



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y AMBIENTE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE

**ANÁLISIS MOLECULAR Y MORFOLÓGICO DE *Asclepias*
jaliscana B.L. Rob. (APOCYNACEAE: ASCLEPIADOIDEAE)
EN EL CENTRO DE MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE

PRESENTA

BIÓL. FERNANDO SANCHEZ HERNANDEZ

REALIZADO BAJO LA DIRECCIÓN DE:

DR. JOSÉ LUIS MARTÍNEZ Y PÉREZ

DRA. ALBA MÓNICA MONTIEL GONZÁLEZ

TUTORES:

DR. OSCAR GUMERSINDO VÁZQUEZ CUECUECHA

DR. ALEJANDRO ESPINOSA DE LOS MONTEROS



IXTACUIXTLA, TLAX., JUNIO 2025

HOJA DE FINANCIAMIENTO

Es el presente trabajo de tesis fue financiada con recurso propio del Dr. José Luis Martínez y Pérez y la Dra. Alba Mónica Montiel González. Junto con el apoyo de la beca CONACYT con número **1153487**.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y AMBIENTE
MAESTRIA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Código: 505-RGE-04
Publicación: Diciembre 2020
Revisión: 9001:2015 04

C. FERNANDO SANCHEZ HERNANDEZ

P R E S E N T E

En cumplimiento al artículo 52 fracción "d" del Reglamento General de Evaluación Académica, el comité de evaluación de examen de grado ha revisado el trabajo de investigación titulado: "Análisis molecular y morfológico de *Asclepias jaliscana* B.L. Rob. (Apocynaceae: Asclepiadoideae) en el centro de México.", realizado bajo la dirección del Dr. José Luis Martínez y Pérez y la Dra. Alba Mónica Montiel González. No habiendo encontrado objeción alguna, se autoriza su impresión:

Dra. Elizabeth García Gallegos

Dr. Oscar G. Vázquez Cuecuecha

Dr. Alejandro Espinosa de los Monteros

M. en C. Gema Lilia Galindo Flores

Dra. Esmeralda García Torres

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

"POR LA CULTURA A LA JUSTICIA SOCIAL"

Ixtacuixtla, Tlax., 12 de mayo de 2025.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN GENÉTICA Y AMBIENTE

DR. HÉCTOR SANTOS LUNA ZENDEJAS
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA DE POSGRADO

c.c.p. Expediente



AGRADECIMIENTOS

Les agradezco a mis directores de tesis el Dr. José Luis Martínez y Pérez y la Dra. Alba Mónica Montiel González por su paciencia para realizar este trabajo de investigación. Así como también le agradezco a mis compañeros del posgrado (Ing. Miguel Renato, M.C.S.A. Karla Hernández y M.C.S.A. Janet Flores)., por su apoyo durante y después de la maestría.

También, agradecer el apoyo a la M.C.S.A. Selenia Silva León durante y después de la maestría, junto con a mis padres y hermanos de los que siempre recibí ánimos y apoyo moral.

Índice	
Resumen:	9
Abstract	10
I Introducción	10
I.1 Marco Teórico	13
I.1.1 Plantas	13
I.1.2 Cloroplastos	14
I.1.3 Marcadores Moleculares	16
I.1.4 Filogenia	19
I.1.5 Morfometría	23
I.1.6 Angiospermas	25
I.1.7 Apocynaceae	25
I.1.8 Género <i>Asclepias</i> L.	26
I.1.9 Interacciones ecológicas	28
I.1.10 Uso del género <i>Asclepias</i> L.	31
I.1.11 <i>Asclepias jaliscana</i> B.L. Rob.	33
I.1.12 Estado de Conservación de la especie	35
I.1.13 Distribución de <i>Asclepias jaliscana</i>	36
I.1.14 Usos de <i>Asclepias jaliscana</i> (<i>A. contrayerba</i>, <i>A. setosa</i>)	36
I.1.15 Discrepancias del taxón <i>A. jaliscana</i>	38
I.2 Antecedentes	41
I.4 Justificación	44
I.5 Objetivos	45
1.5.1 Objetivo general	45
1.5.2 Objetivos específicos	45
II. Materiales y métodos	46
2.1 Selección de sitio de estudio	46
2.2 Sitios de estudio	47
2.3 Recolección de las muestras	47
2.4 Análisis de ADN	48
2.4.1 Diseño de Primers	48
2.4.3 Extracción del ADN	50

2.4.3 Confirmación de ADN total (ADNt)	50
2.4.4 Amplificación de regiones génicas	50
2.4.5 Confirmación de los amplicones	51
2.4.6 Purificación de productos de PCR	51
2.4.7 Secuenciación	52
2.5 Análisis de datos moleculares	52
2.5.1 Análisis de similitud de secuencias	52
2.5.2 Alineamiento de secuencias	52
2.5.3 Análisis filogenético	53
2.6.2 Análisis estadístico de datos morfométricos	58
III Resultados	60
3.1 Resultados de datos moleculares	60
3.2 Resultados de datos morfométricos	65
IV Discusión	77
4.1 Discusión de datos moleculares	78
4.2 Discusión de datos morfométricos	79
V Conclusión	82
VI Perspectivas	82
VII Referencias	82
VIII Anexos	104
Anexo 1	104
Anexo 2	105
Anexo 3	105

Índice de tablas

Tabla 1 . Comunidades y usos de <i>A. jaliscana</i> en Tlaxcala.	37
Tabla 2. Resumen de discrepancias en claves taxonómicas.	40
Tabla 3. Características de los primers <i>rpl16</i> y <i>trnC-rpoB</i>	49
Tabla 4. Resultados de BLAST de las muestras recolectadas en campo de <i>Asclepias jaliscana</i>	62
Tabla 5. Resumen de resultados de ANOVA, datos morfométricos de láminas de <i>A. jaliscana</i> : LIH (largo intermedio), LIZH (largo izquierdo), LDH (largo derecho), AINH (ancho intermedio), AAA (ancho de la apertura del ápice), ABH (ancho de la base), ASH (ancho superior con respecto al 25% con respecto a LIH), AIFH (ancho inferior con respecto al 25% con respecto a LIH) y LP (largo del peciolo). Nota: Significación estadística: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$	72
Tabla 6. Prueba post hoc Tukey, datos de variables de láminas de <i>A. jaliscana</i> sin diferencias significativas: A (clúster rojo), B (clúster magenta), C (clúster azul) y D (clúster verde). LIH (largo intermedio), LIZH (largo izquierdo), LDH (largo derecho), AINH (ancho intermedio), AAA (ancho de la apertura del ápice), ABH (ancho de la base), ASH (ancho superior con respecto al 25% con respecto a LIH), y LP (largo del peciolo).	72
Tabla 7. Prueba de post hoc Tukey, resumen de comparación de grupos con diferencias significativas de los grupos de clúster de <i>A. jaliscana</i> : A (clúster rojo), B (clúster magenta), C (clúster azul) y D (clúster verde). Variables: LIH (largo intermedio), LIZH (largo izquierdo), LDH (largo derecho), AINH (ancho intermedio), AAA (ancho de la apertura del ápice), ABH (ancho de la base), ASH (ancho superior con respecto al 25% con respecto a LIH), AIFH (ancho inferior con respecto al 25% con respecto a LIH) y LP (largo del peciolo).	73
Tabla 8. Resultados de análisis de ANOVA de las variables de las estructuras florares: LCHF (largo del capuchón), CF (columna de flor), LF (largo de flor) y LSPF (largo del sépalo).	75
Tabla 9. Resumen de datos no significativos de post hoc TUKEY de estructuras florales <i>A. jaliscana</i> : A (clúster rojo), B (clúster magenta), C (clúster azul) y D (clúster verde). Variables: LCHF (capuchón), CF (largo de columna), LF (largo de flor).	75
Tabla 10. Prueba de post hoc Tukey, resumen de comparación de grupos con diferencias significativas de los grupos de clúster de <i>A. jaliscana</i> : A (clúster rojo), B (clúster magenta), C (clúster azul) y D (clúster verde). Variables: LCHF (capuchón), CF (largo de columna), LF (largo de flor).	76
Tabla 11. Localidades visitadas para buscar material vegetal de <i>A. jaliscana</i>	104
Tabla 12. Observaciones de las poblaciones encontradas de <i>A. jaliscana</i>	105
Tabla 13. Ejemplares.	105

Índice de figuras

Figura 1. Estructura de un árbol filogenético: raíz (Root), ramas (Branches), nodos terminales (Tips), nodos internos (Internal nodes) y taxón (Taxon) (Xue, 2022).	21
Figura 2. A) Red de relaciones (sin raíz); B, C, D y E) árboles enraizados con diferente topología, F) la longitud del tiempo (Xue, 2022).	21
Figura 3. Cuadro verde representación gráfica de un grupo “monofilético”, cuadro rosa, representación de los grupos “polifilético y parafilético” (Besse et al., 2021).	22
Figura 4. Estructura floral del género <i>Asclepias</i> L. (Sundell, 1984).	27
Figura 5. Inflorescencia de <i>Asclepias</i> L.: A: <i>A. glaucescens</i> , B: <i>A. otaroides</i> , C: <i>A. linaria</i> , y D: <i>A. curassavica</i>	28
Figura 6. Especies con alguna aplicación antropogénica; A) <i>A. glaucescens</i> , B). <i>A. notha</i> y C) <i>A. curassavica</i>	33
Figura 7. Ejemplar de <i>Asclepias jaliscana</i> del municipio de Ixtacuixtla, Tlaxcala.	35
Figura 8. Cronología de las sinonimias de <i>A. jaliscana</i>	40
Figura 9. Ubicación geográfica de las muestras de <i>A. jaliscana</i>	48
Figura 10. A) Tamaño conocido de <i>rpl16</i> de <i>A. jaliscana</i> , B) Tamaño conocido de <i>trnC-rpoB</i>	49
Figura 11. Indicaciones del documento exportado de Mesquite a Mr. Bayes 3.2.	54
Figura 12. Distribución geográfica en México de los 70 ejemplares de herbario de <i>A. jaliscana</i> (<i>A. contrayerba</i> y <i>A. setosa</i>) considerados para este estudio.	55
Figura 13. Variables consideradas para el análisis morfométrico de los ejemplares de <i>A. jaliscana</i> . A) Medidas de la lámina de la hoja utilizadas para el análisis morfométrico (Imagen tomada del ejemplar Colector: Jesus Gonzalez Ortega, No. 48322 (MEXU); B) Medidas de la inflorescencia consideradas para el análisis morfométrico (Imagen tomada del ejemplar No. 149714 (MEXU), Colectores: James L. Revel, William J. Hess y Rober W. Kiger.	57
Figura 14. A) Variables medidas de las estructuras florales de los ejemplares de <i>A. jaliscana</i> utilizadas para el análisis morfométrico (Imagen tomada del ejemplar Colectores: James L. Revel, William J. Hess y Rober W. Kiger. No. 149714 (MEXU).	57
Figura 15. Recolección de material biológico de <i>A. jaliscana</i> , en Tlaxcala, México. A) Ambiente de población de Ixtacuixtla, B) Ambiente de población de Sancturum, C) Extracción de la raíz de <i>A. jaliscana</i> (Otumba), D y C) observación de nervadura (Sancturum), F) Forma de lámina ovada y tallo erecto (Ixtacuixtla), G) Forma angostamente ovada de la hoja y tallo decumbente (Ixtacuixtla), H) Flores (Ixtacuixtla), I) Deceso de la planta (Ixtacuixtla), J) Infección por artrópodos (Ixtacuixtla), K) Planta sin producción de semillas (Ixtacuixtla).	61
Figura 16. Árbol filogenético del género <i>Asclepias</i> : Grupo externo (morado), especie identificada como <i>A. jaliscana</i> (azul claro), muestras de este estudio (verde) y especies con más de una representación (amarillo).	63
Figura 17. Árbol filogenético del género <i>Asclepias</i> que muestra el clado A: muestras utilizadas en este estudio (verde): TLAX-S (Tlaxcala-Sancturum), TLAX-I (Tlaxcala-Ixtacuixtla), GRO-EN (Guerrero-Eduardo Neri) y EMEX-O (E. México-Otumban).	64

Figura 18. Árbol filogenético: posición de la muestra MG678816 <i>Asclepias jaliscana</i> utilizada en el trabajo de Fishbein <i>et al.</i> , (2017).	64
Figura 19. Grafica de PCA de las variables de la lámina de <i>A. jaliscana</i> : Se muestra la correlación de variables del componente principal 1 (CP1) y componente principal 2 (CP2).	66
Figura 20. Clúster por el método de Ward; se observan cuatro clústeres basados en la morfometría de las hojas de <i>A. jaliscana</i>	67
Figura 21. Morfología de láminas foliares por clúster de <i>A. jaliscana</i>	68
Figura 22. Distribución geográfica por clúster de <i>A. jaliscana</i>	69

Resumen:

México no solo es un país megadiverso, si no que varios de sus recursos naturales como las plantas, tienen un impacto importante en la sociedad, desde cuestiones culturales hasta medicinales. Sin embargo, existe un gran rezago en cuanto al conocimiento de sus recursos biológicos y aun más de aquellos que tienen potencial biotecnológico. La subfamilia Asclepiadoideae es un grupo taxonómico conocido por sus usos tradicionales en cuestiones tanto culturales como medicinales; pero, a pesar de esto, se desconocen muchos de los aspectos básicos de varias especies que la conforman. Se sabe que *Asclepias jalicana* es una planta con usos mágico-religiosos, comestible e incluso con propiedades medicinales. No obstante, se desconocen cuestiones básicas, enfocadas a la especie, siendo objeto de suposiciones sobre su morfología y su posición taxonómica variable poco definida. El objetivo de este trabajo es conocer las posibles variaciones morfológicas y moleculares de poblaciones que se asumen como de esta especie, con una distribución discontinua en el país, utilizando ejemplares de herbario y marcadores moleculares del cloroplasto (*trnC-rpoB*, *rpl16* y *rbcL*). Este estudio constituye el primer trabajo morfológico para *Asclepias jalicana* con fines exploratorios y con el uso de muestras recolectadas de las pocas poblaciones silvestres que se pudieron encontrar para realizar los análisis filogenéticos. Como resultado de este trabajo se muestra la existencia de morfotipos foliares, así como datos morfológicos en estructuras florales que sugiere la sospecha de un posible taxón dentro de los ejemplares de *A. jaliscana*. Así mismo, el análisis filogenético mostro grupos no monofiléticos, debido a posibles mutaciones del intrón *rpl16*.

Abstract

Mexico is not only a megadiverse country, but several of its natural resources, such as plants, have an important impact on society, from cultural to medicinal issues. However, there is a great lag in the knowledge of its biological resources and even more of those with biotechnological potential. The subfamily Asclepiadoideae is a taxonomic group known for its traditional uses in both cultural and medicinal matters; but, despite this, many of the basic aspects of several species that comprise it are unknown. It is known that *Asclepias jalicana* is a plant with magical-religious uses, edible and even with medicinal properties. However, basic issues are unknown, focused on the species, being subject to assumptions about its morphology and its variable taxonomic position poorly defined. The objective of this work is to know the possible morphological and molecular variations of populations assumed to be of this species, with a discontinuous distribution in the country, using herbarium specimens and molecular markers of the chloroplast (*trnC-rpoB*, *rpl16* and *rbcL*). This study constitutes the first morphological work for *A. jalicana* with exploratory purposes and with the use of samples collected from the few wild populations that could be found to perform phylogenetic analyses. The results of this work show the existence of foliar morphotypes, as well as morphological data in floral structures that suggest the suspicion of a possible taxon within the specimens of *A. jaliscana*. Likewise, the phylogenetic analysis showed non-monophyletic groups, due to possible mutations in the *rpl16* intron.

I Introducción

México es un país megadiverso, considerado como el 5° lugar a nivel internacional por albergar el 12% de la biodiversidad mundial, con 23,424 especies de plantas aproximadamente, de las cuales, 22,126 pertenecen al grupo Magnoliophyta, también conocido como angiospermas, las cuales se calculan pueden llegar a superar las 25 000 especies (Villaseñor y Ortiz, 2014; Villaseñor, 2016). Esta biodiversidad se debe principalmente a la geografía accidentada del país, por la presencia de dos regiones biogeográficas; la Neártica y la Neotropical, las cuales tienen una zona de transición llamada Zona de Transición Mexicana, donde convergen plantas provenientes de dichas regiones, además de los elementos propios que pueden considerarse como endemismos (Miguez-Gutiérrez et al., 2013; Morrone, 2019). Aunque, México tiene dicha riqueza natural, los esfuerzos por conocer estos recursos bióticos se han visto opacados, a pesar de que en el Artículo 7 del Convenio sobre la Diversidad Biológica, adoptado en Río de Janeiro, Brasil en junio de 1992, que México firmó, se estipula como prioridad la identificación de especies que se encuentran en el país, además, de que en general, se hace el compromiso del cuidado de la biodiversidad y de dirigir su importancia para la investigación y la sociedad (Suprema Corte de Justicia de la Nación [SCJN], 1993). En el grupo taxonómico de las angiospermas, los estudios sobre diversidad de la familia Apocynaceae han observado un creciente interés en años recientes, que se refleja en inventarios florísticos, actualización de bases de datos y en estudios taxonómicos, principalmente, de la subfamilia Asclepiadoideae (Juarez-Jaimes *et al.*, 2007). Uno de los géneros de esta subfamilia, mayormente representado en

México, es *Asclepias* L., un grupo de plantas que es peculiar por una modificación en la estructura floral y de la cual se conocen diversos usos medicinales en distintas comunidades del país (Fernández *et al.*, 2008). El presente trabajo tiene como objeto de estudio una especie medicinal llamada *Asclepias jaliscana* B.L. Rob., en la cual diversos autores (Juárez-Jaimes y Lozada, 2003; Gutiérrez-Cisneros *et al.*, 2014; Cervantes-Meza, 2018) han observado características morfológicas que sugieren la existencia de especies distintas o de la presencia de algunos fenómenos biogeográficos que la hacen morfológicamente variable. Por ello, para contribuir con el conocimiento que esclarezca estas observaciones, se presenta un análisis morfométrico de ejemplares de herbario y un análisis filogenético de tres regiones génicas, para poder determinar si dichas observaciones corresponden a un grupo taxonómico distinto o simplemente a una variación morfológica relacionada con su distribución geográfica.

I.1 Marco teórico

I.1.1 Plantas

El Reino Plantae abarca diferentes grupos como los helechos, briofitas, gimnospermas y angiospermas; su diversidad conocida se estima en 364,300 especies clasificadas (Crang *et al.*, 2019). Sin embargo, existen aproximadamente 2 millones de organismos de este reino que, en su mayoría, están sin descubrir y por ende sin un nombre científico; particularmente en plantas terrestres, se estima que alrededor del mundo existen 500,000 especies (Corlett, 2016; Crang *et al.*, 2019). Se ha descrito que este desconocimiento se debe, principalmente, a la falta de inversión para investigación en regiones tropicales (Asia, África y Neotrópico) y a la falta de un interés genuino por la conservación y el conocimiento de éstas, debido a que, en el caso de las plantas, siempre se busca que sean útiles a diferencia de lo que sucede con otros grupos, como el de los animales (Corlett, 2016). Particularmente, en el caso de las embriofitas o plantas terrestres (helechos, briofitas, gimnospermas y angiospermas), tienen su origen evolutivo a partir de algas verdes de la división de Streptophyta, en la que sus antepasados fueron algunos de los primeros organismos fotosintéticos en invadir la tierra, a la par de los holobiontes (Hoffmann, 1989; Vries & Arcibald, 2018). Algunas de las evidencias que sustentan esta hipótesis son análisis filogenéticos, en los que se muestra que ciertas algas embriofitas comparten genotipos que, en algún momento, se consideraban exclusivos de las plantas terrestres (Vries & Arcibald, 2018). Al ser tan diversa la morfología y los ciclos de vida de las embriofitas se pueden definir de forma general como organismos eucariontes que son autótrofos, debido a que

generan su alimento a través de la fotosíntesis, y que varios de estos organismos se caracterizan por poseer una pigmentación verde, debido a la clorofila (Crang *et al.*, 2019).

I.1.2 Cloroplastos

Los cloroplastos pertenecen a una familia de organelos llamada plástidos, con capacidad fotosintética, que son propios de las cianobacterias, algas y plantas. Dichas estructuras se caracterizan por estar compuestas, principalmente, por una molécula llamada clorofila, la cual contribuye a la actividad metabólica para la conversión del dióxido de carbono, agua y la energía solar, en carbohidratos, fuente de alimento para estos organismos (Daniell *et al.*, 2016; Crang *et al.*, 2019). Se considera que los primeros organismos eucariontes con la capacidad de realizar fotosíntesis aparecieron aproximadamente hace 1000 millones de años, originados de un proceso similar a la teoría de la endosimbiosis, donde una cianobacteria endosimbionte fue huésped de una célula eucariota, la que posteriormente dio lugar a distintos plástidos como cianelas, rodoplastos y cloroplastos. De estos organismos fotosintéticos evolucionarían las primeras plantas terrestres durante el periodo del Ordovícico (Lenton *et al.*, 2012; Jensen & Leister, 2014). A pesar de que la función más conocida del cloroplasto es la fotosíntesis, en realidad realiza diversos roles dentro de las plantas, que van desde la fisiología, el desarrollo y la síntesis de aminoácidos, de nucleótidos, de ácidos grasos, de fitohormonas y de una gran variedad de metabolitos, además de ayudar a la fijación del nitrógeno (Daniell *et al.*, 2016). Los cloroplastos son estructuras celulares conformadas por tres membranas; la interna, la externa y una tercera que se compone de un sistema de membranas

tilacoides. Dentro del espacio entre los tilacoides y la membrana interna se encuentra una sustancia acuosa denominada estroma. El conocimiento de la arquitectura de esta biomembrana se sigue desarrollando gracias a los avances en la microscopía y en la tomografía crioelectrónicas (Staehelin, 1986; Kirchhoff, 2019).

