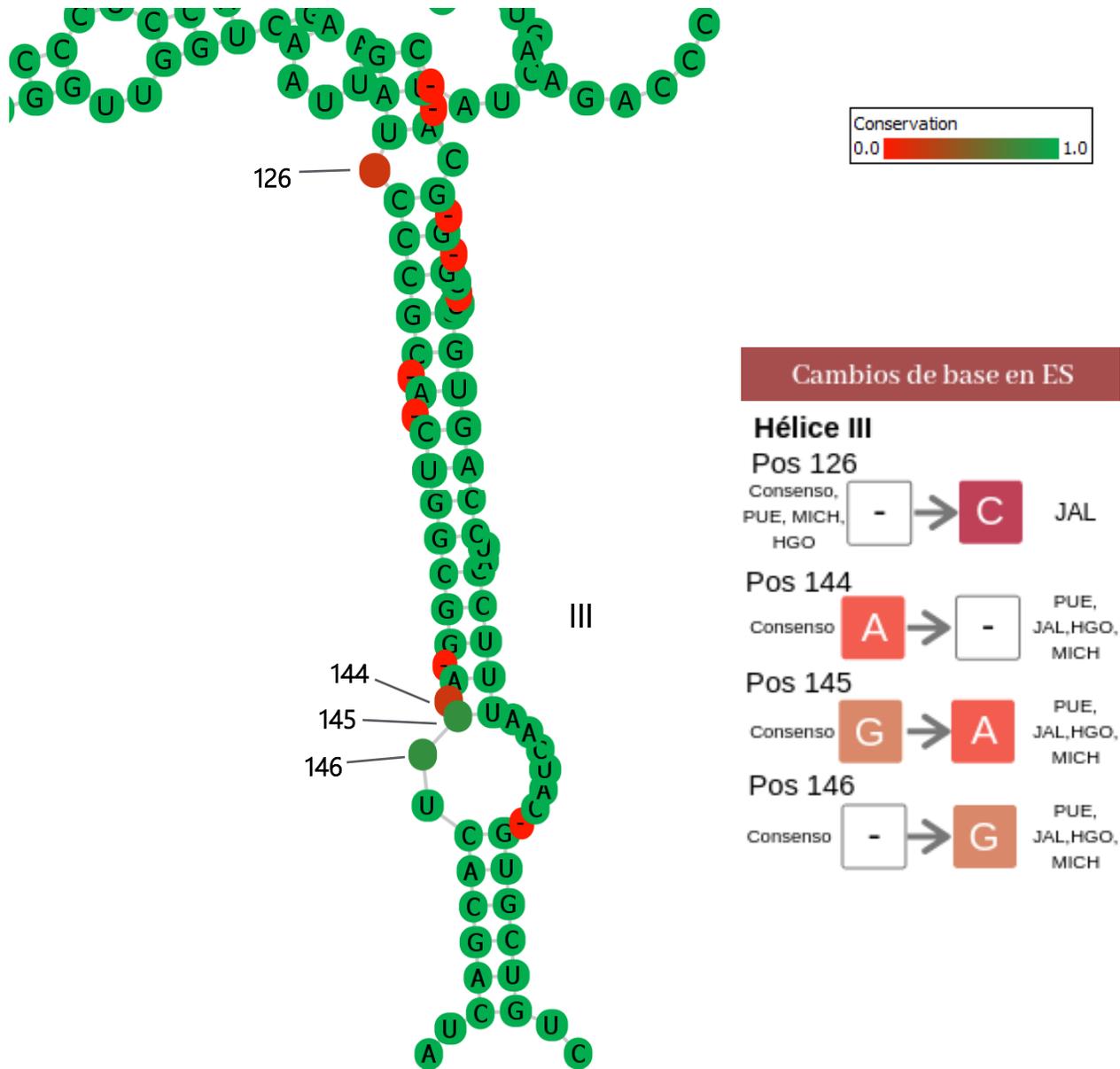


FIG. 8. MODELO DE ESTRUCTURA SECUNDARIA – HÉLICE III. A) MODELO DE ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL ITS2, EN DONDE SE SEÑALAN LAS POSICIONES DONDE SE ENCONTRARON CAMBIOS DE UNA SOLA BASE. B) ESQUEMA DE CAMBIOS DE BASE PARA CADA UNA DE LAS ACCESIONES HALLADO EN EL ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS PROBLEMA Y LA SECUENCIA CONSENSO DE *B. MONNIERI*. EL GUIÓN (-) REPRESENTA LOS GAPS EN LA PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA.

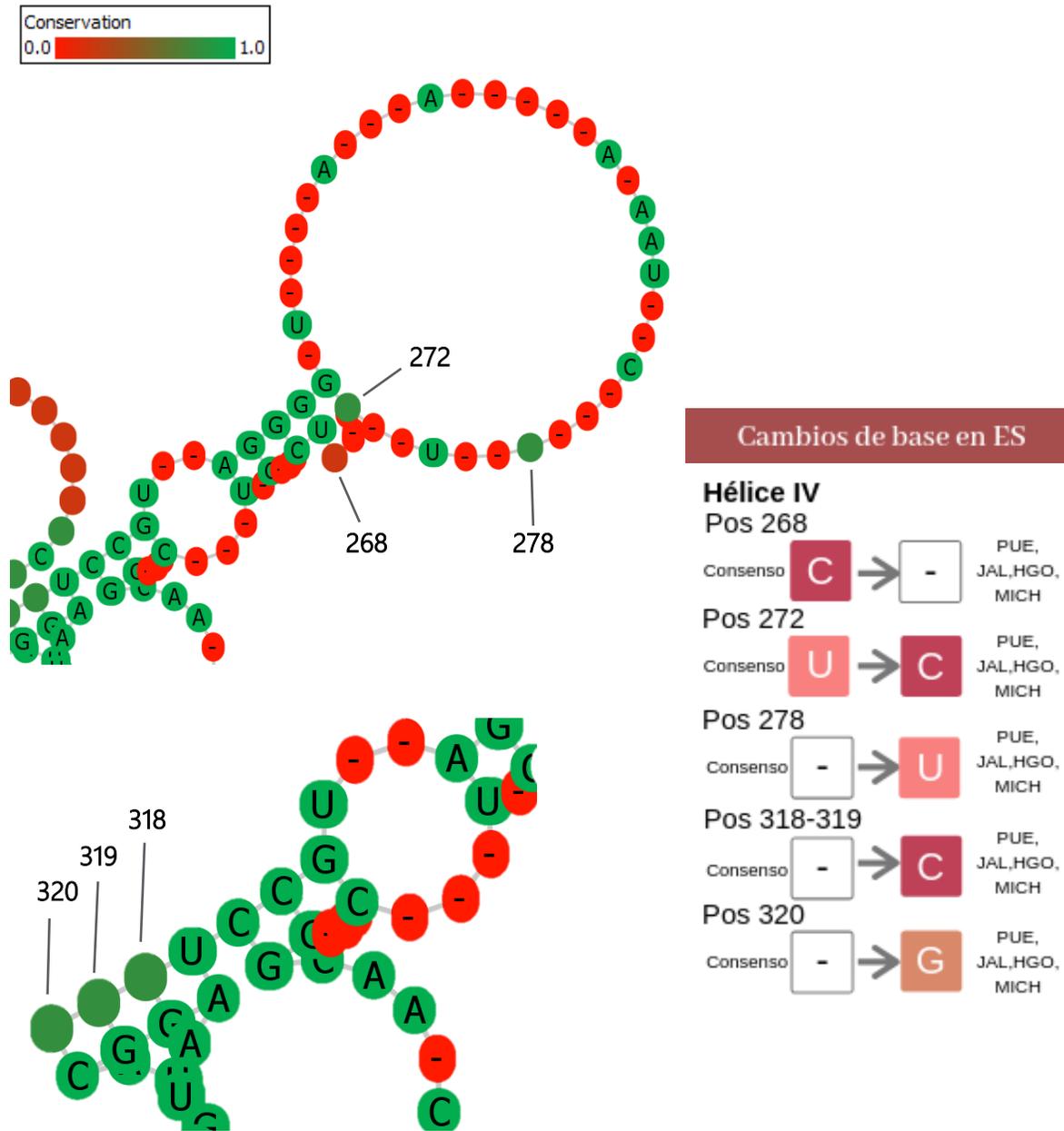


FIG. 9. MODELO DE ESTRUCTURA SECUNDARIA – HÉLICE IV. A) Y B) MODELO DE ESTRUCTURA SECUNDARIA, SE SEÑALAN LAS POSICIONES DONDE SE ENCONTRARON CAMBIOS RESPECTO AL CONSENSO. C) ESQUEMA DE CAMBIOS DE UNA SOLA BASE PARA CADA UNA DE LAS ACCESIONES HALLADO EN EL ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS PROBLEMA Y LA SECUENCIA CONSENSO DE *B. MONNIERI*. EL GUIÓN (-) REPRESENTA LOS GAPS EN LA PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA.

