



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE HIERBA DE CHAN (*Hyptis suaveolens* L. Poit.) DEL ESTADO DE OAXACA

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

Presenta:

Bertín Aparicio Quiroz

Bajo la supervisión de:

Dra. Margarita Gisela Peña Ortega



APROBADA



Chapingo, Estado de México, mayo del 2020

**EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE
HIERBA DE CHAN (*Hyptis suaveolens* L. Poit.) DEL ESTADO DE OAXACA**

Tesis realizada por el C. Ing. Bertin Aparicio Quiroz bajo la supervisión del
Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito
parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

DIRECTORA:



Dra. Margarita Gisela Peña Ortega

ASESOR:



Dr. Jesús Axayácatl Cuevas Sánchez

ASESOR:



Dr. Benito Reyes Trejo

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
ABREVIATURAS EMPLEADAS.....	vii
DEDICATORIA.....	viii
AGRADECIMIENTOS.....	ix
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 OBJETIVOS.....	3
1.2 HIPÓTESIS.....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 Diversidad de la familia <i>Lamiaceae</i>	4
2.2 Importancia de la familia <i>Lamiaceae</i> en México.....	4
2.3 La hierba de Chan (<i>Hyptis suaveolens</i> L. Poit).....	5
2.3.1 Nombres comunes.....	6
2.3.2 Origen y distribución.....	6
2.3.3 Composición química de <i>Hyptis suaveolens</i>	7
2.3.4 Usos principales.....	9
2.4 Marcadores moleculares.....	9
2.4.1. Uso de los marcadores moleculares.....	10
2.4.2 Principales marcadores moleculares.....	10
2.4.2.1 ISSR.....	11
2.4.3 Métodos de limpieza de ADN.....	12
2.4.3.1 Purificación de ADN con columnas de sílice.....	13
2.5 Uso de plantas medicinales.....	13
2.5.1 Extractos de plantas medicinales.....	13
2.5.2 Métodos de extracción de componentes bioactivos de plantas.....	14

2.5.2.1 Extracción de compuestos empleando disolventes.....	14
2.5.3 Toxicidad en plantas medicinales.....	15
2.5.3.1 Pruebas de toxicidad.....	16
2.5.3.2 Concentración letal 50 CL ₅₀	16
2.5.3.3 Prueba de <i>Artemia salina</i>	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1 Identificación taxonómica	18
3.2 Colecta de materiales	19
3.3 Caracterización molecular	19
3.3.1 Limpieza y almacenamiento del material vegetativo	19
3.3.2 Extracción de ADN	19
3.3.3 Medición de la cantidad y pureza del ADN.....	21
3.3.4 Amplificación del gen 16s.....	22
3.3.5 Fenolización de la solución de ADN.....	23
3.3.6 Purificación de ADN mediante columnas	24
3.3.7 Obtención de patrones ISSR.....	24
3.4 Evaluación de la toxicidad de extractos.....	26
3.4.1 Colecta y secado de material vegetativo	26
3.4.2. Preparación de extractos.....	27
3.4.3 Partición de extractos.....	27
3.4.4 Eclosión de <i>Artemia salina</i>	29
3.4.5 Concentraciones de extractos evaluados.....	30
3.4.6 Evaluaciones de toxicidad	30
3.5 Análisis estadístico	31
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1 Análisis de agrupamiento	32
4.2 Análisis Coordenadas Principales	33
4.3 Análisis Molecular de Varianza (AMOVA)	34
4.4 Descriptiva de marcadores	35
4.5 Índice de diversidad de Shannon-Weaver	37
4.6 Evaluación de toxicidad de extractos.....	38

V. CONCLUSIONES..... 41

VI. LITERATURA CITADA 42

VII.ANEXO..... 53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplares de Hierba de Chan (<i>Hyptis suaveolens</i> L. Poit.) observadas en campo.....	5
Figura 2. Metabolitos secundarios aislados del extracto etanólico de las semillas de <i>Hyptis suaveolens</i>	8
Figura 3. Metabolitos secundarios extraídos de diversas estructuras vegetales de <i>Hyptis suaveolens</i>	9
Figura 4. Ejemplar de herbario de la planta de Chan (<i>Hyptis suaveolens</i> L. Poit.) depositado en el herbario Biólogo Jorge Espinoza Salas de la Universidad Autónoma Chapingo.	18
Figura 5. Procedimiento para la obtención de extractos de diferente polaridad de hojas de Chan (<i>Hyptis suaveolens</i> L. Poit.).	29
Figura 6. Dendograma construido a partir de la distancia de Dice (1 – S) y el método de agrupamiento de varianza mínima de Ward de 9 poblaciones de <i>Hyptis suaveolens</i> colectadas en el Istmo de Tehuantepec, Oaxaca.	33
Figura 7. Diagrama de dispersión obtenido a partir del análisis de coordenadas principales de 9 poblaciones de <i>Hyptis suaveolens</i> a partir de las distancias de Dice (1 – S) utilizando 10 marcadores moleculares tipo ISSR.....	34
Figura 8. Patrón de bandeo obtenido mediante el iniciador ISSR10 en 88 colectas de hierba de Chan (<i>Hyptis suaveolens</i> L. Poit.).....	37

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Sitios de colecta de hierba de Chan (<i>Hyptis suaveolens</i> L. Poit.)... 18	18
Cuadro 2. Reactivos empleados en la mezcla de reacción para amplificar el gen cloroplástico 16S..... 22	22
Cuadro 3. Temperaturas y tiempos para la amplificación del gen cloroplástico 16S. 22	22
Cuadro 4. Reactivos empleados para realizar la mezcla de reacción de PCR. 24	24
Cuadro 5. Condiciones de temperatura de los ciclos de amplificación de la PCR para la obtención de patrones ISSR. 25	25
Cuadro 6. Iniciadores ISSR utilizados para la obtención de patrones de bandeo de <i>Hyptis suaveolens</i> 26	26
Cuadro 7. Análisis molecular de varianza de 88 colectas de hierba de Chan (<i>Hyptis suaveolens</i> L. Poit.)..... 35	35
Cuadro 8. Análisis descriptivo de 10 iniciadores ISSR usados en el análisis de 9 poblaciones de <i>Hyptis suaveolens</i> L. Poit..... 36	36
Cuadro 9. Índice de diversidad de Shannon-Weaver en nueve poblaciones de <i>Hyptis suaveolens</i> L. Poit. colectadas en el Istmo de Tehuantepec, Oaxaca... 38	38
Cuadro 10. Evaluación de la toxicidad (CL ₅₀) de extractos de <i>Hyptis suaveolens</i> mediante el modelo de <i>Artemia salina</i> 39	39

ABREVIATURAS EMPLEADAS

AcOEt=Acetato de etilo
CH₂Cl₂=Cloruro de metileno
CTAB= Bromuro de cetiltrimetilamonio
CL₅₀=Concentración letal 50
EDTA=Ácido etilendiaminotetraacético
EtOH=Etanol
kb=Kilobase
MeOH=Metanol
MgCl₂=Cloruro de Magnesio
mL=Mililitro
mM=Milimolar
ng/reacción=Nanogramos/reacción
ng/μL= Nanogramos/microlitro
pmol/reacción=Picomol/reacción
ppm= Partes por millón
pvp= Polivinilpirrolidona
SDS=Dodecil sulfato de sodio
TAE=Tris-Acetato-EDTA
TE=Tris-EDTA
Tris HCl= Clorhidrato de Tris
U/reacción=Unidades por reacción
xg= Gravedades

DEDICATORIA

A mi familia por todo el apoyo que me han brindado en cada etapa de mi vida.

A mis amigos que sin importar el tiempo y la distancia siempre han estado conmigo.

AGRADECIMIENTOS

A mi Padre Celestial por darme las fuerzas y la inspiración para comenzar y terminar el presente trabajo de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el financiamiento para cursar la maestría y llevar acabo el presente trabajo.

A la Universidad Autónoma Chapingo por haberme brindado las herramientas necesarias durante mi formación académica.

A mi comité de tesis: Dra. Margarita Gisela Peña Ortega, Dr. Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez y Dr. Benito Reyes Trejo por sus consejos y su dedicación en las revisiones del presente trabajo.

Al Q.F.B. Ricardo Gaspar Hernández por sus consejos y toda su ayuda brindada durante la fase experimental de la caracterización molecular.

A la M.C. María Elisa Alvarado Cano por la capacitación brindada durante la fase inicial del trabajo de caracterización molecular.

A la M.C. Ernestina Cedillo Portugal por su valiosa ayuda en la identificación taxonómica de los ejemplares colectados de la planta de Chan.

A la Dra. Priscila Guerra Ramírez por su dirección y apoyo en la obtención de los diferentes extractos evaluados.

A la Dra. Diana Guerra Ramírez por la asesoría brindada durante la obtención de los diferentes extractos.

Al M.C. Luis Emilio Castillo Márquez por su ayuda otorgada durante el análisis estadístico de los datos obtenidos en la prueba de toxicidad.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Bertin Aparicio Quiroz

Fecha de Nacimiento: 11 de agosto de 1989

Lugar de Nacimiento: Santo Domingo Zanatepec,
Oaxaca.

CURP: AAQB890811HOCPRR08

Profesión: Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia

Cedula profesional: 11426354



Desarrollo académico

Bachillerato: Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario N° 158. Santo Domingo Zanatepec, Oaxaca. Periodo 2004-2007.

Licenciatura: Licenciatura en Ingeniería Agronómica Especialista en Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco de Mora, Estado de México. Periodo 2012-2016.

RESUMEN

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE HIERBA DE CHAN (*Hyptis suaveolens* L. Poit.) DEL ESTADO DE OAXACA¹

La planta de Chan (*Hyptis suaveolens* L. Poit.) se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial, esto en gran parte debido a los diversos usos que presenta. En nuestro país esta planta se localiza en diversas regiones agrícolas; sin embargo, en muchas de estas regiones sólo es considerada como una maleza. El objetivo de este trabajo fue evaluar la diversidad genética de poblaciones de *Hyptis suaveolens* L. Poit. en tres municipios de la región Istmo de Tehuantepec, Oaxaca, empleando 10 marcadores moleculares tipo ISSR a fin de contribuir con información de utilidad para futuros programas de mejoramiento genético en esta especie. Otro objetivo fue determinar la capacidad citotóxica de los extractos etanólico, hexánico, cloruro de metileno, acetato de etilo y acuoso de *Hyptis suaveolens* L. Poit., empleando el bioensayo de *Artemia salina* a las concentraciones de 10,000, 1,000, 100, 10, 1, 0.1 y 0.01 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Se colectó material vegetativo en campo para la extracción de ADN y para la preparación de los diferentes extractos. El ADN se extrajo con el método CTAB y posteriormente se analizó con diez iniciadores ISSR. El análisis molecular de varianza mostró una mayor variabilidad genética dentro de las poblaciones (76.37 %) que entre poblaciones (23.63 %). Los iniciadores que proporcionaron mayor información polimórfica en esta especie fueron ISSR4, ISSR2, ISSR10, HY8 y HY6. Bajo el modelo indicado, el extracto etanólico fue el que exhibió la mayor toxicidad con una CL_{50} de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Los marcadores moleculares ISSR demostraron ser herramientas útiles en el estudio de la variabilidad genética presente en poblaciones de la planta de Chan (*Hyptis suaveolens* L. Poit.). Es necesario continuar con la evaluación de los efectos tóxicos del extracto etanólico de esta especie medicinal para propiciar su actividad anticancerígena potencial.

Palabras clave: Recurso vegetal, diversidad genética, especies medicinales, marcadores moleculares, *Artemia salina*, toxicidad.

¹Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo
Autor: Bertín Aparicio Quiroz
Directora de Tesis: Dra. Margarita Gisela Peña Ortega

ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND TOXICITY OF CHAN HERB (*Hyptis suaveolens* L. Poit.) FROM OAXACA PROVINCE¹

Chan herb (*Hyptis suaveolens* L. Poit.) is widely distributed worldwide, due to its diverse uses. In Mexico this specie is distributed across many agricultural regions, where it has been mostly considered as weed. The main objective of this work was to evaluate the genetic variability of natural populations of *Hyptis suaveolens* L. Poit. from three municipalities of Tehuantepec, Oaxaca, using ISSR-type molecular markers, to contribute with useful information for future genetic improvement programs in this specie. A second objective was to determine the cytotoxic activity of this medicinal specie using the *Artemia salina* bioassay associated to ethanol, hexane, methylene chloride, ethyl acetate and aqueous extracts, at concentrations 10,000, 1,000, 100, 10, 1, 0.1, and 0.01 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. For DNA extraction and extracts preparation vegetative material was collected at the field. DNA was extracted using CTAB method; it was analyzed using 10 ISSR primers. Molecular analysis of variance showed greater genetic variability within populations (76.37 %), rather than between populations (23.63 %). ISSR4, ISSR2, ISSR10, HY8, and HY6 primers exposed high polymorphic information content. *Artemia salina* model showed that ethanolic extract exhibited higher toxicity LC_{50} at 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. ISSR molecular markers were useful for studying genetic variability in natural populations of Chan herb (*Hyptis suaveolens* L. Poit.). It is convenient to continue evaluating the toxic effects of the ethanolic extract obtained from this medicinal specie to promote its use as potential antitumor resource.

Key words: Plant resource, genetic diversity, medicinal species, molecular markers, *Artemia salina*, toxicity.

¹Thesis of Master of Science in Agricultural Biotechnology, Universidad Autónoma Chapingo
Author: Bertin Aparicio Quiroz
Thesis director: Dra. Margarita Gisela Peña Ortega

1. INTRODUCCIÓN

La familia *Lamiaceae* es una de las más diversas del mundo con cerca de 236 géneros y 7,173 especies (Lara-Cabrera *et al.*, 2016). Las especies pertenecientes a esta familia han sido utilizadas como plantas ornamentales, medicinales y aromáticas, muchas de las cuales producen aceites esenciales que se utilizan en la medicina tradicional y moderna, y en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica (Mamadalieva *et al.*, 2017).

La familia *Lamiaceae* es una de las más diversas en la República Mexicana, sólo después de *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Poaceae*, *Orchidaceae*, *Cactaceae*, *Euphorbiaceae* y *Rubiaceae*. En nuestro país existen 13.55 % de los géneros y 8.23 % de las especies del mundo, lo cual representa un endemismo de 65.82 %. Los géneros mejor representados son *Salvia*, *Scutellaria*, *Stachys* e *Hyptis*, con más de 35 especies cada uno (Martínez-Gordillo *et al.*, 2013).

De acuerdo a The plant List (2013), el género *Hyptis* se compone actualmente de 296 especies que se distribuyen a nivel mundial, así como algunas variantes que presentan varios miembros de este género, como es el caso de *Hyptis alata*, *Hyptis fasciculata* e *Hyptis emoryi* (ver Anexo 1).

La planta de Chan (*Hyptis suaveolens* L. Poit.) es una hierba perenne de rápido crecimiento que alcanza portes de 180 a 210 cm. (Rios *et al.*, 2015). Esta especie se ha utilizado como planta medicinal debido a que posee propiedades antifertilidad, antiinflamatorias y antiplasmodiales (Prince *et al.*, 2013); también se ha reportado que posee propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Nantitanon *et al.*, 2007). Estudios en los que se ha evaluado la toxicidad que presentan los extractos de los diferentes órganos de la planta de Chan empleando el bioensayo de *Artemia salina* han demostrado que esta planta presenta gran toxicidad para este organismo (Bezerra *et al.*, 2017; Hasan *et al.*,

2018). Debido a la significativa correlación que existe entre la prueba de toxicidad de *Artemia salina* y la capacidad de inhibir el crecimiento *in vitro* de líneas celulares tumorales (Silva *et al.*, 2007) se considera que la planta de Chan posee propiedades anticancerígenas.

El bioensayo que utiliza las larvas de *Artemia salina* contenidas en sal marina es una herramienta muy útil para el aislamiento de compuestos bioactivos de extractos de plantas (Gadir, 2012). Dicho ensayo consiste en exponer las larvas a la muestra de prueba en solución salina y la letalidad se evalúa después de 24 h. La disponibilidad comercial de huevecillos de *Artemia salina* eclosionados en salmuera es económicamente confiable, el bajo costo y la facilidad de realizar el ensayo hacen que este bioensayo de letalidad sea un método práctico y muy útil (Krishnaraju *et al.*, 2006).