El cloroplasto también se caracteriza por poseer sus propios cromosomas de aspecto circular y ocasionalmente, de forma lineal (Oldenburg & Bendich, 2016; Mower & Vickrey 2018), los cuales se encuentran empaquetados en estructuras denominadas nucleoides. Dentro del cloroplasto, en el caso del género *Arabidopsis* spp., se ha podido observar un aproximado de 1000-1700 copias de dicha estructura (Zoschke *et al.*, 2007; Morley *et al.*, 2019). En el ADN de cloroplastos (ADNcp) se presentan una serie de fragmentos similares llamados repeticiones invertidas (IR), estos se dividen en dos regiones, una larga y una corta, la primera denominada como LSC (por sus siglas en inglés Long Single Copy) y la corta conocida como SSC (por sus siglas en inglés Short Single Copy), dichas regiones se caracterizan por ser altamente conservadas con un tamaño de 20,000-25,000 pb (Daniell *et al.*, 2016; Morley *et al.*, 2019). A pesar de que en ocasiones se da por hecho que el ADN es conservado, se ha visto que ciertas regiones, al igual que en el ADN de la mitocondria, es material que transfiere información genética a otros organelos; este fenómeno se conoce como “transferencia genética endosimbiótica”, documentado anteriormente con la transferencia de información del ADNcp al núcleo celular y más recientemente del ADNcp a la mitocondria (Ku *et al.*, 2015, Dobrogojski *et al.*, 2020). Algunos de los genes que se han transferido del ADNcp a la mitocondria y al núcleo son *infA*, *rpl22* y *ndh* (Dobrogojski *et al.*, 2020).

En la actualidad, el uso del ADNcp, con los avances en la secuenciación de próxima generación y secuenciación masiva, se ha ampliado a diversas utilidades dentro de la investigación básica y aplicada, en donde algunos genes o espaciadores intergénicos son utilizados como marcadores moleculares (Daniell *et al.*, 2016; Dobrogojski *et al.*, 2020).

I.1.3 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares, también conocidos como moléculas distintivas, son diversos, van desde proteínas hasta material genético, con aplicaciones variadas; estos suelen ser ampliamente utilizados en la medicina para detectar mutaciones y enfermedades (Rashad & Al-Kazaz, 2015; Freeland, 2020; NCI, 2023). Sin embargo, en la biología, tienen otras funciones como determinar la diversidad genética de las especies, explicar fenómenos de dispersión, la identificación de especies, explicar relaciones filogenéticas entre grupos intra e interespecíficos, determinar historias evolutivas pasadas y recientes, por mencionar algunas (Freeland, 2020). Dichas aplicaciones corresponden principalmente a disciplinas como la ecología, biogeografía, evolución y taxonomía (Rentarías, 2007; Freeland, 2020). Cabe destacar, que cada marcador molecular busca responder a ciertas preguntas específicas de investigación (Freeland, 2020). Los marcadores moleculares van desde aloenzimas, isoenzimas, regiones de ADN nuclear (ADNn), así como microsatélites, ya sea STR (simple tandem repeats) o SSR (simple sequence repeats), PCR-RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms),

AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms), RAPDs (Randomly Amplified Polymorphic DNA), SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), regiones de ADN ribosomal (DNAr), por ejemplo, ITS1, ITS2, ADNr 16S y ADNr 18S. En el caso del ADN mitocondrial (ADNmt) y el ADNcp, se ha realizado la secuenciación parcial o completa de su genoma; de igual forma, están los ADN barcoding (códigos de barras), que consideran regiones intergénicas, intrones y genes codificantes; un ejemplo destacado es el gen COI (citocromo c oxidasa I) en animales, debido a que es de los genes más conservados dentro del ADNmt (Rentarías, 2007; Rashad & Al-Kazaz, 2015; Freeland, 2020; Besse, 2021; Dong *et al.*, 2021).

En el caso de plantas, tanto para estudios de ecología y taxonomía molecular, suelen utilizarse microsatélites, AFLPs, RAPDs, ADNmt y ADNcp (Besse, 2021), prefiriendo el uso del ADNcp, dado que la información genética en plantas se considera conservada debido a que gran parte de su información de sus genes se mantienen sin cambios drásticos a escala evolutiva, a pesar de esto, muchas de sus regiones génicas y no codificantes tienen altas tasas de cambio en las secuencias lo que los vuelve ideales para estudios ecológicos y evolutivos (Freeland, 2020). Otra característica importante del ADNcp es la forma en que se transmite el material genético, que generalmente, tiene una sucesión uniparental, es decir, que este genoma se hereda de un solo progenitor; por ejemplo, en la mayoría de las angiospermas esta información genética proviene de la parte materna, similar a como ocurre en las mitocondrias, mientras que en las gimnospermas tienden a heredarlo desde la parte paterna. Debido a esta característica el ADNcp no tiene un proceso de recombinación de material genético como en el caso del núcleo

(Freeland, 2020; Besse, 2021). Además, el ADNcp puede proporcionar información diferente conforme al grupo de plantas, por ejemplo, en gimnospermas la información almacenada en el ADNcp se asocia principalmente con la función masculina y los patrones de dispersión de polen, mientras que en angiospermas describen la historia evolutiva de la función femenina, respondiendo a los patrones de dispersión de las semillas (Freeland, 2020; Besse *et al.*, 2021). Por ello, al ADNcp en la biología evolutiva se le considera importante, debido a que poseen información útil para resolver incógnitas sistemáticas, como relaciones entre linajes a nivel de división, familia, así como por debajo del nivel de género, y por tal motivo, se utilizan los llamados ADN Barcoding.

La idea de los ADN Barcoding surge por primera vez en el año 2003 por Paul Hebert, Mark Stoeckle y colaboradores, los cuales propusieron el utilizar un solo gen para poder identificar a todos los seres vivos del mundo, con la finalidad de poder reducir costos en la identificación molecular de las especies. A raíz de esto se fundó el CBOL (Consortium for the Barcoding Of Life) que es una iniciativa internacional con sede en el Smithsonian Institution en Washintong, DC, la cual apoya esta postura respecto a un gen universal, considerando en una primera instancia el uso del gen COI (Citocromo c oxidasa subunidad I), el cual se encuentra en el genoma de las mitocondrias (Hebert *et al.*, 2003; Stoeckle, 2003). En 2009, el CBOL sugiere el uso de un sistema múltiple de genes como código de barras de ADN para plantas, estos genes son *rbcL* (ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa: 1400 pb) y *matK* (maturasa K: 600 a 800 pb) (CBOL, 2009). Esto se debe a que individualmente no son efectivos, debido a que *rbcL* es más conservado y *matK* presenta cierto grado de variación

genética (Nurhasanah *et al.*, 2019; Orozco *et al.*, 2019; Besse *et al.*, 2021). Por ello, se ha propuesto utilizarlos a niveles taxonómicos altos y a niveles intraespecíficos. Por otro lado, también se consideran efectivas las regiones intergénicas debido a su alta tasa de mutaciones que proporcionan (Besse *et al.*, 2021).

Así mismo, existe un estudio que sugiere que el uso de *matK* en la familia Apocynaceae es más efectivo para estudios filogenéticos y de identificación molecular de especies, que utilizando solo marcadores moleculares de regiones intergénicas como *trnH-psbA* y *trnL-F* (Domingo & Duran, 2016). No obstante, Besse *et al.*, (2021) sugieren que el uso de *rbcL* y *matK* con la región nuclear ITS mejora la efectividad en los análisis filogenéticos entre especies estrechamente cercanas y se pueden detectar individuos híbridos con mayor facilidad, como en el género *Vanilla*; de igual forma se sugiere que el uso de *rbcL* y *matK* son aceptables para estudios intraespecíficos y de especies cercanas. Domingo & Duran (2016) sugieren que para la familia Apocynaceae podría mejorar la efectividad de *matK* con la ayuda de las regiones intergénicas *trnH-psbA* y *trnL-F*. Como puede observarse, dichos marcadores son variados cuando hablamos de estudios de identificación y taxonomía en plantas.

I.1.4 Filogenia

El origen de la clasificación biológica es tan antiguo que incluso, desde el aspecto religioso, es un mandato de Dios hacia Adán, dándole la tarea de dar nombre a cada ser vivo que habitaba dentro del jardín del Edén (Papavero *et al.*, 2004), siguiendo desde tiempos remotos con clasificaciones más complejas como las realizadas por

Platón y Aristóteles, dichas clasificaciones eran subjetivas, las cuales en esta época no permitirían muchas posturas positivas (Andrew *et al.*, 2021), en la actualidad la clasificación taxonómica de los seres vivos es manejada por la sistemática, la cladística y la biología evolutiva (Wiley & Lieberman, 2011). En esta última, se pueden notar dos tipos de procesos evolutivos, los cambios microevolutivos que consisten en pequeños cambios en la información genética de las metapoblaciones y, por último, los macroevolutivos, los cuales son los cambios morfológicos y genéticos de los eventos de especiación (Otero, 2020). La filogenia es la herramienta de la biología evolutiva que se enfoca en analizar dichos cambios, ya sea con datos morfológicos o moleculares (Wiley & Lieberman, 2011). En este sentido, se podría decir, que esta disciplina de la biología evolutiva se caracteriza por tener una serie de postulados: 1) los árboles de la vida ligan a todos los seres vivos, 2) dichas relaciones son el fruto de hipótesis, 3) cualquier carácter es potencialmente útil para realizar un análisis filogenético, 4) la hipótesis de la filogenia tiene una base lógica que lo puede volver al resultado de un análisis a ser candidato para entrar en la clasificación biológica y 5) la relación entre hipótesis debe contar con evidencia clara (Wiley & Lieberman, 2011).

Una de las características que presenta la filogenia es la presencia de los árboles de la vida (Tree life), siendo la descripción gráfica de los eventos evolutivos analizados. Estos árboles se caracterizan por tener nodos, nodos internos, ramas y un taxón en el nodo terminal y poseen raíz (Xue, 2022) (Fig.1).

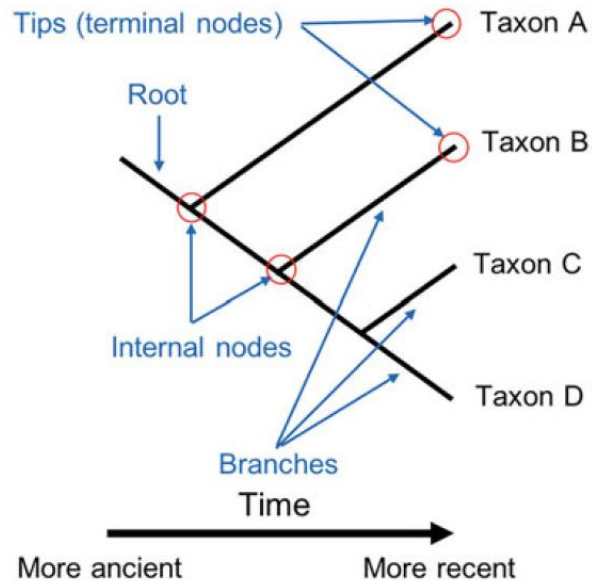


Figura 1. Estructura de un árbol filogenético: raíz (Root), ramas (Branches), nodos terminales (Tips), nodos internos (Internal nodes) y taxón (Taxon) (Xue, 2022).

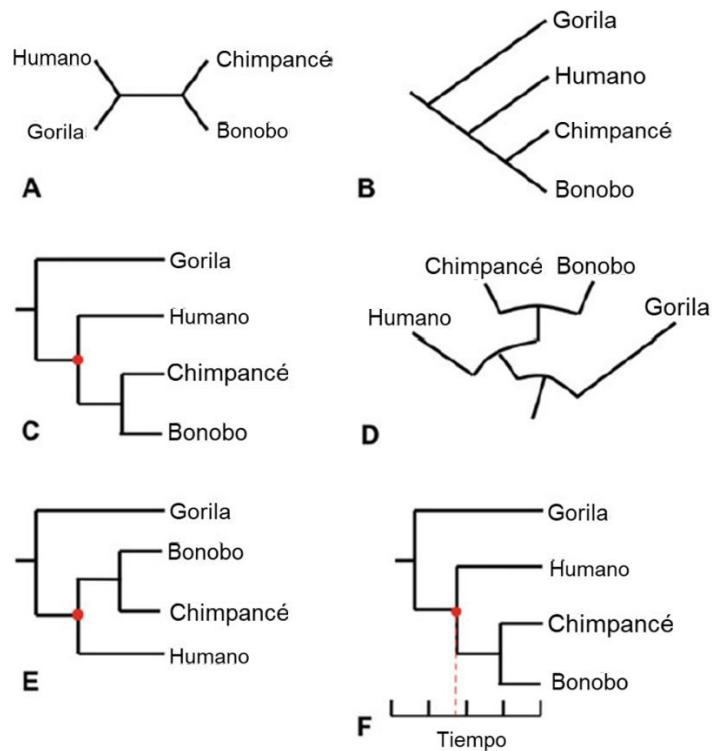


Figura 2. A) Red de relaciones (sin raíz); B, C, D y E) árboles enraizados con diferente topología, F) la longitud del tiempo (Xue, 2022).

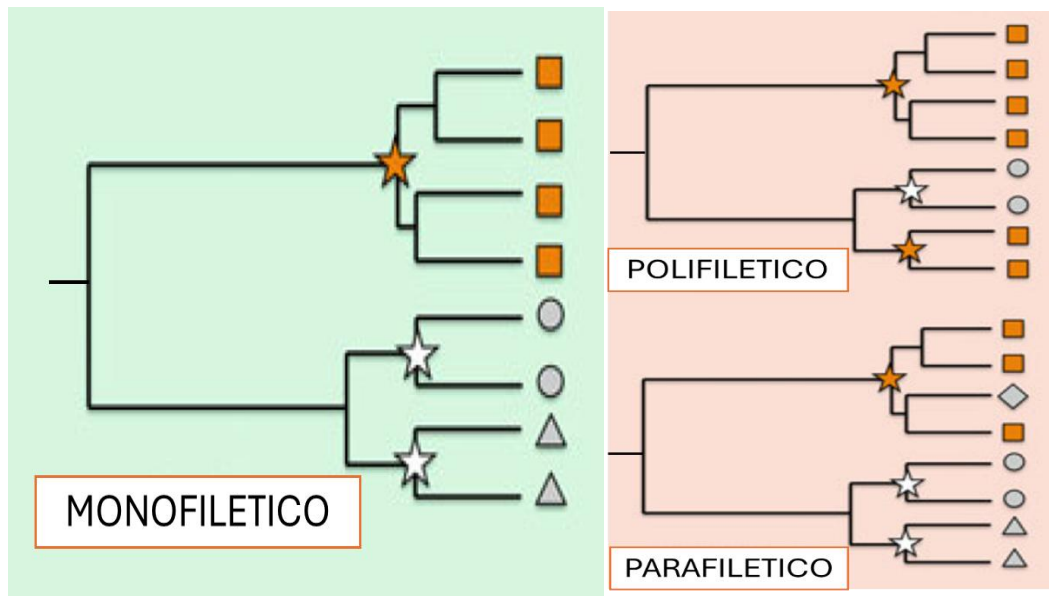


Figura 3. Cuadro verde representación gráfica de un grupo “monofilético”, cuadro rosa, representación de los grupos “polifilético y parafilético” (Besse *et al.*, 2021).

Así mismo, se puede diferenciar que los agrupamientos por relaciones filogenéticas se pueden mostrar en diagramas conocidos como árboles (presentan raíz) y la inclusión en el análisis de un grupo externo (Fig. 2 B, C, E y D F), pero también redes de relaciones que no poseen raíz (Xue, 2022) (Fig. 2 A). En los árboles filogenéticos se infieren los ancestros hipotéticos, así como la longitud de las ramas que pueden indicar la estimación de cambios evolutivos. También es importante resaltar que el cambio de diseño de un árbol filogenético no afecta su resultado, siempre y cuando se respete la topología dada por el análisis utilizado. Cabe mencionar que, desde el aspecto filogenético, también se manejan varios conceptos de especie, al igual que en otras ramas de la biología; en este aspecto, la filogenia considera un taxón (en este caso una especie) cuando dentro de un análisis forma un grupo monofilético, descartando a los que no son monofiléticos (parafilético y polifilético) (Wiley & Lieberman, 2011) (Fig. 3). Dentro de la sistemática filogenética

se pueden utilizar tres métodos de análisis, basándose en modelos de probabilidad: Maximun Likelihood (Máxima Verosimilitud), Maximun Parsimony (Máxima Parsimonia) y Bayesian Analysis (Análisis Bayesiano) (Wiley & Lieberman, 2011; DeSalle *et al.*, 2021).

La biología, desde sus inicios, se dedica a la clasificación de organismos basándose, principalmente, en observaciones morfológicas (Villalobos-Leiva y Benítez, 2020). Sin embargo, a lo largo del tiempo ha cambiado el estudio de dichos caracteres; en la actualidad la morfometría es una herramienta de la ecología y la evolución, que estudia la forma y el tamaño de caracteres mediante datos cuantitativos (Luna, 2020).

I.1.5 Morfometría

El término “morfometría” proviene del griego “forma” y “medición” y es considerada una subrama de la estadística, que se ocupa de los análisis de las formas de los organismos, basándose principalmente, en los fundamentos de la estadística multivariada (Mitteröcker, 2021). Sus orígenes se remontan en la aplicación de modelos multivariados en la psicología; a pesar de ello, esta fue adoptada rápidamente por la biología, teniendo un gran auge en los modelos estadísticos en la “fenética”, la cual tenía como finalidad clasificar a los taxones de acuerdo con a patrón común por similitud (Wiley & Lieberman, 2011; Mitteröcker, 2021). No obstante, los primeros fenetistas tenían la idea de que podían llegar a una medida de similitud general entre especies e incluso con grupos taxonómicos superiores, lo cual nunca ocurrió. A pesar de estas limitaciones, la fenética dejó un legado positivo

que se preserva aun en nuestros días, son los análisis morfológicos basados en estadística multivariada y geometría morfométrica (Wiley & Lieberman, 2011).

En la actualidad se manejan dos ramas de la morfometría; la geométrica y la tradicional (Benítez y Puschel, 2014; Villalobos-Leiva y Benítez, 2020). La primera se caracteriza por el uso de análisis multivariados y plano cartesiano, para poder tener un modelo 2D ó 3D del carácter morfológico en cuestión, teniendo como principal ventaja una descripción más precisa y certera de la forma biológica que se esté analizando, lo cual le permite hacer comparaciones más detalladas (Luna, 2020; Mitteröcker, 2021). La morfometría tradicional, se caracteriza por el uso de medidas lineales, ángulos, recuentos, porciones y la aplicación de diversos modelos estadísticos, principalmente, análisis multivariados (Marcus, 1990; Adams *et al.*, 2004). Se puede decir que, de manera general, en la morfometría sobresalen algunos análisis estadísticos como: el análisis de discriminantes (DA), el análisis de componentes principales (PCA), el análisis de variables canónicas (CVA), el análisis de matrices de distancias euclidianas (EDMA) y el análisis multivariante de varianza (MANOVA) (Juene & Sattler, 1991; Lele & Richtsmejer, 2001; Benítez y Puschel, 2014; Mitteröcker, 2021). Cabe resaltar que el estudio de la morfología vegetal no solo se limita al aspecto de la biología evolutiva o ecología, sino también a disciplinas como la biología del desarrollo, la genética y la fisiología (Kaplan, 2001; Mitteröcker, 2021).

I.1.6 Angiospermas

Las angiospermas o Magnoliophyta, también conocidas como plantas con flor (Villaseñor y Ortiz, 2014), son un grupo de plantas que se estima que tienen alrededor de 254,076 especies vegetales divididas en 5 clases, de las cuales el 4% lo abarcan los grupos Ceratophyllum (6 spp.), Chloranthales (70 spp.) y Magnoliids (9000 spp.), mientras que el 96% pertenece a los grupos de Monocotyledonae (70000 spp.), también conocido como monocotiledóneas y Eudicotyledonae (175000 spp.), llamadas como eudicotiledóneas (Crang *et al.*, 2019). Según la evidencia fósil, los registros más antiguos de plantas con flor se remontan a mediados del Cretácico (Herendeen *et al.*, 2017). Para México se estiman 22,126 plantas angiospermas con 53 órdenes y 247 familias (Villaseñor *et al.*, 2016).

I.1.7 Apocynaceae

La familia Apocynaceae se ubica taxonómicamente en la Clase Magnoliopsida, el Orden Gentianales y está conformada por tres subfamilias reconocidas: Asclepiadoideae, Peroplocoideae y Secamonoideae (Alvarado *et al.*, 2020), con alrededor de 4,500 especies, considerándolo uno de los grupos más diversos en el mundo. Su distribución geográfica es pantropical, es decir, se encuentran representadas en las zonas tropicales de África, Asia y América (Endress *et al.*, 2018), y varias especies tienen importancia medicinal, económica y cultural. Morfológicamente esta familia se caracteriza por poseer conductos laticíferos, por donde se transporta un líquido lechoso llamado látex; ovario súpero, bicarpelar, un ginostegio representando la estructura reproductora femenina modificada, así como

la masculina reducida a polinios. Los frutos son foliulares y las semillas presentan estructuras accesorias de dispersión en forma de pelos llamadas comas (Alvarado *et al.*, 2020).

En México, la familia Apocynaceae fue un grupo taxonómico casi abandonado, hasta en años recientes en los que se han realizado trabajos taxonómicos y de biodiversidad y en el año 2007, se estimaban 50 géneros y 385 especies (Juarez-Jaimes *et al.*, 2007). No obstante, actualmente este número ha cambiado, pasando de 50 géneros a 52 y, por supuesto, la cantidad de especies, considerándose hasta el momento 418 especies de las cuales 214 son endémicas para México (Alvarado-Cárdenas *et al.*, 2020).

I.1.8 Género *Asclepias* L.