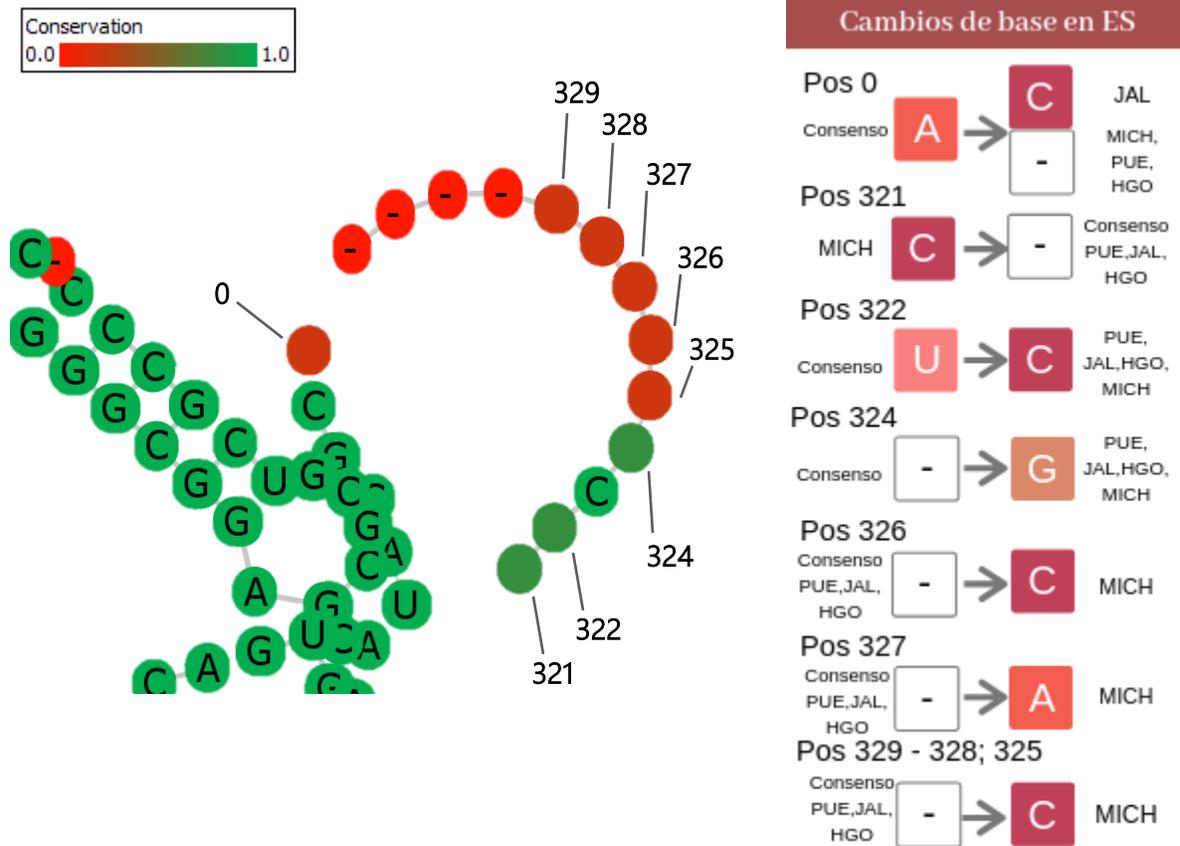
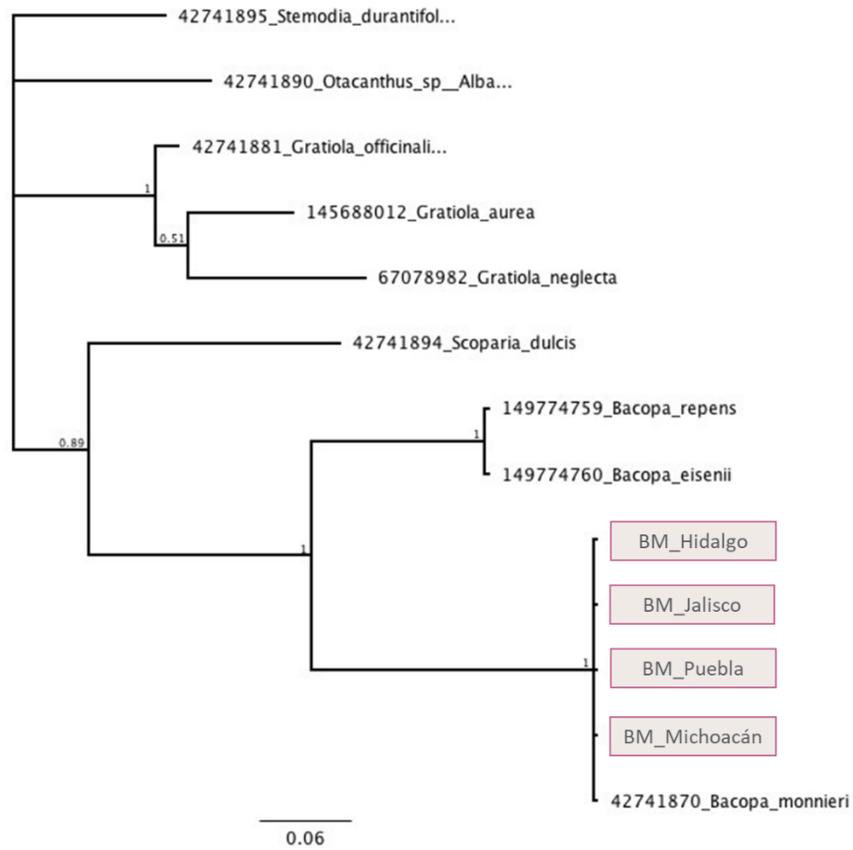
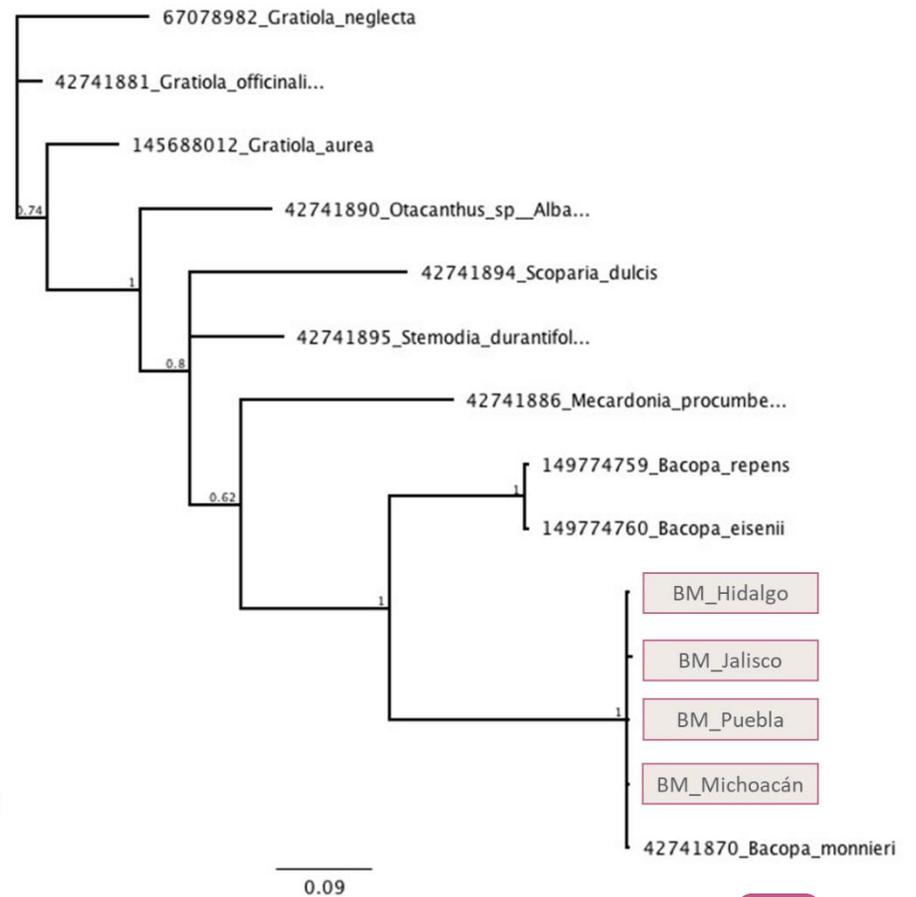


FIG. 10. MODELO DE ESTRUCTURA SECUNDARIA – REGIONES NO HELICOIDALES. A) MODELO DE ESTRUCTURA SECUNDARIA, SE SEÑALAN LAS POSICIONES DONDE SE ENCONTRARON CAMBIOS RESPECTO AL CONSENSO. B) ESQUEMA DE CAMBIOS DE UNA SOLA BASE PARA CADA UNA DE LAS ACCESIONES HALLADO EN EL ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS PROBLEMA Y LA SECUENCIA CONSENSO DE B. MONNIERI. EL GUÍÓN (-) REPRESENTA LOS GAPS EN LA PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA.



A



B

FIG. 11 Y 12. COMPARACIÓN DE ÁRBOLES FILOGENÉTICOS POR MP EN SECUENCIA PRIMARIA Y ESTRUCTURA SECUNDARIA DE ITS2 DE LA TRIBU GRATIOLAE. A) ÁRBOL FILOGENÉTICO INFERIDO A PARTIR DEL MODELO GENERAL DE SUSTITUCIÓN GTR PARA LA SECUENCIAS PRIMARIAS Y B) ÁRBOL FILOGENÉTICO INFERIDO A PARTIR DEL MODELO GENERAL DE SUSTITUCIÓN GTR PARA LA ESTRUCTURA SECUNDARIA. GRUPOS EXTERNOS BASADOS EN LO PROPUESTO POR OLMSTEAD Y COLABORADORES (2001).

A pesar de que la secuencia primaria es muy informativa en el alineamiento múltiple, la estructura secundaria arroja un árbol por MP con un índice de consistencia robusto, y no altera la homoplasia de los grupos. Los dos alineamientos construyen árboles con agrupamientos topológicamente similares, con algunas excepciones.

Hay algunas diferencias dentro de los clados en relación con la posición de algunas especies: dentro de la especie *B. monnieri* los individuos de estudio cambian de posición, mientras que el individuo de *B. monnieri* de Jalisco es más cercano a la secuencia primaria consenso, el individuo de *B. monnieri* proveniente de Hidalgo es más cercano a la estructura secundaria de la secuencia consenso. Aun así, los alineamientos de secuencia primaria y de estructura secundaria permite diferencias e identificar los individuos de cada población de procedencia, y es observable en los cambios de un solo nucleótido hallados en el modelo de estructura secundaria.

De acuerdo con el software 4SALE, no se encontraron CBCs ni hCBCs (CBCs: Compensatory Base Changes, por sus siglas en inglés; hCBCs: hemi Compensatory Base Changes, la traducción al español se define como Cambios de Base Compensatorios y semi Cambios de Base Compensatorios), es decir no se detectaron mutaciones en los nucleótidos en una posición estructural, en ninguno de los modelos de estructura secundaria, entre las poblaciones de este estudio ni de la secuencia y estructura consenso de *B. monnieri*.

Análisis de caracteres vegetativos y reproductivos.

La variación encontrada en los caracteres vegetativos y reproductivos de las poblaciones de estudio de *B. monnieri* se encuentra expresada en el cuadro 3, en donde se presentan los rangos máximos y mínimos de cada carácter evaluado.

CUADRO 3. MEDIA, RANGOS MÁXIMOS Y MÍNIMOS DE 17 CARACTERES VEGETATIVOS Y REPRODUCTIVOS DE LAS POBLACIONES DE ESTUDIO DE *B. MONNIERI*.

Rasgo evaluado	Código	Media	Rango	
			Máximo	Mínimo
Altura de la planta (cm)	AP	10.63	26.6	2.5
Número de nodos (cm)	NN	12.58	23	6
Longitud de entrenodos (cm)	LeN	0.94	1.9	0.2
Longitud de hoja (cm)	LH	1.14	2.23	0.6
Ancho de hoja (cm)	AH	0.52	1.73	0.2
Diámetro del tallo (cm)	DT	0.21	0.3	0.1
Área de la hoja (cm ²)	ÁH	0.47	1.62	0.10
Relación largo/ancho de la hoja	R L/A	2.30	3.66	0.42

Rasgo evaluado	Código	Media	Rango	
			Máximo	Mínimo
Longitud de pedicelo floral (cm)	LPF	0.8	2.6	0.09
Longitud de la flor (cm)	LF	0.76	0.99	0.52
Longitud de bractéolas (cm)	LB	0.35	0.6	0.1
Longitud de sépalo grande (cm)	LSG	0.79	0.91	0.5
Longitud de sépalo externo (cm)	LSE	0.74	0.9	0.5
Longitud de sépalo interno (cm)	LSI	0.70	0.9	0.3
Longitud del pistilo (cm)	LPis	0.54	0.7	0.3
Longitud de anteras cortas (cm)	LAc	0.36	0.45	0.15
Longitud de anteras largas (cm)	LAL	0.54	0.7	0.4

CUADRO 4. MEDIAS Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR (DE) DE CADA RASGO MORFOLÓGICO EVALUADO EN ESTE ESTUDIO.

	BM Jalisco	BM Hidalgo	BM Puebla	BM Michoacán
AP (cm)	8.10 ± 2.367	5.56 ± 2.476 ^{****}	19.90 ± 4.845 ^{****}	8.96 ± 2.962 ^{***}
NN (cm)	9.71 ± 2.367	10.78 ± 2.424	17.78 ± 4.406 ^{****}	12.07 ± 2.702 ^{**}
LeN (cm)	0.94 ± 0.333 [*]	0.60 ± 0.348	1.36 ± 0.244 ^{****}	0.87 ± 0.213 ^{***}
LH (cm)	0.78 ± 0.084 ^{***}	0.80 ± 0.112 ^{****}	1.84 ± 0.409 ^{****}	1.15 ± 0.200 ^{***}
AH (cm)	0.29 ± 0.047 ^{***}	0.39 ± 0.040 ^{**}	0.89 ± 0.355 ^{**}	0.53 ± 0.101 ^{****}
DT (cm)	0.19 ± 0.027	0.20 ± 0.083	0.26 ± 0.050 ^{**}	0.21 ± 0.066
ÁH (cm ²)	0.18 ± 0.043	0.24 ± 0.079	1.04 ± 0.311 ^{****}	0.44 ± 0.156 ^{***}
R L/A	2.72 ± 0.446 ^{***}	2.03 ± 0.187	2.25 ± 0.730	2.19 ± 0.214
LPF (cm)	1.61 ± 0.770 ^{****}	0.25 ± 0.166	1.02 ± 0.300 ^{****}	0.31 ± 0.200 ^{***}
LF (cm)	0.79 ± 0.089	0.66 ± 0.081 ^{**}	0.85 ± 0.070 ^{***}	0.76 ± 0.072 [*]
LB (cm)	0.18 ± 0.046 ^{****}	0.46 ± 0.736	0.44 ± 0.083 [*]	0.34 ± 0.068 ^{****}
LSG (cm)	0.79 ± 0.104	0.77 ± 0.057	0.86 ± 0.040 ^{****}	0.74 ± 0.087
LSE (cm)	0.70 ± 0.108	0.68 ± 0.063	0.82 ± 0.051 ^{***}	0.75 ± 0.088 ^{**}
LSI (cm)	0.64 ± 0.131 [*]	0.66 ± 0.070	0.80 ± 0.060 ^{****}	0.72 ± 0.091
LPis (cm)	0.60 ± 0.086 [*]	0.50 ± 0.069	0.54 ± 0.046	0.53 ± 0.072
Lac (cm)	0.33 ± 0.085	0.36 ± 0.049	0.40 ± 0.021 [*]	0.36 ± 0.063
LAL (cm)	0.54 ± 0.097	0.52 ± 0.058	0.58 ± 0.044 [*]	0.55 ± 0.060

^ANOVA DE DOS VÍAS Y TUKEY, * P≤0.05, ** P≤0.01, *** P≤0.001, ****P≤0.0001.