A pesar de las diversas características benéficas que posee *Hyptis suaveolens*, en muchos lugares aún está catalogada como una maleza (De la Cruz *et al.*, 2017; Esqueda *et al.*, 2010), por lo que en la actualidad no se dispone de información detallada sobre esta especie (Rios *et al.*, 2015).

Los marcadores moleculares son una valiosa herramienta que permite explorar la variabilidad genética presente en poblaciones naturales de plantas por lo que pueden ser utilizados en la planta de Chan (*Hyptis suaveolens* L. Poit.), para contar con información que pudiera mejorar la eficiencia y precisión de futuros programas de fitomejoramiento (Collard y Mackill, 2008; Nadeem *et al.*, 2018).

1.1 OBJETIVOS

Evaluar la variabilidad genética de poblaciones de *Hyptis suaveolens* L. Poit. procedentes de tres municipios de la región Istmo de Tehuantepec, Oaxaca, mediante marcadores moleculares tipo ISSR a fin de contribuir con información de utilidad para futuros programas de mejoramiento genético en esta especie.

Determinar la citotóxicidad de las hojas de *Hyptis suaveolens* L. Poit. mediante el bioensayo de *Artemia salina*, con la finalidad de establecer el uso potencial de sus extractos como anticancerígenos potenciales.

1.2 HIPÓTESIS

Los marcadores moleculares tipo ISSR permitirán cuantificar la variabilidad genética existente en las poblaciones de *Hyptis suaveolens* que se estudiarán en la región del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca.

El bioensayo de *Artemia salina* posibilitara conocer la toxicidad de los diferentes extractos de *Hyptis suaveolens* evaluados para identificar los niveles de concentración con mayor eficacia que podrán relacionarse con su uso como anticancerígenos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Diversidad de la familia *Lamiaceae*

La familia *Lamiaceae* o *Labiatae*, también conocida como la familia de la menta, pertenece al grupo de las angiospermas, por lo que presenta flores (Raja, 2012). Forma parte de las dicotiledóneas y comprende aproximadamente 236 géneros y hasta 7,200 especies clasificadas en 7 subfamilias (Maher *et al.*, 2019). Esta familia tiene importancia económica en varias partes del mundo, ya que muchas de sus especies se usan como condimentos (*Origanum*, *Thymus*, *Mentha*), para obtener aceites esenciales (*Lavandula*, *Pogostemon*, *Salvia*) y/o como ornamentales (*Coleus*, *Salvia*, *Scutellaria*) (Martínez-Gordillo *et al.*, 2013) mientras que algunas especies son alimenticias y medicinales (Khoury *et al.*, 2016). Las especies de la familia *Lamiaceae* tienen distribución cosmopolita y se encuentran en casi todos los ecosistemas terrestres, aunque son más abundantes en bosques de clima templado y en zonas montañosas (Martínez-Gordillo *et al.*, 2017).

2.2 Importancia de la familia *Lamiaceae* en México

La familia *Lamiaceae* es una de las más diversas en México y se distribuye con preferencia en zonas templadas, aunque es posible encontrar especies pertenecientes a los géneros *Hyptis* y *Asterohyptis* en zonas secas y calientes (Martínez-Gordillo *et al.*, 2013). Algunos de sus linajes son endémicos del país o se han diversificado en éste, lo que explica su amplia distribución, en particular la especie de salvia subgénero *Calosphace* (Martínez-Gordillo *et al.*, 2017). Una de las especies del género *Hyptis* que puede encontrarse ampliamente distribuida en algunos municipios de la región del Istmo de Tehuantepec es *Hyptis suaveolens*. Esta especie en particular abunda en el municipio de Santo Domingo Zanatepec, ya que dicho municipio presenta un

clima cálido subhúmedo con lluvias en verano, con un rango de temperatura que va de los 20-28 °C y un rango de precipitación que va 1200–2500 mm (INEGI, 2015), lo cual favorece el desarrollo de esta especie vegetal. La familia *Lamiaceae* tiene una representación amplia en la medicina vernácula de diferentes culturas. En México sus especies se utilizan sobre todo como relajantes y digestivas. Los frutos de algunas plantas se usan como alimento, como es el caso de los ahuilotes o uvalanes (varios miembros del género *Vitex*) y la chía (*Salvia hispanica* y otras especies). Algunas especies tienen un potencial ornamental elevado debido a lo vistoso de sus flores y/o follaje y sus hojas aromáticas. Un caso particular es el de la teca (*Tectona grandis*), originaria del sureste asiático, la que se ha introducido en zonas cálido-húmedas del país con fines de explotar su madera (González-Gallegos *et al.*, 2014).

2.3 La hierba de Chan (*Hyptis suaveolens* L. Poit)

La hierba de Chan (*Hyptis suaveolens* L. Poit.) es una hierba suave, sufrutescente y ruderal que normalmente crece a lo largo de los bordes de las carreteras y los márgenes húmedos de los estanques (Islam *et al.*, 2014). Las plantas tienen un porte de 0.5 a 1.5 m o más, presentan un tallo que lleva las hojas opuestas, en bordes finamente dentados, al cual se le injerta una extremidad ovalada y una inflorescencia en cimas axilares (Noudogbessi *et al.*, 2013) (Figura 1). La planta emite un olor a menta característico cuando se aplasta (Pessoa *et al.*, 2010). Casi todas las partes de esta planta se utilizan en medicina tradicional para tratar diversas enfermedades (Mishra *et al.*, 2011).



Figura 1. Ejemplares de Hierba de Chan (*Hyptis suaveolens* L. Poit.) observadas en campo.

2.3.1 Nombres comunes

La especie *Hyptis suaveolens* recibe una gran cantidad de nombres comunes. En México se puede conocer como Confitura, Confiturilla (Sonora y Sinaloa), Conivaria, Chan (Sonora), Chana (Colima), Chía de Colima (Jalisco y Colima), Chía Gorda (Colima), La-pil (lengua chontal, Oaxaca) (Martínez, 1979), así como Chía, Chía cimarrona, Chían, Hierba del burro, Salvia cimarrona (UNAM, 2009). En el extranjero también presenta una gran variedad de nombres comunes como son: Wilayati tulusi (India) (Mishra *et al.*, 2011), Alfazema, Bamburral (Brasil) (Pessoa *et al.*, 2010; Bezerra *et al.*, 2017), Mastranto o Macusa (Venezuela) (Ríos *et al.*, 2015). Esta gran diversidad de nombres comunes tiene importancia etnobotánica, ya que evidencia la relevancia antropocéntrica de esta especie.

2.3.2 Origen y distribución

Esta dicotiledónea es nativa de América tropical, es una hierba anual que se establece en bordes de carreteras, vías férreas, tierras baldías, cursos de agua, pastos y bosques abiertos donde el suelo está bien drenado. *Hyptis* está muy extendida en Australia (territorio del norte y Queensland), China, Indonesia, Papúa Nueva Guinea, Islas Salomón, Polinesia Francesa, Estados Federados de Micronesia (Islas Chuuk y Yap), Islas Niue y Guam y las Islas Hawaianas en los Estados Unidos. También está presente en África occidental y central, donde se considera una especie maliciosa en algunos países (Prince *et al.*, 2013). Se le puede encontrar también en la Guayana Francesa, Brasil, Venezuela, Ecuador en América del Sur; Estados Unidos en América del norte; Bangladesh, China e India en Asia; Benín, Kenia, Nigeria, Sudán y Camerún en África (Ngozi *et al.*, 2014). En nuestro país está presente en Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Colima, Durango, Estado de México, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán. Habita

sobre todo en selva baja caducifolia, selva alta o mediana subcaducifolia, vegetación secundaria, matorral subtropical, vegetación sabanoide y como arvense en cultivos de maíz, mango y sorgo; también se encuentra ocasionalmente en encinares, bosque de pino-encino y palmar (González-Gallegos *et al.*, 2014).

2.3.3 Composición química de *Hyptis suaveolens*

Se ha reportado que *Hyptis suaveolens* contiene nutrientes alimenticios básicos: proteínas, carbohidratos, grasas, fibra y fitonutrientes como alcaloides, taninos, saponinas, flavonoides y terpenoides. La planta también es rica en algunos elementos minerales como potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), nitrógeno (N), sodio (Na) y fósforo (P) (Ngozi *et al.*, 2014). *Hyptis suaveolens* representa una fuente importante de aceites esenciales, alcaloides, flavonoides, fenoles, saponinas, terpenos y esteroides (Rios *et al.*, 2015).

Por otro lado, el estudio de los metabolitos secundarios contenidos en el extracto etanólico de semillas de *Hyptis suaveolens*, permitió el aislamiento y caracterización de derivados de los ácidos cafeico, ferúlico y *p*-coumarico (**1-15**) (Figura 2). Estos metabolitos secundarios son muy importantes, desde el punto de vista farmacológico, ya que desarrollan actividad antihiperuricémica disminuyendo las ganas frecuentes de orinar (Fu-Chun *et al.*, 2019).

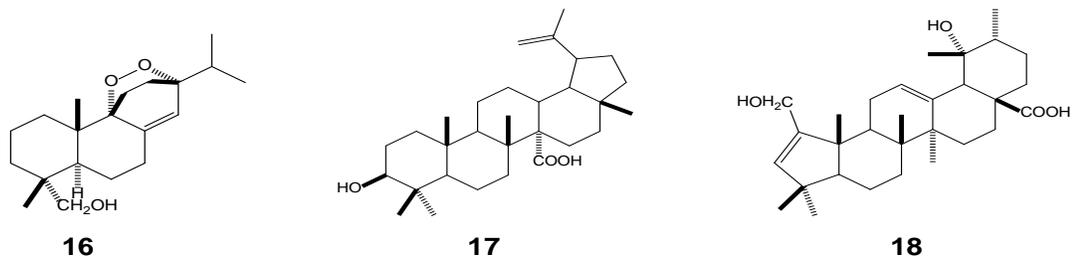


Figura 3. Metabolitos secundarios extraídos de diversas estructuras vegetales de *Hyptis suaveolens*.

2.3.4 Usos principales

La hierba de Chan (*Hyptis suaveolens* L. Poit.) se ha utilizado tradicionalmente como una planta medicinal en el tratamiento de infecciones respiratorias y gastrointestinales, indigestión, resfriados, dolor, fiebre, calambres y enfermedades de la piel (Pessoa *et al.*, 2010). *Hyptis suaveolens* es comúnmente utilizada por la población tradicional en varias partes del mundo para tratar la inflamación, la úlcera gástrica y la infección, y se usa como un medicamento en crudo para aliviar los síntomas relacionados con la úlcera gástrica o la gastritis en la región noreste y central de Brasil. En la India, las hojas de *H. suaveolens* se han utilizado como estimulantes, carminativos, sudoríficos, galactógenos y como cura para enfermedades cutáneas parasitarias (Sumitha y Thoppil, 2016). Esta planta también puede ser empleada como agente alelopático (Maiti *et al.*, 2015) y agente antifúngico (Pessoa *et al.*, 2010).

2.4 Marcadores moleculares

El término marcador molecular de ADN se refiere a una variación específica del ADN entre individuos que se ha asociado con ciertas características. Estas variaciones incluyen inserciones, deleciones, translocaciones, duplicaciones y mutaciones puntuales. Tienen propiedades biológicas características que

pueden detectarse y medirse en cualquier parte de la planta, en cualquier etapa fenológica de desarrollo y no se ven confundidos por el efecto ambiental, pleiotrópico o epistático (Singh *et al.*, 2014). Un marcador molecular ideal debe tener algunas propiedades deseables: 1) naturaleza altamente polimórfica para que permita realizar estudios de diversidad genética, 2) herencia codominante que posibilite la determinación de estados homocigotos y heterocigotos de organismos diploides, 3) ocurrencia uniforme y frecuente en todo el genoma, 4) conducta neutral a las condiciones ambientales o prácticas de manejo, 5) de fácil acceso, rápido y económico de detectar, 6) alta reproducibilidad y 7) debe posibilitar el sencillo intercambio de datos entre laboratorios (Kumar *et al.*, 2009).

2.4.1. Uso de los marcadores moleculares

Los marcadores moleculares basados en ADN son una herramienta versátil en los campos de taxonomía, fisiología, embriología, ingeniería genética, etc. (Singh y Kumar, 2009). Debido a su estabilidad, rentabilidad y facilidad de uso presentan una variedad de aplicaciones que incluyen mapeo genómico, marcado genético, diversidad genética, análisis filogenético e investigaciones forenses (Grover y Sharma, 2016). Los marcadores de ADN se han utilizado en plantas para estudios de relaciones genéticas entre individuos, identificación híbrida y varietal, relación filogenética entre especies, mapeo de genes y rastreo de loci de rasgos cuantitativos (Amom y Nongdam, 2017).

2.4.2 Principales marcadores moleculares

En las últimas tres décadas se han desarrollado y aplicado varias técnicas de marcadores moleculares en todo el mundo en diferentes sistemas. Sin embargo, sólo un puñado de estas técnicas: RFLP (fragmentos polimórficos de restricción de diferente longitud), RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar), AFLP (polimorfismos en longitud de fragmentos amplificados), SSR (secuencias

simples repetidas o microsatélite), ISSR (inter secuencias simples repetidas) y SNP (polimorfismos de un sólo nucleótido) han recibido aceptación mundial (Grover y Sharma, 2016). Estos marcadores basados en ADN se diferencian en dos tipos: el primero no basado en PCR (técnica de reacción en cadena de la polimerasa, como es el caso de los RFLP) y el segundo formado por marcadores basados en PCR (RAPD, AFLP, SSR, SNP, etc.) (Kumar *et al.*, 2009). Los marcadores no basados en PCR son informativos, pero el uso de isótopos radiactivos, el alto costo, el requisito absoluto de contar con información de secuencia y la configuración sofisticada de laboratorio limitan su uso. Los marcadores basados en PCR se han utilizado ampliamente debido a su simplicidad técnica y a la facilidad de detección en gran cantidad de muestras en un corto período de tiempo y a que sólo requieren de un laboratorio moderadamente equipado (Bhagyawant, 2016).

2.4.2.1 ISSR

Los marcadores moleculares tipo ISSR son fragmentos de ADN de aproximadamente 100-3,000 pb ubicados entre regiones de microsatélites adyacentes, orientadas en sentido opuesto. En esta técnica, reportada por Zietkiewicz *et al* (1994) se utilizan iniciadores basados en microsatélites para amplificar secuencias de ADN localizadas entre estos SSR. Los ISSR se amplifican por PCR utilizando como iniciadores unos pocos nucleótidos selectivos como anclajes en las regiones adyacentes no repetidas (16-18 pb). Se pueden generar simultáneamente de 10 a 60 fragmentos de múltiples loci, los cuales son separados por electroforesis en geles de agarosa y calificados como presencia o ausencia de fragmentos de tamaño particular (Kumar *et al.*, 2009). La técnica es útil en áreas de diversidad genética, estudios filogenéticos, marcado de genes, mapeo genómico y biología evolutiva en una amplia gama de especies de cultivos (Reddy *et al.*, 2002).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la síntesis de fragmentos de ADN específicos utilizando una enzima ADN-polimerasa, que participa en la replicación del material genético celular. Esta enzima sintetiza una secuencia complementaria de ADN, ya que un pequeño fragmento (iniciador) está conectado a una de las cadenas de ADN en el sitio específico elegido para comenzar la síntesis (Alves *et al.*, 2009). La PCR se realiza en un termociclador e implica tres pasos principales: 1) desnaturalización de la plantilla de ADN a 92-95 °C, 2) alineamiento de iniciadores a 50-70 °C, y 3) extensión de moléculas de ADN a aprox. 72 °C. Estos pasos se repiten durante 30 a 40 ciclos (Gupta, 2019). A pesar de la amplia aplicación de esta técnica en las últimas dos décadas, los inhibidores de PCR siguen siendo un impedimento importante para la amplificación exitosa del ADN de la planta. Varios compuestos, incluidos los polisacáridos y los compuestos fenólicos en los tejidos vegetales, pueden inhibir la amplificación por PCR (Samarakoon *et al.*, 2013).