El género *Asclepias* L. le debe su nombre al dios griego de la medicina Asclepios, este taxón es conocido comúnmente como “algodoncillo” en el habla hispana y en inglés como “milkweed” (Fishbein *et al.*, 2011). Se describen, de forma general, como plantas que van desde aspecto de hierbas, enredaderas o arbustos perennes, poseen látex (savia lechosa); con las hojas opuestas, verticiladas o alternas; la inflorescencia de forma de cimas interpeciolares o raramente terminales, en su mayoría racemosas a umbeliformes (Sundell, 1993). Sin embargo, una de las características que distinguen a este género es su estructura floral, siendo incluso peculiar entre las angiospermas debido a que posee los polinios y translator; otras características resaltantes de la flor es que son actinomorfas, pentámeras, excepto el gineceo; con los lóbulos del cáliz basalmente unidos, posee una corola sinpétala;

estambres epipétalos, que surgen del tubo de la corola; los filamentos fusionados en un anillo o tubo (columna) que rodea los ovarios, anteras coherentes o unidas en un anillo (cabeza de antera) y adherentes a la cabeza del estigma engrosada que forma el ginostegio central, cada antera con un apéndice hialino terminal y márgenes laterales, típicamente córneos (alas de antera), formando los márgenes de cada par de anteras adyacentes; una hendidura que conduce a la superficie estigmática, poseen típicamente una corona compuesta por capuchones y cuernos (Sundell, 1984, 1993) (Fig. 4).

Este grupo vegetal tiene una amplia distribución en América del Sur, América del Norte y África, se estima que existen unas 72 especies representadas en México, de las cuales 36 son endémicas y siete especies consideradas endémicas locales para algunas regiones (Fishbein *et al.*, 2011; Alvarado *et al.*, 2020).

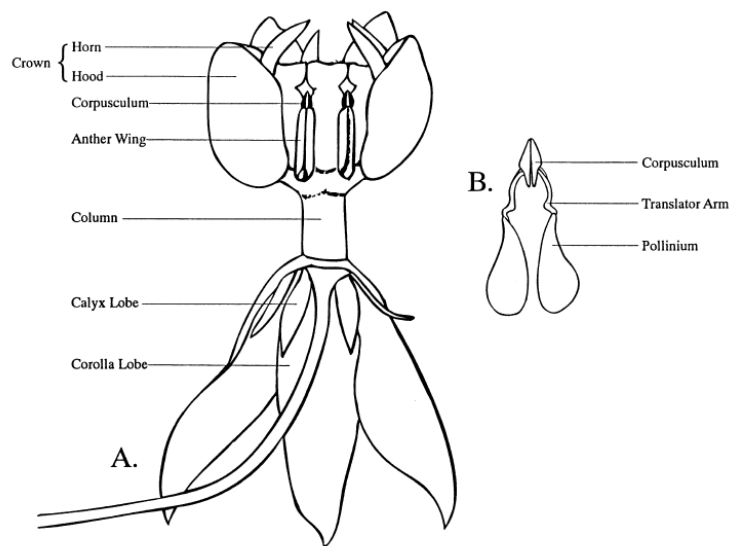


Figura 4. Estructura floral del género *Asclepias* L. (Sundell, 1984).



Figura 5. Inflorescencia de *Asclepias* L.: A: *A. glaucescens*, B: *A. otaroides*, C: *A. linaria*, y D: *A. curassavica*.

I.1.9 Interacciones ecológicas

El género *Asclepias* L. es popularmente conocido por su asociación simbiótica con especies del orden de los lepidópteros, debido a que algunas especies de este orden se ven favorecidas por este grupo de plantas, debido a que las flores de algodoncillo son longevas y producen abundante néctar, que fluye de los nectarios dentro de las cámaras estigmáticas para llenar las capuchas que sirven como reservorios, funcionan como resguardo para los huevecillos de los lepidópteros, aprovechando la producción de cardenólidos con propiedades tóxicas que alejan a

sus depredadores, el néctar también trae el beneficio de servir como líquido de germinación para los granos de pólen (Wyatt & Broyles, 1994; Agrawal *et al.*, 2008; Luna & Dumroese, 2013). Algunas especies que se ha visto mayor interacción con lepidópteros son *A. syriaca* L., *A. speciosa* Torr., *A. incarnata* L., *A. ovalifolia* Decne., *A. tuberosa* L., y *A. viridiflora* Raf. (Luna & Dumroese, 2013). Siendo la especie más sobresaliente la asociación simbiótica de lepidópteros con *A. syriaca* (Fishbein *et al.*, 2011), la cual está considerada en categoría de riesgo, dicha especie es un elemento de sobrevivencia de *Danaus plexippus* L. (mariposa monarca), por lo que ha sido considerada en programas de conservación que incluyen su propagación a través de semillas (Agrawal *et al.*, 2010; Luna & Dumroese, 2013).

Cabe mencionar que, otra de las características que presenta este género es la hibridación natural entre especies, un proceso raro de ver en la naturaleza, incluso en plantas. Para ilustrar esto, en *A. syriaca* y *A. exaltata* L., se han encontrado poblaciones de forma natural F1 (filial 1) y F2 (entrecruzamiento), no obstante, dichos híbridos tienden a tener bajas tasas de producción de semillas, resultando en escasos individuos F2 (Broyles, 2002).

Otras interacciones ecológicas de *Asclepias* son las relacionadas con micorrizas arbusculares (HMA), principalmente con *A. syriaca* (Landis *et al.*, 2004). Se han realizado trabajos de inoculación de raíces de *A. syriaca*, *A. latifolia*, *A. purpurascens* L., *A. californica* Greene., *A. curassavica* L., *A. verticillata* L., *A. linearis* Scheele. y *A. incarnata* con HMA, notando algunos beneficios en el crecimiento y producción de metabolitos que ayudan como defensa ante depredadores. Sin embargo, de manera contradictoria, se han descrito efectos

neutrales o negativos al inocular con especies de HMA, por ejemplo, *Glomus etunicatum* W.N. Becker & Gerd. en *A. syriaca*, en donde, aparentemente, actuaba más como parásito del desarrollo y producción del látex (Vannette & Hunter. 2010; Vannette *et al.*, 2013). Por otra parte, se han descrito asociaciones simbióticas entre hongos endófitos como *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. y *Penicillium chrysogenum* Thom. con *Asclepias sinaica* Bioss., observando beneficios en el desarrollo de las raíces (Fouda *et al.*, 2015). También, se reportan estudios de interacción con virus, tal es el caso de *Tymovirus* en *A. viridis*, con características asintomáticas en su interacción (Min *et al.*, 2012).

A pesar de la importancia ecológica del género *Asclepias*, se puede señalar, que varias especies carecen de un programa de conservación y, más aún, existe desconocimiento sobre su aspecto ecológico. Finalmente, cabe destacar los problemas que en años recientes enfrenta este grupo. Se han reportado poblaciones afectadas por el crecimiento urbano y la fragmentación de paisajes, como el caso de *Asclepias lanuginosa* Nutt. que ha presentado una producción nula de semillas a pesar de producir flor y que a través de microsatélites se ha determinado un alto porcentaje de clonalidad. Aún no se tiene evidencia de endogamia y se han registrado cambios en las estrategias de reproducción sexual pasando a asexual, esto en poblaciones ubicadas en Illinois y Wisconsin en Estados Unidos de América (Sun-Kin *et al.*, 2015). Algunos otros retos que enfrentan el género y sus especies asociadas son el cambio climático, debido a que algunas modelaciones de sus probables áreas de distribución futura, se espera que durante los siguientes años *A. syriaca*, *A. tuberosa*, *A. speciosa*, *A. purpurascens* L., *A.*

fascicularis Decne., y *A. curassavica* tengan un área de distribución más al norte del continente americano, principalmente, en regiones de Canadá y, aunado a esto, el cambio del comportamiento de la migración de *D. plexippus* (Lemoine, 2015).

I.1.10 Uso del género *Asclepias* L.

El género *Asclepias* L. es un grupo de plantas que tiene diversas aplicaciones tradicionales en México; dentro del territorio nacional sobresalen al menos 17 especies que tienen algún uso en las comunidades de este País. Los usos van desde medicinales hasta mágico-religiosos, incluyendo el ámbito alimenticio. Las especies mencionadas son: *A. linaria* Cav., *A. euphorbiifolia* Engelm. ex A. Gray., *A. glaucescens* Kunth., *A. notha* W.D.Stevens., *A. albicans* S.Watson., *A. curassavica*, *A. glaberrima* Sessé & Moc., *A. hypoleuca* (A.Gray) Woodson., *A. mexicana* Cav., *A. lynchiana* Fishbein., *A. oenotheroides* Schltdl. & Cham., *A. similis* Hemsl., *A. subulata* Decne., *A. tuberosa*, *A. woodsoniana* Standl. & Steyer., *A. quinquedentata* A.Gray. y *A. contrayerba* Sessé & Moc. (*A. jaliscana*) (Fernández *et al.*, 2008) (Fig. 6).

Entre las especies comestibles conocidas de este género está *A. notha*, de la cual se extrae el látex para producir chicle en algunas regiones de México, como en la Mixteca de Oaxaca y en Tlaxcala (Fernández *et al.*, 2008; Juárez-Cruz *et al.*, 2016). De otras especies de *Asclepias* se ha documentado el consumo de otras partes de la planta, como en *A. similis* y *A. oenotheroides* se pueden consumir los frutos; mientras que, el consumo de hojas se da en *A. brachystephana*, *A. jaliscana*, *A. euphorbiifolia*, *A. glaberrima*, y *A. quinquedentata* (Fernández *et al.*, 2008). En

cuanto a especies con propiedades medicinales, el conocimiento que existe no es homogéneo como se puede observar en *A. circinalis* y *A. melantha*, que cuentan con un reporte como plantas de uso medicinal en el estado de Oaxaca, en la comunidad de San Pedro el Alto, pero se desconocen detalles sobre su aplicación como medicina tradicional (Pérez-Luis, 2023).

En el caso de *A. glaucescens*, la cual tiene una amplia distribución desde el sur de los Estados Unidos de América hasta Centro América (Juárez-Jaimes *et al.*, 2022), se conoce que, en algunas comunidades de México, la raíz de la planta es útil para tratar malestares estomacales y el látex para tratar heridas infectadas (Fernández *et al.*, 2008). Desde hace décadas se conoce parte de la composición bioquímica del látex, principalmente, metabolitos secundarios llamados asclepaínas y labrioformina, con posibles efectos terapéuticos (Tablero *et al.*, 1991; Fonseca *et al.*, 1991). Sin embargo, a pesar de que *A. glaucescens* posee metabolitos de interés farmacéutico, se puede notar una gran diferencia con otras especies con respecto a su conocimiento y aplicación.

A. curassavica es una especie ampliamente distribuida en el continente americano (Juárez-Jaimes *et al.*, 2022), considerada una planta con propiedades medicinal y tóxica; tradicionalmente utilizada como purgante, diurético, para tratar hemorragias, fiebre, inflamación, infecciones y mordeduras de serpiente, y que cuenta con diversos estudios (Fernández *et al.*, 2008; Al-Snafi, 2015) por la presencia de glucósidos cardenólidos, la corotoxigenina y la coroglaucigenina, que han demostrado ser eficientes al tratar células cancerosas hepáticas y de pulmón, inhibiendo su viabilidad y proliferación (Ji *et al.*, 2022). Otros de los compuestos

metabólicos que produce son asclepaínas (asclepaína CI y CII), las cuales son potenciales para tratar la inhibición de células cancerosas (Liggieri *et al.*, 2009; Al-Snafi, 2015), así como también se han hecho pruebas de los efectos antiparasitarios, antiinflamatorios, antinociceptivos y sedantes de extractos etanólicos en ratones (Alonso-Castro *et al.*, 2021). El registro de varias aplicaciones en medicina hace que estas especies sean consideradas promesas dentro de la farmacología (Al-Snafi, 2015). Por último, *A. subulata* que tiene una distribución desde Estados Unidos a México (Juárez-Jaimes *et al.*, 2022), produce cardenólidos con una alta actividad anti proliferativa en líneas celulares cancerosas (Bustamante-Armenta, 2018).

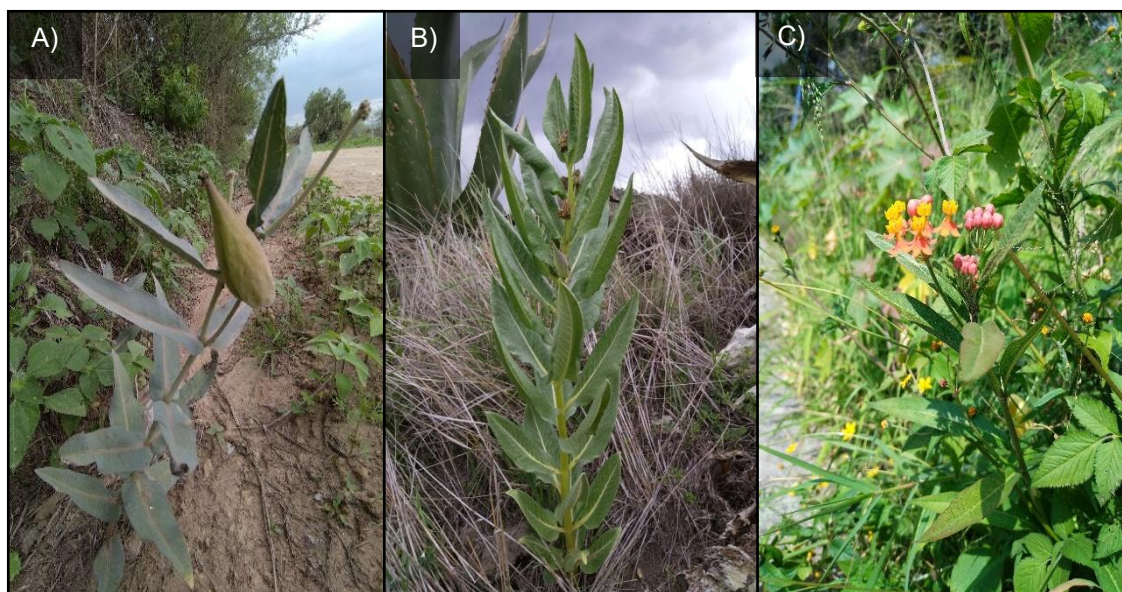


Figura 6. Especies con alguna aplicación antropogénica; A) *A. glaucescens*, B). *A. notha* y C) *A. curassavica*.

I.1.11 *Asclepias jaliscana* B.L. Rob.

Asclepias jaliscana B.L. Rob., tiene como sinónimos a *A. contrayerba* Sessé & Moc. y *A. setosa* Benth. (Fig. 7) y se diferencia del resto de las especies de *Asclepias* L.

por presentar pubescencia hispida a setosa (muy raramente glabra) tanto en láminas, tallo y brácteas; hojas con peciolo cortos de 0 a 4 mm, margen ondulado y córneo, textura coriácea, membranosa y con color glauca en el envés de la lámina, así como una venación de color negro a rojizo; tallo rojizo (Calderón y Rzedowski, 2010). Esta especie tiene una fenología que corresponde a los meses de junio a septiembre y el desarrollo de sus frutos a partir del mes de septiembre (Juárez-Jaimes y Lozada 2003). La especie cuenta con una serie de nombres comunes en diferentes comunidades de México y Centro América. Sin embargo, el más antiguo, encontrado en la bibliografía, es el de “contrayerba” en la zona centro de México, siendo utilizado en algunas comunidades, en años recientes (Sessé y Monciño, 1894; Ortiz y España, 2000; López y Rojas, 2006). Otros nombres comunes con los que se le conoce en México son quiebramuela, hierba del inmortal, escoradilla, atusivants (purépecha), polpoc (tzeltal), choriki (taraumara), panyat wamal (Tzeltal) (Fernández *et al.*, 2008). En Guatemala se le conoce como sicaquina, jicana y jicaquina, mientras que en El Salvador le dicen isbcaco (Woodson, 1954).



Figura 7. Ejemplar de *Asclepias jaliscana* del municipio de Ixtacuixtla, Tlaxcala.

I.1.12 Estado de conservación de la especie

De acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010, *A. jaliscana* no se encuentra dentro de su listado de especies en riesgo, por lo que puede considerarse como preocupación menor, lo mismo sucede con la IUNC (International Union for Conservation of Nature; en español: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza), donde no es considerada como una especie en peligro. Sin embargo, no existe un estudio que avale dicha certificación (SEMARNAT, 2010; IUNC, 2024), aunque se ha mencionado que sus poblaciones silvestres no son muy abundantes y en algunas localidades se considera que ha desaparecido (Gutiérrez *et al.*, 2014).

I.1.13 Distribución de *Asclepias jaliscana*

Asclepias jaliscana presenta una distribución amplia correspondiente a mega México II (México a Centroamérica), que incluye las regiones biogeográficas neártica, neotropical y la zona de transición mexicana (Rzedowski, 1991; Luna-Vega, 2008; Juárez-Jaimes *et al.*, 2022). Algunos de los ejemplares de herbario registrados están relacionados con algunas comunidades vegetales representadas por *Quercus* spp, *Clethra* spp, *Acacia* spp, *Bursera* spp, *Pinus* spp, *Juniperus* spp, *Pterotrichus* spp, *Eriosema* spp, *Tripogandra* spp, *Bouteloua* spp. y *Lasianthaea* spp. El tipo de suelo de las localidades mencionadas son rocosos, volcánico, asoleado, somero discontinuo, ladera riolítica y negro rocoso (IBUNAM, 2022). Las poblaciones reportadas se encuentran ampliamente distribuidas en el estado mexicano con excepción de Baja California, Baja California Sur, Quintana Roo, Yucatán y Campeche, también existen registros de la especie en Guatemala y El Salvador, no obstante, dichos registros son limitados (Calderón y Rzedowski, 2010; TROPICOS, 2022; GBIF, 2022). Recientemente se ha mencionado que *A. jaliscana* tiene una distribución potencial desde los Estados Unidos de América hasta Centro América. Se puede encontrar a una elevación de 4 a 2586 msnm, así como en todos los tipos de vegetación del país (Juárez-Jaimes *et al.*, 2022).

I.1.14 Usos de *Asclepias jaliscana* (*A. contrayerba*, *A. setosa*)

El primer registro del uso *A. contrayerba* corresponde entre los años 1787 y 1803 en el Valle de Malacatepec (actualmente en la zona de Valle de Bravo, Estado de México), donde los indígenas locales la denominaban contrayerba de la cual

utilizaban el polvo de la raíz para tratar malestares estomacales (Sessé & Mociño, 1894; McVaugh, 2000). En años más recientes se han visto otros usos y otras comunidades del país donde utilizan esta especie. En Morelos se utiliza para curar el espanto, tratar quemaduras, dolor de muelas e incluso intoxicaciones (se desconoce parte utilizada de la planta) (Ortiz y España, 2000). En el caso del estado de Tlaxcala se reportan múltiples usos de esta especie, así como partes empleadas de la planta (Tabla 1) (Aguilar-Jiménez, 1997; López y Rojas, 2006).

Tabla 1 . Comunidades y usos de *A. jaliscana* en Tlaxcala.

Municipio/Localidad	Parte Usada	Padecimiento	Autor
Panotla, comunidad de Temetzontla.	Raíz.	Envenenamiento e Intoxicación: Por cualquier tipo de mordedura de reptiles, arácnidos, o ingesta de hongos venenosos.	Aguilar-Jiménez, 1997.
Ixtacuixtla, comunidad de Jilotepec.	Raíz.	Envenenamiento e intoxicación: Por cualquier picadura o mordedura o ingesta de hongos tóxicos. Dolor de cabeza. Malestar estomacal. Quemaduras. Dolor de muelas.	López y Rojas, 2006.
	Flores.		
	Hojas.		

Además de las aplicaciones mencionadas anteriormente, se reportan otros efectos relacionados a su uso como alimento, en donde las hojas se consumen como quelites en el estado de Chihuahua, así como para tratar el acné utilizando el látex y, por último, se ha reportado su uso desde el aspecto mágico-religioso, macerando la raíz para bañar a los niños, además de tratar el mal de amores y maleficio

(Fernández *et al.*, 2008). Sin embargo, a pesar de tener muchas utilidades por algunas comunidades del país, se conoce poco sobre sus propiedades químicas, las cuales se han reportado, para una población de *A. contrayerba*, específicamente, en una que se encuentra en la comunidad de Jilotepec del municipio de Ixtacuixtla, Tlaxcala, indicando que la raíz la cual, está compuesta por taninos en un 7.10%, resinas 11.64%, glicósido 35.44%, alcaloides 46.06% correspondientes con su peso total (Cardoso y Flores, 1998).

I.1.15 Discrepancias del taxón *A. jaliscana*

No hay prioridad sobre los dos nombres de la especie: *Asclepias jaliscana* y *Asclepias contrayerba*, debido a que la descripción hecha por Robinson (1894), que corresponde a *A. jaliscana*, y la descripción de Sessé y Mociño (1894), que hace referencia a *A. contrayerba*, comparten el mismo año de publicación. Sin embargo, hay evidencia que sugiere que Robinson fue el primero en publicar la descripción morfológica y debido a esta cuestión, McVaugh (2000), sugiere que a través del principio de prioridad debe llamarse *A. jaliscana* y no *A. contrayerba*. No obstante, si se basa en la historia botánica en México, debería darse prioridad al nombre de *A. contrayerba*, dado que Martín Sessé y Lacasta entre los años 1787-1803 dirigió la expedición, en la entonces Nueva España donde se incluía a México, con el apoyo de varios botánicos que fueron formados por la primera cátedra botánica en dicho territorio, como D. Mariano Mociño. A pesar de sus esfuerzos, la publicación de sus resultados se vio detenida por la falta de dinero para su impresión y por la desaparición del primer tomo de la Flora de México (León, 1895). Woodson (1954), señala que la especie debería llamarse *A. contrayerba* debido a la relación con su

uso medicinal, ya que el nombre común que le dan los indígenas es contrayerba; y a su amplia distribución, desde el norte de México hasta El Salvador. *A. jaliscana* tiene otra sinonimia menos conocida y más antigua que la descrita en la expedición de Sessé, que es *Asclepias setosa*; Forssk (1775); Benth (1839), sin embargo, puede confundirse la descripción de *A. setosa* Forssk 1775, la cual corresponde a “Flora Aegyptiaco-Arábica” (Flora egipcio-arábica), es decir, es una descripción de plantas que corresponden a una región del Medio Oriente, no obstante, *A. setosa* Benth. 1839 realiza una descripción que aparece en “Plantas Hartwegianas Impirimis Mexicanas”, basada en un ejemplar de *Asclepias* de México. En la Fig. 8, se resume parte de la historia de la especie *A. jaliscana*.