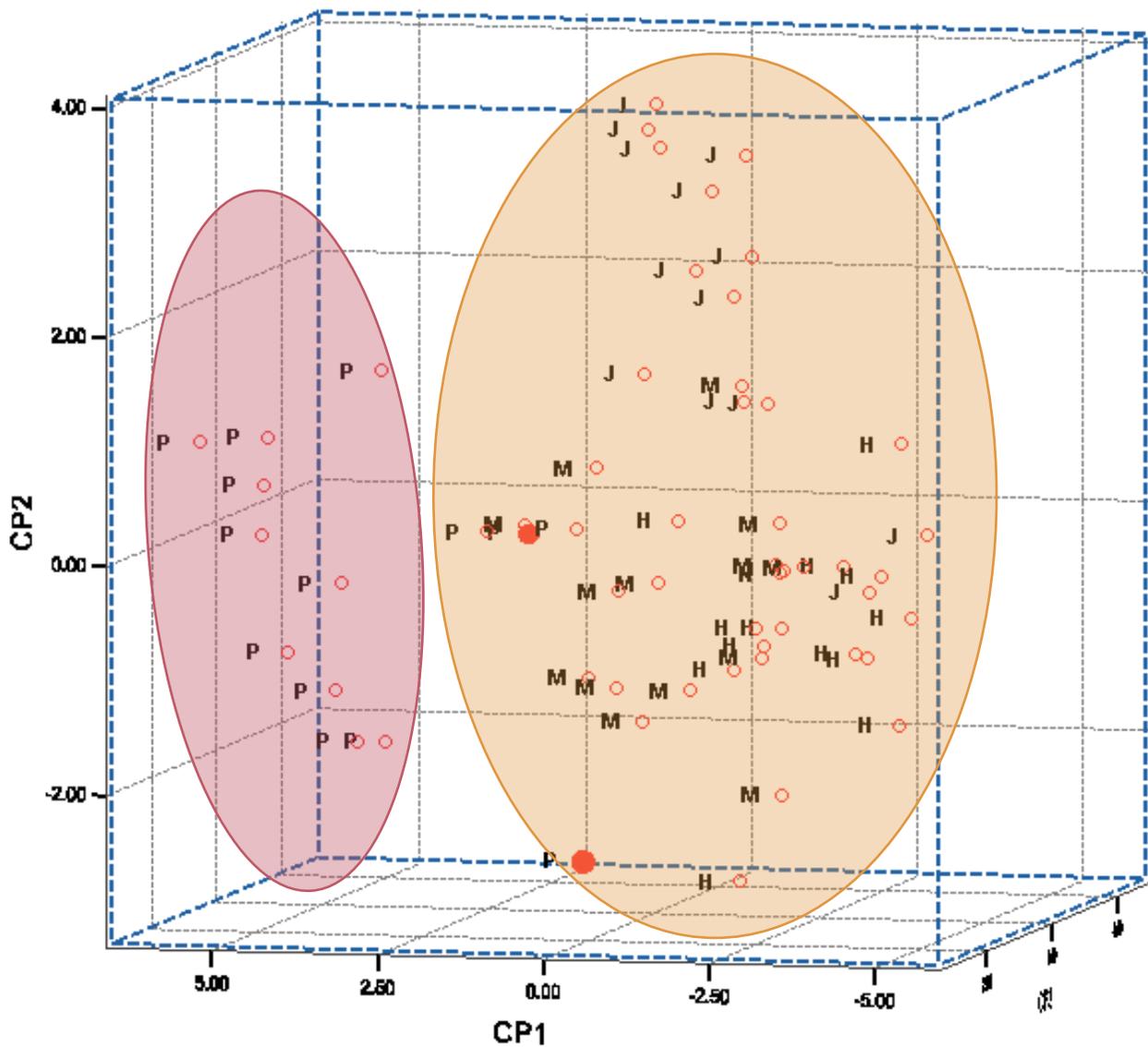


FIG. 13. GRÁFICO DE DISPERSIÓN GENERADO A PARTIR DEL ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (ACP) DE INDIVIDUOS DE LAS POBLACIONES DE ESTUDIO DE B. MONNIERI. J = JALISCO, M = MICHOCÁN, H = HIDALGO, P = PUEBLA; CADA PUNTO REPRESENTA UNA OBSERVACIÓN (INDIVIDUO) DE LA POBLACIÓN DE PROCEDENCIA. EL GRÁFICO ESTÁ PRESENTADO EN TRES DIMENSIONES POR LA SELECCIÓN DE TRES COMPONENTES. LOS PUNTOS ROJOS SÓLIDOS SEÑALAN ALGUNAS OBSERVACIONES DE PUEBLA QUE SE ENCUENTRAN FUERA DEL GRUPO SEÑALADO EN COLOR MORADO.

Para el ACP, los tres primeros componentes explican el 71.54% de la varianza acumulada para todo el conjunto de datos (figura 12), de los cuales el componente 1 explica el 45.41% de variación, el componente 2 explica el 14.10% de variación y el componente 3 explica el 12.03% de variación. Para este estudio, el componente 1 concentra las siguientes variables: altura de la planta (AP), largo de hoja (LH), área de la hoja (ÁH), longitud del sépalo externo (LSE), longitud de bractéola (LB), número de nudos (NN) y longitud de entrenudos (LeN), mientras que el componente 2 agrupa al longitud de pedicelo florar (LPF), relación largo-ancho de hoja (R L/A), ancho de hoja (AH) y longitud del pistilo (LPis) y por último, el componente 3 se encuentra la longitud de anteras cortas (LAc), longitud de anteras largas (LAL), longitud de pedicelo florar (LPF), relación largo-ancho de hoja (R L/A) y longitud de entrenudos (LeN).

De estas variables, las que aportan mayor variación al conjunto de datos son la altura de la planta, longitud de hoja, área de hoja, longitud de sépalo externo y longitud del sépalo interno de acuerdo con los vectores propios, así mismo, las variables más informativas además de las ya mencionadas también son el número de nudos, diámetro de tallo, ancho de hoja, longitud de flor, longitud de anteras largas, longitud de sépalo grande y longitud de anteras cortas.

Es distinguible la formación de dos grupos de datos principales: los individuos provenientes de Puebla formando un grupo en la parte izquierda del plano (Fig. 13) y los individuos procedentes de Jalisco, Hidalgo y Michoacán. Sin embargo, aunque se forman estos grupos, hay diferencias entre las observaciones de una población al estar dispersos por todo el gráfico.

Aun así, aunque las observaciones de procedencia de Puebla forman un grupo, solamente 4 de ellas se correlacionan positivamente con los ejes de los Componentes Principales 1 y 2 mientras que el resto solamente se correlaciona positivamente para el eje del Componente 1; de manera similar ocurre con observaciones con procedencia en Jalisco donde se correlacionan de manera positiva para el Componente 2, no es el caso de las observaciones provenientes de Jalisco e Hidalgo donde la mayoría guarda una correlación negativa en ambos componentes, de esta forma no es posible definir una estructura para este conjunto de datos.

Detección de compuestos fitoquímicos.

Una vez obtenidos los extractos metanólicos, se realizó el tamizaje fitoquímico en cada uno para detectar presencia o ausencia de algunos de los principales grupos de metabolitos en plantas, el cual arrojó los siguientes resultados mostrados en el cuadro 5.

CUADRO 5. TAMIZAJE FITOQUÍMICO PARA DETECCIÓN DE FLAVONOIDES, FENOLES, ALCALOIDES Y SAPONINAS.

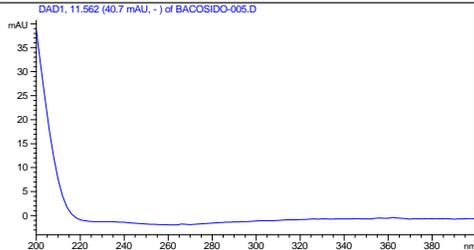
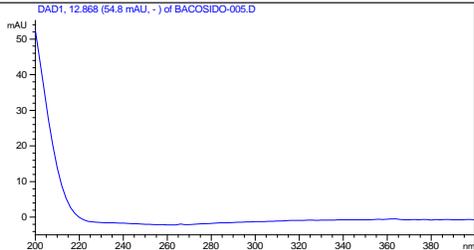
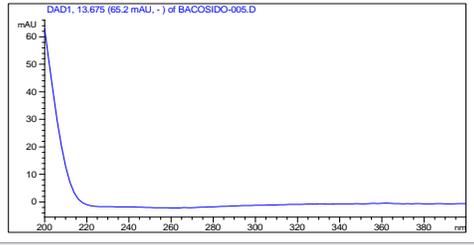
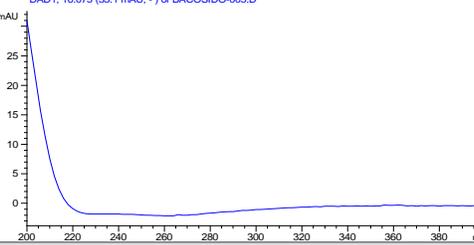
Nombre	Flavonoides	Fenoles	Alcaloides*		Saponinas
<i>BM Hidalgo</i>	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
<i>BM Jalisco</i>	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
<i>BM Puebla</i>	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
<i>BM Michoacán</i>	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)

*PARA EVALUAR LA PRESENCIA DE ALCALOIDES, SE REALIZARON DOS PRUEBAS CON REACTIVOS DISTINTOS, EN LA SECCIÓN DE ALCALOIDES, LA COLUMNA IZQUIERDA CORRESPONDE A LA PRUEBA MAYER, MIENTRAS QUE LA COLUMNA DERECHA A LA PRUEBA DRAGENDORFF.

En el caso específico de las pruebas de detección de alcaloides, se realizan con distintos reactivos debido a la naturaleza de dichos compuestos, la determinación por una sola prueba puede arrojar resultados inconsistentes. De manera general, los ejemplares de cada población evaluada presentan casi todos los principales metabolitos con excepción de las poblaciones de Hidalgo y Jalisco que no contienen ningún tipo de alcaloide.

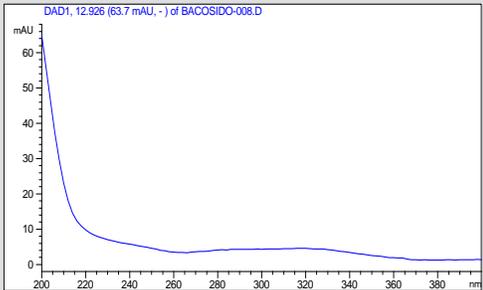
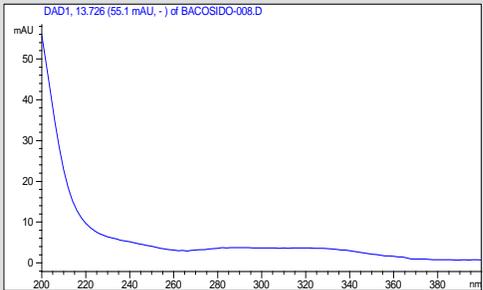
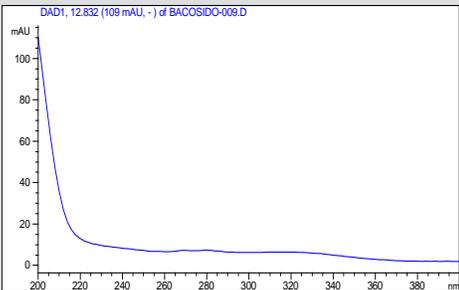
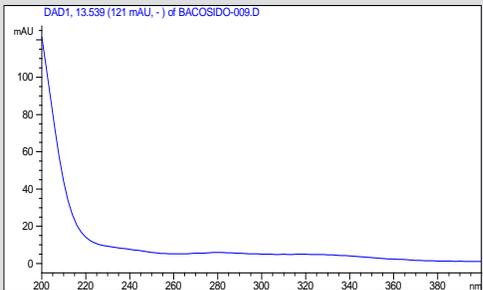
Otro aspecto de este estudio fue la detección de compuestos fitoquímicos, en específico los componentes del bacósido A, metabolito característico de la especie *B. monnieri*, dichos componentes detectados en los extractos problema se encuentran cuantificados en el cuadro 6 y 7.

CUADRO 6. CUANTIFICACIÓN DE COMPONENTES DE BACÓSIDO A DEL ESTÁNDAR (SIGMA-ALDRICH®) – BACÓSIDO A3, BACOPÁSIDO II, BACOPÁSIDO X, BACOPASAPONINA C.

		Bacósido A3	Bacopásido II	
Estándar – mix de bacósido A (Sigma-Aldrich®)	Tiempo de retención (min)	11.53	12.874	
	λ máxima	-	-	
	Espectro UV			
	mg/ml	0.0155	0.0213	
			Bacopásido X	Bacopasaponina C
	Tiempo de retención (min)	13.64	16.065	
	λ máxima	-	-	
	Espectro UV			
	mg/ml	0.0305	0.0125	

*NO SE REGISTRÓ λ MÁXIMA EN NINGUNO DE LOS COMPUESTOS YA QUE EL ESPECTRO UV-VIS DETECTÓ BAJA ABSORCIÓN, ESTO HA SIDO REPORTADO ANTERIORMENTE EN MÉTODOS ANALÍTICOS COMO HPLC Y HPTLC (GANZERA Y COLABORADORES, 2004; MURTHY Y COLABORADORES, 2006).