2.4.3 Métodos de limpieza de ADN

Los inhibidores de la PCR pueden afectar la amplificación al disminuir o incluso bloquear la actividad de la ADN polimerasa o al interactuar con los ácidos nucleicos (ADN molde o iniciadores) (Sidstedt *et al.*, 2018). En consecuencia, se han desarrollado numerosos procedimientos para reducir los niveles de los compuestos inhibidores, por ejemplo, la adición de polivinilpirrolidona para reducir la cantidad de polifenoles, fenol para proteínas, RNasa para ARN y NaCl para polisacáridos (Lancíková *et al.*, 2014), así como columnas a base de sílice que se encuentran entre los sistemas de purificación de ADN y ARN más utilizados, y que permiten la recuperación de ácidos nucleicos de alta calidad sin ninguna extracción orgánica (Nicosia *et al.*, 2009).

2.4.3.1 Purificación de ADN con columnas de sílice

Las columnas de sílice y fibra de vidrio se encuentran entre los sistemas de purificación de ADN más utilizados, lo que garantiza la recuperación de ADN de alta calidad sin ninguna extracción orgánica. Dichas columnas están disponibles comercialmente para la purificación de moléculas pequeñas (por ejemplo, fragmentos de PCR, plásmidos) o ADN genómico adecuado para diferentes aplicaciones (Tagliavia *et al.*, 2009). Esta técnica se basa en el principio de la unión selectiva del ADN cargado negativamente con la superficie de sílice que está cubierta con iones cargados positivamente. Con el ADN firmemente unido a la matriz de sílice, el resto de los contaminantes celulares se pueden lavar antes de que el ADN extraído de las partículas de sílice se eluya con agua destilada o un tampón como Tris-EDTA (Shetty y Dairawan, 2020).

2.5 Uso de plantas medicinales

Las plantas que poseen propiedades terapéuticas o ejercen efectos farmacológicos beneficiosos sobre un organismo se conocen generalmente como "plantas medicinales" (Saranraj *et al.*, 2016). Las plantas medicinales contienen algunos compuestos orgánicos que promueven una acción fisiológica en el cuerpo humano y estas sustancias bioactivas incluyen taninos, alcaloides, carbohidratos, terpenoides, esteroides y flavonoides (Soni y Sosa, 2013). Las partes de las plantas medicinales que se pueden usar son diferentes tipos de semillas, raíces, hojas, frutos, cáscaras, flores o incluso toda la planta (Jamshidi-Kia *et al.*, 2018).

2.5.1 Extractos de plantas medicinales

Un extracto de hierbas podría definirse como los compuestos y / o mezclas de compuestos obtenidos de plantas frescas o secas, o partes de plantas: hojas, flores, semillas, raíces y cortezas, mediante diferentes procedimientos de

extracción. Característicamente, los componentes activos se obtienen junto con otros materiales presentes en la masa vegetal (Vinatoru, 2001). Los extractos de plantas se han utilizado durante miles de años en la conservación de alimentos, medicina alternativa farmacéutica y terapias naturales. Estos pueden ser una muy buena fuente de antibióticos contra diversos patógenos fúngicos y bacterianos (Uma *et al.*, 2013). Recientemente se ha prestado mucha atención a los extractos y compuestos biológicamente activos aislados de especies de plantas para analizar sus actividades farmacológicas (Tlili *et al.*, 2019).

2.5.2 Métodos de extracción de componentes bioactivos de plantas

La extracción es el primer paso crucial en el análisis de plantas medicinales, porque es necesario extraer los componentes químicos deseados de los materiales vegetales para su separación y caracterización (Sasidharan *et al.*, 2011). Las técnicas generales de extracción de plantas medicinales incluyen maceración, infusión, percolación, digestión, decocción, extracción continua en caliente (mediante un extractor Soxhlet), extracción acuosa-alcohólica por fermentación, extracción a contracorriente, extracción asistida por microondas, extracción por ultrasonido (sonicación), extracción de fluido supercrítico y técnicas de destilación (destilación de agua, destilación al vapor, extracción fitónica con disolventes de hidrocarburos fluorados). Para plantas aromáticas se puede emplear maceración hidrolítica seguida de destilación, expresión y eflourage (extracción de grasa fría) (Pandey y Tripathi, 2014).

2.5.2.1 Extracción de compuestos empleando disolventes

Uno de los factores más importantes que afectan la eficiencia de extracción de compuestos bioactivos de materiales vegetales y sus consecuentes beneficios para la salud es el disolvente de extracción (Ngo *et al.*, 2017). La selección del sistema de solventes depende en gran medida de la naturaleza específica del compuesto bioactivo que se busca. Existen diferentes sistemas de solventes

disponibles para extraer el compuesto bioactivo de los productos naturales. La extracción de compuestos hidrofílicos utiliza solventes polares como metanol, etanol o acetato de etilo. Para la extracción de compuestos lipofílicos, se utilizan diclorometano o una mezcla de diclorometano/metanol en una proporción de 1:1. (Sasidharan *et al.*, 2011). Los alcoholes (EtOH y MeOH) son disolventes universales en la extracción con disolventes para la investigación fitoquímica (Zhang *et al.*, 2018). Elegir el tipo de disolvente para el proceso de extracción es esencial para las pruebas posteriores de toxicidad, ya que los diferentes disolventes muestran un potencial de extracción diferente. Si es posible, la extracción debe llevarse a cabo en condiciones suaves, utilizando disolventes de baja reactividad (Hamidi *et al.*, 2014).

2.5.3 Toxicidad en plantas medicinales

La toxicidad se define como cualquier efecto nocivo de una sustancia química o una droga en un organismo objetivo (Sharan *et al.*, 2011). Desde tiempos muy antiguos las plantas han sido utilizadas como medicinas. Varias especies de plantas han demostrado su potencial para proveer drogas efectivas contra enfermedades parasitarias, por lo que muchos grupos de investigación se dedican a evaluar extractos vegetales como estrategia para hallar nuevas alternativas terapéuticas frente a estas afecciones. Sin embargo, es bien conocido que muchas plantas pueden ocasionar reacciones tóxicas a quienes las utilizan. Por esta razón, se llevan a cabo investigaciones con el propósito de determinar, además de la acción farmacológica, la toxicidad que pueden tener las plantas medicinales (Fernández-Calienes *et al.*, 2009). Los estudios toxicológicos permiten tomar la decisión de si un nuevo medicamento debe ser adoptado para uso clínico o no (Subha y Geetha, 2017).

2.5.3.1 Pruebas de toxicidad

Gran parte de la información sobre hierbas medicinales puesta a disposición de los consumidores no está respaldada por datos científicos creíbles. Por esta razón, se llevan a cabo estudios para determinar la toxicidad de las plantas medicinales. Según la recomendación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), para reducir los efectos adversos del consumo de medicamentos a base de hierbas es necesaria una validación científica exhaustiva sobre la toxicidad de estas plantas (Uangbaoje *et al.*, 2016).

Se han utilizado diferentes tipos de ensayos para la determinación de la toxicidad potencial de extractos de hierbas basados en diferentes modelos biológicos, como los ensayos *in vivo* en animales de laboratorio. Sin embargo, estudios recientes han desarrollado ensayos biológicos alternativos que incluyen especies de crustáceos braquiópodos como *Artemia salina*, *Artemia franciscana*, *Artemia urmiana* y *Thamnocephalus platyurus* (Hamidi *et al.*, 2014). El ensayo de letalidad de *Artemia salina* se basa en la posibilidad de causar la muerte de larvas de este crustáceo cultivadas en el laboratorio. Este método fue propuesto por Michael y colaboradores en 1956, y posteriormente desarrollado por Vanhaecke y colaboradores, así como Sleet y Brendel, con el propósito de contar con una herramienta útil y sencilla para la determinación de la toxicidad (Fernández-Calienes *et al.*, 2009).

2.5.3.2 Concentración letal 50 CL₅₀

En toxicología, la dosis letal media DL₅₀ (abreviatura de "dosis letal, 50 %"), CL₅₀ (concentración letal, 50 %) o CLt₅₀ (concentración letal y tiempo) de una toxina, radiación o patógeno es la concentración requerida para matar a la mitad de los miembros de una población probada después de una exposición de prueba especificada (Teke y Kuete, 2014). La evaluación de la concentración letal media (CL₅₀) se ha utilizado como un parámetro importante para medir la

toxicidad aguda y también como un procedimiento inicial para detectar la toxicidad de algún compuesto. El término CL₅₀ fue introducido por Trevan (1927) para estimar la concentración de una sustancia que produce 50 % de muerte en animales de prueba (Pandit y Kumari, 2019).

2.5.3.3 Prueba de *Artemia salina*

Artemia salina Leach. (*Artemiidae*) es un crustáceo de ambientes de agua salada. Este organismo desempeña un papel importante en el flujo de energía de la cadena alimentaria en este entorno. Debido a que es barato y no requiere la aprobación del comité de ética, se usa ampliamente en estudios toxicológicos para determinar la concentración letal (CL) (Bezerra *et al.*, 2017). El Instituto Nacional del Cáncer (NCI por sus siglas en inglés) de Estados Unidos ha demostrado que existe una correlación significativa entre el ensayo en larvas de *Artemia salina* y la inhibición del crecimiento *in vitro* de líneas celulares tumorales sólidas humanas. Esta correlación significativa permite emplear este bioensayo como una herramienta útil en la detección de fármacos antitumorales (Arcanjo *et al.*, 2012). Las principales ventajas de utilizar larvas de *Artemia* en las pruebas de toxicidad han sido reportadas por el grupo de Libralatoa *et al.*, (2016) como: rapidez (sólo se requiere de 28-72 h desde la eclosión hasta el primer punto final), rentabilidad y la disponibilidad de nauplios nacidos de quistes (huevos) comerciales duraderos (es decir, homogeneidad de la población, disponibilidad durante todo el año sin necesidad de cultivo)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Identificación taxonómica

Debido a que al inicio del presente trabajo sólo se conocía el nombre común de la especie, se colectaron algunos ejemplares para herbario en el municipio de Reforma de Pineda, perteneciente a la región Istmo de Tehuantepec, en el estado de Oaxaca, durante el mes de octubre del 2018. Estos se trasladaron al Herbario-Hortorio “Biólogo Jorge Espinoza Salas”, con sede en el Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, ubicada en el km 38.5 de la carretera federal México-Texcoco, en el municipio de Texcoco, Estado de México. Los botánicos del herbario determinaron que los ejemplares colectados correspondían a la especie *Hyptis suaveolens* L. Poit. Se depositó un ejemplar para resguardo, asignándosele el número de registro 25987 (Figura 2).



Figura 4. Ejemplar de herbario de la planta de Chan (*Hyptis suaveolens* L. Poit.) depositado en el herbario Biólogo Jorge Espinoza Salas de la Universidad Autónoma Chapingo.

3.2 Colecta de materiales

Las plantas de Chan (*Hyptis suaveolens* L. Poit.) utilizadas en el presente trabajo para llevar a cabo la caracterización molecular fueron colectadas en los municipios de Santiago Niltepec, Reforma de Pineda y Santo Domingo Zanatepec, ubicados en la región Istmo de Tehuantepec, Oaxaca, durante el mes de junio del 2019, eligiendo tres comunidades por municipio (Cuadro 1), en las cuales se colectaron 10 ejemplares por comunidad dando un total de 90 plantas colectadas. Para la realización del análisis tóxico el material vegetativo se colectó en el municipio de Santo Domingo Zanatepec, durante el mes de octubre del 2018. La caracterización molecular de la planta de Chan (*Hyptis suaveolens* L. Poit.) se llevó a cabo en el Laboratorio de Mejoramiento Genético Asistido del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. El análisis tóxico se desarrolló en el Laboratorio de Productos Naturales del área de Química del Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

Cuadro 1. Sitios de colecta de hierba de Chan (*Hyptis suaveolens* L. Poit.).

Municipio	Localidad	N° de colecta	Localización Geográfica	Altitud (msnm)	Rango de Temperatura	Precipitación	Tipo de clima
Santo Domingo Zanatepec	Piedras Negras	1-10	LN 16°26'27.15" LO 94°20'10.03"	61	20 – 28°C	1200–2500 mm	Aw ₁ (54.62 %) Aw ₂ (40.05 %)
	El Jícaro	11-20	LN 16°26'30.61" LO 94°15'49.85"	106			(A)C(w) (5.33 %)
Santiago Niltepec	El Encuentro	21-30	LN 16°29'26.31" LO 94°20'32.44"	67	22 – 28°C	1000–2000 mm	Aw ₁ (65.46%) Aw ₂ (26.70%)
	La Blanca	31-40	LN 16°34'10.71" LO 94°41'55.78"	48			Aw ₀ (7.84%)
Reforma de Pineda	Niltepec	41-50	LN 16°33'08.95" LO 94°36'36.13"	64	24 – 28°C	1200–1500 mm	Aw (100%)
	Guamol	51-60	LN 16°30'06.81" LO 94°28'33.25"	45			
Reforma de Pineda	El Crucero	61-70	LN 16°25'01.25" LO 94°26'23.82"	51	24 – 28°C	1200–1500 mm	Aw (100%)
	La Esperanza	71-79	LN 16°23'15.87" LO 94°27'31.89"	21			
	Reforma	80-88	LN 16°23'54.59" LO 94°28'02.22"	19			

Tipo de Clima:

Aw=cálido subhúmedo con lluvias en verano

Aw₂ =cálido subhúmedo con lluvias en verano, más húmedo

Aw₁ =cálido subhúmedo con lluvias en verano, de humedad media

Aw₀ =cálido subhúmedo con lluvias en verano, menos húmedo

(A)C(w) = semicálido subhúmedo con lluvias en verano

3.3 Caracterización molecular

3.3.1 Limpieza y almacenamiento del material vegetativo

Para llevar a cabo la caracterización molecular de los materiales colectados se tomaron algunas hojas de cada una de las plantas colectadas y se lavaron con hipoclorito de sodio y agua destilada para eliminar las impurezas que pudieran traer del campo. En este paso se evitó utilizar etanol al 70 %, ya que se observó que las hojas se oxidaban muy rápido, lo cual generaba un ADN de baja pureza. Posteriormente las hojas se secaron con toallas sanitas y se pesó 0.9 g de hoja de cada planta, ya que la extracción de ADN se realizó por triplicado. Una vez pesado el material vegetativo se depositó en bolsas de plástico y se almacenó en un ultracongelador a -50°C para su posterior análisis.

3.3.2 Extracción de ADN

La extracción del ADN se llevó a cabo mediante el método de bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB por sus siglas en inglés) (Doyle y Doyle, 1987), al cual se le realizaron algunas modificaciones.

La cantidad de amortiguador de extracción CTAB (Tris HCl 100 mM, EDTA 50 mM, NaCl 50 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, SDS 1.3%, pH 8.0) requerida para extraer el ADN de las 90 colectas, cada una de ellas por triplicado, se depositó en un matraz, al cual se le adicionó 20 µL de 2-mercaptoetanol por cada 10 mL de amortiguador. Se agitó la solución y con una micropipeta se tomó 700 µL y se depositaron en cada uno de los tres tubos Eppendorf de 1.5 mL correspondientes a cada colecta, luego los tubos se colocaron en un termoblock (Thomas Scientific, E.U.A.) a 65 °C durante 10 minutos.

Para realizar la extracción de ADN el material vegetativo de las diferentes colectas se depositó en morteros de porcelana, se les agregó nitrógeno líquido

y se procedió a macerarlas hasta obtener un polvo fino, el cual se distribuyó entre los tres tubos de cada colecta. Luego los tubos se colocaron en un termoblock (Thomas Scientific, E.U.A.) a 65 °C durante 20 minutos, tras lo cual se retiraron del termoblock y se depositaron en una centrifuga FRONTIER™ 5515(OHAUS, E.U.A.), donde se centrifugaron a 21,000 xg durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo el sobrenadante de cada tubo se transfirió a un tubo nuevo, al cual se le adicionó 4 µL de ARNasa y se puso en el termoblock a 37 °C durante 20 minutos. A continuación, los tubos fueron retirados del termoblock y se les agregaron 600 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se agitaron por inversión durante 2 minutos y se centrifugaron a 15,000 xg durante 5 minutos. Posteriormente se extrajo el sobrenadante de cada muestra y se transfirió a un nuevo tubo, al cual se le adicionaron 600 µL de isopropanol frío y se agitó por inversión para precipitar los ácidos nucleicos. Finalmente, los tubos se colocaron en el congelador a -20 °C durante 30 minutos.