Juárez-Jaimes y Lozada (2003), da una descripción en el “fascículo 37 de la Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán”, consideran que la especie *A. contrayerba* tiene características morfológicas diferentes a las de *A. jaliscana* y que posiblemente sean otro grupo taxonómico, pero no da razón de esta conjetura. Cervantes-Meza (2018) mencionan la existencia de un cambio gradual en la forma de las hojas desde el norte de México al sur, pero, solo es una observación superficial y no se presenta un análisis como tal. Además, Gutiérrez *et al.*, (2014), reportan, que una población de Guerrero que presentaba homocigosis los individuos particularmente tenía un mayor tamaño en las hojas que las poblaciones de Tlaxcala y Jalisco, a pesar de que en este último estado una población presentaba de igual forma homocigosis, a pesar de esto es solo una observación y no da datos de un análisis morfológico que respalde dicha diferencia. Así mismo, no existe un consenso con respecto a la morfología de la lámina e inflorescencia de esta especie, debido a que en diferentes

claves taxonómicas estas varían de acuerdo con el autor, esto se resumen en la Tabla 2.

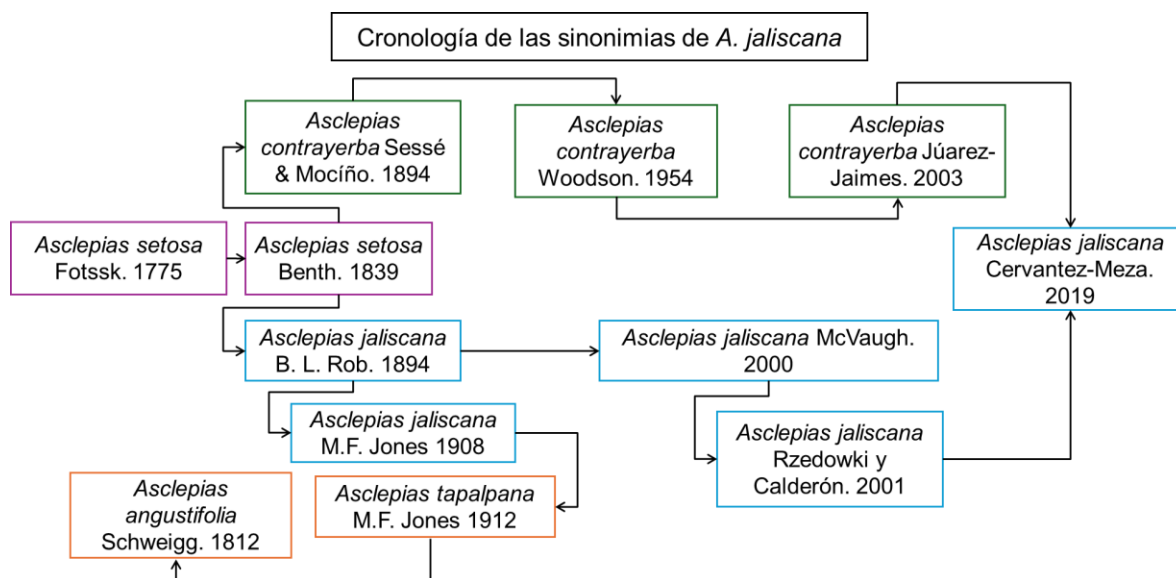


Figura 8. Cronología de las sinonimias de *A. jaliscana*.

Tabla 2. Resumen de discrepancias en claves taxonómicas.

TABLA COMPARATIVA DE CLAVES TAXONÓMICAS						
Especie	CLAVE TAXONÓMICA	AÑO	AUTOR	POSICIÓN DE INFLORESCENCIA	FORMA DE INFLORESCENCIA	LÁMINAS
<i>A. setosa</i>	Plantas Hartwegianas Imprimis Mexicanas.	1839	Benth.	Inter-pecioladas.	Umbela.	Oval y lanceolada-oval.
<i>A. contrayerba</i>	Flora Mexicana.	1984	Sessé y Mocino.	Terminal erecta o doblada.	Umbela.	Cordada-oblonga.
<i>A. jaliscana</i>	Descriptions of New and Hitherto Imperfectly Known Plants Collected in Mexico.	1894	B.L. Rob.	No se menciona.	Umbela.	Oval, ovada- oblonga.
<i>A. contrayerba</i>	The Birth American Species of <i>Asclepias</i> L.	1954	Woodson.	Terminal.	Corimbo.	Ovada, oblonga-lanceolada.
<i>A. jaliscana</i>	Flora fanerogámica del Valle de México.	2001	Rzedowki y Calderon.	Terminal y lateral.	Cima.	Lanceolda y ovada.
<i>A. contrayerba</i>	Flora del Valle de Tehuacan-Cuicatlan.	2003	Juarez-Jaimes y Lozada.	Terminal	Umbeliformes.	Ovada y angostamente ovada.
<i>A. jaliscana</i>	Sinopsis Del Género <i>Asclepias</i> (Asclepiadoideae, Apocynaceae) De Hidalgo, México.	2018	Cervantes-Meza	Terminal y lateral.	No se menciona.	Oblonga, obovada, angostamente elíptica, a largamente ovada.

I.2 Antecedentes

Cardoso y Flores (1998), documentan los metabolitos anti-fisiológicos de la raíz de *A. jaliscana* recolectada en San Marcos Jilotepec de Ixtacuixtla, Tlaxcala. López y Rojas (2006), en un estudio etnobotánico en la comunidad de San Marcos Jilotepec de Ixtacuixtla, Tlaxcala, prueban, tres métodos de propagación de la especie: por semillas en sustrato (suelo del lugar de donde encontraban las poblaciones) bajo condiciones controladas en un invernadero, propagación de semillas en cámaras húmedas y propagación por esquejes (hojas) en agar-agua, teniendo mejores resultados con la propagación de semillas de sustrato, seguida del uso de las cámaras húmedas, siendo la peor forma de propagar con agar-agua, debido a que las plántulas que se llegaban a formar al momento de reincorporarlas con los otros grupos en el invernadero terminaban muriendo, debido a que eran plantas muy pequeñas y frágiles.

En el aspecto etnobotánico se observó que el 88% de los encuestados conocen su uso medicinal, además, en dicha comunidad utilizan casi toda la planta, solo difiriendo las formas de empleo, la parte más usada fue la raíz, además de que su uso va dirigido para tratar dolores de cabeza, estómago y muelas, así como quemaduras e intoxicación por hongos (Cardoso y Flores, 1998).

Dejando de lado los estudios relacionados con su uso y las posibles estrategias para su conservación, el tercer trabajo enfocado únicamente a la especie es el de Gutiérrez *et al.*, (2014), el cual tiene un enfoque de diversidad genética utilizando aloenzimas, específicamente, isoenzimas. Como resultado se observó que *A.*

jaliscana tienen una mayor heterocigosis entre las poblaciones de Jalisco y Tlaxcala y un mayor grado de homocigosis entre las poblaciones de Guerrero y Jalisco, lo que puede deberse a un aislamiento de las poblaciones o endogamia; dichos fenómenos pueden alterar el acervo genético de estas poblaciones, además de que la población de Guerrero, se observaron individuos de mayor tamaño en comparación con las poblaciones de Tlaxcala y Jalisco.

Otro trabajo que denota las diferencias morfológicas es una sinopsis del género *Asclepias* en el estado de Hidalgo (Cervantes-Meza, 2018) donde menciona a *A. jaliscana* con un cambio en la forma de la hoja relacionado con su distribución desde el norte de México al sur, pasando de ser láminas lanceoladas a ovadas. Juárez-Jaimes y Lozada (2003) mencionan que *A. jaliscana* y *A. contrayerba* que son diferentes debido a ciertas variaciones morfológicas; sin embargo, no hacen referencias a las mismas, ni aun método que suponga esto.

En el aspecto molecular se han hecho trabajos con el género *Asclepias* L., en los cuales, solo hay dos con análisis filogenéticos en los que se consideran entre las muestras a la especie de *Asclepias jaliscana* representada por una sola secuencia de un individuo en cada caso. Dichos trabajos utilizan diferentes marcadores moleculares el primero de Fishbein *et al.*, (2011), generan una hipótesis con respecto a cómo el género *Asclepias* fue diversificándose entre los continentes de África y América, dando como hipótesis que este grupo proviene de África y que posteriormente colonizó a América del Norte, seguido de América del Sur, esto utilizando las regiones intergénicas *trnC-rpoB*, *trnS-trnG* y el intrón *rpl16*, marcadores ubicados en el cloroplasto. Se observó que *A. jaliscana*, representada

por una secuencia de un ejemplar del estado de Durango; está relacionada con *A. jorgeana*. El estudio de Fishbein *et al.*, (2017) incluye una secuencia de un ejemplar del estado de Sonora y es un trabajo relacionado con la evolución de tricomas (pubescencias) y se realiza un análisis utilizando el genoma parcial del cloroplasto de 103 especies de América del Norte, no obstante, *A. jaliscana* queda emparentada en este estudio con *A. otaroides*, para ambos trabajos de investigación se basaron en el análisis filogenético de parsimonia y máxima verosimilitud.

Cabe destacar que el uso de los marcadores moleculares como el intrón *rpl16* no solo se han limitado en *Asclepias*, sino, que tiene amplias aplicaciones en la filogenia de otras familias de plantas, como Poaceae y Cactaceae, siendo adecuados para describir relaciones filogenéticas a nivel de familia y hasta género, como es el caso de los trabajos de Butterworth *et al.*, (2002) donde usa como marcador molecular *rpl16* para realizar un análisis filogenético de parsimonia, llegando a la delimitación de tribu en Cactaceae. En la familia Poaceae se han regiones intergénicas (*rps16-trnQ*, *trnC-rpoB*, *trnH-psbA* y *trnD-T*) para análisis parsimonia en la subfamilia Bambusoideae (Goh *et al.*, 2010). Específicamente en el género *Chusquea* (Poaceae); se observó que este marcador a pesar de poseer mutaciones puntuales es posible establecer relaciones filogenéticas a nivel intergenérico y intragenérico (Zhang, 2010).

I.3 Preguntas de Investigación

¿Cuál es la posición filogenética de las secuencias de *A. jaliscana* del norte, centro y oriente de México?

¿Cuáles son las variaciones morfológicas que existen en los ejemplares de herbario identificados como *A. jaliscana*, *A. contrayerba* y *A. setosa*?

I.4 Justificación

El género *Asclepias* L. es un grupo taxonómico poco estudiado, a pesar de que muchas de sus especies tienen importancia cultural y medicinal. Tal es el caso de *Asclepias jaliscana*, que tiene un amplio uso en varias regiones del país, que van desde un uso medicinal, alimenticio y en algunas ocasiones comercial. Sin embargo, algunos autores han mencionado que algunas poblaciones presentan características morfológicas únicas, con respecto a su tamaño, forma de la hoja e incluso de suponer que hay más de un taxón en las colecciones científicas de herbario, por tal razón, el presente trabajo aportará información molecular y morfométrica respecto a la posición taxonómica de *Asclepias jaliscana*, debido a la variación morfológica observada en las colecciones científicas de herbarios.

I.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Conocer la posición filogenética de *Asclepias jaliscana* usando como fuente de datos tres regiones génicas y explorar datos morfométricos para determinar patrones variaciones dentro del taxón.

1.5.2 Objetivos específicos

1. Conocer la posición filogenética de muestras de *A. jaliscana* obtenidas de localidades del centro de México, con secuencias de cloroplasto: *trnC-rpoB*, *rpl16* y *rbcL*.
2. Analizar los caracteres morfológicos de ejemplares de herbario identificados como *A. jaliscana*, *A. contrayerba* y *A. setosa* para reevaluar la variación reportada de la especie.

II. Materiales y métodos

2.1 Selección de sitio de estudio

Los sitios de estudio se seleccionaron con base en la información disponible en bases de datos públicas como TROPICOS, Global Biodiversity Information Facility, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y datos abiertos del Instituto de Biología de la UNAM (TROPICOS, 2022; Global Biodiversity Information Facility [GBIF], 2022; Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad [CONABIO], 2022; Instituto de Biología de la UNAM [IBUNAM], 2022). Se obtuvo información de las bases de datos de las páginas anteriormente mencionadas, y se hizo una depuración de las localidades donde se han reportado poblaciones de *A. jaliscana*, para esta clarificación se consideró importante la información sobre la fecha, las coordenadas, el estado y la localidad.

2.2 Sitios de estudio

El área de estudio incluye las localidades en las que se encuentran reportadas las poblaciones de *A. jaliscana*, que corresponden con los estados de: Tlaxcala, Puebla, Morelos, Estado de México, Hidalgo, Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Chiapas, Sinaloa, Jalisco, Nayarit, Guanajuato, Querétaro, Durango, Sonora, Chihuahua, Tamaulipas, Veracruz y Tabasco (TROPICOS, 2022; GBIF, 2022; CONABIO, 2022; IBUNAM, 2022), siendo un total de 120 localidades registradas (TROPICOS, 2022; GBIF, 2022; CONABIO, 2022; IBUNAM, 2022).

2.3 Recolección de las muestras

La recolección de muestras se llevó a cabo en la temporada de primavera-otoño, entre los meses de abril a noviembre del 2022 (TROPICOS, 2022; GBIF, 2022; CONABIO, 2022; IBUNAM, 2022). Se visitaron 22 localidades correspondientes a los estados de Tlaxcala, Puebla, Hidalgo, Ciudad de México, Estado de México, Chiapas (Véase en Anexo 1). En localidades reportadas con la presencia de *A. jaliscana*. Se obtuvo un total de tres muestras correspondientes a tres localidades; Estado de México (Otumba) y Tlaxcala (Ixtacuixtla y Sanctorum). Además, se agregó una muestra de una población, que corresponden con el estudio de Gutiérrez *et al.* (2014), este material obtenido es del estado de Guerrero (Eduardo Neri), Fig. 9. Para la recolección de muestras frescas en el centro de México, sólo se consideró reunir material vegetal de tres individuos por localidad. El material vegetal que se recolectó fue de hojas, preferentemente, sanas para hacer la extracción de ADN; una vez obtenidas las muestras fueron almacenadas en bolsas

herméticas con silica gel para poder transportarlas (Valadez y Kahl, 2000; Záveská, 2019).

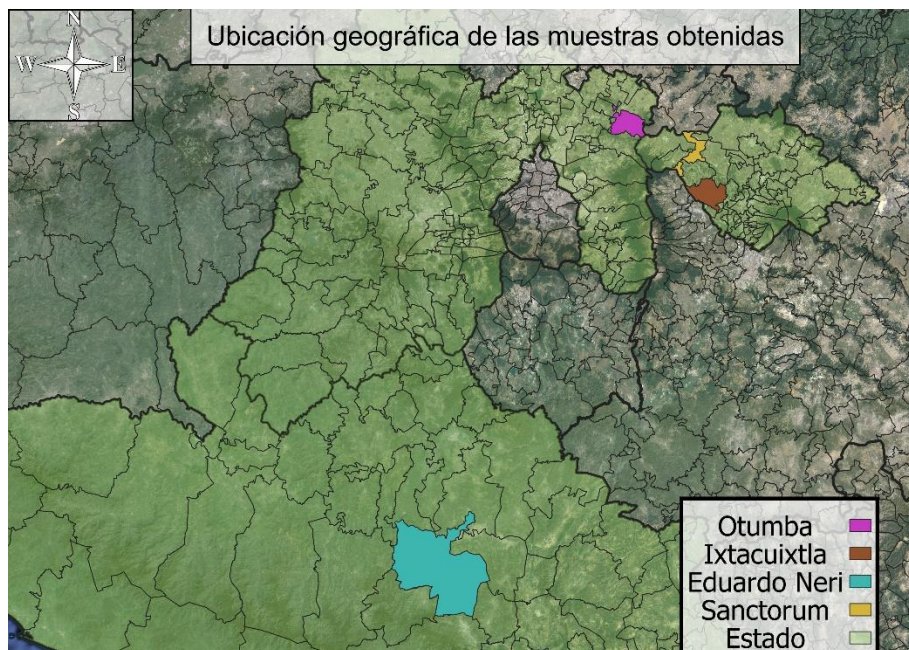


Figura 9. Ubicación geográfica de las muestras de *A. jaliscana*.

2.4 Análisis de ADN

2.4.1 Diseño de primers

Para el diseño de los primers se consideraron las regiones *trnC-rpoB* y *rpl16* ya utilizados para el género *Asclepias* L. por Fishbein *et al.*, (2011). Se hizo el rediseño de los primers seguido de dos alineamientos ClustalW en el programa BioEdit ver.7.7, uno con la región intergénica *trnC-rpoB* y otro con el intrón *rpl16*, considerando en el alineamiento todas las secuencias individuales disponibles para el género. Se seleccionaron las secuencias más conservadas de las regiones *trnC-rpoB* y *rpl16* y posteriormente, se ajustaron las temperaturas medias de fusión de

los primers en la página Integrated DNA Technologies (IDT). Se comprobó en primer-BLAST, la unión a las regiones seleccionadas en el ADN de cloroplastos en el género *Asclepias* y subfamilia Asclepiadoideae (Fig. 10). Finalmente se solicitó su síntesis en el IBT-UNAM (Instituto de Biotecnología de la UNAM), los datos técnicos de los primers diseñados se muestran en el Tabla 3.

Tabla 3. Características de los primers *rpl16* y *trnC-rpoB*.

Región	Forward	Reverse	Temperatura Forward	Temperatura Reverse	GC% Forward	GC% Reverse
<i>rpl16</i>	GTGTGA CTCGTTGGTTTT T	GGCTTCTATTTG TCTAGATGTG	51 °C	50.8°C	42.11%	40.91%
<i>trnC-rpoB</i>	CCAATCCGTTT GAATACCCGA	TGATGCAGTACG GAACTT	51.1 °C	51 °C	47.62%	44.44%

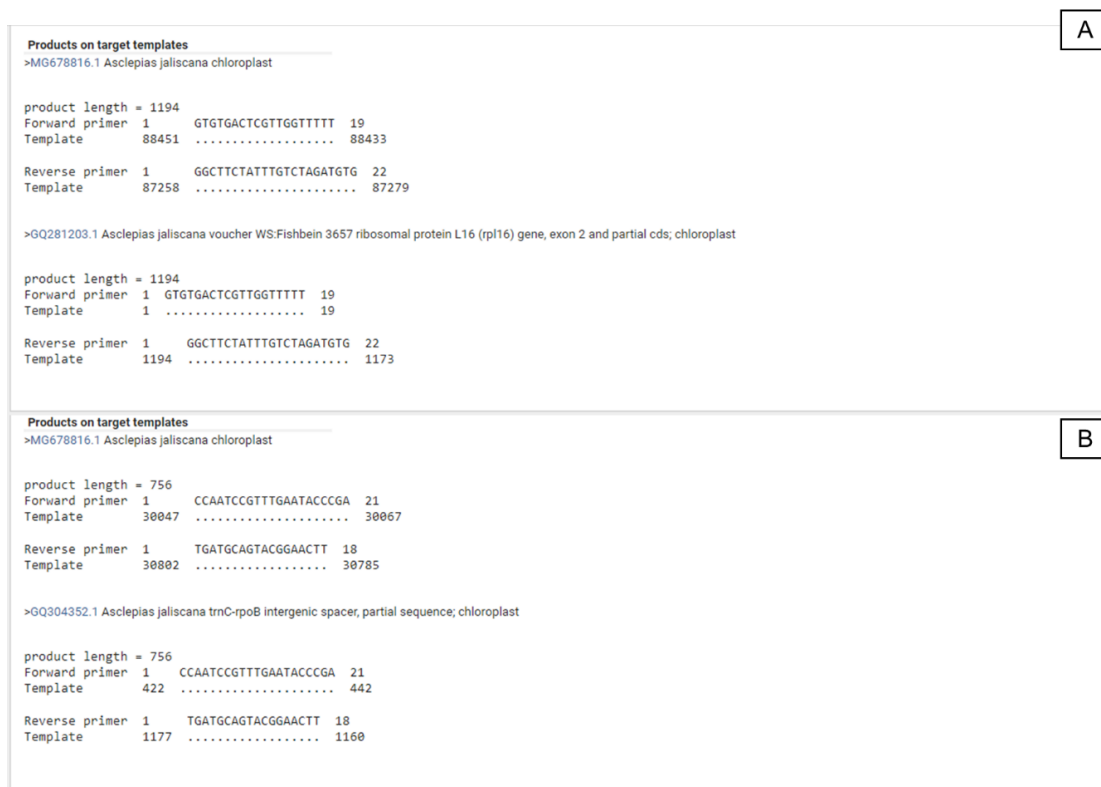


Figura 10. A) Tamaño conocido de *rpl16* de *A. jaliscana*, B) Tamaño conocido de *trnC-rpoB*.

2.4.3 Extracción del ADN

La extracción del ADN se realizó a partir de hojas recolectadas, las cuales fueron sometidas a un proceso de deshidratación durante 72 h a 40°C, en un horno de secado marca Drying Oven. Una vez teniendo las hojas secas, se procedió a macerarlas en un mortero hasta tener un polvo homogéneo. Posteriormente, se utilizó el kit de extracción: Plant/Seed DNA MicroPrep marca Zymo Research siguiendo las instrucciones del fabricante (Záveská, 2019).

2.4.3 Confirmación de ADN total (ADNt)

Para determinar el éxito en la extracción del ADNt se realizó la técnica de electroforesis con geles de agarosa. Los geles fueron preparados al 1.2% de agarosa estándar y buffer TAE 1X (Tris-acetato-EDTA). Se utilizó una cámara de electroforesis Mini-Sub Cell GT Systems (BioRad) a 70 V durante 120 min. Una vez pasado el tiempo de la electroforesis, el gel de agarosa fue teñido con bromuro de etidio (5 µg/L) de 15 a 20 min en oscuridad. Posteriormente se prosiguió a revelar el gel en un fotodocumentador marca UVP PhotoDoc-IT™ (Fisher Scientific). Una vez confirmada la extracción de ADN se prosiguió a realizar la amplificación de las regiones seleccionadas.