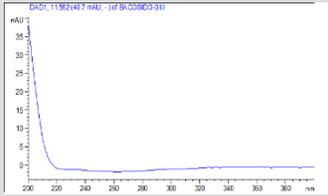
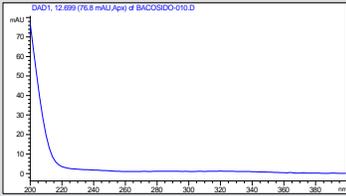
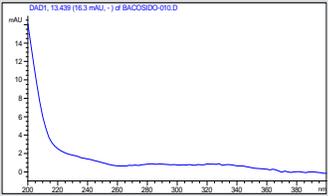
CUADRO 7. CUANTIFICACIÓN DE BACÓSIDOS DETECTADOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE LAS POBLACIONES DE ESTUDIO DE *B. MONNIERI* (HIDALGO, JALISCO Y MICHOACÁN).

		Bacopásido II	Bacopásido X
<i>B. monnieri</i> Hidalgo	Tiempo de retención (min)	12.887	13.698
	λ máxima (nm)	-	-
	Espectro UV		
	mg/ g de peso seco	209	247.58
<i>B. monnieri</i> Jalisco	Tiempo de retención (min)	12.795	13.529
	λ máxima (nm)	-	-
	Espectro UV		
	mg/ g de peso seco	237.75	336.22

<i>B. monnieri Michoacán</i>	Tiempo de retención (min)	12.663	13.37
	λ máxima (nm)	-	-
	Espectro UV	<p style="font-size: small; text-align: center;">DAD1, 12.666 (64.3 mAU, -) of BACOSIDO-011.D</p>	<p style="font-size: small; text-align: center;">DAD1, 13.379 (23.2 mAU, -) of BACOSIDO-011.D</p>
	mg/ g de peso seco	310	100.85

*LOS RESULTADOS CALCULADOS DE CADA UNO DE LOS COMPUESTOS DEL BACÓSIDO A ESTÁN EXPRESADOS EN MILIGRAMOS POR CADA GRAMO DE PESO SECO DE *B. MONNIERI* CON EL QUE SE ELABORÓ EL EXTRACTO CRUDO PARA CADA MUESTRA PROBLEMA.

CUADRO 8. CUANTIFICACIÓN DE BACÓSIDOS DETECTADOS EN EXTRACTO METANÓLICO DE *B. MONNIERI* PROCEDENTE DE PUEBLA.

		Bacósido A ₃	Bacopásido II	Bacopásido X
<i>B. monnieri</i> Puebla	Tiempo de retención (min)	11.96	12.7	13.408
	λ máxima (nm)	-	-	-
	Espectro UV			
	mg/g de peso seco	112.50	270.31	15.54

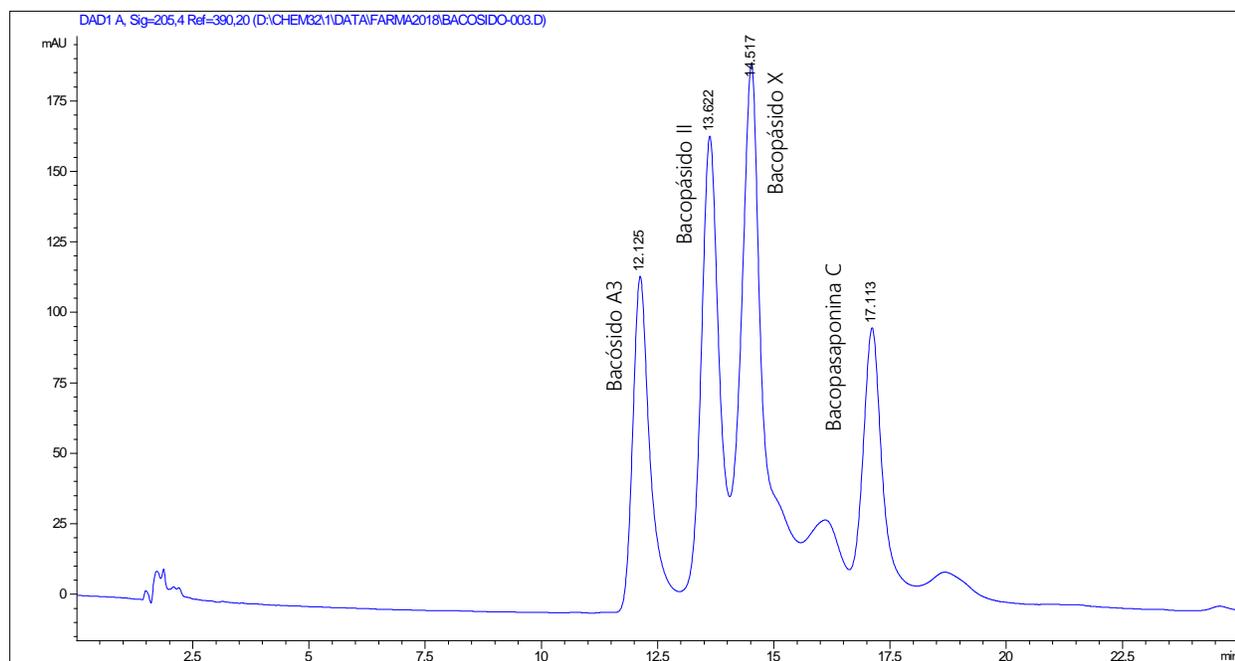


FIG. 14. CROMATOGRAMA DE MIX DE BACÓSIDO A (ESTÁNDAR) – BACÓSIDO A₃, BACOPÁSIDO II, BACOPÁSIDO X Y BACOPASAPONINCA C – POR HPLC.

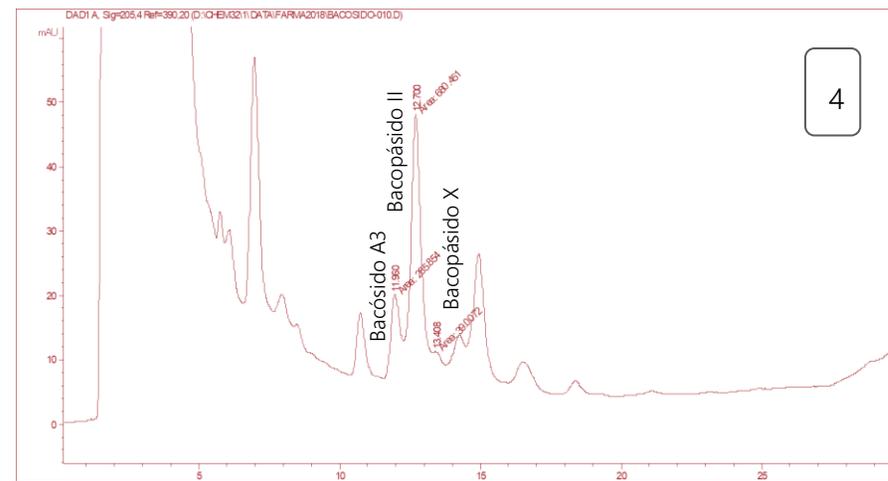
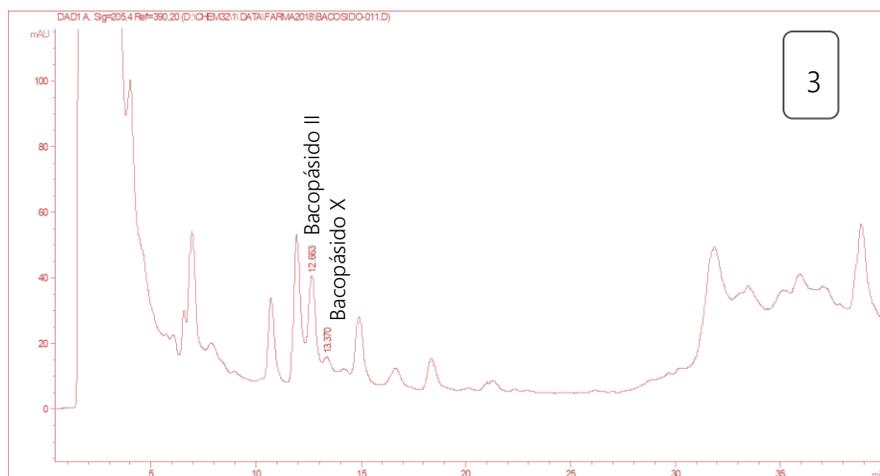
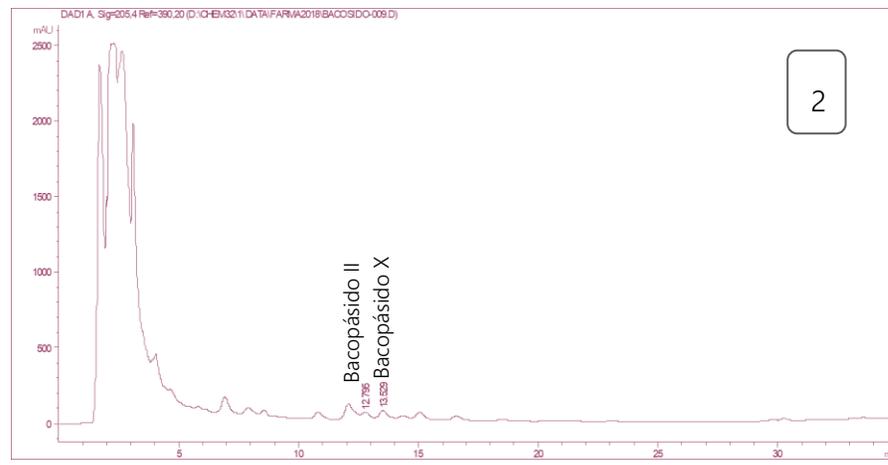
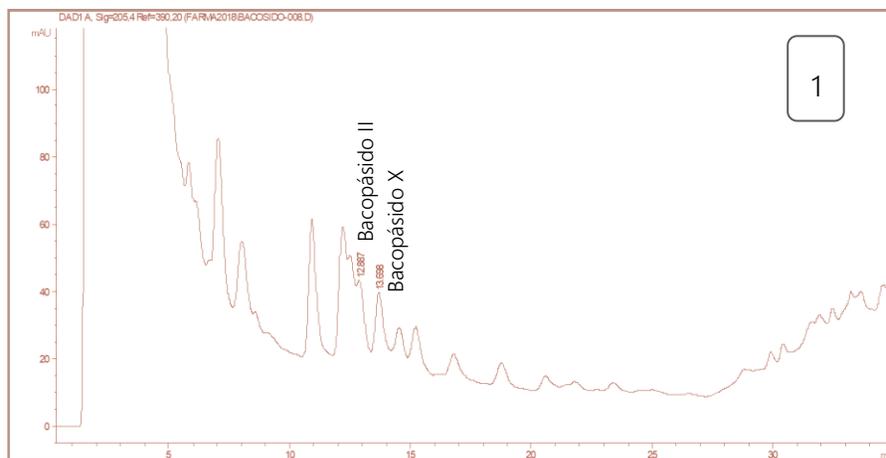


Fig. 15 – 18. CROMATOGRAMAS DE LOS EXTRACTOS CRUDOS METANÓLICOS DE *B. MONNIERI*. 1. *B. MONNIERI* HIDALGO – DETECCIÓN DE BACOPÁSIDO II Y BACOPÁSIDO X; 2. *B. MONNIERI* JALISCO – DETECCIÓN DE BACOPÁSIDO II Y BACOPÁSIDO X; 3. *B. MONNIERI* MICHOACÁN – DETECCIÓN DE BACOPÁSIDO II Y BACOPÁSIDO X; 4. *BACOPA MONNIERI* PUEBLA – DETECCIÓN DE BACÓSIDO A3, BACOPÁSIDO II Y BACOPÁSIDO X.

CUADRO 9. CUANTIFICACIÓN DE BACÓSIDOS DETECTADOS Y PORCENTAJE TOTAL RESPECTO AL PESO SECO (PS) EN LAS POBLACIONES DE ESTUDIO.

Población	Bacósido A (mg/g de peso seco)				Peso seco (PS) (g)	% de bacósido A respecto a PS
	Bacósido A3	Bacopásido II	Bacopásido X	TOTAL		
BM Hidalgo		209	247.58	456.58	6.2	7.36
BM Jalisco		237.75	336.22	573.97	3.1	5.85
BM Puebla	112.50	270.31	15.54	398.35	7.9	5.04
BM Michoacán		310	100.85	410.85	7.9	5.20

*LOS VALORES ESTÁN EXPRESADOS EN MG/G DE PESO SECO OBTENIDO DE CADA EXTRACTO ELABORADO PARA CADA POBLACIÓN DE ESTUDIO.