Después de transcurrido este tiempo los tubos se sacaron del congelador y se centrifugaron a 15,000 xg durante 5 minutos, el sobrenadante de cada tubo se desechó dejando sólo la pastilla de ADN. A continuación, los tubos se escurrieron en sanitas y se pusieron a secar en el termoblock a una temperatura de 37°C durante 15 minutos. Posteriormente a cada tubo se le agregaron 50 µL de TE pH 8.0 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) y se guardaron en el refrigerador a 4 °C durante 24 horas. Después de transcurrido este tiempo los tubos se agitaron suavemente para disolver la pastilla de ADN, y el contenido de los tres tubos que correspondían a una misma colecta se combinó en un solo tubo y se guardó en el refrigerador a 4°C.

Con la finalidad de aumentar la cantidad y mejorar la pureza del ADN extraído, inicialmente al amortiguador de extracción se le adicionó PVP al 0.1 % y 3 µL de proteinasa K y se probó con algunas muestras. Sin embargo, esta modificación no mejoró las condiciones de extracción, por lo que ya no fue utilizada al trabajar el resto de las muestras.

3.3.3 Medición de la cantidad y pureza del ADN

La cuantificación del ADN se llevó a cabo empleando un Nanodrop™ LITE (Thermo Scientific, U.S.A), para lo cual primero se calibró el equipo y posteriormente se depositaron 4 μ L del ADN de cada muestra en el lector del Nanodrop y éste proporcionó la concentración presente.

Antes de realizar la prueba de calidad, se tomó parte del ADN de cada colecta y se diluyó a una concentración uniforme de 10 ng/ μ L. Luego se preparó un gel de agarosa al 1.8 %, para lo cual se pesó 2.16 g de agarosa y se depositó en un matraz Erlenmeyer, posteriormente al matraz se le adicionaron 120 mL de TAE 1x y se agitó suavemente. Posteriormente se calentó en un horno de microondas para disolver completamente la agarosa, luego la solución se enfrió mediante agitación y se depositó en un portagel, inmediatamente se colocaron los peines en el portagel y una vez que la agarosa hubo gelificado, el portagel se depositó en una cámara de electroforesis OWL D3-14 (Thermo Scientific, U.S.A.) y se le agregó TAE 0.25 x hasta cubrir completamente el gel, tras lo cual se retiraron los peines.

Posteriormente se cargó 5 μ L de marcador de peso molecular (Invitrogen de 1 kb Cat. No.10787018) en cada una de las esquinas del gel, luego se midió 2 μ L de amortiguador de carga para cada una de las muestras y se depositó sobre cinta Parafilm. Después la solución de ADN de cada muestra se mezcló con los 2 μ L de amortiguador de carga y se cargó el gel. La electroforesis se realizó a 120 voltios durante 1 hora y media aproximadamente. A continuación, el gel se retiró de la cámara de electroforesis y se tiñó en bromuro de etidio durante 15 minutos, tras lo cual se fotodocumentó en un transiluminador DigiDoc-it (UVP, U.S.A.).

3.3.4 Amplificación del gen 16s

Debido a que en el gel de calidad existieron muestras que no presentaron una banda de ADN bien definida, posiblemente debido a la presencia de inhibidores en la solución, se decidió realizar una prueba de amplificación del gen cloroplástico 16S. Los componentes de la mezcla de reacción se presentan en el Cuadro 2. Con una micropipeta se tomaron 22.5 μL de la mezcla y se colocaron en microtubos de 0.2 mL, los cuales habían sido previamente marcados y posteriormente se agregaron 2.5 μL de la solución de ADN de cada colecta.

Cuadro 2. Reactivos empleados en la mezcla de reacción para amplificar el gen cloroplástico 16S.

Reactivos	Concentración Final	1x (μL)	90x (μL)
H ₂ O grado biología molecular		6.2	558
dNTP's	200 mM	10	900
Amortiguador	1x	2.5	225
MgCl ₂	3 mM ⁻¹	1.5	135
Iniciador 16S1	10 pmol/reacción	1	90
Iniciador 16S2	10 pmol/reacción	1	90
Taq ADN polimerasa	1.5 U/reacción	0.3	27
ADN de las muestras	25 ng/reacción	2.5	

Los microtubos se colocaron en un termociclador Techne TC-412 (Bibby Scientific, U.S.A.), el cual se programó con las temperaturas y los tiempos que se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Temperaturas y tiempos para la amplificación del gen cloroplástico 16S.

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo	N° de ciclos
Predesnaturalización	94	3 minutos	1
Desnaturalización	94	20 segundos	35
Alineamiento	55	1 minuto	35
Extensión	72	1 minuto	35
Extensión final	72	6 minutos	1
Enfriamiento	10	α	

Para poder observar los productos amplificados se preparó un gel de agarosa al 1.8 %, el cual se cargó con un marcador de peso molecular, así como con los productos amplificados y se realizó la electroforesis a 120 voltios durante 1 hora y media. Luego el gel se retiró de la cámara y se tiñó con bromuro de etidio durante 15 minutos. Finalmente, se fotodocumentó en un transiluminador DigiDoc-it (UVP, U.S.A.)

3.3.5 Fenolización de la solución de ADN

La prueba de amplificación del gen cloroplástico 16S demostró que el protocolo de extracción de ADN aplicado había sido exitoso, sin embargo, su calidad no era la necesaria para llevar a cabo su amplificación, por lo que a fin de eliminar de la solución los inhibidores aún presentes se llevó a cabo la fenolización de las muestras de la siguiente manera. En un tubo Eppendorf se colocó la solución de ADN correspondiente a cada muestra y se le agregó agua grado biología molecular hasta alcanzar un volumen de 400 μ L. Posteriormente se agregó un volumen de fenol (400 μ L) y se agitó por inversión. Luego los tubos se centrifugaron a 21,000 xg durante 5 minutos. Transcurridos los 5 minutos se retiraron de la centrifuga y el sobrenadante se transfirió a otro microtubo y se agregó un volumen de cloroformo igual al que se había agregado de sobrenadante. Los tubos se agitaron por inversión y fueron centrifugados a 21,000 xg durante 5 minutos. A continuación, la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo, al cual se le adicionaron 500 μ L de isopropanol. Luego los microtubos se agitaron por inversión y se depositaron en el congelador a 4°C durante 20 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 21,000 xg durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se dejó sólo la pastilla de ADN. Luego los tubos se pusieron sobre toallas sanitas para escurrir el exceso de sobrenadante y a continuación se colocaron en el termoblock a 37°C durante aproximadamente 15 minutos para eliminar los restos de sobrenadante y secar la pastilla de ADN. Finalmente, se les agregaron 50 μ L de TE, tras lo cual se

depositaron en el refrigerador a 4 °C durante un periodo de 24 horas. Transcurrido este tiempo los tubos se agitaron para disolver la pastilla de ADN y se procedió a cuantificar nuevamente la cantidad de ADN obtenida por muestra. Posteriormente se procedió a correr de nuevo el gel de calidad y a realizar la amplificación del gen 16S.

3.3.6 Purificación de ADN mediante columnas

Debido a que a pesar de haber llevado a cabo el proceso de fenolización algunas muestras siguieron presentando baja calidad de ADN, se decidió utilizar el kit de purificación de ADN genómico PureLink™ Genomic Plant DNA Purification Kit con número de catálogo K183001 (Invitrogen, U.S.A.), el cual consiste en un sistema de columnas de centrifugación en fase sólida que purifica el ADN en 40 minutos. Una vez aplicado este procedimiento fue posible obtener ADN de alta calidad necesario para llevar a cabo la caracterización molecular de las muestras colectadas.

3.3.7 Obtención de patrones ISSR

Con el ADN de alta calidad obtenido se procedió a realizar las diluciones necesarias para homogeneizar todas las muestras a una concentración de 10 ng/μL. Se preparó una mezcla de reacción a 90x para cada iniciador colocando en un tubo Eppendorf de 1.5 mL los reactivos presentados en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Reactivos empleados para realizar la mezcla de reacción de PCR.

Reactivos	Concentración Final	1x (μL)	90x (μL)
H ₂ O grado biología molecular	----	5.2	468
dNTP´s	200 Mm	10	900
Amortiguador	1x	2.5	225
MgCl ₂	3 Mm ⁻¹	1.5	135
Iniciador	30 ng/reacción	3	270
Taq ADN polimerasa	1.5 U/reacción	0.3	27
ADN de las muestras	25 ng/reacción	2.5	

Una vez preparada la mezcla de reacción, ésta se agitó para mezclar todos los componentes y se depositaron 22.5 µL en tubos de 0.2 mL que previamente habían sido marcados con el correspondiente número de colecta. A continuación, a cada microtubo se le adicionaron 2.5 µL del ADN correspondiente a cada colecta. Para la obtención de los patrones de bandeo se utilizaron 10 iniciadores ISSR cuya secuencia y temperaturas de alineamiento se presentan en el Cuadro 6. Los microtubos conteniendo un volumen final de 25 µL se colocaron en un termociclador, el cual se programó con las temperaturas y los tiempos que se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Condiciones de temperatura de los ciclos de amplificación de la PCR para la obtención de patrones ISSR.

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo	N° de ciclos
Predesnaturalización	93	1 minuto	1
Desnaturalización	93	20 segundos	40
Alineamiento	+	1 minuto	40
Extensión	72	20 segundos	40
Extensión final	72	6 minutos	1
Enfriamiento	10	α	

*La (T_m °C) varió dependiendo de cada iniciador (ver Cuadro 6).

Los productos de amplificación fueron separados en un gel de agarosa al 1.8 %, mediante electroforesis a 120 voltios durante una hora y media aproximadamente, después el gel se retiró de la cámara de electroforesis y se tiñó en bromuro de etidio durante 15 minutos, tras lo cual se fotodocumentó en un transiluminador DigiDoc-it (UVP, U.S.A.).

Cuadro 6. Iniciadores ISSR utilizados para la obtención de patrones de bandeo de *Hyptis suaveolens*.

N°	Iniciador	Secuencia 5´- 3´	Tm °C
1	ISSR-02	(CA) ₈ AAGCT	62
2	ISSR-03	(GA) ₈ CTC	58
3	ISSR-04	(AG) ₈ CTC	58
4	ISSR-07	(AG) ₈ CTG	56
5	ISSR-09	(AG) ₈ C	52
6	ISSR-10	(GA) ₈ T	50
7	UBC 811	(GA) ₈ C	52
8	UBC 823	(TC) ₈ C	52
9	HY6	(TC) ₈ G	49
10	HY8	(AG) ₈ TC	46

3.4 Evaluación de la toxicidad de extractos

La evaluación de la citotoxicidad de los diferentes extractos obtenidos de la planta de Chan (*Hyptis suaveolens* L. Poit.) se realizó empleando el modelo propuesto por Meyer *et al.*, 1982 y Michael *et al.*, 1956.

3.4.1 Colecta y secado de material vegetativo

La colecta del material vegetativo empleado en la preparación de los extractos se efectuó en campo para lo cual se colectaron solamente hojas, las cuales se trasladaron al laboratorio en donde se pusieron a secar a la sombra sobre papel periódico durante un lapso de 5 días, tras lo cual se guardaron en bolsas de plástico.

3.4.2. Preparación de extractos

Las hojas que previamente se habían puesto a secar a la sombra se molieron con la ayuda de un procesador Nutribullet®, posteriormente se pesó 1.5 kg de hojas molidas y se colocaron en un botellón de cristal, al cual se le adicionó etanol hasta cubrir dos centímetros por arriba del nivel de las hojas. Posteriormente el material vegetativo se dejó reposar en el etanol por un periodo de tres días, al cabo de dicho periodo el líquido se hizo pasar por un embudo que contenía papel filtro a fin de separar el extracto etanólico de las hojas molidas y este se traspasó a otro recipiente.

El extracto etanólico se destiló en un rotavapor a fin de recuperar el etanol empleado y concentrar los compuestos extraídos por dicho disolvente. El etanol recuperado se regresó al recipiente que contenía las hojas molidas a fin de dejarlo reposar nuevamente por un segundo periodo de tres días. El extracto etanólico obtenido se depositó en un refractario. El procedimiento de extracción se llevó a cabo tres veces y todo el extracto etanólico obtenido se depositó en una campana de extracción durante 5 días a fin de eliminar el disolvente que aún pudiera tener. Una vez evaporado y con la ayuda de una espátula se raspó el extracto etanólico, se pesó y se guardó en un frasco ámbar, el cual se mantuvo bajo refrigeración hasta que se utilizó en ensayos posteriores.

3.4.3 Partición de extractos

Para llevar a cabo la partición de los extractos, en un vaso de precipitado se depositó extracto etanólico y se le adiciono hexano en una proporción 1:20 (p/v), y se agito vigorosamente hasta formar una fase homogénea. Luego se adicionó agua destilada en una proporción 1:1 (v/v) y la mezcla se colocó en un embudo de separación, el cual se agitó suavemente por algunos segundos a fin de extraer los metabolitos solubles en hexano y se dejó reposar esta mezcla hasta que se separaron la fase hexánica (superior) y la fase acuosa(inferior).

La fase acuosa se regresó al embudo de separación, mientras que la fase hexánica se depositó en un rotavapor a fin de separar por un lado el hexano y por otro el extracto hexánico. El hexano recuperado se regresó al embudo de separación volviéndose a mezclar con la fase acuosa, mientras que el extracto hexánico se depositó en un refractario. Este proceso se repitió tres veces y al final el refractario conteniendo el extracto hexánico total se depositó en una campana de extracción a fin de extraer el disolvente aun presente. El extracto hexánico se raspó con una espátula, se pesó y se depositó en un frasco ámbar el cual se guardó en el refrigerador. La fase acuosa se mantuvo en el embudo de separación. A la fase acuosa anterior se le adicionó cloruro de metileno en una proporción 1:1 (v/v) y se efectuaron las extracciones correspondientes bajo la misma metodología empleada en la extracción del extracto hexánico. Finalmente, a la fase acuosa residual se le efectuaron tres extracciones empleando acetato de etilo, mismo que fue colocado en un plato refractario y evaporado en una campana de extracción, para posteriormente raspar el residuo y guardarlo en un frasco ámbar. Por último, la fase acuosa se retiró del embudo de separación y se vació en un refractario, el cual se depositó en una campana de extracción a fin de eliminar toda el agua aprovechando su presión de vapor normal. Luego el extracto acuoso se pesó y se almaceno en el refrigerador. La metodología de extracción descrita anteriormente se ilustra en la Figura 5.

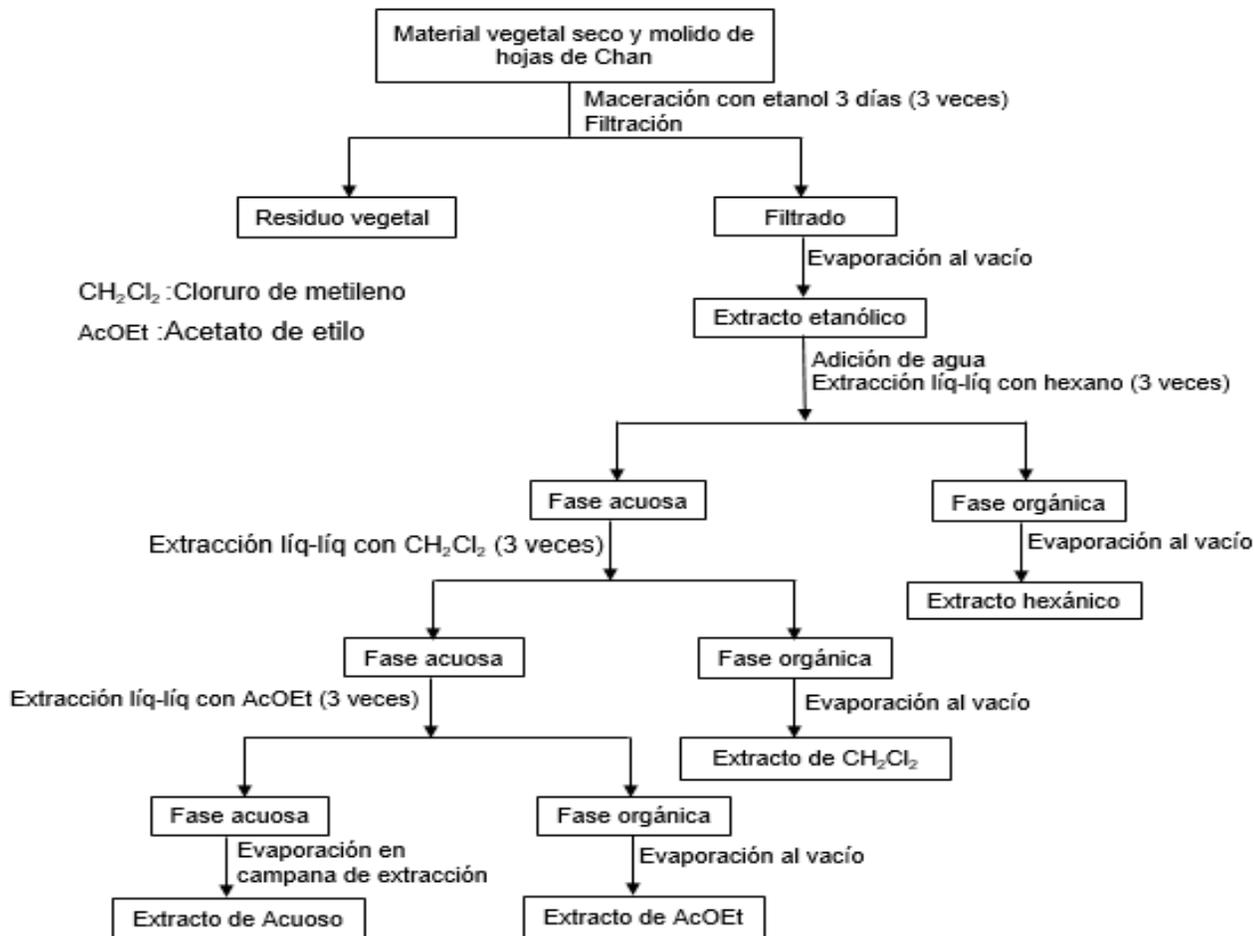


Figura 5. Procedimiento para la obtención de extractos de diferente polaridad de hojas de Chan (*Hyptis suaveolens* L. Poit.).