2.4.4 Amplificación de regiones génicas

A partir del ADN total se amplificaron, mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), las regiones *trnC-rpoB*, *rpl16* y *rbcL*. Los reactivos utilizados para 50 µL de reacción fueron: ADN 10 ng (1 µL), primers F y R 20 µM (1

μL de cada uno), dNTPs 10 μM (1 μL), 10x Taq buffer PCR (250 unidades) (5 μL), 1.5 mM MgCl₂ (1 μL), Taq polimerasa (5 unidades/ μL marca QIAGEN) (0.3 μL), completando con H₂O el volumen de reacción (Valadez y Kahl, 2000). A continuación, se muestra el protocolo de temperaturas de la PCR para cada primer. *trnC-rpoB*: desnaturalización, 4 min a 94°C, alineamiento, 1 min a 51°C y extensión, 7 min a 72°C; *rpl16*: desnaturalización, 4 min a 94°C, alineamiento, 1 min a 51°C, extensión, 7 min a 72°C. En ambos casos, se amplificaron las regiones durante 35 ciclos, en un termociclador de gradiente marca T100 Thermal Cycler (BioRad).

2.4.5 Confirmación de los amplicones

Para confirmar la amplificación de las regiones *trnC-rpoB* y *rpl16* se realizaron geles de agarosa al 1.2% con TAE (1X) en las mismas condiciones mencionadas para la confirmación de la extracción de ADN (Valadez y Kahl, 2000). Se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler 100 DNA Plus Ladder, con un peso de 3000 bp, para estimar el tamaño de los amplicones. Una vez comprobado el tamaño y la presencia de los fragmentos se llevó a cabo el proceso de purificación (Kalendar *et al.*, 2021).

2.4.6 Purificación de productos de PCR

Los productos de la PCR fueron purificados utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez realizado este paso se repitió la comprobación en un gel de agarosa para confirmar la presencia de los fragmentos utilizando solo 1 μl del amplicón (Kalendar *et al.*, 2021).

2.4.7 Secuenciación

Los productos purificados de PCR se guardaron en microtubos plásticos estériles y se prepararon de acuerdo con las instrucciones del proveedor del servicio de secuenciación (IBT-UNAM). Las secuencias se obtuvieron mediante el método de Sanger en un secuenciador automático de DNA de 16 capilares (Applied Biosystems, modelo 3130xl).

2.5 Análisis de datos moleculares

Los datos obtenidos de la secuenciación fueron sometidos a distintos programas bioinformáticos para poder ser analizados a través de uno de los modelos matemáticos ampliamente utilizados en la filogenia molecular, siendo este el análisis Bayesiano, a continuación, se explica más detalle este proceso.

2.5.1 Análisis de similitud de secuencias

Una vez obtenidos los datos de la secuenciación, se sometieron a un análisis de similitud de secuencias en la Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), que es una herramienta que permite confirmar que la amplificación corresponde a la región deseada, a través de la comparación de las secuencias obtenidas del amplicón con las secuencias depositadas en las bases de datos (Bromham, 2016).

2.5.2 Alineamiento de secuencias

Los datos moleculares correspondientes Fishbein *et al.*, (2017), fueron bajados de GenBank. El alineamiento de secuencias fue realizado en el programa BioEdit con

el módulo Clustal W a 1000 bootstraps (Bromham, 2016), con especies del género *Asclepias* L. y el grupo externo considerando otros géneros de la familia Apocynaceae mencionados en el trabajo de Fishbein *et al.*, (2011). Este procedimiento se realizó tres veces: el primero con 120 regiones de cloroplastos (tres del grupo externo y el resto de *Asclepias*) y una secuencia de la región *trnC-rpoB* del trabajo de Fishbein *et al.*, (2011). Junto a las cuatro muestras de este estudio, una vez alineados, se recortó el alineamiento para ajustarlo a la región *trnC-rpoB*. En cuanto *rpl16* se pudo extraer el fragmento de la información del cloroplasto desde GenBank y se hizo el alineamiento de igual forma que en *trnC-rpoB*. En el caso de *rbcL* se hizo el mismo procedimiento que *rpl16*. Posteriormente en Mesquite se realizó una matriz para las 124 secuencias de cada región y se hizo una edición de las etiquetas de cada fragmento de ADN (Maddison & Maddison, 2019).

2.5.3 Análisis filogenético

El análisis se realizó en el programa Mr. Bayes 3.2. a 3,000,000 de generaciones (Fig. 11) y el modelo evolutivo general GTR (Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Ronquist *et al.*, 2012; DeSalla *et al.*, 2021), se analizaron las cuatro muestras recolectadas para este estudio y se usaron las regiones *rpl16*, *trnC-rpoB* y *rbcL*, junto a muestras del genoma del cloroplasto de *Asclepias* de Fishbein *et al.*, (2017), se utilizó como grupo externo los géneros *Calotropis*, *Pergularia* y *Gomphocarpus* los cuales ya han sido propuestos como grupo externo para *Asclepias* (Fishbein *et al.*, 2011). Una vez obtenido el resultado del análisis se visualizó el árbol filogenético consenso en el programa FigTree ver 1.4.4. (Rambaut, 2007).

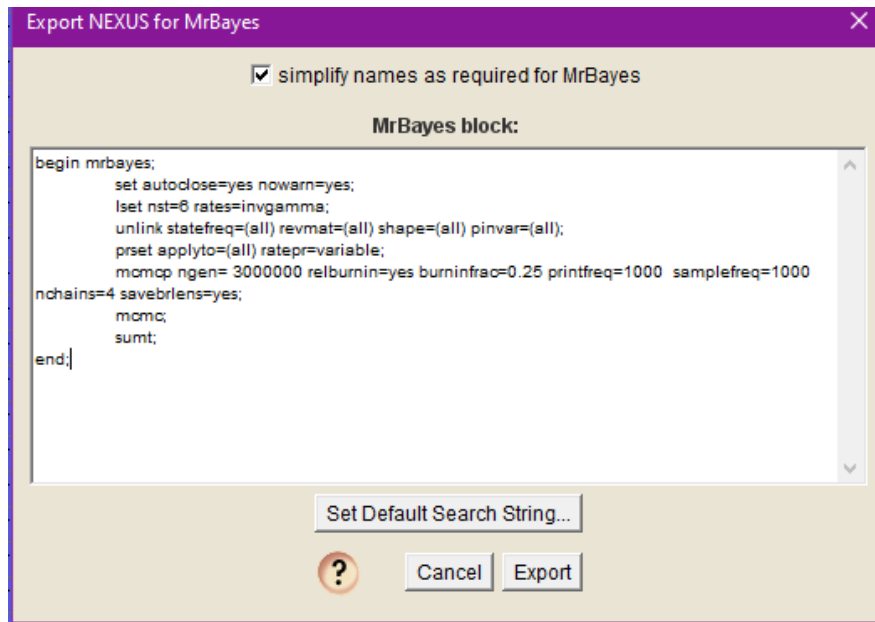


Figura 11. Indicaciones del documento exportado de Mesquite a Mr. Bayes 3.2.

2.6 Análisis morfológico

2.6.1 Revisión de ejemplares de herbario

Se revisó un total de 70 ejemplares de herbario de los cuales algunos tuvieron una revisión física y otros digital, los ejemplares de herbario corresponden a la distribución mostrada en la Fig. 12.



Figura 12. Distribución geográfica en México de los 70 ejemplares de herbario de *A. jaliscana* (*A. contrayerba* y *A. setosa*) considerados para este estudio.

La revisión de los ejemplares de herbario incluyó imágenes digitales obtenidas de los herbarios internacionales y nacionales: Herbario de la Universidad de San Carlos de Guatemala (USCG), Universidad de Guadalajara Herbario “Luz María Villarreal de Puga” (IBUG), Herbarium of The Society of Natural History of Delaware (DOV), Brown University Herbarium (BRU), University of Arizona Herbarium (ASU), Herbiers Université de Lyon (LY), The Harvard University Herbaria (HARVARD), New York Botanical Garden (NY), The Academy of Natural Sciences Philadelphia, PA USA (PH) (NYBG, 2023). Para éstos se consideró que las imágenes digitales tuvieran como mínimo la información de la localidad y regla de referencia.

Los ejemplares físicos, fueron revisados principalmente de la colección de Asclepiadaceae del Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM (MEXU) y del Herbario de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (TLXM). Los caracteres considerados para esta revisión fueron: hojas, inflorescencias, flores y frutos. En cuanto a las láminas de las hojas, se tomó en cuenta forma de lámina, margen, ápice y base, así como nueve variables cuantitativas continuas: largo intermedio (LIH), largo izquierdo (LIZH), largo derecho (LDH), ancho de la apertura del ápice (AAA), ancho de la base (ABH), ancho intermedio (AINH), ancho superior con respecto al 25% (ASH) del LIH y el ancho inferior con respecto al 25% (AIFH) del LIH y el largo del peciolo (LP) Fig. 13 A. En cuanto a inflorescencias, se consideró la posición de la inflorescencia y forma, en cuanto a las medidas cuantitativas continuas se tomó en cuenta largo del pedúnculo (LPI) y largo de pedicelos (LPDI) Fig. 11 B. De las flores solo se consideraron características cuantitativas continuas del largo de la columna (CF), flor (LF), capuchón (LCHF), cuerno (LCRF), largo del pétalo (LPTF) y sépalo (LSPF), Fig. 14. Para la obtención de los datos de todas estas variables se utilizó un vernier marca SURTEX graduada en milímetros, y en el caso de las estructuras florales se usó el apoyo de un estereoscopio marca ZEISS.



Figura 13. Variables consideradas para el análisis morfométrico de los ejemplares de *A. jaliscana*. A) Medidas de la lámina de la hoja utilizadas para el análisis morfométrico (Imagen tomada del ejemplar Colector: Jesus Gonzalez Ortega, No. 48322 (MEXU); B) Medidas de la inflorescencia consideradas para el análisis morfométrico (Imagen tomada del ejemplar No. 149714 (MEXU), Colectores: James L. Revel, William J. Hess y Rober W. Kiger.

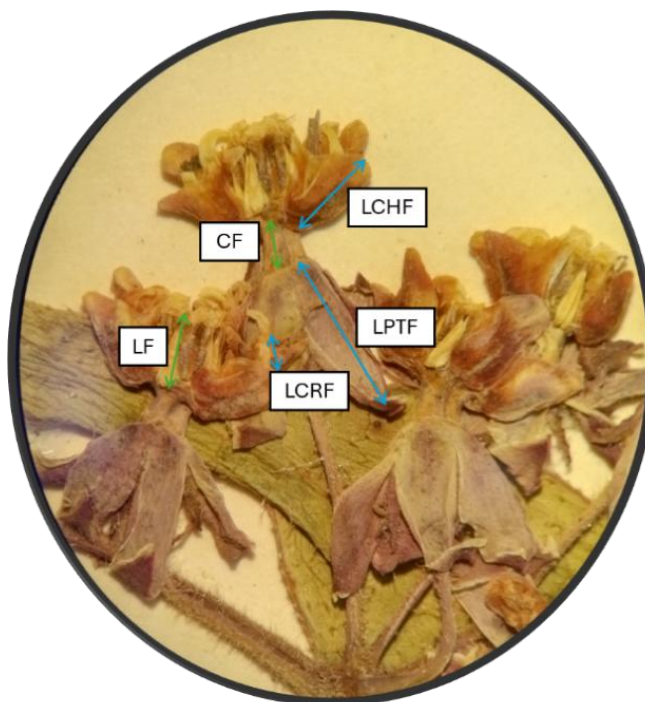


Figura 14. A) Variables medidas de las estructuras florales de los ejemplares de *A. jaliscana* utilizadas para el análisis morfométrico (Imagen tomada del ejemplar Colectores: James L. Revel, William J. Hess y Rober W. Kiger. No. 149714 (MEXU).

2.6.2 Análisis estadístico de datos morfométricos

Los análisis estadísticos realizados fueron llevados a cabo en el programa R studio (Leps & Smilauer, 2020). Para poder explorar las variables obtenidas de *Asclepias jaliscana*, se consideró la falta de datos de las estructuras florales, debido a los diferentes estados del ciclo reproductivo de la especie en los ejemplares de herbario, teniendo datos completos de las estructuras foliares de 70 ejemplares, y una moderada cantidad de información sobre las inflorescencias (50 ejemplares) y muy poca de las estructuras florales (20 ejemplares). Para evitar sesgos se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con la información de las láminas de 70 ejemplares con tres pseudo réplicas de cada ejemplar (210 muestras) (Leps & Smilauer, 2020). Con los resultados del PCA se realizó un Clúster de Ward el cual tiene como función hacer agrupamientos de similitud de aspecto jerárquico utilizando distancias euclidianas (Orlóci, 1975; Ann *et al.*, 2019). Las agrupaciones producidas por el Clúster fueron utilizadas para realizar un análisis de varianza correspondientes para probar si dichos grupos presentan diferencias significativas (Orlóci, 1975).

Para probar la normalidad de los datos de las láminas se usó la prueba de Kolmogorov-Smirnov la cual es recomendada para bases de datos mayores a 60 muestras, los datos que no pasaron la prueba de normalidad fueron transformados a logaritmo (Hassouna, 2023). En el caso de las inflorescencias fueron datos que superaban las 60 observaciones, por lo que fue utilizada la prueba de Kolmogorov-Smirnov, solamente en el caso de las estructuras florales fue utilizada la prueba de Shapiro-Wilk. Todas las variables que presentaran normalidad en sus datos fueron

analizadas por ANOVA de una vía y *post hoc* de Tukey (ambas con $p \leq 0.05$), el resto que no cumplió con normalidad fueron analizadas por Kruskal Wallis y Dunn Test ($p \leq 0.05$) (Hassouna, 2023).

III Resultados

3.1 Resultados de datos moleculares

De las cuatro muestras obtenidas de ADN, se secuenciaron un total de 12 fragmentos amplificados por PCR (*trnC-rpoB*, *rpl16* y *rbcL*). Para *trnC-rpoB* el fragmento analizado con la herramienta BLAST presentó desde un 96 a un 97% de cover, con un porcentaje de similitud desde 99.72% hasta el 100%, siendo constante la aparición de *A. jaliscana* en las 10 primeras de la lista de resultados de BLAST. Las regiones con similitud de las muestras son del genoma del cloroplasto de algunas *Asclepias* spp. (no se especifica región) y de la región intergénica *trnC-rpoB*. Para *rpl16* mostró cover muy variados, al igual que sus porcentajes de similitud, presentaron variación de 17 hasta 72%; en cuanto a los porcentajes de similitud fue del 93.80-99.31 %, el resultado en BLAST, no destacó *A. jaliscana*, pero sí otras especies del género *Asclepias* y géneros dentro de la subfamilia Asclepiadaceae. Las regiones destacadas fueron genoma parcial de cloroplasto (no se especifica ubicación) y el intrón *rpl16* (Tabla 3). En el caso de *rbcL* el análisis por BLAST dio como resultado un cover del 92 al 97%, un porcentaje de similitud del 99.16 al 99.72% con especies del género *Asclepias* y géneros cercanos (Tabla 5).

En el análisis filogenético, se observan valores estadísticos de probabilidad con valor de 0.90 al 1, lo que puede interpretarse que la relaciones filogenéticas formadas tienen un soporte confiable, formando ramas específicas para ciertos taxones como el caso de *A. coulteri*, *A. leptopus*, *A. criptoceras*, sin embargo, a pesar de que las ramas están sustentadas con valores altos de probabilidad *A. tuberosa* y *A. subulata* tienden a no establecer clados únicos para su taxón, por lo

que a pesar de estar bien soportadas las ramas no se resuelven como grupos monofiléticos (Fig.16). En particular el clado donde se encuentra *A. jaliscana* (MG678816) esta soportada por un valor de 0.7734, considerando a *A. ovata* como una especie con un mismo ancestro común (Fig. 18). EMEX-O y GRO-EN están sustentadas por ramas finales de 1, la rama previa al nodo con un valor de 0.9884, lo que sugiere que está bien soportada su relación filogenética, caso similar pasa con TLAX-I. No obstante, el clado “A” y la muestra TLAX-S tienen un bajo soporte en el nodo con un valor de 0.5373, lo que puede indicar que tiene un bajo nivel de divergencia (Fig. 17).



Figura 15. Recolección de material biológico de *A. jaliscana*, en Tlaxcala, México. A) Ambiente de población de Ixtacuixtla, B) Ambiente de población de Sanctorem, C) Extracción de la raíz de *A. jaliscana* (Otumba), D y C) observación de nervadura (Sanctorum), F) Forma de lámina ovada y tallo erecto (Ixtacuixtla), G) Forma angostamente ovada de la hoja y tallo decumbente (Ixtacuixtla), H) Flores (Ixtacuixtla), I) Deceso de la planta (Ixtacuixtla), J) Infección por artrópodos (Ixtacuixtla), K) Planta sin producción de semillas (Ixtacuixtla).

Tabla 4. Resultados de BLAST de las muestras recolectadas en campo de *Asclepias jaliscana*.

Recolectada como:	Estado	Municipio	Nombre del marcador	MAX SCORE	TOTAL SCORE	QUERY COVER	PER. IDENT	REGIÓN ASIGANDA
<i>A. jaliscana</i>	TLAXCALA	IXTACUIXTLA	<i>rpl16</i>	856-861	1252	72%	96.52-96.71%	Cloroplastos de <i>Asclepias</i> y <i>rpl16</i> .
<i>A. jaliscana</i>	TLAXCALA	SANCTORUM	<i>rpl16</i>	1203-1208	1203-1208	52-53%	96.45-97.08%	Cloroplastos de <i>Asclepias</i> y <i>rpl16</i> .
<i>A. jaliscana</i>	MÉXICO	OTUMBA	<i>rpl16</i>	257-263	257-263	17%	98.62-99.31%	Cloroplastos de <i>Asclepias</i> y <i>rpl16</i> .
<i>A. jaliscana</i>	GUERRERO	EDUARDO NERI	<i>rpl16</i>	411-412	411-412	31%	93.80-93.82%	Cloroplastos de <i>Asclepias</i> y <i>rpl16</i> .
<i>A. jaliscana</i>	TLAXCALA	IXTACUIXTLA	<i>trnC-rpoB</i>	1297	1297	97%	99.86%	Cloroplastos de <i>Asclepias</i> y <i>trnC-rpoB</i> .
<i>A. jaliscana</i>	TLAXCALA	SANCTORUM	<i>trnC-rpoB</i>	1295	1295	96%	99.72%	Cloroplastos de <i>Asclepias</i> y <i>trnC-rpoB</i> .
<i>A. jaliscana</i>	MÉXICO	OTUMBA	<i>trnC-rpoB</i>	1299	1299	96%	100%	Cloroplastos de <i>Asclepias</i> y <i>trnC-rpoB</i> .
<i>A. jaliscana</i>	GUERRERO	EDUARDO NERI	<i>trnC-rpoB</i>	1303	1303	97%	100%	Cloroplastos de <i>Asclepias</i> y <i>trnC-rpoB</i> .
<i>A. jaliscana</i>	TLAXCALA	IXTACUIXTLA	<i>rbcL</i>	643	643	97%	99.16%	Cloroplastos de <i>Asclepias</i> y <i>rbcL</i> .
<i>A. jaliscana</i>	TLAXCALA	SANCTORUM	<i>rbcL</i>	651	651	97%	99.72%	Cloroplastos de <i>Asclepias</i> y <i>rbcL</i> .
<i>A. jaliscana</i>	MÉXICO	OTUMBA	<i>rbcL</i>	630	630	94%	99.42%	Cloroplastos de <i>Asclepias</i> y <i>rbcL</i> .
<i>A. jaliscana</i>	GUERRERO	EDUARDO NERI	<i>rbcL</i>	647	647	96%	99.16%	Cloroplastos de <i>Asclepias</i> y <i>rbcL</i> .



Figura 16. Árbol filogenético del género *Asclepias*: Grupo externo (morado), especie identificada como *A. jaliscana* (azul claro), muestras de este estudio (verde) y especies con más de una representación (amarillo).

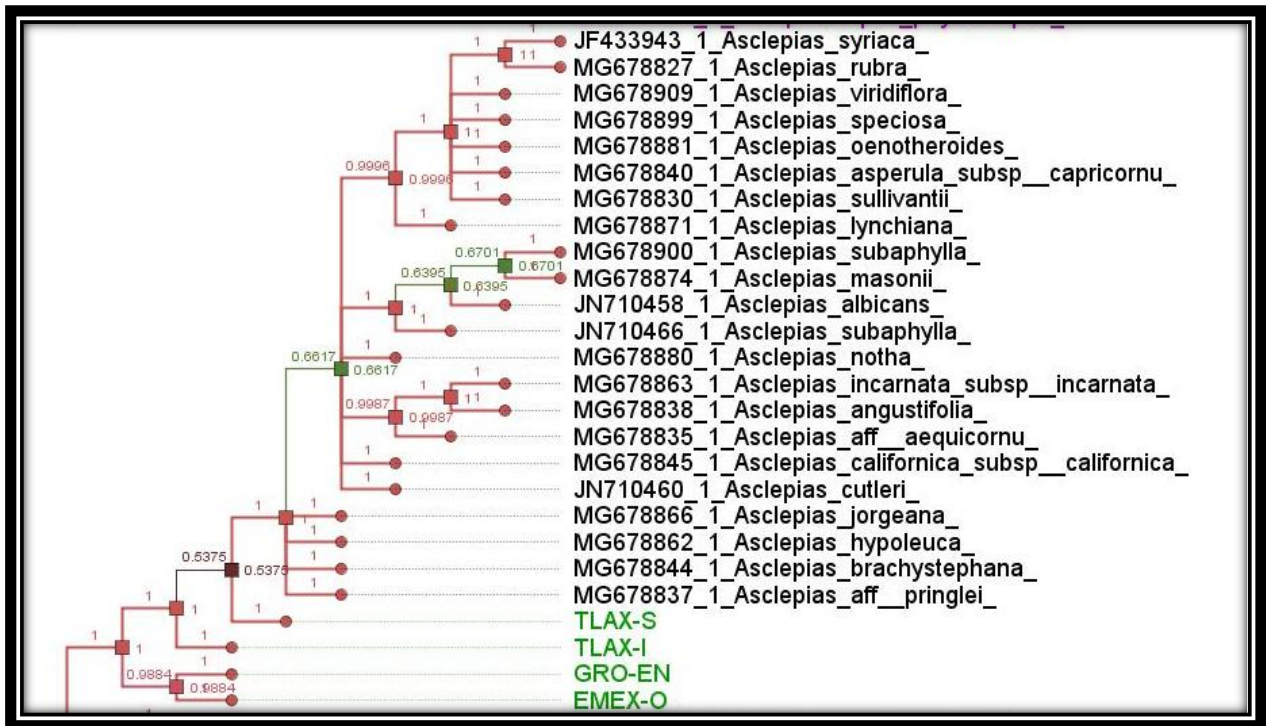


Figura 17. Árbol filogenético del género *Asclepias* que muestra el clado A: muestras utilizadas en este estudio (verde): TLAX-S (Tlaxcala-Sanctorum), TLAX-I (Tlaxcala-Ixtacuixtla), GRO-EN (Guerrero-Eduardo Neri) y EMEX-O (E. México-Otumban).