En general, se detectaron tres de los cuatro compuestos del bacósido A en los extractos problema, de los cuales el extracto elaborado a partir de los individuos de *B. monnieri* provenientes de Puebla presenta bacósido A3, bacopásido II y bacopásido X, no obstante, el extracto hecho a partir de individuos de *B. monnieri* de Jalisco presentan mayor concentración total del bacósido A respecto al resto de los extractos obtenidos.

Por otra parte, el mayor porcentaje de bacósido A respecto al peso seco obtenido de cada extracto es el del extracto elaborado a partir de individuos de *B. monnieri* de Hidalgo en comparación al resto de los extractos, lo que representa un mayor rendimiento respecto al extracto crudo.

Discusión

Identificación, predicción de estructura secundaria y alineamiento de secuencias.

Se logró identificar a nivel específico los individuos de las poblaciones de *B. monnieri* utilizados para este estudio, a través de claves taxonómicas de la familia (determinados por el Herbario IZTA), así como por marcadores moleculares utilizados en el *barcoding* de plantas. Aunque por sí misma la base de datos de NCBI® no es una autoridad taxonómica, el empleo de dichos marcadores moleculares facilitó la identificación de los individuos, especialmente porque la especie en cuestión supone dificultades en algunos caracteres morfológicos para diferenciar entre especies del género *Bacopa*.

Es por ello por lo que además de la utilización de la combinación de marcadores moleculares *rbcl* + *matK* + ITS2 se llevó a cabo un análisis más profundo de este último ya que aporta mucha más información respecto a la filogenia de un grupo de datos, no solamente esto, sino que en el caso particular de plantas medicinales esta técnica provee una autenticación confiable y robusta de acuerdo con estudios como el realizado por Zhang y colaboradores (2015) y Chen y colaboradores (2010).

Tal como postulan Ogden y Rosenber (2006), Höhl y Ragan (2007) y Mugridge y colaboradores (2013) la calidad del alineamiento depende de la calidad inicial de las secuencias y, por lo tanto, esto influye en la calidad del árbol filogenético que se genere a partir de ello. En el presente estudio la discriminación entre especies fue efectiva y esto se ve reflejado tanto en la topología de los árboles filogenéticos (figura 10 y 11). Sin embargo, debido a que se utilizaron primers universales para este estudio, la calidad inicial de las secuencias es relativamente baja, algunos autores sugieren el empleo de más loci para que la autenticación del *barcoding* sea aún más confiable, pero esto supone una mayor utilización tanto de recursos económicos y recurso humano para su análisis, por lo que en sustitución al empleo de más loci se sugiere que para el estudio de *B. monnieri* sean diseñados primers específicos para esta región y se estandarice el análisis de la estructura secundaria del ITS2, no solamente por la reducción de recursos sino porque arroja información importante de la filogenia y supone un método efectivo en la autenticación de la especie (por ser medicinal).

Esto se ha visto también en estudios como el publicado por Zhang y colaboradores (2015) que a través del uso del *barcoding* con ITS2 se logra distinguir entre especies de una planta medicinal denominada “Mu Tong” por estar estrechamente relacionadas en la escala filogenética, y que el análisis de la estructura secundaria se considere como un complemento necesario en los análisis de *barcoding* de especies vegetales, en especial de aquellas consideradas medicinales.

A su vez, en el estudio publicado por Tungphatthong y colaboradores (2018) coincide en que la utilización de la región del ITS permite distinguir entre las especies ya que para el género *Bacopa* es especialmente difícil distinguir entre especies como *B. floribunda* y *B. caroliniana* de manera visual lo cual resulta confuso durante la identificación, además recordando que *B. monnieri* es medicinal y *B. floribunda* y *B. caroliniana* no lo son, por lo que la autenticación es clave y fundamental para asegurar la calidad terapéutica a los consumidores.

Otro aspecto que considerar es la ausencia de CBCs (Compensatory Base Changes, por siglas en inglés y que al español se traduce como Cambios de Base Compensatorios) y de hemi CBCs (hCBCs), en términos del concepto la presencia de CBCs en el transcrito de RNA e implica una mutación ocurrida en ambos nucleótidos emparejados en una posición estructural mientras se retiene el enlace nucleotídico (por ejemplo, G – C muta a A – U), mientras que el hCBCs es la mutación de un solo nucleótido emparejado con el complementario en una posición estructural mientras mantiene el enlace nucleotídico (por ejemplo, G – C muta a G – U) (Gutell, Larse, y Woese, 1994). Esto es relevante porque según Wolf y colaboradores (2013), existe una correlación entre los CBCs y el concepto de especie biológica en organismos eucariontes (al menos, animales y vegetales), si existe incluso un CBC entonces hay dos especies diferentes con una probabilidad de ~ 0.93 , si no se detecta un CBC entonces es la misma especie con una probabilidad de ~ 0.76 (lo cual no necesariamente significa una relación causal), por lo que ausencia de CBCs y hemi CBCs en las estructuras secundarias de los individuos con procedencia de Jalisco, Michoacán, Puebla e Hidalgo y la estructura consenso con procedencia en La India de *B. monnieri* indica una baja probabilidad de ser una especie diferente a la cual fue identificada.

Variación en caracteres vegetativos y reproductivos intra y entre poblaciones de *B. monnieri* de este estudio.

De acuerdo con el APC, los componentes principales están reflejando de cierta manera el comportamiento del crecimiento de la planta y los diferentes órganos. Así mismo, a partir del APC permitió el alineamiento de dos grupos (figura 12), por un lado, el grupo 1 (señalado en color morado) son únicamente observaciones provenientes de Puebla y los cuales se caracterizan en tener una mayor proporción tanto en los órganos vegetativos (tallos, hojas y número de nudos y distancia entre los nudos) así como flores más grandes. Mientras que el grupo 2 (señalado en color naranja) incorpora a las observaciones de Hidalgo, Michoacán y Jalisco, donde se presentan flores y órganos vegetativos más pequeños, para el caso de Jalisco, algunas de las observaciones presentaron los pedúnculos más grandes que el resto (incluso mayores que los individuos con procedencia en Puebla).

Al comparar las accesiones evaluadas con las características de cada uno de los sitios de colecta se encuentra lo siguiente: los individuos colectados en el sitio de Puebla se encuentran en la Sierra Madre del Sur, el clima registrado es semiseco templado y la vegetación dominante es el matorral xerófilo según datos del INEGI (2010), a su vez de acuerdo con la clasificación de Challenger y Soberón (2008), esta especie forma parte de la ecorregión de las Sierras Templadas en la Sierra Madre del Sur. Para los individuos colectados en Hidalgo, estos se encuentran dentro del Eje Neovolcánico (subprovincia Llanuras de Hidalgo) en clima semiseco cálido donde la vegetación dominante es el matorral xerófilo, a su vez los individuos colectados en Michoacán se encuentran también dentro del Eje Neovolcánico (subprovincia Bajíos Michoacanos), en clima templado subhúmedo y la vegetación dominante es el bosque tropical caducifolio y por último, los individuos colectados en el sitio de Jalisco se encuentra en el Eje Neovolcánico (subprovincia Chapala), en clima semicálido subhúmedo y la vegetación dominante es el bosque tropical caducifolio, datos también de INEGI (2010) y de acuerdo con la clasificación de Challenger y Soberón (2008), todas estas poblaciones colectadas se encuentran en las Sierras Templadas del Sistema Neovolcánico Transversal. De manera general, las accesiones colectadas se agrupan no solo por características morfológicas similares, sino por zonas climáticas y ecorregiones similares.

Cabe destacar que, aunque no está incluido en el grupo de datos, las observaciones con procedencia en Puebla son aquellas que detectó presencia de bacósido A3, el cual se ha mencionado anteriormente, es el compuesto más activo y el de mayor interés comercial. En el estudio realizado por Mathur y colaboradores (2003), al llevar a cabo un APC en un grupo de datos tanto morfológicos como fitoquímicos (porcentaje de bacósido A) encuentran una relación entre la producción de bacósidos y las proporciones de los caracteres: aquellas accesiones que presentaban valores promedio relativamente más altos muestran menor expresión de bacósido A –accesiones con hojas y tallos grandes, así como órganos vegetativos de mayor tamaño relativo–, mientras que las accesiones que tuvieron valores promedio más bajos presentaron mayor expresión en la producción de bacósido A. Aunque no es una relación causal, estos datos son completamente opuestos a lo observado en este estudio: el grupo 1 (fig. 13, señalado en color morado) el cual se ha señalado pertenece a observaciones únicamente provenientes de Puebla fueron aquellos que se detectó presencia del compuesto activo bacósido A3 y para los cuales se encontró valores promedios superiores respecto al resto de las observaciones, es decir, los individuos de esta población presentaron hojas y tallos más grandes así como flores más grandes respecto al resto de las poblaciones del estudio. Los mismos autores explican que estas diferencias podrían estar relacionadas a los genotipos se encuentran sometida a presiones de selección dentro de los ambientes en los que se le asocia, en su mayoría cuencas –estanques, canales, ríos y otros tipos de cuerpos de agua– y que estos genotipos mantienen interacciones con los microambientes en donde se asienta la población. De esta forma, cada una de las poblaciones responde a cada microambiente en donde se encuentra y con los factores bióticos y abióticos propios.

A diferencia de estudios realizados por Mathur y colaboradores (2003) y Tripathi y colaboradores (2012) en donde encuentran discrepancias entre los factores ambientales y las características morfológicas, ambos coinciden en que las características morfológicas no necesariamente dictan las relaciones genéticas entre las poblaciones, en especial porque las accesiones evaluadas en los estudios en La India son aquellas ya tipificadas como genotipos que son reconocidas como un cultivo y que son propagadas de manera vegetativa, contrario a las accesiones evaluadas en este estudio las cuales son silvestres y no han sido manipuladas

bajo selección artificial, procesos como polinización abierta, selección indirecta, deriva genética aleatoria, fragmentación del hábitat, aislamiento de la población o cambios en la distribución pueden estar operando. Como es observable, las diferencias estadísticamente significativas especialmente en los rasgos vegetativos en la especie modelo resultan responder a los cambios asociados a las condiciones ambientales que operan constantemente, existen muchos estudios sobre aspectos de condiciones ambientales vs rasgos morfológicos, aunque son escasos en la especie modelo, esta interrogante no ha sido del todo esclarecida ya que aún no es clara la asociación entre la producción de los metabolitos de importancia comercial (bacósido A) en los genotipos o poblaciones élite y las condiciones ambientales en los cuales estos se encuentran inmersos.

Sin embargo, por las diferencias observadas tanto en rasgos vegetativos y reproductivos entre e intra-poblaciones, también se sugiere que la identificación de la especie *B. monnieri* sea a través de marcadores moleculares, esto debido a que los rasgos vegetativos (al menos en las accesiones tomadas en cuenta en este estudio), son variables y la identificación visual puede resultar confusa, además los periodos de floración no son del todo establecidos (en épocas del año específicas), esto ha sido enfatizado por múltiples estudios citados anteriormente que utilizaron el mismo modelo biológico, Tripathi y colaboradores (2012), Mathur y colaboradores (2003), Christopher y colaboradores (2017).

Aun así, el estudio de los rasgos morfológicos sienta un precedente para el estudio de las relaciones genéticas entre las poblaciones de la especie *B. monnieri* e incluso de otras poblaciones distribuidas en condiciones ambientales que contrasten con las observadas en este estudio.

Detección de bacósido A en poblaciones silvestres de *B. monnieri* dentro de este estudio.

El compuesto detectado en este estudio aporta información muy importante para las poblaciones de la especie distribuidas en México, ya que los datos obtenidos contrastan respecto a extractos evaluados provenientes de poblaciones silvestres y cultivadas de regiones

en La India, donde se han estudiado y tomado en cuenta parámetros agroclimáticos, genotipos élite o incluso periodos estacionales.