3.4.4 Eclosión de *Artemia salina*

Artemia salina es una especie de crustáceo braquiópodo que se reproduce por quistes y que es empleado en bioensayos para la detección de toxicidad de compuestos. Los quistes de *Artemia salina* empleados en el presente trabajo se compraron en un acuario. Para la eclosión de los quistes primero se preparó el agua salina en donde se depositarían estos, para lo cual se pesó 228 g de sal de mar y se disolvió en 6 L de agua destilada, obteniendo una concentración de 28 g/L. Luego el agua salina se colocó en una pecera y se le hizo pasar aire a fin de oxigenarla. A continuación se pesaron 150 mg de quistes de *Artemia salina* y se depositaron en la pecera. A fin de mantenerla iluminada se colocó

en la parte superior un foco de 60 watts. Los quistes se mantuvieron en la pecera por un periodo de 24 horas, luego de lo cual se obtuvieron las larvas de *Artemia salina*.

3.4.5 Concentraciones de extractos evaluados

Con la finalidad de establecer la toxicidad de las hojas de *Hyptis suaveolens* L. Poit. se evaluaron los extractos etanólico, hexánico, cloruro de metileno, acetato de etilo y acuoso a las concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1,000, 10,000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, para lo cual primero se preparó una solución madre a una concentración de 10,000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de cada uno de los extractos, disolviendo 50 mg de extracto en 5 mL de acetona. Posteriormente se realizaron las diluciones necesarias para obtener el resto de las concentraciones evaluadas. De cada tratamiento se tomaron 0.5 mL y se depositaron en un vial de cristal, considerando tres repeticiones por cada concentración. El disolvente se evaporó a temperatura ambiente durante un periodo de 24 horas. Como tratamiento testigo se usó 0.5 mL de acetona.

3.4.6 Evaluaciones de toxicidad

Una vez que las larvas de *Artemia salina* tenían 24 horas de haber eclosionado y que el disolvente se había evaporado completamente de los extractos depositados en los viales, con la ayuda de una pipeta Pasteur de cristal se tomaron 10 larvas y se depositaron en cada uno de los viales que contenían cada concentración de prueba. Se aforó a un volumen de 5 mL con agua salada que se hallaba a una concentración de 28 g/L. Posteriormente los viales se colocaron en una incubadora donde se controló la temperatura y la aireación y se colocó un foco de 60 watts. Al cabo de 24 horas se contabilizó el número de larvas muertas en cada vial.

3.5 Análisis estadístico

Las bandas que se obtuvieron como producto de la amplificación de cada iniciador evaluado se registraron para crear una Matriz Básica de Datos (MBD) asignando el valor de 1 a la presencia y 0 a la ausencia de las bandas en cada uno de los geles obtenidos. La MBD se usó para calcular diferentes similitudes y distancias genéticas entre las cuales se seleccionó la distancia de Dice ($1 - S$) para calcular las distancias entre pares de muestras. Con las distancias obtenidas se realizó un análisis de agrupamiento empleando el método de varianza mínima de Ward. Con el objetivo de corroborar el agrupamiento obtenido mediante la observación de la distribución espacial de las muestras se llevó a cabo un Análisis de Coordenadas Principales.

A fin de particionar la variabilidad genética entre y dentro de poblaciones se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA). Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis descriptivo de marcadores a fin de definir aquéllos más útiles en el estudio de la variación genética de hierba de Chan. Por último, se realizó un análisis de diversidad de las poblaciones muestreadas usando el Índice de Diversidad de Shannon-Weaver. Los análisis descritos anteriormente se realizaron con el programa estadístico InfoGen® de la Universidad de Córdoba, Argentina. Los resultados obtenidos a partir de la evaluación de la toxicidad de los diferentes extractos de la planta de Chan empleando larvas de *Artemia salina* permitieron estimar la Concentración Letal 50 (CL_{50}), la cual se calculó empleando la función Probit del programa estadístico SAS® Ver.9.0

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis de agrupamiento

La Matriz Básica de Datos (MBD) se usó para calcular las distancias genéticas de Dice ($1 - S$) entre las diferentes accesiones y con ellas se realizó un análisis de agrupamiento mediante el método de varianza mínima de Ward y se obtuvo el dendograma que se presenta en la Figura 4. En esta figura se aprecia que las nueve localidades donde se realizaron las colectas de material vegetativo se conglomeraron en dos grupos claramente definidos a una altura de corte de 0.58. El grupo I estuvo conformado por las tres localidades correspondientes al municipio de Santo Domingo Zanatepec más dos localidades pertenecientes al municipio de Santiago Niltepec, La Blanca y Niltepec. A partir de la información presentada en el Cuadro 1 de la sección de materiales y métodos se puede apreciar que estas cinco localidades son las que presentan la mayor altitud sobre el nivel del mar (45 – 106 m). Por lo que los ambientes climáticos asociados a esta condición geográfica son de mayor peso en la determinación de la similitud genética que los criterios antropogeográficos de división municipal. Esto sugiere que es conveniente una mayor precisión en la caracterización del medio ecológicos de los sitios de colecta. El grupo II estuvo conformado por las tres localidades del municipio de Reforma de Pineda y Guamol, una localidad del municipio de Santiago Niltepec, las cuales tienen en común el presentar las menores altitudes sobre el nivel del mar (19 – 51 m).

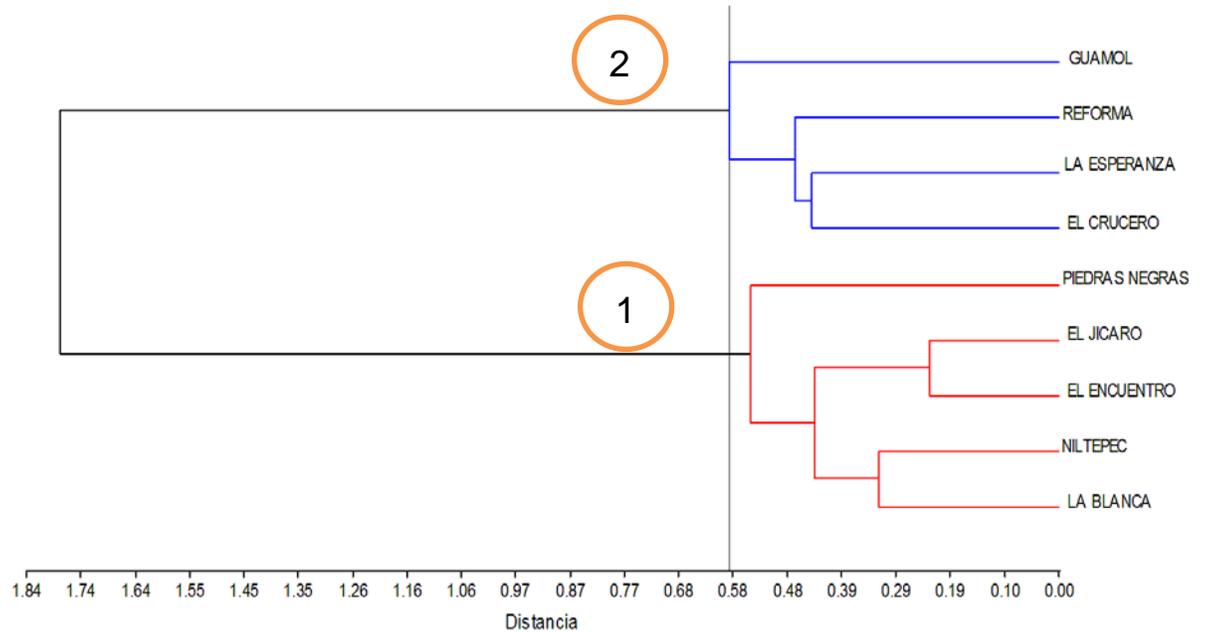


Figura 6. Dendrograma construido a partir de la distancia de Dice ($1 - S$) y el método de agrupamiento de varianza mínima de Ward de 9 poblaciones de *Hyptis suaveolens* colectadas en el Istmo de Tehuantepec, Oaxaca.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con lo establecido por Sharma y Raghubanshi (2009) y Saha *et al.* (2017), quienes encontraron que la hierba de Chan es una especie altamente adaptativa en la naturaleza y ampliamente distribuida geográficamente debido a su alta plasticidad fenotípica que le permite tener éxito en la colonización de áreas ambientalmente diversas.

4.2 Análisis Coordenadas Principales

A fin de observar la distribución espacial de las poblaciones de *Hyptis suaveolens* colectadas se realizó un análisis de coordenadas principales usando la distancia de Dice ($1-S$) mediante el programa InfoGen®. El diagrama obtenido se presenta en la Figura 5. En ella se puede apreciar que las coordenadas I y II explicaron el 72.8 % de la variabilidad genética existente y separan claramente en dos grupos las nueve poblaciones muestreadas. El ordenamiento de muestras basado en la caracterización molecular coincide con

el análisis de agrupamiento realizado previamente. La variabilidad genética presente en ambos grupos podría aprovecharse para comenzar un programa de mejoramiento genético a fin de obtener híbridos en esta especie vegetal, ya que como mencionan Groszmann *et al.* (2010) la magnitud de la heterosis esperada estará en función directa de la distancia genética entre los padres del híbrido.

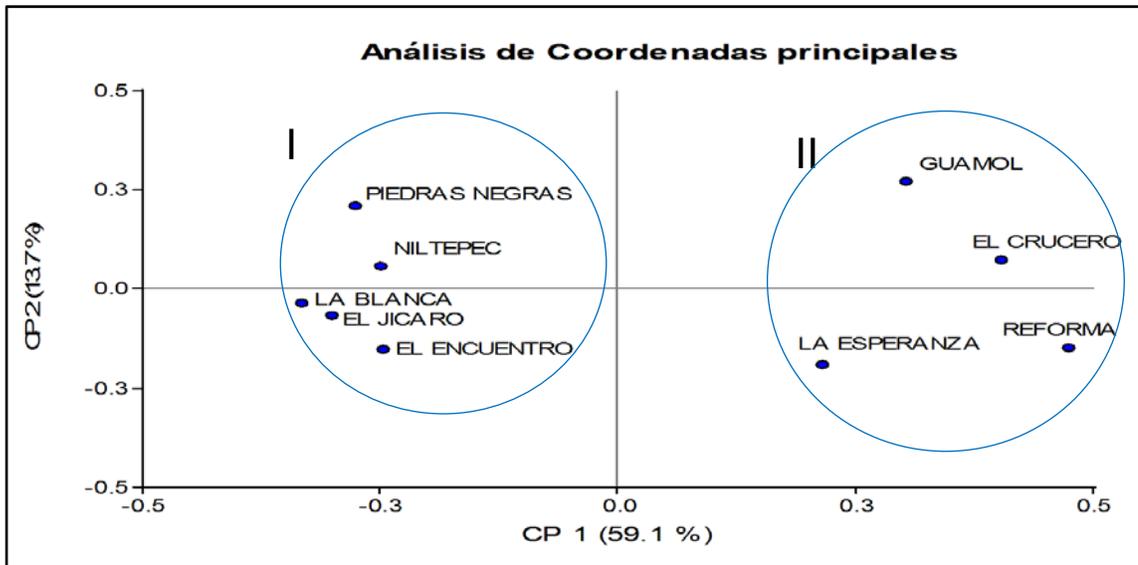


Figura 7. Diagrama de dispersión obtenido a partir del análisis de coordenadas principales de 9 poblaciones de *Hyptis suaveolens* a partir de las distancias de Dice (1 – S) utilizando 10 marcadores moleculares tipo ISSR.

4.3 Análisis Molecular de Varianza (AMOVA)

La evaluación de la distribución de la variabilidad molecular existente entre y dentro de las poblaciones mediante el Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) (Cuadro 7) muestra que la mayor variabilidad genética se localiza dentro de las poblaciones (76.37 %), mientras que el 23.63 % restante se presentó entre las poblaciones. Los resultados descritos permiten ver que, en caso de comenzar un programa de mejoramiento genético en esta especie, la extensa variabilidad existente dentro de las poblaciones puede ser un punto de partida para elegir las características que se deseen mejorar.

El poder conocer cómo se distribuye la variabilidad genética de esta especie vegetal en las poblaciones evaluadas permite tomar decisiones acerca de la

conservación de esta variabilidad genética, ya que como mencionan Szczecińska *et al.* (2016) la diversidad genética dentro y entre las poblaciones debe identificarse para seleccionar las poblaciones responsables de la mayoría de la variación existente. Si la variación genética se encuentra principalmente dentro de una población, entonces se requieren menos poblaciones para proteger y mantener la variación general en el rango geográfico de una especie determinada.

Cuadro 7. Análisis molecular de varianza de 88 colectas de hierba de Chan (*Hyptis suaveolens* L. Poit.).

F.V.	GI	SC	CM	p-valor	Iter. #	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre Poblaciones	8	510.88	63.86	<0.0001	400	4.91	23.63
Dentro de poblaciones	79	1253.26	15.86	<0.0001	400	15.86	76.37
Total	87	1764.14	20.28			20.77	100.00

FV=Fuente de variación, GI=grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=cuadrados medios

La extensa variación genética existente en las poblaciones analizadas de la planta de Chan se debe en gran medida a que dichas poblaciones son completamente silvestres, por lo cual, al no haber sido mejoradas genéticamente, aún conservan una extensa variabilidad. Otro de los factores que sin duda influye en la variabilidad genética son las mutaciones espontaneas que se producen dentro de las poblaciones (Gadidasu *et al.*, 2011), así como el sistema alógamo de reproducción que presenta esta especie (Saha *et al.*, 2017).

4.4 Descriptiva de marcadores

En el Cuadro 8 se presenta la descriptiva de los diez iniciadores ISSR utilizados para la obtención de los perfiles moleculares de las nueve poblaciones analizadas de la planta Chan (*Hyptis suaveolens* L. Poit). Este análisis se

obtuvo con el programa InfoGen® a partir de la MBD. Los resultados obtenidos muestran que ninguna de las 88 colectas analizadas se encuentra duplicada.

Cuadro 8. Análisis descriptivo de 10 iniciadores ISSR usados en el análisis de 9 poblaciones de *Hyptis suaveolens* L. Poit.