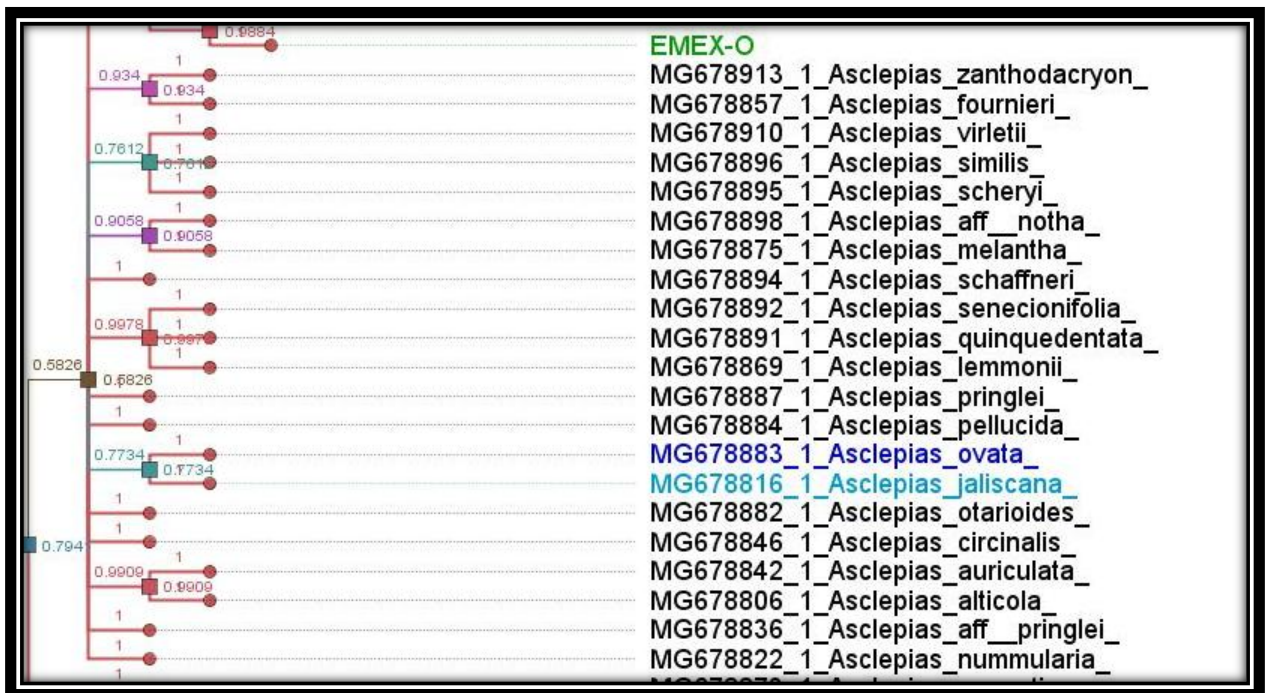


Figura 18. Árbol filogenético: posición de la muestra MG678816 *Asclepias jaliscana* utilizada en el trabajo de Fishbein *et al.*, (2017).

3.2 Resultados de datos morfométricos

El análisis de PCA muestra un valor 84.5% resultado del primer componente principal (CP1) del 63.8% y segundo (CP2) del 20.7%, siendo que LP es la variable que menos contribuye a la variabilidad de los datos de la estructura de la lámina, mientras que LIH, LIZH, LDH y AINH, tienen una alta contribución con respecto a CP1, y para CP2 AAA, ASH y AIFH (Fig. 19). El análisis de Clúster de Ward formó cuatro grupos: clúster color rojo (A), magenta (B), azul (C) y verde (D) (Fig. 20). Los grupos formados se caracterizan de la siguiente forma, el A, se presenta principalmente del Sur y Poniente de México en los estados de: Oaxaca, Guerrero, México, Morelos, Jalisco, Aguascalientes (Fig. 21). Caracterizándose de láminas foliares de un aparente mayor tamaño, con aspecto ovado. En el caso de B, se presenta principalmente en el Poniente y Norponiente de México en los estados: Jalisco, Nayarit y Sinaloa (Fig. 21). Caracterizado por poseer láminas foliares oblongas. Mientras que C, tiene una amplia distribución del norte México hasta Guatemala, mostrando fenotipos que van de láminas lanceoladas a angostamente ovadas, teniendo presencia en los estados: Sonora, Durango, Chihuahua, Sinaloa, Puebla, San Luis Potosí, Oaxaca, Veracruz, Estado de México, Tlaxcala, Chiapas y Guatemala (Fig. 21). En cuanto D, al igual que C, tiene una morfología foliar que va de angostamente ovada a lanceolada. Con una distribución que va de Sonora, Chihuahua, Durango, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Puebla. Ciudad de México, Veracruz y Chiapas (Fig. 21). Así mismo, no se observa un patrón de distribución geográfica para C, D y A. Sin embargo, se ve una concentración en el

occidente de B entre los estados de Jalisco, Nayarit, y Sinaloa, pero su distribución es compartida por el resto de los clústeres (Fig. 22).

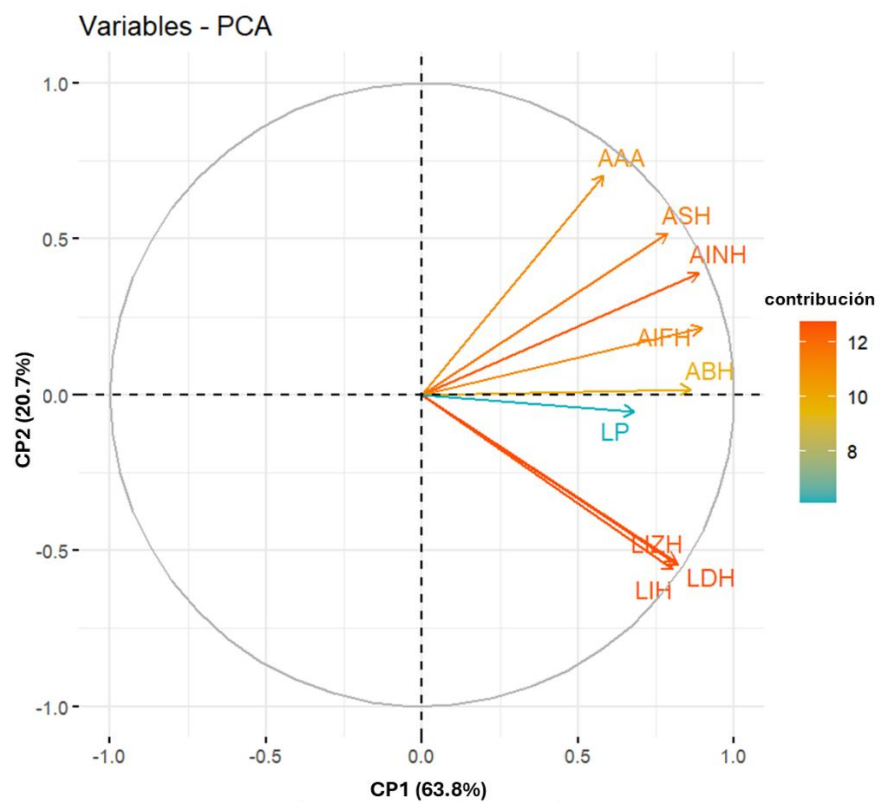


Figura 19. Grafica de PCA de las variables de la lámina de *A. jaliscana*: Se muestra la correlación de variables del componente principal 1 (CP1) y componente principal 2 (CP2).

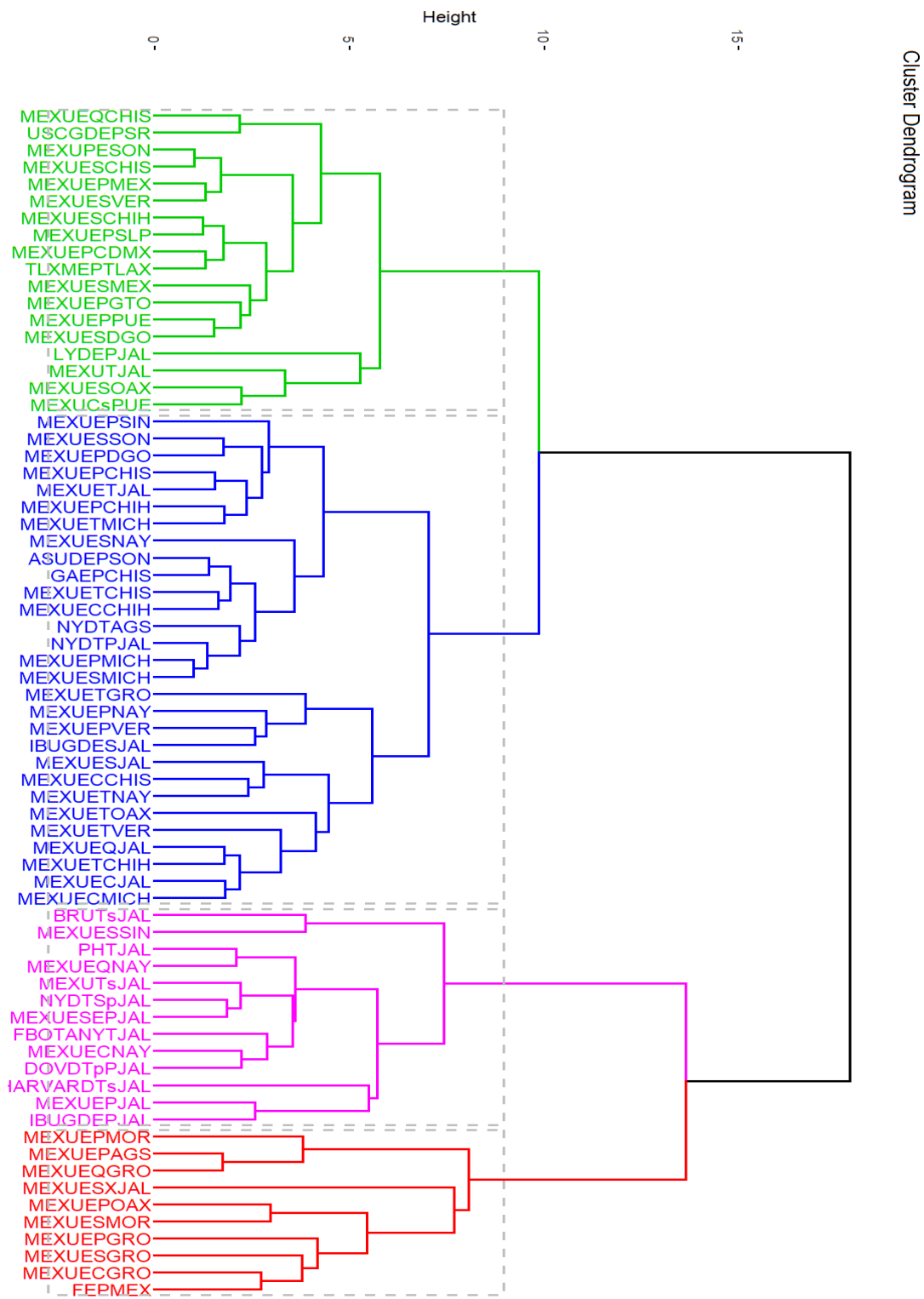


Figura 20. Clúster por el método de Ward; se observan cuatro clústeres basados en la morfometría de las hojas de *A. jaliscana*.

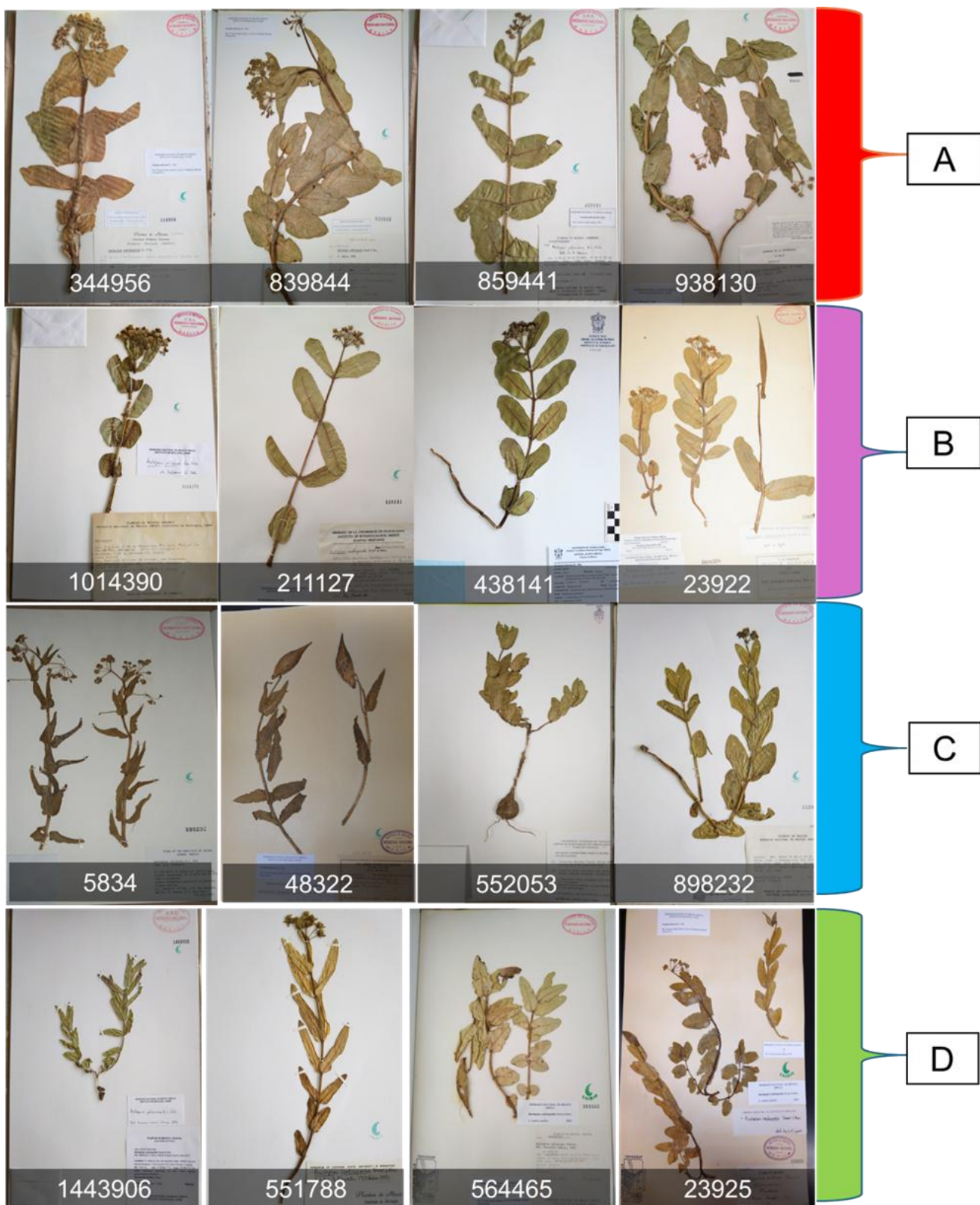


Figura 21. Morfología de láminas foliares por clúster de *A. jaliscana*.

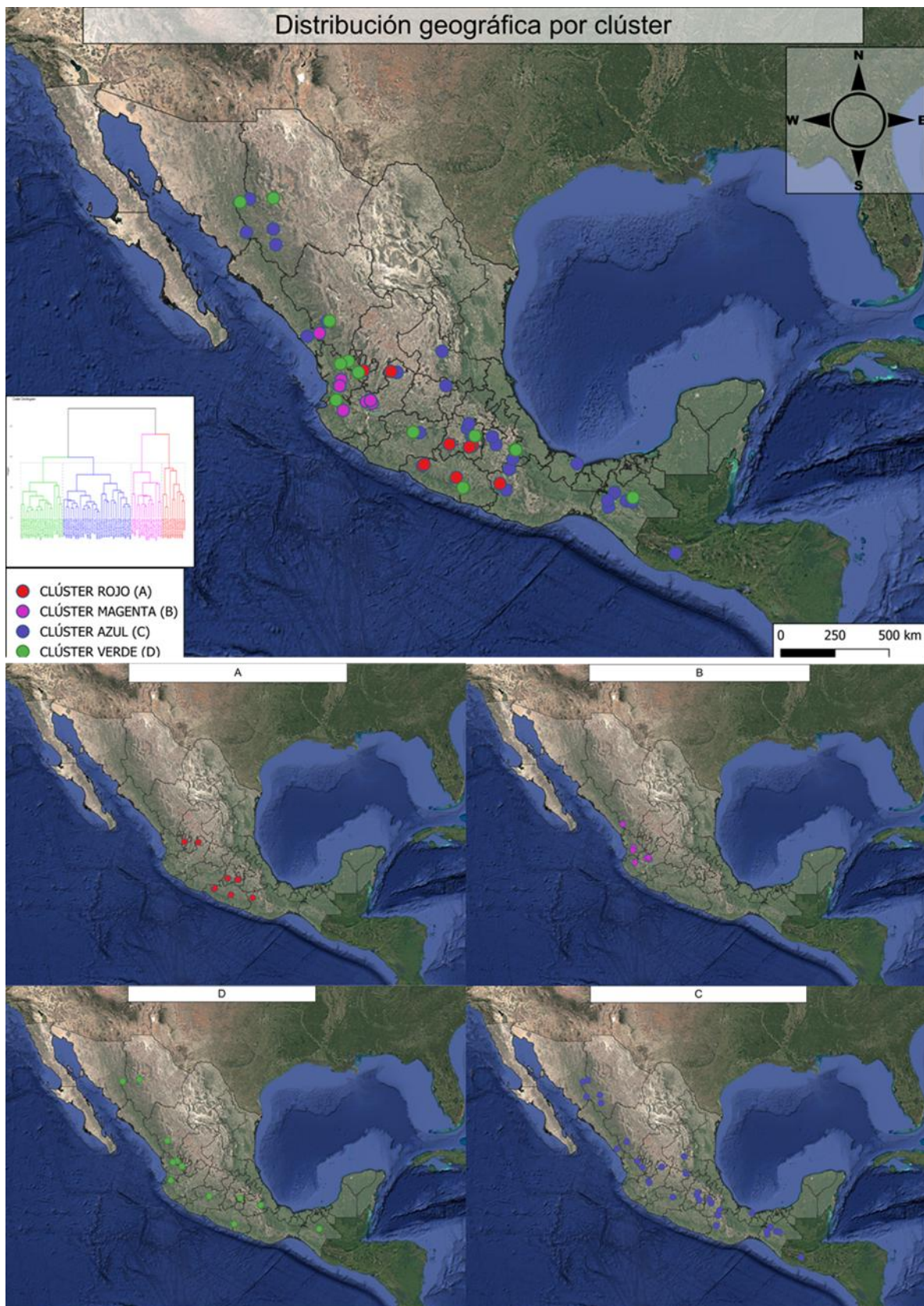


Figura 22. Distribución geográfica por clúster de *A. jaliscana*.

El análisis de varianza por ANOVA presento en las variables de la lámina foliar diferencias significativas, estos datos se resumen en la Tabla 5. Los resultados del análisis post hoc Tukey de las láminas foliares se muestran en la Tabla 6 y 7.

Las variables LIH, LIZH y LDH (largo de hojas) presentaron diferencias significativas en los grupos A y D con respecto a todas las combinaciones (Tabla 7); por lo que se puede decir que las diferencias de tamaño de ambos grupos son marcas por la longitud de la lámina, caracterizándose A por tener medidas de láminas con un aproximado 88.55 mm y en D 64.56 mm. Mientras que C y B no presentan diferencias significativas (Tabla 6), y son las más pequeñas con respecto a su longitud, con un tamaño aproximadamente 50.22 mm y 55.52 mm respectivamente.

Los valores mostrados de los anchos intermedios de la lámina (AINH) muestran diferencias significativas (Tabla 7) en los grupos A y B con respecto a D y C, pero las comparaciones A-B y D-C no muestran estas diferencias (Tabla 6). El primero caracterizándose con medidas de 32.07 mm (A) y 30.90 mm (B), y la segunda de 21.42 mm (D) y 16.88 mm (C).

En cuanto los valores de los anchos superior de las láminas (AAA y ASH) los grupos comparados D-C no muestran diferencias significativas para ambas variables (Tabla 6), siendo grupos similares en n AAA con una media de 6.10 mm (D) y 4.91 mm (C), y ASH de 14.90 mm (D) y 11.48 mm (C). En cuanto a las comparaciones de A y B muestran diferencias significativas de forma homogénea con el resto de los grupos,

siendo las más anchas B con una medida de 19.14 mm (AAA) y 25.99 mm (ASH), seguido de A con un valor de 9.04 mm (AAA) y 21.48 mm (ASH).

Para la variable AIFH perteneciente a los anchos inferiores de la hoja, muestra diferencias significativas de forma homogénea todos los grupos (Tabla 7), siendo el AIFH más amplio de 33.63 mm (A), seguido de 27.29 mm (B), 21.42 mm (D) y 16.54 mm (C). En cuanto a la variable ABH no muestra diferencias significativas en la comparación B-D (Tabla 6), teniendo un ancho de 18.96 mm (B) y 11.48 mm (D), en el resto hay diferencias en cuanto al tamaño de la base laminar, con un tamaño aproximado de 28.92 mm en A, en cuanto a C presenta la base más corta de con un valor de 11.48 mm (Tabla 7).