Para el presente estudio, el parámetro de colecta fue el estadio fisiológico de la floración, donde a pesar de estar en el mismo momento fisiológico existen diferencias en la concentración de bacósido A, así como en la presencia de los elementos del compuesto. De acuerdo con autores como Christopher y colaboradores (2017) y Bansal, Reddy y Kumar (2016) las diferencias en la concentración y presencia de bacósido A pueden estar relacionadas más bien por diferencias en genotipos y no a diferencias a condiciones agroclimáticas donde se puedan encontrar las poblaciones, es decir, los rasgos genotipo/quimiotipo son factores críticos para la biosíntesis de bacósidos. Otro elemento encontrado en el tamizaje fitoquímico (cuadro 5) es la presencia o ausencia de ciertos metabolitos en cada población de este estudio, de esta forma reforzando la premisa de que cada una posee un perfil bioquímico distinto de manera general. Aun así, todavía no es del todo clara la razón por la cual la concentración del bacósido A sea fluctuante entre poblaciones, de acuerdo con Gupta y colaboradores (2017) se sugiere que la producción de este metabolito puede ser mediada incluso a través de la introducción de algunos parásitos (en específico de *Meloidogyne incógnita*) sugiriendo así que la síntesis de este metabolito en particular respondería a estímulos biológicos, a la interacción que tiene con algunos herbívoros y patógenos que podrían atacar a la planta en el medio silvestre.

Otro aspecto por considerar dentro de este estudio, son las concentraciones calculadas. Łojewski y colaboradores (2016), reporta una concentración total de bacósido A en biomasa de cultivos *in vitro* de 26.8 mg/g de peso seco (PS), Gupta y colaboradores (2017) encuentran una concentración total de 14 mg/g de PS de bacósido A, mientras que Christopher y colaboradores (2017), encuentran una concentración total de bacósido A de 5.4% respecto al peso seco, todos los estudios anteriormente mencionados fueron llevados a cabo en accesiones distribuidas en La India. Para los extractos evaluados (cuadro 5), la máxima concentración se encuentra en el extracto elaborado de individuos de *B. monnieri* de Jalisco con un total de 573.97 mg/g de PS, lo que significa 21.41 veces superior a lo reportado por Łojewski y colaboradores (2016) y 40.9 veces superior a la concentración calculada en el estudio de Gupta y colaboradores (2017),

mientras que el mayor porcentaje de bacósido A respecto al PS para este estudio se halló en el extracto elaborado a partir de individuos de *B. monnieri* de Hidalgo de 7.36%, lo que representaría 1.36 veces superior al reportado por Christopher y colaboradores (2017). Estas aseveraciones son relativas ya que las técnicas de extracción de bacósido A fueron distintas y están reportadas de acuerdo con dicha técnica. Aun así, se sugiere realizar repeticiones para los extractos evaluados dentro de este estudio y analizar la varianza que se pueda encontrar.

Por último, es importante mencionar que, aunque el bacósido A₃ no se encontró en todos los extractos (el cuál se ha postulado que es el biológicamente más activo y por lo tanto el de mayor interés comercial), el resto de los componentes – Bacopásido II, Bacopásido X, Bacopasaponina C – juegan un rol importante con respecto a los efectos farmacológicos atribuidos a *B. monnieri*, de acuerdo con Ramasamy y colaboradores (2015) los *componentes parentales* (denominados así los componentes del bacósido A anteriormente mencionados) son metabolizados *in vivo* en formas activas previo a ejercer sus actividades farmacológicas, esto a través de una deglicosilación secuencial mediante el cual el bacósido A₃, bacopásido II, bacopásido X y la bacopasaponina C se pueden transformar en agliconas (jujubogenina y pseudojujubogenina) que a su vez se pueden hidrolizar adicionalmente para formar ebelina lactona y bacogenina A1, respectivamente. Al estar en forma de agliconas, presentan mejor actividad y apareamiento espacial en receptores asociados a enfermedades como el Alzheimer y otras demencias en tejidos cerebrales, así como en su absorción a través del intestino delgado (por su menor peso molecular respecto a los compuestos parentales). Por lo que, aunque el bacósido A₃, el compuesto parental de mayor interés comercial, el resto de los componentes del bacósido A aún siguen siendo farmacológicamente activos.

Este estudio sienta un precedente en la detección de compuestos fitoquímicos específicos de *B. monnieri* en poblaciones silvestres en México, y no solo ello sino también un primer reporte de presencia y concentración de los componentes de bacósido A en extractos metanólicos para poblaciones de México.

Conclusiones.

La identificación por marcadores moleculares (*rbcl*, *matK* e ITS2) fue exitosa, además con la estructura secundaria del ITS2 es posible identificar y clasificar por cada sitio de procedencia, por lo cual se sugiere utilizar esta técnica para la identificación eficaz y precisa de ejemplares de *B. monnieri*.

El Análisis de Componentes Principales (ACP) separa en dos grupos por el tamaño registrado tanto en órganos vegetativos y reproductivos, siendo los ejemplares con procedencia en Puebla que presentan tallos, hojas y flores más grandes y que se asientan en la ecorregión de las Sierras Templadas de la Sierra Madre del Sur, mientras que los ejemplares con procedencia en Michoacán, Hidalgo y Jalisco presentan tallos, hojas y flores más pequeñas y que se asientan en la ecorregión de las Sierras Templadas del Sistema Neovolcánico Transversal, esto podría resultar útil en el estudio de la relación que guardan los posibles genotipos de la especie *B. monnieri* y las características ambientales donde se asientan las poblaciones de México.

Por último, se detectaron algunos de los componentes del bacósido A en todos los extractos crudos elaborados a partir de las poblaciones de estudio, de los cuales el extracto crudo elaborado con individuos con procedencia en Puebla se detectó el bacósido A₃, el cual es de mayor interés comercial y el cual se sugiere puede ser usado como planta medicinal.

Bibliografía.

- Abhishek, M., Verma, S. K., Reena, P., Singh, S. K., Deepika, M., Prasad, G. B. K. S., & Dua, V. K. 2010. Pharmacological investigation of *Bacopa monnieri* on the basis of antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory properties. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2(6), 191-198.
- Adams, M., Gmünder, F., & Hamburger, M. 2007. Plants traditionally used in age related brain disorders—A survey of ethnobotanical literature. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(3), 363-381.
- Agrawal, H., Kaul, N., Paradkar, A. R., & Mahadik, K. R. 2006. Separation of bacoside A~ 3 and bacopaside II, major triterpenoid saponins in *Bacopa monnieri*, by HPTLC and SFC. Application of SFC in implementation of uniform design for herbal drug standardization, with thermodynamic study. *Acta Chromatographica*, 17, 125.
- Albach, D. C., Meudt, H. M., & Oxelman, B. (2005). Piecing together the "new" Plantaginaceae. *American Journal of Botany*, 92(2), 297-315.
- Bansal, M., Reddy, M. S., & Kumar, A. 2016. Seasonal variations in harvest index and bacoside A contents amongst accessions of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. collected from wild populations. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 22(3), 407-413.
- Barrett, S. C., & Strother, J. L. 1978. Taxonomy and natural history of *Bacopa* (Scrophulariaceae) in California. *Systematic Botany*, 408-419.
- Bhandari, P., Kumar, N., Singh, B., & Kaul, V. K. 2007. Cucurbitacins from *Bacopa monnieri*. *Phytochemistry*, 68(9), 1248-1254.
- Bodeker, C., et al. (2005). WHO global atlas of traditional, complementary and alternative medicine 2. *World Health Organization*
- Calderón, G. y Rzedowski, J. 2005. *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2da. Ed., Instituto de Ecología A.C y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán), 677-678 p.
- CBOL Plant Working Group, Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., Spouge, J. L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., ... & Fazekas, A. J. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 12794-12797.
- Challenger, A., y J. Soberón. 2008. Los ecosistemas terrestres, en *Capital natural de México*, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp. 87-108.
- Chase, M. W., Christenhusz, M. J. M., Fay, M. F., Byng, J. W., Judd, W. S., Soltis, D. E., ... & Stevens, P. F. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1), 1-20.
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., ... & Luo, K. 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PloS one*, 5(1), e8613.

- Christopher, C., Johnson, A. J., Mathew, P. J., & Baby, S. 2017. Elite genotypes of *Bacopa monnieri*, with high contents of Bacoside A and Bacopaside I, from southern Western Ghats in India. *Industrial Crops and Products*, 98, 76-81.
- Coleman, A. W. (2007). Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure. *Nucleic acids research*, 35(10), 3322-3329.
- Deepak, M., & Amit, A. 2004. The need for establishing identities of 'bacoside A and B', the putative major bioactive saponins of Indian medicinal plant *Bacopa monnieri*. *Phytomedicine*, 11(2-3), 264-268.
- Deepak, M., Sangli, G. K., Arun, P. C., & Amit, A. 2005. Quantitative determination of the major saponin mixture bacoside A in *Bacopa monnieri* by HPLC. *Phytochemical Analysis*, 16(1), 24-29.
- Del Amo, S., 1979. Plantas medicinales del estado de Veracruz. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos (INIREB). Xalapa, Veracruz.
- Doveri, S., Maheswaran, M., Powell, W. 2008. Molecular markers – history, features and applications. In: Kole C, Abbott AG (eds) Principles and Practices of Plant Genomics. Vol 1: *Genome Mapping*. Science Publishers, Enfield, Jersey, Plymouth.
- Duke, J. A. 2008. Duke's handbook of medicinal plants of Latin America. *CRC Press*. 86-87 p.
- Ganzera, M., Gampenrieder, J., Pawar, R. S., Khan, I. A., & Stuppner, H. 2004. Separation of the major triterpenoid saponins in *Bacopa monnieri* by high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 516(1-2), 149-154.
- Global Biodiversity Information Facility. 2018. *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. in GBIF Secretariat. GBIF Backbone Taxonomy. Recuperado en: <https://doi.org/10.15468/39omei>.
- Goertzen, L. R., Cannone, J. J., Gutell, R. R., & Jansen, R. K. 2003. ITS secondary structure derived from comparative analysis: implications for sequence alignment and phylogeny of the Asteraceae. *Molecular phylogenetics and evolution*, 29(2), 216-234.
- Gutell, R. R., Larsen, N., & Woese, C. R. 1994. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 58(1), 10-26.
- Hajibabaei, M., Singer, G. A., Hebert, P. D., & Hickey, D. A. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *TRENDS in Genetics*, 23(4), 167-172.
- Hayward, A. C., Tollenaere, R., Dalton-Morgan, J., & Batley, J. 2015. Molecular marker applications in plants. In *Plant Genotyping* (pp. 13-27). Humana Press, New York, NY.
- Hilu, K. W., Borsch, T., Müller, K., Soltis, D. E., Soltis, P. S., Savolainen, V., ... & Sauquet, H. (2003). Angiosperm phylogeny based on *matK* sequence information. *American Journal of Botany*, 90(12), 1758-1776.

- Hosamani, R., Krishna, G., & Muralidhara. 2016. Standardized *Bacopa monnieri* extract ameliorates acute paraquat-induced oxidative stress, and neurotoxicity in prepubertal mice brain. *Nutritional neuroscience*, 19(10), 434-446.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía, INEGI. 2010. Compendio de Información Geográfica Municipal – Tecozautla; Zapotitlán; Zinapécuaro; Tuxcueca. Recuperado en: <http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/topografia/compendio.aspx>
- Jones, N., Ougham, H., & Thomas, H. 1997. Markers and mapping: we are all geneticists now. *The New Phytologist*, 137(1), 165-177.
- Keller, A., Schleicher, T., Schultz, J., Müller, T., Dandekar, T., & Wolf, M. (2009). 5.8 S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation. *Gene*, 430(1-2), 50-57.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- Kordrostami, M., & Rahimi, M. 2015. Molecular markers in plants: concepts and applications. *G3M*, 13, 4024-4031.
- Kress, W. J., & Erickson, D. L. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcl* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS one*, 2(6), e508.
- Krishnamurthy, P. K., & Francis, R. A. 2012. A critical review on the utility of DNA barcoding in biodiversity conservation. *Biodiversity and conservation*, 21(8), 1901-1919.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.
- Lansdown, R.V., Knees, S.G. & Patzelt, A. 2013. *Bacopa monnieri*. The IUCN Red List 2013. Recuperado en: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T164168A17722668.en>.
- Lot H., A., y A. Novelo R. 1988. Vegetación y flora acuática del Lago de Pátzcuaro; Michoacán, México. *Southwestern Naturalist* 33(2): 167-175.
- Łojewski, M., Krakowska, A., Reczynski, W., & Szewczyk, Agnieszka & Muszynska, Bozena. 2016. Analysis of elements and bacosides in vitro shoot culture of *Bacopa monnieri*. *Acta Physiologiae Plantarum*. 38. 10.1007/s11738-016-2182-y.
- Mannan, A., Abir, A. B., & Rahman, R. 2015. Antidepressant-like effects of methanolic extract of *Bacopa monnieri* in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 337.
- Manyam, B. V. 1999. Dementia in ayurveda. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 5(1), 81-88.
- Marcano, D., & Hasegawa, M. 2002. Fitoquímica Orgánica (Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico). Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. 54-57 p.
- Mathur, S., Sharma, S., Gupta, M. M., & Kumar, S. 2003. Evaluation of an Indian germplasm collection of the medicinal plant *Bacopa monnieri* (L.) Pennell by use of multivariate approaches. *Euphytica*, 133(3), 255-265.