Iniciador	BP	BM	BT	PMF (95)	PIC	E.E.	AMP	PDICMA
ISSR2	12	0	12	1.00	0.26	0.03	36.84	3.7E-12
ISSR3	18	0	18	0.83	0.23	0.03	22.35	1.5E-11
ISSR4	10	0	10	0.90	0.28	0.02	37.50	1.9E-13
ISSR7	18	0	18	0.89	0.23	0.03	20.64	7.5E-12
ISSR9	12	0	12	1.00	0.25	0.02	37.41	1.0E-10
ISSR10	11	0	11	0.82	0.26	0.02	46.28	5.9E-11
UBC811	14	0	14	0.86	0.23	0.02	31.25	8.7E-11
UBC823	13	0	13	0.77	0.24	0.02	31.47	1.2E-10
HY6	10	0	10	0.70	0.26	0.02	32.27	9.1E-14
HY8	12	0	12	0.83	0.27	0.03	37.12	2.7E-13
Total	130	0	130				32.03	1.3E-112

BP=Numero de bandas polimórficas; BM=Número de bandas monomórficas; BT=Número de bandas totales; PMF=Proporción de loci polimórficos; PIC=Contenido de información polimórfica; E.E.=Error estándar del PIC; AMP=Porcentaje de amplificación; PDICMA=Probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo por azar.

Los 10 iniciadores evaluados presentaron 100 % de polimorfismo. Los iniciadores que más bandas amplificaron fueron el iniciador ISSR3 (18 bandas) con 22.35 % de amplificación a través de las 88 muestras, así como el ISSR7 (18 bandas) con 20.64 % de amplificación. Los mayores valores de información polimórfica (PIC) fueron obtenidos con los iniciadores ISSR4, HY8, ISSR2, ISSR10 (Figura 6) y HY6, lo cual indica que estos iniciadores son los más informativos y pueden considerarse de gran utilidad en estudios posteriores de caracterización en esta especie vegetal. Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con los obtenidos por Gadidasu *et al.* (2011), quienes encontraron que los marcadores HY8, ISSR10 y HY6 fueron los que presentaron los mayores valores de PIC en poblaciones de hierba de Chan de la India.

La menor probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo por azar (PDICMA) fue obtenida por los iniciadores ISSR9, UBC823, ISSR3 e ISSR10, lo

cual indica que estos iniciadores presentan un alto grado de confiabilidad para la selección de individuos que pudieran ser empleados en el mejoramiento genético de esta especie. Los resultados también muestran que el iniciador UBC823 fue el que presentó la menor capacidad discriminatoria, así como el menor contenido de información polimórfica. Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que, tal como había sido reportado previamente por Feitosa-Alcantara *et al.* en 2017 para *Hyptis pectinata*, los marcadores ISSR son de gran utilidad cuando se desea obtener los perfiles moleculares de la hierba de Chan (*Hyptis suaveolens*).

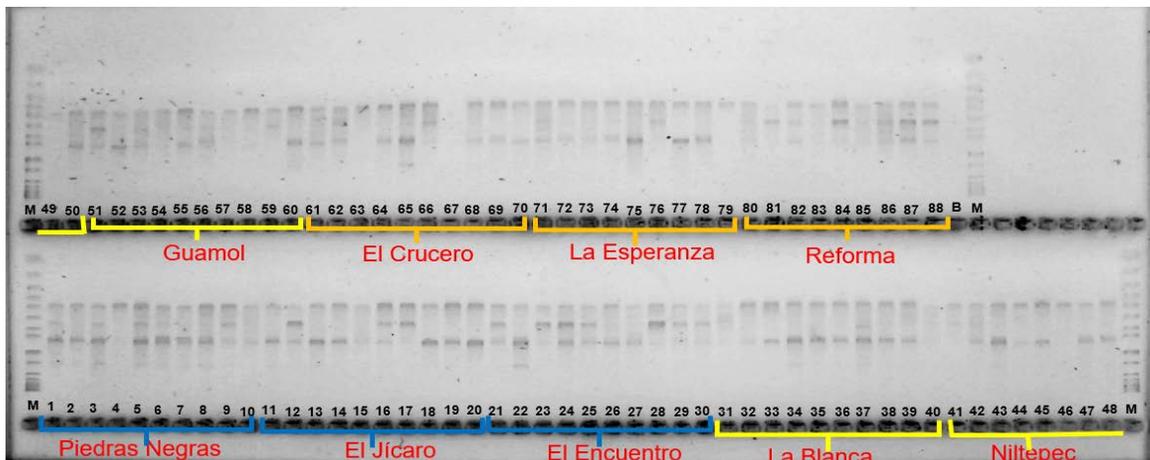


Figura 8. Patrón de bandeo obtenido mediante el iniciador ISSR10 en 88 colectas de hierba de Chan (*Hyptis suaveolens* L. Poit.).

4.5 Índice de diversidad de Shannon-Weaver

El análisis de la diversidad genética de las nueve poblaciones de hierba de Chan estudiadas mediante el Índice de Shannon-Weaver se muestra en el Cuadro 9.

En él se puede apreciar que las poblaciones de hierba de Chan procedentes del municipio 2 (Santiago Nilttepec) fueron las que mostraron la mayor variabilidad genética (4.53). Por lo que en caso de desear mejorar esta especie vegetal

pueden considerarse este municipio como lugar de colecta para elegir a los individuos con las características que se deseen mejorar.

Por otra parte, la menor variabilidad genética que presentan las poblaciones de la planta de Chan procedentes del municipio 3 (Reforma de Pineda) puede deberse en parte a las prácticas agrícolas, específicamente el combate de malezas, ya que la planta de Chan en muchas partes del país aún es considerada como una maleza (Ortega-Acosta *et al.*, 2020), por lo que es común que se le elimine en las primeras etapas de desarrollo, interrumpiendo así el flujo de información genética y disminuyendo con ello la variabilidad presente en las poblaciones.

Cuadro 9. Índice de diversidad de Shannon-Weaver en nueve poblaciones de *Hyptis suaveolens* L. Poit. colectadas en el Istmo de Tehuantepec, Oaxaca.

Municipio	n	I	L _i	L _s	I _{Boot}	EE _{Boot}
1	3	4.45	4.41	4.45	250	0.03
2	3	4.53	4.47	4.53	250	0.08
3	3	4.24	4.19	4.24	250	0.04
Total	9	4.55	4.51	4.57	250	0.03

L_i: límite inferior, L_s: límite superior, I_{Boot}: 250 ciclos de remuestreo (bootstrap) con intervalo de confianza de 0.95, EE_{Boot}: error estándar del remuestreo.

4.6 Evaluación de toxicidad de extractos

La determinación de la concentración letal media (CL₅₀) de los diferentes extractos que se obtuvieron de la planta de Chan (*Hyptis suaveolens* L. Poit) mediante el bioensayo de *Artemia salina* se muestra en el cuadro 10. En él puede observarse que los extractos que presentaron la mayor toxicidad a las 24 horas fueron los extractos etanólico y de acetato de etilo con una CL₅₀ de 25 y 35 µg·ml⁻¹, respectivamente. De manera que, de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, el extracto etanólico de hojas de *Hyptis suaveolens* sería el más recomendable a utilizar como agente antimicrobial o antitumoral de acuerdo a los criterios establecidos por el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos, el cual establece que para que un extracto sea

considerado efectivo en el tratamiento de células cancerígenas debe tener una CL₅₀ inferior a 30 µg·ml⁻¹(Khalighi-Sigaroodi, *et al.*, 2012; Mashjoor y Yousefzadi, 2019; Sukito *et al.*, 2020).

Cuadro 10. Evaluación de la toxicidad (CL₅₀) de extractos de *Hyptis suaveolens* mediante el modelo de *Artemia salina*.

Extractos	Porcentaje de muertes en 24 horas							Límites al 95%*		
	Concentraciones evaluadas en µg/ml							CL 50	LI	LS
	10,000	1,000	100	10	1	0.1	0.01	µg/ml		
Etanólico	100	70	63	20	20	20	17	25	9	80
Hexánico	83	63	53	23	20	17	17	87	24	414
Cloruro de metileno	67	67	50	17	10	10	10	334	96	1750
Acetato de etilo	93	78	63	27	17	10	10	35	14	97
Acuoso	100	40	20	17	17	10	10	415	120	2276

CL₅₀=Concentración letal 50; *Intervalos de confianza al 95 %. LI=Límite inferior; LS=Límite superior

Otros investigadores que realizaron ensayos para evaluar la actividad insecticida de extractos de hojas de Chan contra el gorgojo castaño de la harina (*Tribolium castaneum*) encontraron que el extracto de éter de petróleo de hojas presentó una DL₅₀ de 2.647 mg cm² a las 48 horas y éste fue tres veces más efectivo que el extracto clorofórmico de raíces (Hasan *et al.*, 2018). Por su parte Bezerra y colaboradores (2017) también reportaron la toxicidad del aceite esencial de hierba de Chan en *Drosophyla melanogaster* con una CL₅₀ de 15.5 µg/ml.

Las pruebas para medir la toxicidad de distintos extractos y aceites esenciales de plantas usando el modelo de *Artemia salina* se han llevado a cabo desde hace mucho tiempo (Budaraga *et al.*, 2016) y han contribuido de forma importante en la determinación de la toxicidad de un gran número de especies vegetales a nivel mundial (Fernández-Calienes *et al.*, 2009; Hamidi *et al.*, 2014; Aranda-Ventura *et al.*, 2018). En este sentido, queda por investigar la estructura de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de mayor toxicidad de *Hyptis suaveolens*, etanólico y de acetato de etilo, mediante su análisis por

cromatografía en columna y en capa delgada preparativa principalmente para establecer al menos un perfil de metabolitos empleando técnicas como la espectroscopia de infrarrojo y la resonancia magnética nuclear.

Las diferentes propiedades benéficas que poseen las plantas medicinales las convierte en importantes recursos para la investigación. México tiene un estimado de 30,000 especies de plantas, donde aproximadamente 3,000 a 5,000 son de uso medicinal. La mayoría de las plantas medicinales se recolectan de la naturaleza y sólo el 15% se cultiva (Palma-Tenango *et al.*, 2017). Muchos de los trabajos de mejoramiento genético realizados en México han involucrado el uso de especies silvestres; sin embargo, éstos se han enfocado en mayor medida en especies silvestres con parientes cultivados (Flores-Hernández *et al.*, 2017). Los marcadores moleculares basados en ADN además de contribuir al mejoramiento de las plantas cultivadas, también pueden ayudar a mejorar las especies de plantas medicinales. Estos marcadores se pueden usar para evaluar la diversidad genética, autenticar el material vegetal utilizado para los medicamentos y para la reproducción asistida por marcadores (Kumar y Kumar, 2008). Por lo que el mejoramiento genético de la extensa cantidad de plantas medicinales que existen en nuestro país representa en la actualidad un amplio campo de estudio, lo cual permitiría aumentar el subconjunto vegetal útil que se tiene actualmente entorno a las plantas medicinales.

V. CONCLUSIONES

Los marcadores moleculares tipo ISSR fueron efectivos para el estudio de la variabilidad genética presente en poblaciones naturales de la planta de Chan (*Hyptis suaveolens* L. Poit.).

Las poblaciones de hierba de Chan de la zona del Istmo de Tehuantepec en el estado de Oaxaca muestran una gran variabilidad genética que podría ser de utilidad en futuros programas de mejoramiento de esta especie medicinal. No obstante, para ello es necesario determinar las moléculas o sustancias responsables del efecto medicinal indicado, así como los efectos de la interacción genotipo x ambiente involucradas en su expresión.

Los iniciadores con mayor capacidad discriminante fueron ISSR4, HY8, ISSR2, ISSR10 y HY6, por lo que serían los más recomendados a utilizar para estudios moleculares posteriores en esta especie vegetal.

Todos los extractos de etanol y acetato de etilo obtenidos de hojas de la planta de Chan (*Hyptis suaveolens* L. Poit.). mostraron un alto grado de toxicidad en larvas de *Artemia salina*; esto es indicativo de que la naturaleza de los metabolitos secundarios presentes en estos extractos es de polaridad alta.

VI. LITERATURA CITADA

- Alves, V. M. A., Lima, G. R., Cavalcanti, B. L. A., Eleutério, de S. P.R., Tavares, C. A. de A., Crovela, S. 2009. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Brazilian Journal of Microbiology* 40:1-11. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000100001>
- Amom, T., Nongdam, P. 2017. The use of molecular marker methods in plants: a review. *International Journal of Current Research and Review* 9(17):1-7. DOI: 10.7324/IJCRR.2017.9171
- Aranda-Ventura, J., Villacrés-Vallejo, J., Núñez-Tuesta, L., Marín-Sisley, P., Nonato-Ramírez, L., González-Aspajo, G. 2018. Evaluación de la bioactividad de plantas medicinales cultivadas en el Perú usando la prueba de letalidad de *Artemia salina*. *Revista Peruana de Medicina Integrativa* 3 (3):132-137. DOI: <http://dx.doi.org/10.26722/rpmi.2018.33.93>
- Arcanjo, D.D.R., Albuquerque, A.C.M., Melo-Neto, B., Santana, L.C.L.R., Medeiros, M.G.F., Citó, A. M. G. L. 2012. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. *Brazilian Journal of Biology* 72(3):505-509. DOI: 10.1590/S1519-69842012000300013
- Bhagyawant, S. S. 2016. RAPD-SCAR markers: an interface tool for authentication of traits. *Journal of Biosciences and Medicines* 4(1), 1-9. DOI: 10.4236/jbm.2016.41001
- Bezerra, J.W.A., Costa, A.R., da Silva, M.A.P., Rocha, M.I., Boligon, A.A., da Rocha, J.B.T., Barros, L.M., Kamdem, J.P. 2017. Chemical composition and toxicological evaluation of *Hyptis suaveolens* (L.) Poiteau (LAMIACEAE) in *Drosophila melanogaster* and *Artemia salina*. *South African Journal of Botany* 113:437–442. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.10.003>
- Budaraga, I.K., Arnim, Y. M., Bulanin, U. 2016. Toxicity of liquid smoke cinnamon (*Cinnamomum Burmannii*) production of ways for purification and different concentration. *International Journal of Scientific and Research Publications* 6(7):13-21.

- Collard, B. C. Y., Mackill, D. J. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences* 363:557–572. Doi:10.1098/rstb.2007.2170
- Chukwujekwu, J. C., Smith, P., Coombes, P. H., Mulholland, D. A., Van Staden, J. 2005. Antiplasmodial diterpenoid from the leaves of *Hyptis suaveolens*. *Journal of Ethnopharmacology* 102(2):295-297. DOI: 10.1016/j.jep.2005.08.018
- De la Cruz, A.F., Villarreal, Q. J.A., Estrada, C. A. E., Jasso, C.D. 2017. Flora y vegetación del municipio Álamo Temapache, Veracruz, México. *Acta Botánica Mexicana* 121:83-124. DOI: <http://dx.doi.org/10.21829/abm121.2017.1291>
- De Sá, S., Fiuza, T.S., Borges, L.L., Ferreira, H.D., Tresvenzol, L. M.F., Ferri, P.H., Rezende, M. H., Paula, J.R.2016. Chemical composition and seasonal variability of the essential oils of leaves and morphological analysis of *Hyptis carpinifolia*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 26: 688–693. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2016.05.011>
- Doyle, J.J., Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19(1):11-15.
- Esqueda-Esquivel, V.A., Montero-Lagunes, M., Juárez-Lagunes, F.I.2010. El control de arvenses en la productividad y calidad del pasto llanero. *Agronomía mesoamericana* 21 (1):145-157
- Feitosa-Alcantara, R. B., Silva, A. V. C., Blank, A. F., Almeida, C.S., Alvares-Carvalho, S. V., Arrigoni-Blank. M. F. 2017. Analysis of genetic diversity of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. Plants using ISSR markers. *Genetics and Molecular Research* 16 (3):1-10. DOI: 10.4238/gmr16039603
- Fernández-Calienes, V.A., Mendiola, M.J., Monzote, F.L., García, P.M., Sariego, R.I., Acuña, R.D., Scull, L. R., Gutiérrez, G.Y. 2009. Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 61(3):254-258.