En cuanto al largo del peciolo (LP), A es totalmente distinto al resto de los grupos (Tabla 7) con un largo aproximado de 4.95 mm, C de igual forma presenta diferencias significativas con el resto de los grupos, caracterizándose por presentar un valor de 2.72 mm (Tabla 7). Sin presentar diferencias significativas en la combinación B-D (Tabla 6) teniendo un peciolo con un valor de 3.50 mm (B), 3.49 mm (D).

Tabla 5. Resumen de resultados de ANOVA, datos morfométricos de láminas de *A. jaliscana*: LIH (largo intermedio), LIZH (largo izquierdo), LDH (largo derecho), AINH (ancho intermedio), AAA (ancho de la apertura del ápice), ABH (ancho de la base), ASH (ancho superior con respecto al 25% con respecto a LIH), AIFH (ancho inferior con respecto al 25% con respecto a LIH) y LP (largo del peciolo). Nota: Significación estadística: ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05.

Variable	Grados de libertad entre grupo	Suma de cuadrados (Sum Sq)	Media cuadrática (Mean Sq)	F	p-valor (Pr(>F))
LIH	3	4.177	1.3925	67.85	<0.001***
LIZH	3	5.102	1.7007	73.02	<0.001***
LDH	3	5.431	1.8103	77.02	<0.001***
AINH	3	2.877	0.9590	36.10	<0.001***
AAA	3	4.765	1.5883	70.86	<0.001***
ABH	3	3.641	1.2137	54.14	<0.001***
ASH	3	2.392	0.7973	35.59	<0.001***
AIFH	3	6.902	2.301	33.848	<0.001***
LP	3	4.268	1.423	19.563	<0.001***

Tabla 6. Prueba post hoc Tukey, datos de variables de láminas de *A. jaliscana* sin diferencias significativas: A (clúster rojo), B (clúster magenta), C (clúster azul) y D (clúster verde). LIH (largo intermedio), LIZH (largo izquierdo), LDH (largo derecho), AINH (ancho intermedio), AAA (ancho de la apertura del ápice), ABH (ancho de la base), ASH (ancho superior con respecto al 25% con respecto a LIH), y LP (largo del peciolo).

Comparación de Grupos	Diferencia de Medias	Límite Inferior	Límite Superior	Valor p Ajustado	Variable Analizada
B-C	0.0933622	-0.014848	0.2015721	0.115749	LIH
B-C	0.0927737	-0.013433	0.1989808	0.1088801	LIZH
B-C	0.0985627	-0.006821	0.203946	0.0754274	LDH
D-C	4.5429167	-0.000147	9.0859804	0.0500106	AINH
A-B	1.1691667	-3.373897	5.7122304	0.9068971	AINH
D-C	0.2175726	-0.034422	0.4695676	0.1153475	AAA
D-B	-0.139779	-0.330263	0.0507043	0.2268274	ABH
D-C	3.6229167	-0.295031	7.540864	0.0804656	ASH
D-B	0.0400205	-0.163676	0.2437173	0.9555333	LP

Tabla 7. Prueba de post hoc Tukey, resumen de comparación de grupos con diferencias significativas de los grupos de clúster de *A. jaliscana*: A (clúster rojo), B (clúster magenta), C (clúster azul) y D (clúster verde). Variables: LIH (largo intermedio), LIZH (largo izquierdo), LDH (largo derecho), AINH (ancho intermedio), AAA (ancho de la apertura del ápice), ABH (ancho de la base), ASH (ancho superior con respecto al 25% con respecto a LIH), AIFH (ancho inferior con respecto al 25% con respecto a LIH) y LP (largo del peciolo).

Comparación de Grupos	Diferencia de Medias	Límite Inferior	Límite Superior	Valor <i>p</i> Ajustado	Variable Analizada
A-C	0.549647	0.441437	0.6578569	4.823E-10	LIH
D-C	0.2518169	0.1436069	0.3600268	1.552E-07	LIH
A-B	0.4562848	0.3480748	0.5644947	4.823E-10	LIH
D-B	0.1584547	0.0502447	0.2666646	0.0013099	LIH
D-A	-0.29783	-0.40604	-0.18962	1.433E-09	LIH
A-C	0.5601503	0.4539432	0.6663575	4.823E-10	LIZH
D-C	0.2332954	0.1270883	0.3395026	6.94E-07	LIZH
A-B	0.4673766	0.3611695	0.5735838	4.823E-10	LIZH
D-B	0.1405218	0.0343146	0.2467289	0.0044571	LIZH
D-A	-0.326855	-0.433062	-0.220648	4.991E-10	LIZH
A-C	0.5722308	0.4668474	0.6776141	4.823E-10	LDH
D-C	0.2402599	0.1348766	0.3456433	2.679E-07	LDH
A-B	0.4736681	0.3682847	0.5790515	4.823E-10	LDH
D-B	0.1416973	0.0363139	0.2470807	0.0037215	LDH
D-A	-0.331971	-0.437354	-0.226587	4.891E-10	LDH
B-C	14.025833	9.4827696	18.568897	4.972E-10	AINH
A-C	15.195	10.651936	19.738064	4.829E-10	AINH
D-B	-9.482917	-14.02598	-4.939853	2.366E-06	AINH
D-A	-10.65208	-15.19515	-6.10902	1.266E-07	AINH
B-C	1.3081858	1.0561908	1.5601808	4.823E-10	AAA
A-C	0.5721978	0.3202028	0.8241928	2.978E-07	AAA
A-B	-0.735988	-0.987983	-0.483993	6.013E-10	AAA
D-B	-1.090613	-1.342608	-0.838618	4.823E-10	AAA
D-A	-0.354625	-0.60662	-0.10263	0.0021721	AAA
B-C	0.4967675	0.3062838	0.6872512	6.002E-09	ABH
A-C	0.916088	0.7256043	1.1065717	4.823E-10	ABH
D-C	0.3569881	0.1665045	0.5474718	2.371E-05	ABH
A-B	0.4193205	0.2288369	0.6098042	6.577E-07	ABH
D-A	-0.5591	-0.749584	-0.368616	5.816E-10	ABH
B-C	14.095417	10.177469	18.013364	4.824E-10	ASH
A-C	9.9920833	6.074136	13.910031	1.153E-08	ASH
A-B	-4.103333	-8.021281	-0.185386	0.0364147	ASH
D-B	-10.4725	-14.39045	-6.554553	2.99E-09	ASH
D-A	-6.369167	-10.28711	-2.451219	0.000291	ASH
B-C	0.4926729	0.2957428	0.689603	2.024E-08	AIFH
A-C	0.7191029	0.5221728	0.916033	4.824E-10	AIFH

D-C	0.2523922	0.0554621	0.4493223	0.0062711	AIFH
A-B	0.22643	0.0294999	0.4233601	0.0175127	AIFH
D-B	-0.240281	-0.437211	-0.043351	0.0102418	AIFH
D-A	-0.466711	-0.663641	-0.269781	9.438E-08	AIFH
B-C	0.2462451	0.0425483	0.4499419	0.0111795	LP
A-C	0.5934722	0.3897755	0.797169	6.123E-10	LP
D-C	0.2862656	0.0825689	0.4899624	0.0022088	LP
A-B	0.3472271	0.1435304	0.5509239	0.0001342	LP
D-A	-0.307207	-0.510903	-0.10351	0.0008797	LP

El análisis de ANOVA de las variables de las estructuras florales presento diferencias significativas en LCHF, CF y LSPF y no significativa en la variable LF, dichos valores se visualizan en la Tabla 8.

La prueba de post hoc Tukey en la variable LF, no hay ninguna diferencia significativa (Tabla 9). Teniendo tamaños similares en esta estructura (A (3.03 mm), B (3.28 mm), C (2.77 mm) y D (3.24 mm)).

En el caso de B, muestras variables con diferencias significativas de forma homogénea, teniendo las estructuras florales más largas (4.80 mm (LCHF), 1.53 mm (CF), y 8.43 mm (LSPF)), y diferentes al resto de los grupos (Tabla 10).

Particularmente en la variable LCHF los grupos A (3.16 mm), C (2.85 mm) y D (3.49 mm) no muestran diferencias significativas (Tabla 9). En CF igual los grupos A (1.08 mm), C (1.04 mm) y D (0.93 mm) no presentan diferencias significativas.

En LSPF al igual que B, A presenta diferencias significativas con respecto de los grupos, teniendo un tamaño de 6.38 mm. Sin embargo, D-C no presentan diferencias significativas teniendo las medidas de sépalos más pequeñas de 4.10 mm (D) y 4.92 mm (C).

Para las variables no normales, la prueba de Kruskal-Wallis y Dunn Test la variable LCRF no presento diferencias significativas (Tabla 11), en el caso de LPTF el grupo D presentaron diferencias significativas de forma homogénea con el resto de los grupos (Tabla 11).

Tabla 8. Resultados de análisis de ANOVA de las variables de las estructuras florales: LCHF (largo del capuchón), CF (columna de flor), LF (largo de flor) y LSPF (largo del sépalo).

Variables	Grados de libertad entre grupo	Suma de cuadrados (Sum Sq)	Media cuadrática (Mean Sq)	F	p-value (Pr(>F))
LCHF	3	18.186	6.062	13.748	<0.001***
CF	3	1.48	0.493	4.995	0.006
LF	3	1.141	0.38	2.365	0.089
LSPF	3	93.315	31.105	53.947	<0.001***

Tabla 9. Resumen de datos no significativos de post hoc TUKEY de estructuras florales *A. jalisco*: A (clúster rojo), B (clúster magenta), C (clúster azul) y D (clúster verde). Variables: LCHF (capuchón), CF (largo de columna), LF (largo de flor).

Comparación de Grupos	Diferencia de Medias	Límite Inferior	Límite Superior	Valor p Ajustado	Variable Analizada
A-C	0.2633333	-0.584782	1.1114483	0.8344113	LCHF
D-C	0.4766667	-0.371448	1.3247816	0.4362023	LCHF
D-A	0.2133333	-0.634782	1.0614483	0.9033601	LCHF
A-C	0.0755556	-0.325862	0.4769732	0.9561208	CF
D-C	0.0255556	-0.375862	0.4269732	0.9981368	CF
D-A	-0.05	-0.451418	0.3514176	0.9865152	CF
B-C	0.4377778	-0.074337	0.9498924	0.1155142	LF
A-C	0.1844444	-0.32767	0.6965591	0.7640461	LF
D-C	0.4077778	-0.104337	0.9198924	0.1571587	LF
A-B	-0.253333	-0.765448	0.2587813	0.5448957	LF
D-B	-0.03	-0.542115	0.4821146	0.9985457	LF
D-A	0.2233333	-0.288781	0.735448	0.6426299	LF
D-C	-0.931111	-1.900938	0.0387156	0.0635652	LSPF

Tabla 10. Prueba de post hoc Tukey, resumen de comparación de grupos con diferencias significativas de los grupos de clúster de *A. jaliscana*: A (clúster rojo), B (clúster magenta), C (clúster azul) y D (clúster verde). Variables: LCHF (capuchón), CF (largo de columna), LF (largo de flor).

Comparación de Grupos	Diferencia de Medias	Límite Inferior	Límite Superior	Valor p Ajustado	Variable Analizada
B-C	1.8411111	0.99299617	2.68922605	8.8302E-06	LCHF
A-B	-1.5777778	-2.4258927	-0.7296628	0.00010014	LCHF
D-B	-1.3644444	-2.2125594	-0.5163295	0.00069868	LCHF
B-C	0.4977778	0.09636013	0.89919542	0.0103964	CF
A-B	-0.4222222	-0.8236399	-0.0208046	0.03624934	CF
D-B	-0.4722222	-0.8736399	-0.0708046	0.01606572	CF
B-C	3.3633333	2.39350667	4.33316	6.0236E-10	LSPF
A-C	1.2744444	0.30461778	2.24427111	0.00618019	LSPF
A-B	-2.0888889	-3.0587156	-1.1190622	1.0081E-05	LSPF
D-B	-4.2944444	-5.2642711	-3.3246178	1.4192E-12	LSPF
D-A	-2.2055556	-3.1753822	-1.2357289	3.9447E-06	LSPF

Tabla 11. Resumen de análisis de Kruskal-Wallis y Dunn Test de estructuras florales: largo del pétalo (LPTF) y largo del cuerno (LCRF). Grupos: A (clúster rojo), B (clúster magenta), C (clúster azul) y D (clúster verde). LPTF: chi-cuadrado = 24.257, $p = 2.21 \times 10^{-5}$; LCRF: chi-cuadrado = 1.815, $p = 0.6117$.

Comparación de grupos	Diferencia crítica	Diferencia significativa	Variable
C-B	1.27	No	LPTF
C-A	0.83	No	LPTF
C-D	3.49	Sí	LPTF
B-A	2.1	No	LPTF
B-D	4.75	Sí	LPTF
A-D	2.66	Sí	LPTF
C-B	0.36	No	LCRF
C-A	1.07	No	LCRF
C-D	1.12	No	LCRF
B-A	0.72	No	LCRF
B-D	0.76	No	LCRF
A-D	0.04	No	LCRF

Los datos de la variable LPDI de la inflorescencia presento en ANOVA diferencias significativas, el resumen de los datos se observa en la Tabla 12. No obstante, la prueba de post hoc Tukey con respecto a esta variable no es homogénea, presentando diferencias significativas (Tabla 14) solo en B (15,91 mm) con respecto

a los grupos C (12.51 mm) y D (12.92 mm), y no muestra diferencia significativa (Tabla 13) con A (14.32 mm). En cuanto de LPI en la prueba de Kruskal-Wallis y Dunn Test solo D es diferente a los grupos C y B (Tabla 15).

Tabla 12. Prueba de ANOVA de la variable del largo del pedicelo (LPDI).

Variables	Grados de libertad entre grupo	Suma de cuadrados (Sum Sq)	Media cuadrática (Mean-Sq)	F	p-valor (Pr(>F))
LPDI	3	182.972	60.091	5.352	0.002

Tabla 13. Resumen de análisis de post hoc Tukey de la variable de inflorescencia LPDI (largo de pedicelos) de *A. jaliscana* sin diferencias significativas: A (clúster rojo), B (clúster magenta), C (clúster azul) y D (clúster verde).

Comparación de Grupos	Diferencia de Medias	Límite Inferior	Límite Superior	Valor p Ajustado	Variable Analizada
A-C	1.6971429	-1.036418	4.4307038	0.3683684	LPDI
D-C	0.2090476	-2.524513	2.9426086	0.9971165	LPDI
A-B	-1.993333	-4.726894	0.7402276	0.2307031	LPDI
D-A	-1.488095	-4.221656	1.2454657	0.4855969	LPDI

Tabla 14. Resumen de análisis de post hoc Tukey de la variable de inflorescencia LPDI (largo de pedicelos) de *A. jaliscana* con diferencias significativas: A (clúster rojo), B (clúster magenta), C (clúster azul) y D (clúster verde).

Comparación de Grupos	Diferencia de Medias	Límite Inferior	Límite Superior	Valor p Ajustado	Variable Analizada
B-C	3.6904762	0.9569152	6.4240372	0.0036476	LPDI
D-B	-3.481429	-6.21499	-0.747868	0.0068162	LPDI

Tabla 15. Resumen de análisis de Kruskal-Wallis y Dunn Test de la variable de la inflorescencia LPI: Estadístico chi-cuadrado = 11.615, p = 0.0088. A (clúster rojo), B (clúster magenta), C (clúster azul) y D (clúster verde).

Comparación de grupos	Diferencia crítica	Diferencia significativa
C-B	19.86	No
C-A	19.86	No
C-D	19.86	Sí
B-A	19.86	No
B-D	19.86	Sí
A-D	19.86	No

IV Discusión

4.1 Datos moleculares

En el presente trabajo la variación genética sugiere la existencia de cambios puntuales, mutaciones como inserción y delección, que van incluso a la desaparición completa de la región *rp/16*, similar como se reporta en Poaceae y Cactaceae (Kelchner & Clark, 1997; Butterworth *et al.*, 2002; Butterworth *et al.*, 2007). Un factor que puede determinar dichas mutaciones es la endogamia en plantas que consiste en entrecruzamiento entre individuos de una especie que están estrechamente relacionados, este fenómeno puede provocar la homocigosis, esto ocurre principalmente en plantas que poseen procesos de autofecundación y clonación (Meloni *et al.*, 2013; Achrem *et al.*, 2023). Particularmente el género *Asclepias* suele tener algunas especies que presentan autogamia y clonalidad (Howard & Barrows, 2014; Sun-Kin *et al.*, 2015). La muestra de Guerrero proviene de material utilizado por Gutiérrez *et al.*, (2014), en este trabajo de aloenzimas (isoenzimas), determinaron, en comparación con otras poblaciones de *A. jaliscana*, que la población de Guerrero presentaba homocigosis (Gutiérrez *et al.*, 2014). Así mismo, hay que recordar que los fenómenos de endogamia en plantas pueden reducir la diversidad genética, y la heterocigosis de éstas (Achrem *et al.*, 2023). Sin embargo, muchas de éstas terminan en regiones no codificantes y pueden incluso alterar la expresión genética y por ende cambios metabólicos y fenotípicos (Charlesworth & Willis, 2009; Achrem *et al.*, 2023). Estas alteraciones en el intrón *rp/16* es un posible indicador de endogamia, siendo una dificultad para poder establecer grupos monofiléticos en el análisis filogenético.

4.2 Datos morfométricos

Los análisis estadísticos sugieren la existencia de diferencias significativas morfológicas dentro de los ejemplares descritos como *Asclepias jaliscana*.

En las estructuras foliar, a través de las agrupaciones formadas por el Clúster de Ward se aprecian limbos con características distintas (Figura 21), los análisis de ANOVA-Tukey con respecto a las variables y agrupaciones, presentan diferencias significativas (Tabla 5, 6, y 7) Destacando la agrupación A que presenta la mayor homogeneidad en las diferencias significativas con respecto a la prueba post hoc Tukey, seguido de D y finalmente B y C. Las variaciones del limbo foliar pueden indicar distintos fenómenos dependiendo del taxón. Si bien hay evidencia dentro de la botánica, de que se pueden delimitar especies por un carácter vegetativo, no es recomendable para todos los grupos taxonómicos, y menos si se trata de especies con una amplia distribución geográfica, debido a que las hojas suelen estar sujetas a cambios en la altitud, microclimas, e incluso recepción de la luz solar (Mitchell *et al.*, 1999), este último, suele estar estrechamente relacionado a cuestiones fisiológicas de cómo absorben, interceptan y reflejan las diferentes ondas de la luz (Ellsworth & Reich, 1993), por lo cual, es difícil determinar a la estructura foliar como un carácter diagnóstico a nivel taxonómico, en el caso del género *Asclepias* las variaciones en hojas no son un carácter para diferenciar especies, como sí lo son las estructuras florales (Chávez-Hernández *et al*, 2023; Alvarado-Cárdenas e Islas-Hernández, 2024).

Limitando su interpretación de los datos a morfotipos en los ejemplares de *A. jaliscana*, esto se respalda, debido a que el uso del Clúster de Ward y métodos

similares de clúster por jerarquía a través de análisis de varianza, son usados frecuentemente para determinar estas agrupaciones en láminas foliares, como el caso del trabajo de Salvaña *et al.*, (2019) que se enfocan en la especie *Vitex negundo* y han establecido morfotipos basados en el uso de datos cualitativos, utilizando 10 individuos de diferentes germoplasmas. También se ha visto el uso de Clúster de Ward para diferenciar rasgos foliares entre híbridos del género *Quercus* (Gailing *et al.*, 2012), en el aspecto taxonómico se ha utilizado para explorar el complejo de *Salix retusa* (Saliceae) estableciendo 14 características morfológicas en este grupo (Kosiński *et al.*, 2017), o fomentar la conservación de germoplasmas de plantas medicinales y con importancia ecológica, como el caso de *Elaeagnus angustifolia* (Elaeagnaceae) en el cual se han visto diferencias morfológicas en laminas foliares y frutos, mostrando la diversidad morfológica en esta especie (Khadivi, 2018).

Por lo que la información recogida hasta el momento sugiere que al menos dentro de las hojas de *A. jaliscana* hay morfotipos bien diferenciados. Así mismo, descartamos un posible patrón foliar como lo menciona Cervantes, (2018) que reporta la existencia de un cambio gradual con respecto a las láminas lanceoladas y ovadas. Teniendo como posible patrón de distribución el grupo B, que tiene una concentración en el poniente de México (Figura 22).

En cuanto a las estructuras florales a pesar de ser una muestra reducida se ha observado diferencias significativas (Tabla 8 y 9), que pueden indicar que la agrupación B es otro taxón distinto al resto de A, C, y D. Dado que la columna floral (CF), el largo del capuchón (LCHF), y el largo de sépalos (LSPF) presentan un

mayor tamaño a diferencia del resto de los grupos. Debido que una forma de diferenciar especies dentro del género son las estructuras de las flores, como el caso de los trabajos de Chávez-Hernández *et al.*, (2023), en donde describieron dos nuevas especies en México, *A. sauronii* y *A. graogramanii*, la primera con una distribución geográfica dentro de los estados de Nuevo León y Coahuila, que tenían un fenotipo similar a la hoja de *A. otarioides*, pero que presentaban una corola de color distinto con formas de cuernos digitados y curvos. El segundo es *A. graogramanii*, con similitudes morfológicas a *A. glaucescens*, pero distribuida en los Estados de Jalisco y Nayarit, pero diferente en el color de flores y la posición del ginostegio y capuchones cilíndricos oblongos. Otro ejemplo reciente de una nueva especie para este género es *A. gordaensis*, la cual es morfológicamente similar a *A. pringlei* en caracteres vegetativas, pero con una diferencia en el tamaño de la flor y con cambios en la forma del capuchón y cuernos (Alvarado-Cárdenas y Islas-Hernández, 2024).