- Medicinal Plant Names Services. 2017. Kew: Royal Botanic Gardens. Recuperado en: <http://mpns.kew.org/mpns-portal/searchName?>
- Mondal, S. K., Shit, S., & Kundu, S. 2013. A comparative computational study of the 'rbcL' gene in plants and in the three prokaryotic families—Archaea, cyanobacteria and proteobacteria. *Indian Journal of Biotechnology*, 12, 58-66.
- Murthy, P. B. S., Raju, V. R., Ramakrisana, T., Chakravarthy, M. S., Kumar, K. V., Kannababu, S., & Subbaraju, G. V. 2006. Estimation of twelve bacopa saponins in Bacopa monnieri extracts and formulations by high-performance liquid chromatography. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 54(6), 907-911.
- Muszyńska, B., Łojewski, M., Sułkowska-Ziaja, K., Szewczyk, A., Gdula-Argasińska, J., & Hałaszuk, P. 2016. In vitro cultures of Bacopa monnieri and an analysis of selected groups of biologically active metabolites in their biomass. *Pharmaceutical biology*, 54(11), 2443-2453.
- Olmstead, R. G., Wolfe, A. D., Young, N. D., Elisons, W. J., & Reeves, P. A. 2001. Disintegration of the Scrophulariaceae. *American Journal of Botany*, 88(2), 348-361.
- Rajan, K. E., Preethi, J., & Singh, H. K. 2015. Molecular and functional characterization of Bacopa monniera: a retrospective review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015.
- Ramasamy, S., Chin, S. P., Sukumaran, S. D., Buckle, M. J. C., Kiew, L. V., & Chung, L. Y. 2015. In silico and in vitro analysis of bacoside A aglycones and its derivatives as the constituents responsible for the cognitive effects of Bacopa monnieri. *PloS one*, 10(5), e0126565.
- Ronquist, F., and J.P. Huelsenbeck. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574
- Roodenrys, S., Booth, D., Bulzomi, S., Phipps, A., Micallef, C., & Smoker, J. 2002. Chronic effects of Brahmi (Bacopa monnieri) on human memory. *Neuropsychopharmacology*, 27(2), 279.
- Roshni, L. S., Gangaprasad, A., & Siril, E. A. 2014. Evaluation of variability in Bacopa monnieri (L.) Pennell using morphological and biochemical markers. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 7(2), 25-31.
- Russo, A., & Borrelli, F. 2005. Bacopa monniera, a reputed nootropic plant: an overview. *Phytomedicine*, 12(4), 305-317.
- Rzedowski, J., & Huerta, L. 1978. Vegetación de México (Vol. 432). México: Limusa.
- Rzedowski, J., Zamudio, S., Calderón de Rzedowski, G. y Paizanni, A. 2014. Flora del Bajío y regiones adyacentes. *America*, 20, 107-135.
- Saitou N. and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Salazar-Rojas, V. M., Herrera-Cabrera, B. E., Soto-Arenas, M. Á., & Castillo-González, F. 2010. Morphological variation in Laelia anceps subsp. dawsonii f. chilapensis Soto-Arenas

- Orchidaceae in traditional home gardens of Chilapa, Guerrero, Mexico. *Genetic resources and crop evolution*, 57(4), 543-552.
- Sánchez-Blanco, J., & Guevara-Féfer, F. 2013. Plantas arvenses asociadas a cultivos de maíz de temporal en suelos salinos de la ribera del lago de Cuitzeo, Michoacán, México. *Acta botánica mexicana*, (105), 107-129.
- Seibel P. N, Müller T., Dandekar T. y M. Wolf. 2008. Synchronous visual analysis and editing of RNA sequence and secondary structure alignments using 4SALE *BMC Research Notes* 2008, 1:91.
- Sivaramakrishna, C., Rao, C. V., Trimurtulu, G., Vanisree, M., & Subbaraju, G. V. 2005. Triterpenoid glycosides from *Bacopa monnieri*. *Phytochemistry*, 66(23), 2719-2728.
- Sosa, M. D. L. M., Moroni, P. & O'Leary N. 2018. A taxonomic revision of the genus *Bacopa* (Gratiolales, Plantaginaceae) in Argentina. *Phytotaxa*, 336(1), 1-27.
- Srivastava, A., Garg, G., Sharma, P., Shah, N., Sharma, S., & Shrivastava, N. 2016. Genetic diversity in chemically diverse accessions of *Bacopa monnieri*. *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 29(3), 203-208.
- Tripathi, N., Chouhan, D. S., Saini, N., & Tiwari, S. 2012. Assessment of genetic variations among highly endangered medicinal plant *Bacopa monnieri* (L.) from Central India using RAPD and ISSR analysis. *Biotech*, 2(4), 327-336.
- Tropicos. 2017. Missouri Botanical Garden. Recuperado de: [http://www.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=Bacopa+monnieri&commonname =](http://www.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=Bacopa+monnieri&commonname=)
- Tungphatthong, C., Somnuek, J., Phadungcharoen, T., Ingkaninan, K., Denduangboripant, J., & Sukrong, S. 2018. DNA barcoding of species of *Bacopa* coupled with high-resolution melting analysis. *Genome*, 61(12), 867-877.
- Varnham, K. 2006. Non-native species in UK Overseas Territories: a review. JNCC Report No. 372.
- Villaseñor R., J.L. & F.J. Espinosa G. 1998. Catálogo de Malezas de México. México: UNAM-Fondo de Cultura Económica. 449 pp.
- Villaseñor, J. L. 2016. Catálogo de las plantas vasculares nativas de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(3), 559-902.
- Williams, P., Sorribas, A., & Howes, M. J. R. 2011. Natural products as a source of Alzheimer's drug leads. *Natural product reports*, 28(1), 48-77.
- Winter, P., & Kahl, G. 1995. Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(4), 438-448.
- Wolf, M., Chen, S., Song, J., Ankenbrand, M., & Müller, T. 2013. Compensatory base changes in ITS2 secondary structures correlate with the biological species concept despite intragenomic variability in ITS2 sequences—a proof of concept. *PloS one*, 8(6), e66726.

- World Health Organization. 2014. WHO Traditional Medicine Strategy 2014–2023. Recuperado en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/92455/1/9789241506090_eng.pdf?ua=1;
- World Health Organization. 2016. Global Health Estimates 2015: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000–2015. Geneva, World Health Organization. Recuperado en: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates_regional/en/
- Yao, H., Song, J., Liu, C., Luo, K., Han, J., Li, Y., ... & Chen, S. 2010. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PloS one*, 5(10), e13102.
- Zhang, W., Yuan, Y., Yang, S., Huang, J., & Huang, L. 2015. ITS2 secondary structure improves discrimination between medicinal “Mu Tong” species when using DNA barcoding. *PloS one*, 10(7), e0131185.
- Zhang, X., Xu, Z., Pei, H., Chen, Z., Tan, X., Hu, J., ... & Sun, J. 2017. Intraspecific variation and phylogenetic relationships are revealed by ITS1 secondary structure analysis and single-nucleotide polymorphism in *Ganoderma lucidum*. *PloS one*, 12(1), e0169042.

Anexos.

1. Identificación de la especie *B. monnieri*.

1.1. Matriz de datos de CBCs.

Sequences	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 42741890_Otacanthus_sp__Albach_ex_BG_Bonn	2	2	4	4	4	4	4	4	4	1	1	0	3	
2 42741895_Stemodia_durantifolia	0	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0	
3 42741886_Mecardonia_procumbens	0	2	2	2	2	2	3	3	3	1	0	0	0	
4 Sequence_1	2	2	0	0	0	0	0	2	2	2	1	1	1	
5 Sequence_2	2	2	0	0	0	0	0	2	2	2	1	1	1	
6 Sequence_3	2	2	0	0	0	0	0	2	2	2	1	1	1	
7 Sequence_4	2	2	0	0	0	0	0	2	2	2	1	1	1	
8 42741870_Bacopa_monnieri	1	3	0	0	0	0	3	3	3	1	1	1	1	
9 149774759_Bacopa_repens	0	3	2	2	2	2	3	0	0	1	2	0	2	
10 149774760_Bacopa_eisenii	0	3	2	2	2	2	3	0	0	1	2	0	2	
11 42741894_Scoparia_dulcis	0	1	2	2	2	2	1	1	1	0	0	0	0	
12 145688012_Gratiola_aurea	0	0	1	1	1	1	1	2	2	0	0	0	1	
13 42741881_Gratiola_officinalis	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	
14 67078982_Gratiola_neglecta	0	0	1	1	1	1	1	2	2	0	1	1	1	

EL CUADRO EN COLOR SEÑALA LA AUSENCIA DE CBCs ENTRE LAS SECUENCIAS PROBLEMA Y LA SECUENCIA CONSENSO. *SEQUENCE_1: BM HIDALGO; SEQUENCE_2: BM JALISCO; SEQUENCE_3: BM PUEBLA; SEQUENCE_4: MICHOACÁN.

2. Marcadores morfológicos y Análisis de Componentes Principales (APC).

2.1. Observaciones de los 17 caracteres morfológicos evaluados por población.

	AP	NN	LeN	LH	AH	DT	ÁH	R/L/A	LPF	LF	LB	LSG	LSE	LSI	Lpis	LAc	LAL
1	4.7	12	0.33333333	0.73333333	0.2	0.2	0.10633333	3.66666667	0.7	0.6	0.15	0.6	0.5	0.3	0.6	0.2	0.5
2	4.3	9	0.36666667	0.86666667	0.3	0.2	0.142	2.88888889	0.3	0.7	0.1	0.8	0.6	0.7	0.5	0.15	0.45
3	7	10	0.93333333	0.8	0.36666667	0.2	0.217	2.18181818	1.05	0.9	0.2	0.85	0.8	0.78	0.61	0.4	0.65
4	7.1	10	1.1	0.8	0.3	0.1	0.16933333	2.66666667	1.48	0.8	0.15	0.81	0.8	0.7	0.68	0.4	0.6
5	8.1	12	0.76666667	0.76666667	0.33333333	0.2	0.185	2.3	1.58	0.9	0.15	0.9	0.7	0.68	0.68	0.4	0.6
6	6.9	15	0.43333333	0.73333333	0.3	0.2	0.12566667	2.44444444	0.5	0.75	0.15	0.9	0.85	0.8	0.65	0.4	0.68
7	8.2	7	1.16666667	0.6	0.3	0.2	0.15266667	2	2.4	0.8	0.2	0.8	0.7	0.68	0.6	0.39	0.5
8	9	8	1.13333333	0.86666667	0.26666667	0.2	0.19966667	3.25	2.6	0.9	0.25	0.8	0.7	0.6	0.6	0.4	0.6
9	9.4	10	1.26666667	0.76666667	0.26666667	0.2	0.19233333	2.875	2.2	0.7	0.22	0.6	0.6	0.6	0.6	0.3	0.5
10	8.4	9	1.06666667	0.8	0.26666667	0.2	0.213	3	2.5	0.9	0.25	0.9	0.7	0.7	0.7	0.38	0.5
11	6.8	7	1.06666667	0.73333333	0.26666667	0.2	0.19666667	2.75	1.5	0.8	0.13	0.7	0.7	0.6	0.4	0.25	0.4
12	13.6	11	1.3	0.93333333	0.33333333	0.2	0.25933333	2.8	2.5	0.8	0.21	0.8	0.7	0.62	0.5	0.31	0.5
13	10.9	6	1.03333333	0.7	0.23333333	0.2	0.1955	3	1.8	0.8	0.22	0.7	0.6	0.5	0.6	0.3	0.4
14	9	10	1.2	0.86666667	0.36666667	0.2	0.243	2.36363636	1.5	0.8	0.2	0.9	0.9	0.8	0.7	0.4	0.7
MEDIA	7.77836587	9.44957019	0.863460918	0.778962249	0.289147257	0.19033903	0.18052069	2.6939984	1.37862355	0.79157885	0.17854134	0.78313753	0.69569375	0.63111543	0.5950955	0.32167666	0.53326092

OBSERVACIONES DE 14 INDIVIDUOS DE LA POBLACIÓN CON PROCEDENCIA EN JALISCO DE *B. MONNIERI*.