- Flores-Hernández, L.A., Lobato-Ortiz, R., García-Zavala, J.J., Molina-Galán, J.D., Sargerman-Jarquín, D. Ma., Velasco-Alvarado, M. de J. 2017. Parientes silvestres del tomate como fuente de germoplasma para el mejoramiento genético de la especie. *Revista Fitotecnia Mexicana* 40 (1): 83 – 91.
- Fu-Chun, H., Sheng-Fa, T., Shoei-Sheng, L. 2019. Chemical investigation of *Hyptis suaveolens* seed, a potential antihyperuricemic nutraceutical, with assistance of HPLC-SPE-NMR. *Journal of Food and Drug Analysis* 27 (4): 897-905. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.05.006>
- Gadidasu, K. K., Murthy, E. N., Nataraj, P., Srinivas, K., Babu, P.A., Teixeira da Silva, J. A., Raju, V. S., Sadanandam, A. 2011. ISSR markers reveal genetic polymorphism in two morphological variants of *Hyptis suaveolens* invasive to India. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* 5 (2):166-168.
- Gadir, S. A. 2012. Assessment of bioactivity of some Sudanese medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 4(12):5145-5148.
- González-Gallegos, J. G., Castro-Castro, A., Quintero-Fuentes, V., Mendoza-López, M. E., De castro-Arce, E. 2014. Revisión taxonómica de *Lamiaceae* del occidente de México. *Ibugana*, 7:3–545.
- Groszmann, M., Greaves, I.K., Albertyn, Z.I., Scofield, G. N., Peacock, W.J., Dennis, E. S. 2010. Changes in 24-nt siRNA levels in *Arabidopsis* hybrids suggest an epigenetic contribution to hybrid vigor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(6):2617-2622. DOI: 10.1073/pnas.1019217108
- Grover A. I., Sharma, P. C. 2016. Development and use of molecular markers: past and present. *Critical Reviews in Biotechnology* 36(2):290-302. DOI: 10.3109/07388551.2014.959891
- Gupta, N. 2019. DNA extraction and polymerase chain reaction. *Journal of Cytology*, 36(2):116–117. Doi: 10.4103/JOC.JOC_110_18

- Hamidi, M. R., Jovanova, B., Kadifkova, P.T. 2014. Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. Macedonian Pharmaceutical Bulletin 60(1):9-18.
- Hasan, K., Naser, A. A., Sabiha, S., Nesa, M., Khan, M., Islam, N. 2018. Control potentials of *Hyptis suaveolens* L. (Poit.) extracts against *Artemia salina* L. Nauplii and *Tribolium castaneum* (HBST.) adults. Journal of Entomology and Zoology Studies 6(1):785-789.
- INEGI 2015. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos Santo Domingo Zanatepec, Oaxaca. Disponible en: http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/20/20525.pdf
- Islam, A. K. M. M., Ohno, O., Suenaga, K., Kato-Noguchi, H. 2014. Suaveolic acid: a potent phytotoxic substance of *Hyptis suaveolens*. The Scientific World Journal 2014:1-6.
- Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., Amini-Khoei, H. 2018. Medicinal plants: past history and future perspective. Journal of Herbmed Pharmacology, 7(1):1-7.
- Khalighi-Sigaroodi, F., Ahvazi, M., Hadjiakhoondi, A., Taghizadeh, M., Yazdani, D., Khalighi-Sigaroodi, S., Bidel, S. 2012. Cytotoxicity and antioxidant activity of 23 plant species of *Leguminosae* family. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 11(1):295-302.
- Khoury, M., Stien, D., Eparvier, V., Ouaini, N., & El Beyrouthy, M. 2016. Report on the Medicinal Use of Eleven Lamiaceae Species in Lebanon and Rationalization of Their Antimicrobial Potential by Examination of the Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Their Essential Oils. Evidence-based complementary and alternative medicine 2016:1-17. <https://doi.org/10.1155/2016/2547169>
- Krishnaraju, A.V., Rao, T.V.N., Sundararaju, D., Vanisree, M., Tsayb, H-S., Subbaraju, G.V. 2006. Biological Screening of Medicinal Plants Collected from Eastern Ghats of India Using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). International Journal of Applied Science and Engineering 4 (2): 115-125.

- Kumar, J., Kumar, G. P. 2008. Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. *Plant Biotechnology Reports* 2(2):93-112
DOI 10.1007/s11816-008-0059-2
- Kumar, P., Gupta, V.K., Misra, A.K., Modi D. R., Pandey, B. K. 2009. Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics Journal* 2(4):141-162.
- Lancíková, V., Žiarovská, J., Bežo, M., Ražná, K., Rashydov, N.M., Hajduch, M. 2014. Trehalose-based additive improved inter-primer binding site reactions for DNA isolated from recalcitrant plants. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 3 (2):116-118.
- Lara-Cabrera, S. I., Bedolla-García, B. Y., Zamudio, S., Domínguez-Vázquez, G. 2016. Diversidad de *Lamiaceae* en el estado de Michoacán, México. *Acta Botánica Mexicana* 116:107-149.
- Libralatoa, G., Prato, E., Migliorec, L., Cicero, A.M., Manfra, L. 2016. A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. *Ecological Indicators* 69: 35–49.
- Maher, Z.E., Ezzat, K.H., Yehia, D.S., Ahmed, F.M., Salah, K. M. 2019. The antiinflammatory activity and LD₅₀ of *Ocimum forskolei* Benth., family *Lamiaceae*. *Journal of Advanced Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 2:116-120.
- Maiti, P., Bhakat, R.K., Jha, Y., Bhattacharjee, A. 2015. Allelopathic potential of *Hyptis suaveolens* on physio-biochemical changes of mung bean seeds. *Communications in Plant Sciences* 5 (3-4):67-75.
- Mamadaliyeva, N. Z., Akramov, D. K., Ovidi, E., Tiezzi, A., Nahar, L., Azimova, S.S., Sarker, S. D. 2017. Aromatic medicinal plants of the *Lamiaceae* family from Uzbekistan: ethnopharmacology, essential oils composition, and biological activities. *Medicines* 4(1): 2-12. Doi: 10.3390/medicines4010008
- Martínez, M. 1979. Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.1, 220 pp.

- Martínez-Gordillo, M., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M. del R., Montiel, O. 2013. Géneros de *Lamiaceae* de México, diversidad y endemismo. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84:30-86.
- Martínez-Gordillo, M. J., Bedolla-García, B., Cornejo-Tenorio, G., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M. del R., González-Gallegos, J.G., Lara-Cabrera, S.I., Zamudio, S. 2017. *Lamiaceae* de México. *Botanical Sciences* 95 (4): 780-806.
- Mashjoor, S., Yousefzadi, M. 2019. Cytotoxic effects of three Persian Gulf species of Holothurians. *Iranian Journal of Veterinary Research* 20(1):19-26.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D. E., McLaughlin, J.L. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica* 45(5):31-34. DOI: 10.1055/s-2007-971236
- Michael, A. S., Thompson, C. G., Abramovitz, M. 1956. *Artemia salina* as a test organism for a bioassay. *Science* 123: 464.
- Mishra, S. B., Verma, A., Mukerjee, A., Vijayakumar, M. 2011. Anti-hyperglycemic activity of leaves extract of *Hyptis suaveolens* L. Poit in streptozotocin induced diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*: 689-693.
- Misra, T. N., Singh, R. S., Upadhyay, J. 1983. A natural triterpene acid from *Hyptis suaveolens*. *Phytochemistry* 22 (11): 2557-2558.
- Nadeem, M.A., Nawaz, M.A., Shahid, M.Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Hatipoğlu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A., Labhane, N., Özkan, H., Chung, G., Baloch, F.S. 2018. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 32(2):261-285. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1400401>
- Nantitanon, W., Chowwanapoonpohn, S., Okonogi, S. 2007. Antioxidant and antimicrobial activities of *Hyptis suaveolens* essential oil. *Scientia Pharmaceutica* 75:35-46.

- Ngo, T. V., Scarlett, C.J., Bowyer, M. C., Ngo, P. D., Vuong, Q. V. 2017. Impact of different extraction solvents on bioactive compounds and antioxidant capacity from the root of *Salacia chinensis* L. *Journal of Food Quality* 2017(1):1-8. DOI: 10.1155/2017/9305047
- Ngozi, L.U., Ugochukwu, N., Ifeoma, P.U., Charity, E.A., Chinyelu, I.E. 2014. The efficacy of *Hyptis Suaveolens*: a review of its nutritional and medicinal applications. *European Journal of Medicinal Plants* 4(6): 661-674.
- Nicosia, A., Tagliavia, M., Costa, S. 2009. Regeneration of total RNA purification silica-based columns. *Biomedical Chromatography* 24:1263–1264. DOI: 10.1002/bmc.1418 · Source: PubMed
- Noudogbessi, J., Agbangnan, P., Yehouenou, B., Adjalian, E., Nonviho, G., Akibou, O. M., Wotto, V., Figueredo, G., Chalchat, J., Sohounhloue, D. 2013. Physico-chemical of *Hyptis suaveolens* essential oil. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 3(2):191-199.
- Ortega-Acosta, S. A., Ochoa-Martínez, D.L., Hernández-Morales. J., Palemón-Alberto, F. 2020. Morphological and genetic characterization of *Corynespora cassicola* isolates obtained from roselle and associated weeds. *Mexican Journal of Phytopathology* 38(1):62-78. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1909-2
- Palma-Tenango, M., San Miguel-Chávez, R., Soto-Hernández, R.M. 2017. Aromatic and Medicinal Plants in Mexico: El-Shemy, H.A. (Ed.). *Aromatic and Medicinal Plants*. IntechOpen. Rijeka, Croacia.pp.133-147.
- Pandey, A., Tripathi, S. 2014. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2 (5):115-119.
- Pandit, D.N., Kumari, S. 2019. Evaluation of ideal median lethal concentration (LC₅₀) of a biofertilizer in an Indian air-breathing fish, *Channa gachua* (Ham.). *International Journal of Life Science* 7(3): 535-543.
- Pessoa, M. A. C., De Oliveira, L. E., Alves, W.P., Santos, C. E., Leite, de S. E. 2010. Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens*

(L.) Poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. Brazilian Journal of Microbiology 41(1): 28-33.

Prince, P. S., Ram, K.R., Chaudhary, A., Dinesh. G., Sharma, V.K. 2013. *Hyptis suaveolens* (L.) Poit: a phyto-pharmacological review. International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences 4(1): 1-11.

Raja, R. R. 2012. Medicinally potential plants of *Labiatae (Lamiaceae)* family: an overview. Research Journal of Medicinal Plant 6(3): 203-213.

Raja-Rao, K. V., Rao, L. J. M., Prakasa Rao, N. S. 1990. An A-ring contracted triterpenoid from *Hyptis suaveolens*. Phytochemistry 29 (4):1326-1329. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)85456-P](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)85456-P)

Reddy, M. P., Sarla, N., Siddiq, E.A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica 128: 9–17.

Rios, T. N., Márquez, Y. R., Mendoza, R. X., Rojas, F. L., Velasco, C. J., Días, T. Mora, V. F., Yáñez, C. C., Meléndez, G. P. 2015. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae) de los llanos venezolanos. Revista Peruana de Biología 22(1):103-107.

Saha, P.R., Sinha, S., Sinha, R. K. 2017. Morphometric diversity of reproductive structures in *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.: An ethnomedicinal weed of *Lamiaceae*. Current Botany 8: 74-77. DOI: 10.19071/cb.2017.v8.3200

Samarakoon, T., Wang, S.Y., Alford, M. H. 2013. Enhancing PCR amplification of DNA from recalcitrant plant specimens using a trehalose-based additive. Applications in Plant Sciences 1 (1):1-3. Doi:10.3732/apps.1200236

Saranraj, P., Sivasakthi, S., Deepa, M.S. 2016. Phytochemistry of pharmacologically important medicinal plants – a review. International Journal of Current Research in Chemistry and Pharmaceutical Sciences, 3(11):56-66.

Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K.M., Yoga, L. L. 2011. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from

plants' extracts. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines 8(1):1-10.

Sharan, P.S., Verma, S., Nayak, G., Kumar, S.A., Ganesh, N. 2011. Acute and sub-acute toxicity studies of *Passiflora nepalensis* in rats. Revista Brasileira de Farmacognosia 21 (4): 730-736. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000103>

Sharma, G.P., Raghubanshi, A.S. 2009. Plastic responses to different habitat type contribute to *Hyptis suaveolens* Poit. invasiveness in the dry deciduous forest of India. Ambio 38(6):342-344.

Shetty, P. J., Dairawan, M. 2020. The evolution of DNA extraction methods. American Journal of Biomedical Science & Research 8(1):39-45. DOI: 10.34297/AJBSR.2020.08.001234.

Sidstedt, M., Hedman, J., Romsos, E.L., Waitara, L., Wadsö, L., Steffen, C.R., Vallone, P. M., Rådström, P. 2018. Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR. Analytical and Bioanalytical Chemistry 410(10):2569–2583.

Silva, T. M. S., Nascimento, R. J. B., Batista, M. M., Agra, M. F., Camara, C. A. 2007. Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from Northeastern Brazil. Revista Brasileira de Farmacognosia 17 (1):35-38. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100008>

Singh, K. M., Kumar, D. B. 2009. Molecular Markers: It's Application in Crop Improvement. Journal of Crop Science and Biotechnology 12 (4):168-178. DOI No. 10.1007/s12892-009-0124-6

Singh, U., Deb, R., Alyethodi, R. R., Alex, R., Kumar, S., Chakraborty, S., Dhama, K., Sharma, A. 2014. Molecular markers and their applications in cattle genetic research: a review. Biomarkers and Genomic Medicine 6 (2):49-58.

Soni, A., Sosa, S. 2013. Phytochemical analysis and free radical scavenging potential of herbal and medicinal plant extracts. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2 (4):22-29.

- Subha, D., Geetha, N. 2017. Evaluation of acute toxicity of the methanolic extract of *Tanacetum parthenium* L. in albino wistar rats. *Journal of Scientific and Innovative Research* 6(3):113-115.
- Sukito, A., Darmawan, S., Turjaman, M. 2020. Anti-oxidant and anti-diabetes activities of agarwood extracts from *Gyrinops versteegii* (Gilg.)Domke and their cytotoxicity. *IOP Conference Series Earth and Environmental Science* 415:1-11. DOI: 10.1088/1755-1315/415/1/012001.
- Sumitha, K. V., Thoppil, J. E. 2016. Genotoxicity assessment of two common curing weeds: *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. and *Leucas indica* (L.) R. Br. *Cytotechnology* 68:1513–1527.
- Szczecińska, M., Sramko, G., Wołosz, K., Sawicki, J. 2016. Genetic diversity and population structure of the rare and endangered plant species *pulsatilla patens* (L.) Mill in East Central Europe. *PLOS ONE* 11(3), 1-24. Doi:10.1371/journal.pone.0151730
- Tagliavia, M., Nicosia, A., Gianguzza, F. 2009. Complete decontamination and regeneration of DNA purification silica columns. *Notes & Tips/Analytical Biochemistry* 385:182–183. Doi:10.1016/j.ab.2008.10.021.
- Teke, G. N., Kuete, V. 2014. Acute and subacute toxicities of African medicinal plants: Kuete, V. (Ed.). *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*. Elsevier. Waltham, Massachusetts, U.S.A. pp. 63-98.
- The Plant List. 2013. Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> (accessed 1st January).
- Tlili, H., Hanen, N., Ben, A. A., Neffati, M., Boubakri, A., Buonocore, D., Dossena, M., Verri, M., Doria, E. 2019. Biochemical profile and *in vitro* biological activities of extracts from seven folk medicinal plants growing wild in southern Tunisia. *PLOS ONE* 14(9):1-18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213049>
- Uangbaoje, O. F., Abosedo, W.O., Jide, A. A. 2016. Research article toxicity assessment of different solvent extracts of the medicinal plant, *Phragmanthera capitata* (Sprengel) Balle on *brine shrimp* (*Artemia salina*). *International Journal of Pharmacology* 12 (7):701-710.

Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) 2009. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, México: Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Hyptis_suaveolens&id=7152.

Uma, M., Suresh, M., Thulasiraman, K., Lakshmidivi, E., Kalaiselvi, P. 2013. Chronic toxicity studies of aqueous leaf extract of Indian traditional medicinal plant *Ocimum tenuiflorum* (Linn.) in rats. *European Journal of Experimental Biology* 3(5):240-247.

Vinatoru, M. 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry* 8:303-313.

Zhang, Q.W., Lin, L.G., Ye, W. C. 2018. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine* 13(1):1-26. DOI: 10.1186/s13020-018-0177-x

Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain amplification. *Genomics* 20:176-183.

VII.ANEXO

Anexo 1. Especies y variantes intraespecíficas aceptadas del género *Hyptis*.
Fuente: <http://www.theplantlist.org>

-
1. *Hyptis actinocephala* Griseb.

 2. *Hyptis adamantium* A.St.-Hil. ex Benth.

 3. *Hyptis adpressa* A.St.-Hil. ex Benth.