	AP	NN	LeN	LH	AH	DT	ÁH	R/L/A	LPF	LF	LB	LSG	LSE	LSI	Lpis	LAc	LAL
1	5.7	13	0.46666667	0.83333333	0.36666667	0.1	0.17233333	2.27272727	0.49	0.52	0.1	0.78	0.65	0.6	0.6	0.4	0.6
2	11.2	10	1.43333333	0.6	0.33333333	0.3	0.11366667	1.8	0.25	0.7	0.3	0.8	0.6	0.58	0.3	0.3	0.4
3	4.1	11	0.3	0.8	0.43333333	0.2	0.2	1.84615385	0.15	0.6	0.2	0.7	0.6	0.6	0.48	0.35	0.49
4	3.5	8	0.6	0.63333333	0.36666667	0.2	0.17133333	1.72727273	0.15	0.7	3	0.8	0.68	0.6	0.5	0.3	0.5
5	7.3	10	0.8	0.7	0.36666667	0.3	0.17933333	1.90909091	0.09	0.8	0.3	0.78	0.6	0.6	0.51	0.4	0.5
6	4.5	12	0.43333333	0.9	0.43333333	0.2	0.351	2.07692308	0.1	0.6	0.35	0.9	0.8	0.75	0.52	0.29	0.5
7	2.5	9	0.26666667	0.86666667	0.4	0.1	0.32233333	2.16666667	0.2	0.7	0.2	0.8	0.7	0.7	0.5	0.3	0.49
8	4.1	12	0.26666667	0.83333333	0.4	0.1	0.216	2.08333333	0.7	0.6	0.4	0.8	0.7	0.71	0.5	0.4	0.53
9	5.8	7	0.9	0.86666667	0.4	0.3	0.25633333	2.16666667	0.2	0.8	0.2	0.74	0.7	0.7	0.5	0.3	0.5
10	2.5	8	0.2	0.76666667	0.33333333	0.2	0.196	2.3	0.2	0.6	0.2	0.7	0.69	0.6	0.5	0.4	0.5
11	3.8	10	0.43333333	0.93333333	0.46666667	0.1	0.32266667	2	0.12	0.68	0.3	0.7	0.65	0.6	0.48	0.4	0.5
12	7.1	13	1	0.66666667	0.36666667	0.2	0.19833333	1.81818182	0.2	0.7	0.2	0.8	0.7	0.69	0.5	0.34	0.6
13	7.8	16	0.56666667	0.96666667	0.43333333	0.3	0.349	2.23076923	0.3	0.6	0.3	0.7	0.7	0.7	0.5	0.4	0.6
14	8	12	0.8	0.83333333	0.4	0.3	0.33633333	2.08333333	0.3	0.7	0.4	0.8	0.8	0.8	0.6	0.4	0.6
MEDIA	5.07557923	10.5342724	0.51973849	0.79226719	0.39100525	0.1896318	0.22929061	2.0262316	0.20883352	0.65970954	0.29799591	0.76945884	0.6809159	0.65591742	0.49400752	0.35253608	0.51906915

OBSERVACIONES DE 14 INDIVIDUOS DE LA POBLACIÓN CON PROCEDENCIA EN HIDALGO DE *B. MONNIERI*.

	AP	NN	LeN	LH	AH	DT	ÁH	R L/A	LPF	LF	LB	LSG	LSE	LSI	Lpis	LAc	LAL
1	20.5	23	1.4	2	0.76666667	0.3	1.144	2.60869565	1.4	0.9	0.5	0.91	0.9	0.89	0.6	0.45	0.63
2	23.3	19	1.43333333	2.06666667	0.76666667	0.3	1.273	2.69565217	1	0.9	0.6	0.9	0.89	0.8	0.57	0.43	0.6
3	22.9	21	1.3	1.93333333	0.83333333	0.3	1.528	2.32	0.93	0.8	0.4	0.85	0.8	0.75	0.5	0.35	0.6
4	25.2	20	1.6	2.16666667	0.8	0.3	0.994	2.70833333	0.9	0.8	0.59	0.9	0.75	0.8	0.49	0.4	0.6
5	26.6	21	1.5	2.23333333	0.76666667	0.3	1.07866667	2.91304348	1.29	0.88	0.4	0.89	0.81	0.89	0.57	0.4	0.6
6	23.8	20	1.9	2.06666667	0.8	0.3	1.27866667	2.58333333	1.5	0.99	0.5	0.9	0.9	0.89	0.6	0.4	0.6
7	8.5	9	1.16666667	1.56666667	0.63333333	0.2	0.76166667	2.47368421	0.99	0.85	0.39	0.8	0.78	0.73	0.5	0.39	0.55
8	17.7	15	1.46666667	1.86666667	0.7	0.2	0.868	2.66666667	1.5	0.9	0.49	0.9	0.9	0.83	0.6	0.4	0.6
9	20.5	21	1.53333333	2.06666667	0.83333333	0.3	1.16066667	2.48	0.9	0.8	0.4	0.85	0.8	0.79	0.6	0.4	0.55
10	17.8	16	1.2	1.83333333	1.73333333	0.3	0.86233333	1.05769231	0.7	0.9	0.4	0.85	0.85	0.8	0.52	0.4	0.69
11	20.1	23	1	1.43333333	0.63333333	0.2	0.60733333	2.26315789	0.75	0.9	0.3	0.85	0.8	0.8	0.52	0.4	0.55
12	15.9	12	1.2	0.7	1.66666667	0.2	0.84366667	0.42	0.75	0.75	0.4	0.8	0.79	0.68	0.5	0.4	0.5
13	22	12	1.43333333	2.23333333	0.93333333	0.3	1.62533333	1.53571429	1.2	0.75	0.42	0.8	0.8	0.8	0.5	0.4	0.6
14	13.9	17	1	1.66666667	0.6	0.2	0.625	2.77777778	0.6	0.8	0.4	0.85	0.8	0.79	0.5	0.4	0.58
MEDIA	19.2163769	17.1909331	1.34652633	1.783970112	0.84263027	0.25955627	1.00354181	2.05112874	0.98921285	0.84879394	0.43514919	0.85982855	0.82498631	0.80073525	0.53892596	0.40089398	0.58775363

OBSERVACIONES DE 14 INDIVIDUOS DE LA POBLACIÓN CON PROCEDENCIA EN PUEBLA DE *B. MONNIERI*.

	AP	NN	LeN	LH	AH	DT	ÁH	R L/A	LPF	LF	LB	LSG	LSE	LSI	Lpis	LAc	LAL
1	10.2	11	0.9	1.36666667	0.53333333	0.2	0.45366667	2.5625	0.1	0.73	0.2	0.5	0.51	0.5	0.53	0.2	0.45
2	7.2	13	0.76666667	0.93333333	0.36666667	0.1	0.213	2.54545455	0.25	0.71	0.3	0.65	0.65	0.65	0.5	0.4	0.55
3	5.8	10	0.83333333	0.96666667	0.46666667	0.2	0.28966667	2.07142857	0.2	0.7	0.4	0.7	0.7	0.7	0.55	0.3	0.5
4	11	15	0.76666667	1.13333333	0.5	0.2	0.45433333	2.26666667	0.18	0.73	0.3	0.7	0.73	0.73	0.4	0.4	0.6
5	5.7	11	0.53333333	0.86666667	0.46666667	0.2	0.306	1.85714286	0.4	0.7	0.3	0.8	0.8	0.7	0.55	0.4	0.5
6	10.2	15	0.8	1.2	0.63333333	0.2	0.60633333	1.89473684	0.2	0.8	0.45	0.8	0.8	0.79	0.6	0.4	0.5
7	13.3	13	1.36666667	1.43333333	0.66666667	0.3	0.774	2.15	0.25	0.7	0.4	0.8	0.85	0.8	0.65	0.4	0.65
8	11.9	11	1.13333333	1.1	0.5	0.3	0.38533333	2.2	0.2	0.8	0.3	0.75	0.75	0.68	0.4	0.4	0.5
9	11.4	16	0.96666667	1.36666667	0.7	0.2	0.55	1.95238095	0.2	0.9	0.4	0.8	0.8	0.7	0.5	0.3	0.5
10	9.9	16	1.03333333	1.4	0.63333333	0.2	0.62366667	2.21052632	0.9	0.7	0.3	0.8	0.8	0.9	0.6	0.4	0.6
11	12.1	11	0.9	1.26666667	0.53333333	0.3	0.469	2.375	0.45	0.8	0.4	0.7	0.8	0.7	0.5	0.3	0.5
12	7.2	11	0.73333333	1.13333333	0.53333333	0.3	0.47066667	2.125	0.2	0.8	0.3	0.8	0.8	0.8	0.5	0.4	0.6
13	4.3	9	0.6	0.86666667	0.4	0.2	0.294	2.16666667	0.4	0.7	0.3	0.8	0.8	0.7	0.5	0.4	0.6
14	5.2	7	0.8	1	0.43333333	0.1	0.32533333	2.30769231	0.4	0.9	0.4	0.8	0.7	0.7	0.6	0.4	0.6
MEDIA	8.45106014	11.7772474	0.84342988	1.128824457	0.5172983	0.2033937	0.4187438	2.1821538	0.26694642	0.75910666	0.33246217	0.73729265	0.7437665	0.71219126	0.52233934	0.35791942	0.54334548

OBSERVACIONES DE 14 INDIVIDUOS DE LA POBLACIÓN CON PROCEDENCIA EN MICHOACÁN DE *B. MONNIERI*.

2.2. Vectores Eigen y Componentes Principales.

Valores propios:			
	F1	F2	F3
Valor propio	7.719	2.398	2.045
Variabilidad (%)	45.406	14.105	12.028
% acumulado	45.406	59.510	71.538

COMPONENTES PRINCIPALES (F1, F2, Y F3), PORCENTAJE DE VARIACIÓN DE CADA COMPONENTE Y PORCENTAJE ACUMULADO OBTENIDO DEL ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES.

VECTORES EIGEN (O VECTORES PROPIOS). LOS VALORES EN

NEGRITA CORRESPONDEN PARA CADA VARIABLE AL FACTOR PARA LO CUAL EL COSENO CUADRADO ES EL

Contribuciones de las variables (%):			
	F1	F2	F3
Var1	9.997	0.308	7.525
Var2	7.533	0.887	0.143
Var3	7.030	0.776	10.571
Var4	9.674	1.082	3.295
Var5	6.240	8.507	0.283
Var6	3.964	3.534	4.652
Var7	9.923	2.616	1.894
Var8	0.155	14.223	14.748
Var9	0.569	22.346	8.102
Var10	4.930	5.928	3.181
Var11	7.646	4.094	0.055
Var12	5.748	4.424	5.120
Var13	8.566	0.856	6.964
Var14	8.575	0.241	6.364
Var15	0.462	24.594	1.578
Var16	4.367	1.510	13.564
Var17	4.623	4.076	11.962

Vectores propios:			
	F1	F2	F3
Var1	0.316	-0.055	0.274
Var2	0.274	-0.094	0.038
Var3	0.265	0.088	0.325
Var4	0.311	-0.104	0.182
Var5	0.250	-0.292	-0.053
Var6	0.199	-0.188	0.216
Var7	0.315	-0.162	0.138
Var8	-0.039	0.377	0.384
Var9	0.075	0.473	0.285
Var10	0.222	0.243	0.178
Var11	0.277	-0.202	0.023
Var12	0.240	0.210	-0.226
Var13	0.293	0.093	-0.264
Var14	0.293	0.049	-0.252
Var15	0.068	0.496	-0.126
Var16	0.209	0.123	-0.368
Var17	0.215	0.202	-0.346

Cosenos cuadrados de las variables:			
	F1	F2	F3
Var1	0.772	0.007	0.154
Var2	0.581	0.021	0.003
Var3	0.543	0.019	0.216
Var4	0.747	0.026	0.067
Var5	0.482	0.204	0.006
Var6	0.306	0.085	0.095
Var7	0.766	0.063	0.039
Var8	0.012	0.341	0.302
Var9	0.044	0.536	0.166
Var10	0.381	0.142	0.065
Var11	0.590	0.098	0.001
Var12	0.444	0.106	0.105
Var13	0.661	0.021	0.142
Var14	0.662	0.006	0.130
Var15	0.036	0.590	0.032
Var16	0.337	0.036	0.277
Var17	0.357	0.098	0.245

MAYOR.

3. Detección de compuestos fitoquímicos por HPLC y tamizaje fitoquímico.

3.1. Técnicas cualitativas de tamizaje fitoquímico.

Metabolitos secundarios	Ensayos cualitativos	Observaciones
Flavonoides	Ensayo de Shinoda	Alcohol amílico coloreado de amarillo, naranja, carmelita o rojo intensos
Fenoles	Ensayo de Cloruro Férrico	Compuestos fenólicos coloración a rojo-vino
Alcaloides	Ensayo de Mayer	Turbidez
	Ensayo de Dragendorff	Formación de un precipitado y turbidez
Saponinas	Ensayo de la espuma (agitación por 5 minutos)	Espuma persistente por más de 2 minutos