 4. *Hyptis alata* (Raf.) Shinnery

 - 4.1 *Hyptis alata* subsp. *rugosula* (Briq.) Harley

 - 4.2 *Hyptis alata* subsp. *rugulosa* (Briq.) Harley

 5. *Hyptis albida* Kunth

 6. *Hyptis alpestris* A.St.-Hil. ex Benth.

 7. *Hyptis althaeifolia* Pohl ex Benth.

 8. *Hyptis alutacea* Pohl ex Benth.

 9. *Hyptis amaurocaulis* Briq.

 10. *Hyptis americana* (Poir.) Briq.

 11. *Hyptis ammotropha* Griseb.

 12. *Hyptis ampelophylla* Epling

 13. *Hyptis angulosa* Schott ex Benth.

 14. *Hyptis angustifolia* Pohl ex Benth.

 15. *Hyptis anitae* Epling & Játiva

 16. *Hyptis apertiflora* Epling

 17. *Hyptis arborescens* Epling

 18. *Hyptis arenaria* Benth.

 19. *Hyptis argentea* Epling & Mathias

 20. *Hyptis argutifolia* Epling

 21. *Hyptis argyrophylla* Harley

 22. *Hyptis armillata* Epling

 23. *Hyptis asperifolia* Standl.

 24. *Hyptis asteroides* A.St.-Hil. ex Benth.

 25. *Hyptis atrorubens* Poit.

 26. *Hyptis australis* Epling

-
27. *Hyptis bahiensis* Harley
-
28. *Hyptis balansae* Briq.
-
29. *Hyptis bicolor* Epling
-
30. *Hyptis bombycina* Epling
-
31. *Hyptis brachiata* Briq.
-
32. *Hyptis brachypoda* Epling
-
33. *Hyptis brevipes* Poit.
-
34. *Hyptis caduca* Epling
-
35. *Hyptis caespitosa* A.St.-Hil. ex Benth.
-
36. *Hyptis calida* Mart. ex Benth.
-
37. *Hyptis capitata* Jacq.
-
38. *Hyptis caprariifolia* Pohl ex Benth.
-
39. *Hyptis cardiophylla* Pohl ex Benth.
-
40. *Hyptis carpinifolia* Benth.
-
41. *Hyptis carvalhoi* Harley
-
42. *Hyptis chacapoyensis* Briq.
-
43. *Hyptis chyliantha* Urb. & Ekman
-
44. *Hyptis coccinea* Mart. ex Benth.
-
45. *Hyptis colligata* Epling & Játiva
-
46. *Hyptis collina* Brandegee
-
47. *Hyptis colombiana* Epling
-
48. *Hyptis colubrimontis* Epling & Játiva
-
49. *Hyptis compacta* Rusby
-
50. *Hyptis complicata* A.St.-Hil. ex Benth.
-
51. *Hyptis conferta* Pohl ex Benth.
-
52. *Hyptis coriacea* Benth.
-
53. *Hyptis corymbosa* Benth.
-
54. *Hyptis crassifolia* Mart. ex Benth.
-
55. *Hyptis crassipes* Epling
-
56. *Hyptis crenata* Pohl ex Benth.
-
57. *Hyptis cretata* Epling
-
58. *Hyptis crinita* Benth.
-

-
59. *Hyptis cruciformis* Epling
-
60. *Hyptis cubensis* Urb.
-
61. *Hyptis cuneata* Pohl ex Benth.
-
62. *Hyptis cuniloides* Epling
-
63. *Hyptis cymulosa* Benth.
-
64. *Hyptis decipiens* M.E. Jones
-
65. *Hyptis delicatula* Harley
-
66. *Hyptis deminuta* (Epling) Epling
-
67. *Hyptis desertorum* Pohl ex Benth.
-
68. *Hyptis dictyodea* Pohl ex Benth.
-
69. *Hyptis diffusa* Epling
-
70. *Hyptis digitata* Harley
-
71. *Hyptis dilatata* Benth.
-
72. *Hyptis ditassoides* Mart.ex Benth.
-
73. *Hyptis divaricata* Pohl ex Benth.
-
74. *Hyptis diversifolia* Benth.
-
75. *Hyptis domingensis* Urb.
-
76. *Hyptis dubia* Pohl ex Benth.
-
77. *Hyptis dumetorum* Morong
-
78. *Hyptis duplicatodentata* Pohl ex Benth.
-
79. *Hyptis elegans* Briq. ex Micheli
-
80. *Hyptis elongata* Benth.
-
81. *Hyptis emoryi* Torr.
-
- 81.1 *Hyptis emoryi* var. *palmeri* (S. Watson) I.M. Johnst.
-
82. *Hyptis eriocaloides* A. Rich.
-
83. *Hyptis eriocephala* Benth.
-
84. *Hyptis eriophylla* Pohl ex Benth.
-
85. *Hyptis erythrostachys* Epling
-
86. *Hyptis escobilla* Urb.
-
87. *Hyptis eximia* Epling
-
88. *Hyptis fallax* Harley
-
89. *Hyptis fasciculata* Benth.
-

-
- 89.1 *Hyptis fasciculata* subsp. *fastigiata* (Benth.) Harley
-
90. *Hyptis ferruginosa* Pohl ex Benth.
-
91. *Hyptis floribunda* Briq.
-
92. *Hyptis florida* Benth.
-
93. *Hyptis foliosa* A.St.-Hil. ex Benth.
-
94. *Hyptis frondosa* S. Moore
-
95. *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth.
-
96. *Hyptis gardneri* Briq.
-
97. *Hyptis glomerata* Mart.ex Schrank
-
98. *Hyptis goyazensis* A.St.-Hil. ex Benth.
-
99. *Hyptis guanchezii* Harley
-
100. *Hyptis gymnocaulos* Epling
-
101. *Hyptis hagei* Harley
-
102. *Hyptis halimifolia* Mart.ex Benth.
-
103. *Hyptis hamatidens* Epling & Játiva
-
104. *Hyptis hassleri* Briq.
-
105. *Hyptis havanensis* Britton ex Epling
-
106. *Hyptis heterodon* Epling
-
107. *Hyptis heterophylla* Benth.
-
108. *Hyptis hilarii* Benth.
-
109. *Hyptis hirsuta* Kunth
-
110. *Hyptis hispida* Benth.
-
111. *Hyptis homalophylla* Pohl ex Benth.
-
112. *Hyptis huberi* Harley
-
113. *Hyptis humilis* Benth.
-
114. *Hyptis hygrobia* Briq.
-
115. *Hyptis imbricata* Pohl ex Benth.
-
116. *Hyptis imbricatiformis* Harley
-
117. *Hyptis imitans* Epling
-
118. *Hyptis impar* Epling
-
119. *Hyptis incana* Briq.
-
120. *Hyptis indivisa* Pilg.
-

-
121. *Hyptis inodora* Schrank
-
122. *Hyptis intermedia* Epling
-
123. *Hyptis interrupta* Pohl ex Benth.
-
124. *Hyptis involucrata* Benth.
-
125. *Hyptis iodantha* Epling
-
126. *Hyptis irwinii* Harley
-
127. *Hyptis jacobi* Fern.Alonso
-
128. *Hyptis kramerioides* Harley & J.F.B.Pastore
-
129. *Hyptis kuntzeana* Briq.
-
130. *Hyptis laciniata* Benth.
-
131. *Hyptis lacunosa* Pohl ex Benth.
-
132. *Hyptis lacustris* A.St.-Hil. ex Benth.
-
133. *Hyptis lagenaria* A.St.-Hil. ex Benth.
-
134. *Hyptis lanata* Pohl ex Benth.
-
135. *Hyptis lanceolata* Poir.
-
136. *Hyptis langlassei* Fernald
-
137. *Hyptis laniflora* Benth.
-
138. *Hyptis lantanifolia* Poit.
-
139. *Hyptis lanuginosa* Glaz. ex Epling
-
140. *Hyptis lappacea* Benth.
-
141. *Hyptis lappulacea* Mart. ex Benth.
-
142. *Hyptis laurifolia* A.St.-Hil. ex Benth.
-
143. *Hyptis lavandulacea* Pohl ex Benth.
-
144. *Hyptis leptoclada* Benth.
-
145. *Hyptis leptostachys* Epling
-
146. *Hyptis leucocephala* Mart. ex Benth.
-
147. *Hyptis linarioides* Pohl ex Benth.
-
148. *Hyptis lippiioides* Pohl ex Benth.
-
149. *Hyptis lobata* A.St.-Hil. ex Benth.
-
150. *Hyptis loeseneriana* Pilg.
-
151. *Hyptis longifolia* Pohl ex Benth.
-
152. *Hyptis lorentziana* O.Hoffm.
-

-
153. *Hyptis lucida* Pohl ex Benth.
-
154. *Hyptis lutescens* Pohl ex Benth.
-
155. *Hyptis luticola* Epling
-
156. *Hyptis lythroides* Pohl ex Benth.
-
157. *Hyptis macrocephala* M.Martens & Galeotti
-
158. *Hyptis macrostachys* Benth.
-
159. *Hyptis macrotera* Briq.
-
160. *Hyptis madreensis* Fernald
-
161. *Hyptis malacophylla* Benth.
-
162. *Hyptis marrubiifolia* Epling & Mathias
-
163. *Hyptis marrubioides* Epling
-
164. *Hyptis martiusii* Benth.
-
165. *Hyptis maya* Harley
-
166. *Hyptis melissoides* Kunth
-
167. *Hyptis microphylla* Pohl ex Benth.
-
168. *Hyptis microsphaera* Epling
-
169. *Hyptis minutifolia* Griseb.
-
170. *Hyptis mixta* Epling
-
171. *Hyptis mollis* Pohl ex Benth.
-
172. *Hyptis mollissima* Benth.
-
173. *Hyptis monticola* Mart. ex Benth.
-
174. *Hyptis muelleri* Briq.
-
175. *Hyptis multibracteata* Benth.
-
176. *Hyptis multiflora* Pohl ex Benth.
-
177. *Hyptis multiseta* Benth.
-
178. *Hyptis muricata* Schott ex Benth.
-
179. *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq.
-
180. *Hyptis nepetifolia* R. Br.
-
181. *Hyptis nigrescens* Pohl ex Benth.
-
182. *Hyptis nitidula* Benth.
-
183. *Hyptis nivea* Epling
-
184. *Hyptis nubicola* Harley
-

-
185. *Hyptis nudicaulis* Benth.
-
186. *Hyptis oblongifolia* Benth.
-
187. *Hyptis obtecta* Benth.
-
188. *Hyptis obtusata* Benth.
-
189. *Hyptis obtusiflora* C.Presl ex Benth.
-
190. *Hyptis odorata* Benth.
-
191. *Hyptis orbiculata* Pohl ex Benth.
-
192. *Hyptis origanoides* Pohl ex Benth.
-
193. *Hyptis ovalifolia* Benth.
-
194. *Hyptis ovata* Pohl ex Benth.
-
195. *Hyptis pachyarthra* Briq.
-
196. *Hyptis pachycephala* Epling
-
197. *Hyptis pachyphylla* Epling
-
198. *Hyptis paludosa* A.St.-Hil. ex Benth.
-
199. *Hyptis parkeri* Benth.
-
200. *Hyptis passerina* Mart. ex Benth.
-
201. *Hyptis paupercula* Epling
-
202. *Hyptis pectinata* (L.) Poit.
-
203. *Hyptis pedalipes* Griseb.
-
205. *Hyptis peduncularis* Benth.
-
206. *Hyptis penaeoides* Taub. ex Ule
-
207. *Hyptis perbullata* Fern.Alonso
-
208. *Hyptis personata* Epling
-
209. *Hyptis petiolaris* Pohl ex Benth.
-
210. *Hyptis petraea* A.St.-Hil. ex Benth.
-
211. *Hyptis pilosa* Benth.
-
212. *Hyptis pinetorum* Epling
-
213. *Hyptis pinheiroi* Harley
-
214. *Hyptis piranii* Harley
-
215. *Hyptis pittieri* Briq.
-
216. *Hyptis platanifolia* Mart. ex Benth.
-
217. *Hyptis plectranthoides* Benth.
-

-
218. *Hyptis plumosa* Benth.
-
219. *Hyptis poliodes* Briq. ex Micheli
-
220. *Hyptis propinqua* Epling
-
221. *Hyptis proteoides* A.St.-Hil. ex Benth.
-
222. *Hyptis pseudoglauca* Epling
-
223. *Hyptis pseudolantana* Epling
-
224. *Hyptis pseudosinuata* Epling
-
225. *Hyptis pulchella* Briq.
-
226. *Hyptis pulegioides* Pohl ex Benth.
-
227. *Hyptis purdiei* Benth.
-
228. *Hyptis pycnocephala* Benth.
-
229. *Hyptis pyriformis* Epling & Játiva
-
230. *Hyptis racemulosa* Mart. ex Benth.
-
231. *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth.
-
232. *Hyptis recurvata* Poit.
-
233. *Hyptis remota* Pohl ex Benth.
-
234. *Hyptis rhyphiophylla* Briq.
-
235. *Hyptis rhytidea* Benth.
-
236. *Hyptis riparia* Harley
-
237. *Hyptis rivularis* Britton
-
238. *Hyptis rondonii* Epling
-
239. *Hyptis rotundifolia* Benth.
-
240. *Hyptis rubicunda* Pohl ex Benth.
-
241. *Hyptis rubiginosa* Benth.
-
242. *Hyptis rugosa* Benth.
-
243. *Hyptis salicina* J.A. Schmidt
-
244. *Hyptis sancti-gabrielii* Harley
-
245. *Hyptis saxatilis* A.St.-Hil. ex Benth.
-
246. *Hyptis scandens* Epling
-
247. *Hyptis scoparioides* Urb.
-
248. *Hyptis selaginifolia* Mart. ex Benth.
-
249. *Hyptis selloi* Benth.
-

-
250. *Hyptis septentrionalis* Epling
-
251. *Hyptis sericea* Benth.
-
252. *Hyptis shaferi* Britton
-
253. *Hyptis sidifolia* (L'Hér.) Briq.
-
254. *Hyptis silvestris* Epling
-
255. *Hyptis silvinae* Harley
-
256. *Hyptis similis* Epling
-
257. *Hyptis simulans* Epling
-
258. *Hyptis sinuata* Pohl ex Benth.
-
259. *Hyptis siphonantha* Harley
-
260. *Hyptis spicata* Poit.
-
261. *Hyptis spicigera* Lam.
-
262. *Hyptis stachydifolia* Epling
-
263. *Hyptis stricta* Benth.
-
264. *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.
-
265. *Hyptis subrotunda* Pohl ex Benth.
-
266. *Hyptis subtilis* Epling
-
267. *Hyptis subviolacea* Briq.
-
268. *Hyptis* × *sylvularum* A.St.-Hil. ex Benth.
-
269. *Hyptis taciana* Harley
-
270. *Hyptis tafallae* Benth.
-
271. *Hyptis tagetifolia* Harley
-
272. *Hyptis tenuifolia* Epling
-
273. *Hyptis tephrodes* A.Gray
-
274. *Hyptis tetracephala* Bordignon
-
275. *Hyptis tetragona* Pohl ex Benth.
-
276. *Hyptis thyrsoflora* Epling
-
277. *Hyptis tomentosa* Poit.
-
278. *Hyptis tricephala* A.St.-Hil. ex Benth.
-
279. *Hyptis trichopes* (Epling) Harley
-
280. *Hyptis tripartita* Briq.
-
281. *Hyptis tumidicalyx* Epling & Játiva
-

-
282. *Hyptis turnerifolia* Mart. ex Benth.
-
283. *Hyptis tweediei* Benth.
-
284. *Hyptis uliginosa* A.St.-Hil. ex Benth.
-
285. *Hyptis uncinata* Benth.
-
286. *Hyptis urticoides* Kunth
-
287. *Hyptis velutina* Pohl ex Benth.
-
288. *Hyptis verticillata* Jacq.
-
289. *Hyptis viatica* Harley
-
290. *Hyptis vilis* K.Koch & C.D.Bouché
-
291. *Hyptis villicaulis* Epling
-
292. *Hyptis villosa* Pohl ex Benth.
-
293. *Hyptis viminea* Epling
-
294. *Hyptis violacea* Pohl ex Benth.
-
295. *Hyptis virgata* Benth.
-
296. *Hyptis xanthiocephala* Mart. ex Benth.
-