En las inflorescencias no hubo diferencias significativas en el LPI pero si en la estructura LPDI principalmente en CM y CR siendo las más largas con respecto a CV y CA, de acuerdo con Willson & Preece, (1976), los diferentes tamaños de las inflorescencias pueden variar dentro de especies de *Asclepias*, estando asociadas a las inflorescencias de mayor tamaño a la formación de frutos más pequeños, así como una presencia más constante de polinizadores. En el caso de *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus*, los diferentes tamaños y formas de inflorescencias se deben a variaciones de los genes *LFY*, *AP1* y *TFL1* (Benlloch *et al.*, 2007). En pastos, han sido utilizadas en modelos evolutivos con análisis Bayesianos,

observando patrones en los tamaños de las inflorescencias que están asociados a procesos fisiológicos como la fotosíntesis (Kirchoff & Claßen-Bockhoff, 2013).

V Conclusión

El análisis filogenético de *A. jaliscana* no presentan grupos monofiléticos dentro del género, debido a posibles mutaciones en el intrón *rpl16*.

Los análisis estadísticos aplicados a los ejemplares de herbario descritos como *Asclepias jaliscana* (*A. contrayerba* y *A. setosa*) muestran la existencia de morfotipos en láminas foliares: oblongas, lanceoladas, ovadas y angostamente ovadas. Pero no tienen alguna relación con las sinonimias de esta especie. Así mismo, las agrupaciones A y B presenta diferencias significativas en algunas variables de las flores que pueden suponer la existencia de otro taxón.

VI Perspectivas

Análisis morfométrico con ejemplares que compartan características del grupo A y B: Para tener una percepción más amplia de lo que ocurre con los ejemplares que presentan laminas oblongas y ovadas de mayor tamaño, es necesario revisar de manera detallada estructuras florales silvestres, para determinar o descartar la existencia de otra especie. Debido a que el material de herbario no es lo suficientemente informativo debido al deterioro y ausencia de las estructuras florales de algunos ejemplares.

Análisis filogenético de morfotipos: Se recomienda realizar un análisis filogenético que considere los morfotipos propuestos en esta tesis, para determinar si las

variaciones morfológicas se deben a taxones distintos o simplemente a variaciones morfológicas.

VII Referencias

- Achrem, M., Stepien, E. & Kalinka, A. (2023). Epigenetic Changes Occurring in Plant Inbreeding. *International Journal Molecular Sciences*. 24 (6), 3-17. <https://doi.org/10.3390/ijms24065407>
- Adams, D.C., James, F.R. & Slice, E. (2004). Geometric morphometrics: Ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology*, 71 (1), 5-16. <https://doi.org/10.1080/11250000409356545>
- Agrawal, A.A., Lejeunesse, M.J. & Fishbein, M. (2008). Evolution of latex and its constituent defensive chemistry in milkweeds (*Asclepias*): a phylogenetic test of plant defense escalation. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 128(1), 126-138. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2008.00690.x>
- Agrawal, A. & Fishbein, M. (2010). Phylogenetic escalation and decline of plant defense strategies. *PNAS Biological Science*, 105 (29), 10057–10060. <https://doi.org/10.1073/pnas.080236810>
- Alvarado, C.L.O., Lozada, P.L., Islas, H.S., Cortez, E.B., Maya, M.K.G. y Chávez, H.M.G. (2020). Apocináceas de ayer y hoy. Conocimiento histórico y reevaluación de la diversidad y distribución de Apocynaceae en México. *Botanical Sciences*, 98(2), 393-416. DOI:10.17129/botsci.2525
- Alvarado-Cárdenas, L.O. y Islas-Hernández, C.S. (2024). Una nueva *Asclepias* (Apocynaceae, Asclepiadoideae) de la Sierra Gorda, Guanajuato-Querétaro,

- Alonso-Castro, A.J., Arana-Argáez, V., Yáñez-Barrientos, E., Torres-Romero, J.C., Chable-Cetz, R.J., Worbel, K., Euan-Canto, A.J., Wrobel, K., González-Ibarra, A., Solorio-Alvarado, C.R. & Juárez-Vázquez, M.C. (2021). Pharmacological activities of *Asclepias curassavica* L. (Apocynaceae) aerial parts. *Journal of Ethnopharmacology*, 281, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114554>
- Ann, M.E., D'Urso, P. & Caiado, J. (2019). *Time Series Clustering and Classification*. CRC Press. Boca Raton.
- Benítez, H.A. y Puschel, T.A. (2014). Modelando la Varianza de la Forma: Morfometría Geométrica Aplicaciones en Biología Evolutiva. *International Journal Morphology*, 32 (3), 998-1008. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022014000300041>
- Besse, P., Silva, D.D. & Grisoni, M. (2021). Plant DNA Barcoding Principles and Limits: A Case Study in the Genus *Vanilla*. En Besse, P. (Ed). *Molecular Plant Taxonomy Methods and Protocols* (2.ª ed.) (pp.131-147). Springer Protocols-Humana Press. New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0997-2>
- Bromham, L. (2016). *An Introduction To Molecular Evolution And Phylogenetics*. Oxford. Oxford.

- Broyles, S.B. (2002). Hybrid bridges to gene flow: a case study in milkweeds (*Asclepias*). *International Journal of Organic Evolution*, 56(10), 1943-1953.
<https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2002.tb00120.x>
- Broyles, S.B. & Elkin, G. (2019). Hybridization between *Asclepias purpurascens* and *Asclepias syriaca* (Apocynaceae). *Torrey Botanical Society*, 146 (4), 278-290. <https://www.jstor.org/stable/10.2307/27099275>
- Bustamante-Armenta, H.G. (2018). Determinación de cardenólidos y actividad antiproliferativa de *Asclepias subulata* (Decne 1844) cultivada bajo estrés hídrico, para el desarrollo de un potencial fitofármaco [Tesis de maestría]. Universidad de Sonora, Hermosillo.
http://www.repositorioinstitucional.uson.mx/bitstream/20.500.12984/4193/1/bustamante_armenta_hector_guillermo_m.pdf
- Butterworth, C.A., Butterworth, K.M., Maurice, W.A.F. & Maurice, B.F. (2007). A localized loss of the chloroplast rpl16 intron in *Mammillaria* series *Stylotela* (Cactaceae) delineates members of the *M. crinita* group. *Bradleya*, 25, 187-192. <https://doi.org/10.25223/brad.n25.2007.a13>
- Butterworth, C.A., Cota-Sanchez, J.H. & Wallace, R.S. (2002). Molecular Systematics of Tribe Cacteae (Cactaceae: Cactoideae): A Phylogeny Based on rpl16 Intron Sequence Variation. *Systematic Botany*. 27 (2), 257-270.
<https://doi.org/10.1043/0363-6445-27.2.257>
- Calderón, G. y Rzedowski, J. (2010). *Flora fanerogámica del Valle de México*. CONABIO.

Cardaso, A. P. y Flores F.B. (1998). Análisis químico de *Asclepias contrayerba* Sessé & Moc [Tesis de Licenciatura]. Departamento de Ciencias Físico-Químicas, Universidad Autónoma de Puebla.

Cervantes-Meza, C.O. (2018). Sinopsis del Género *Asclepias* (Asclepiadoideae, Apocynaceae) de Hidalgo, México [Tesis de Licenciatura]. Instituto de Ciencias Básicas, Área Académica de Biología, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

<http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/handle/231104/2172/Sinopsis%20del%20g%C3%A9nero%20Asclepias%20%28Asclepiadoideae%2C%20Apocynaceae%29%20de%20Hidalgo.pdf?sequence=2&isAllowed=y#:~:text=Asclepias%20L.,conocidas%20como%20venenillos%20o%20algodoncillos>.

Chávez-Hernández, M.G, Álvarez-Ruiz, J.A. & Alvarado-Cárdenas, L.O. (2023). *Phytotaxa*, 592 (3), 255-266. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.592.3.4>

Charlesworth, W. & Willis, J.H. (2009). The genetics of inbreeding depression. *Nature Reviews Genetics*, 10, 783–796. <https://www.nature.com/articles/nrg2664>

Crang, R., Lyons-Sobaski, S. & Wise, R. (2018). *Plant Anatomy: A Concept-Based Approach to the Structure of Seed Plants*. Springer.

Corlett, R. (2016). Plant diversity in a changing world: Status, trends, and conservation needs. *Plant diversity*, 38(1), 10-16. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2016.01.001>

- DeSalle, R., Tessler, M. & Rosenfeld, J. (2021). *Phylogenomics A Primer* (2.^a ed.). CRC Press. Chennai.
- Domingo, C.V.L. & Duran, A.G.J. (2016). Efficiency of *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*, and *trnL-F* (cpDNA) to Molecularly Authenticate Philippine Ethnomedicinal Apocynaceae Through DNA Barcoding. *Pharmacognosy Magazine*, 12(42), 384-388. doi: [10.4103/0973-1296.185780](https://doi.org/10.4103/0973-1296.185780)
- Daniell, H., Lin, C.S., Yu, M. & Chang, W.J. (2016). Chloroplast genomes: diversity, and applications in genetic engineering. *Genome Biology*, 17(134), 1-29. DOI: 10.1186/s13059-016-1004-2
- Dobrogojski, J., Adamiec, M. & Luciński, R. (2020). The chloroplast genome: a review. *Acta Physiologiae Plantarum*, 42-98. <https://doi.org/10.1007/s11738-020-03089-x>
- Ellsworth, D.S. & Reich, P.B. (1993). Canopy structure and vertical patterns of photosynthesis and related leaf traits in a deciduous forest. *Oecologia*, 96, 169-178. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00317729>
- Endress M.E., Meve, U., Middleton, D.J. & Liede-Schmann, S. (2018). Apocynaceae. In: Kadereit JW, Bittrich V, (Eds.). *Flowering Plants. Eudicots, The Families and Genera of Vascular Plants 15* (pp. 207-411). Springer International Publishing AG. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-93605-5_3

- Fernández, B.A.M., Juárez, J.V. y Cortés, Z.L. (2008). Usos de las especies del género *Asclepias* L. (Apocynaceae, Asclepiadoideae), información del Herbario Nacional de México, MEXU. *Polibotánica*, 25, 155-171. <https://www.scielo.org.mx/pdf/polib/n25/n25a12.pdf>
- Fishbein, M., Kephart, S.R., Wilder, M., Halpin, K.M. & Datwyler, S.L. (2010). Phylogeny of *Camassia* (Agavaceae) Inferred from Plastid *rpl16* Intron and *trnD—trnY—trnE—trnT* Intergenic Spacer DNA Sequences: Implications for Species Delimitation. *Systematic Botany*, 35 (1), 77-85. <https://doi.org/10.1600/036364410790862588>
- Fishbein, M., Chuba, D., Ellison, C., Manson-Gamer, R.J. & Lynch, S.P. (2011). Phylogenetic Relationships of *Asclepias* (Apocynaceae) Inferred from Non-coding Chloroplast DNA Sequences. *Systematic Botany*, 36 (4), 1008-1023. <https://doi.org/10.1600/036364411X605010>
- Fishbein, M., Straub, S.C.K., Boutte, J., Hansen, K., Cronn, R.C. & Liston, A. (2017). Evolution at the tips: *Asclepias* phylogenomics and new perspectives on leaf surfaces. *American journal of Botany*, 105, 514-524. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1062>
- Freeland, J.R. (2020). *Molecular Ecology* (3.^a ed.). Wiley Blackwell.
- Fonseca, G., Rodríguez-Hahn, L., Tablero, M., Rodríguez, A. & Arreguín, B. (1991). Labriformin, a cardiac glucoside from *Asclepias glaucescens*. *Journal of Natural Products*, 54(3), 860-862. <https://doi.org/10.1021/np50075a018>

- Fouda, A.H., Hassan, S.E.D., Eid, M.A. & Ewais, E.E.D. (2015). Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica* (Bioss.). *Annals of Agricultural Sciences*, 60(1), 95-104. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2015.04.001>
- Gailing, O., Lind, J. & Lilleskov, E. (2012). Leaf morphological and genetic differentiation between *Quercus rubra* L. and *Q. ellipsoidalis* E.J. Hill populations in contrasting environments. *Plant Systematics and Evolution*, 298, 1533-1545. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00606-012-0656-y>
- GBIF [Global Biodiversity Information Facility] (2022, 16 de noviembre). *Asclepias jaliscana*. Global Biodiversity Information Facility. <https://www.gbif.org/es/search?q=Asclepias%20jaliscana>
- Goh, W.L., Chandran, S., Lin, R.S., Xia, N.H. & Wong, K.M. (2010). Phylogenetic relationships among Southeast Asian climbing bamboos (Poaceae: Bambusoideae) and the *Bambusa* complex. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38, 764-773. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2010.07.006>
- Gutiérrez, C.S.R., Meza, M.M., Villalamil, C.C., Martínez, P.J.L., Gonzalez, A.J. y Montiel, G.A.M. (2014). Diversidad y estructura genética de *Asclepias contrayerba* Sessé y Moc. (Apocynaceae: Asclepiadoideae) en México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 30, 15-22. <https://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/view/45967>

- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & de Waard, R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *The Royal Society*, 270, 313-321. doi: [10.1098/rspb.2002.2218](https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218)
- Herendeen, P.S., Friis, E.M., Raunkjaer, P.K. & Crane, P.R. (2017). Palaeobotanical redux: revisiting the age of the angiosperms. *Nature Plants*, 3 (17015), 1-8. DOI: 10.1038/nplants.2017.15
- Hoffmann, L. (1989). Algae of terrestrial habitats. *The Botanical Review*, 55, 77-105. <https://doi.org/10.1007/BF02858529>
- Horn, J.W. (2009). Phylogenetics Of Dilleniaceae Using Sequence Data From Four Plastid Loci (*rbcL*, *infA*, *rps4*, *rpl16* Intron). *International Journal of Plant Sciences*, 170 (6), 794-813. <https://www.journals.uchicago.edu/doi/epdf/10.1086/599239>
- Howard, A.F. & Barrows, E.M. (2014). Self-pollination rate and floral-display size in *Asclepias syriaca* (Common Milkweed) with regard to floral-visitor taxa. *BMC Evolutionary Biology*, 14 (144), 2-16. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-144>
- IBUNAM [Instituto de Biología UNAM] (2022, 16 de noviembre). *Asclepias jaliscana*. Datos Abiertos UNAM. <https://datosabiertos.unam.mx/biodiversidad/>
- Jensen P.E. & Leiste D. (2014) Chloroplast evolution, structure and functions. F100Prime Reports, 6(40), 1-14. doi:10.12703/P6-40

- Jeunet, B. & Sattler, R. (1991). Multivariate Analysis in Process Morphology of Plants. *Journal of Theoretical Biology*, 156 (2), 147-167.
[https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(05\)80670-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(05)80670-8)
- Jiao, L., Lu, Y., He, T., Li, J. & Yin, Y. (2019). A strategy for developing high-resolution DNA barcodes for species discrimination of wood specimens using the complete chloroplast genome of three *Pterocarpus* species. *Planta*, 250, 95-104. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03150-1>
- Ji, A.J., Ma, Q., Kong, M.Y., Li, L.Y., Chen, X.L., Liu, Z.Q., Wu, J.J. & Zhang, R.R. (2022). Two cardenolide glycosides from the seed pairs of *Asclepias curassavica* and their cytotoxic activities. *Chinese Journal of Nature Medicines*, 20(3), 202-209. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(21\)60098-5](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(21)60098-5)
- Juárez-Jaimes, V. y Lozada, L. (2003). Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán: Asclepiadaceae fascículo 37. Instituto de Biología UNAM.
<https://www.biodiversitylibrary.org/item/209970#page/1/mode/1up>
- Juárez-Jaimes, V., Alvarado-Cárdenas O. y Villaseñor, J.L. (2007). La familia Apocynaceae *sensu lato* en México: diversidad y distribución. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 78, 459-482.
<https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2007.002.402>
- Juárez-Jaimes, V., Rodríguez-Morales, L.O., Paniagua-Ibáñez, M., Hernández-Barón, G.M. y Fishbein, M. (2022). Riqueza y distribución del género *Asclepias* (Apocynaceae: Asclepiadoideae) en México. *Revista Mexicana de*

<https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2022.93.3958>

- Kalendar, R., Boronnikova, S. & Seppänen, M. (2021). Isolation and Purification of DNA from Complicated Biological Samples. En Besse, P. (Ed). *Molecular Plant Taxonomy Methods and Protocols* (2.ª ed.) (pp.69-88). Springer Protocols-Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0997-2>
- Kelchner, S.A. & Clark, L.G. (1997). Molecular Evolution and Phylogenetic Utility of the Chloroplast rpl16 Intron in *Chusquea* and the Bambusoideae (Poaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 8 (3), 385-397. <https://doi.org/10.1006/mpev.1997.0432>
- Kirchhoff, H. (2019). Chloroplast ultrastructure in plants. *New phytologist*, 223, 565-574. doi: 10.1111/nph.15730
- Khadivi, A. (2018). Phenotypic characterization of *Elaeagnus angustifolia* using multivariate analysis. *Industrial Crops & Products*, 120, 155-161. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.050>
- Kosiński, P., Boratyński, A. & Hilpold, A. (2017). Taxonomic differentiation of *Salix retusa* agg. (Salicaceae) based on leaf characteristics. *Dendrobiology*, 78, 40-50. <http://dx.doi.org/10.12657/denbio.078.005>
- Ku, C., Nelson-Sathi, S., Roettger, M., Garg, S., Hazkani-Covo, E. & Martin, W.F. (2015). Endosymbiotic gene transfer from prokaryotic pangenomes: inherited

- chimerism in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy*, 112(33),10139–10146. doi: 10.1073/pnas.1421385112
- Landis, F.C., Gargas, A. & Givnish, T. (2004). Relationships among arbuscular mycorrhizal fungi, vascular plants and environmental conditions in oak savannas. *New Phytologist Foundation*, 164(3), 493-504.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01202.x>
- Lele, S.R. & Richtsmeir, J.T. (2000). *An Invariant Approach Statistical Analysis of Shapes*. CRC. Press. Florida.
- Lemoine, N.P. (2015). Climate change may alter breeding ground distributions of Eastern migratory monarchs (*Danaus plexippus*) via range expansión of *Asclepias* host plants. *Journal PLOS ONE*, 10(2), 1-22.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118614>
- Lenton, T.M., Crouch, M., Johnson, Pires, N. & Dolan L. (2012). First plants cooled the Ordovician. *Nature Geoscience*, 5. 86-89. DOI:
<https://doi.org/10.1038/ngeo1390>
- León, N (1895). *Biblioteca Botánica-Mexicana; Catálogo Bibliográfico, Biográfico y Cerítico de Autores y Escritos Referentes a Vegetales de México y Sus Aplicaciones, Desde la Conquista Hasta el Presente*. Forgotten Books.
- Liggieri, C., Obregón, W., Trejo, S. & Priolo, N. (2009). Biochemical análisis of a papain-like protease isolated from the latex of *Asclepias curassavica* L. *Acta*

Biochimica et Biophysica Sinica, 41(2), 154-162.

<https://doi.org/10.1093/abbs/gmn018>

Leps, J. & Smilauer, P. (2020). *Biostatistics with R: An Introductory Guide for Fields Biologists*. Cambridge. Cambridge. <https://doi.org/10.1017/9781108616041>

López, de H.U., Duro-garcía, & Soto, A. (2017). Leaf morphology of progenies in *Q. suber*, *Q. ilex*, and their hybrids using multivariate and geometric morphometric análisis.

López, P.M.E. y Rojas, R.M. (2006). *Conocimiento Tradicional de Asclepias contrayerba en Jilotepec, Tlaxcala y su Evaluación de Propagación* (Tesis de Licenciatura). Facultad de Agrobiología, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala. *Biogeosciences and Forestry*. 11, 90-98.
<https://doi.org/10.3832/for2577-010>

Luna T. & Dumroese, R.K. (2013). Monarchs (*Danaus plexippus*) and milkweeds (*Asclepias* species). *Journal NATIVEPLANTS*, 14(1). 5-15.
<https://doi.org/10.3368/npj.14.1.5>

Luna, E. (2020). Integrando análisis morfométricos y filogenéticos: de la sistemática fenética a la morfometría filogenética. *Acta Botánica Mexicana*, 127, 1.50.
<https://doi.org/10.21829/abm127.2020.1640>

Luna-Vega, I. (2008). Aplicaciones de la biogeografía histórica a la distribución de las plantas mexicanas. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 79, 217-241.

https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532008000100018

Marcus, L.F. (1990). Traditional Morphometrics. En James, F.R. & Bookstein, F.L. (Ed). *Proceedings of the Morphometrics Workshop*. The University Michigan Museum of Zoology. Michigan. <https://hdl.handle.net/2027.42/49535>

McVaugh, R. (2000). *Botanical results of the Sesse & Mocino expedition (1787-1803): VII. a guide to relevant scientific names of plants*. Hunt Institute For Botanical Documentation. <https://www.huntbotanical.org/publications/show.php?2>

Meloni, M., Reid, A., Caujapé-Castells, J., Marrero, Á., Fernández-Palacios, J.M., Mesa-Coelo, R.A. & Conti, E. (2013). Effects of clonality on the genetic variability of rare, insular species: the case of *Ruta microcarpa* from the Canary Islands. *Ecology and Evolution*, 3 (6), 1569-1579. <https://doi.org/10.1002/ece3.571>

Miguez-Gutiérrez, A., Castillo, J., Márquez, J., y Goyenechea, I. (2013). Biogeografía de la Zona de Transición Mexicana con base en un análisis de árboles de reconciliados. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84 (1), 215-224. <https://doi.org/10.7550/rmb.32119>

Min, B.E., Feldman, T.S., Ali, A., Wiley, G., Muthukumar, V., Roe, B.A., Roossinck, M., Melcher, U., Palmer, M.W. & Nelson, R. (2012). Molecular characterization, ecology, and epidemiology of a novel Tymovirus in *Asclepias viridis* from

- Oklahoma. *Phytopathology*, 102(2), 166-176. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-11-0154>
- Mitchell, K.A., Bolstad, P.V. & Vose, J.M. (1999). Interspecific and environmentally induced variation in foliar dark respiration among eighteen southeastern deciduous tree species. *Tree Physiology*, 19 (13), 861-870. <https://doi.org/10.1093/treephys/19.13.861>
- Morrone, J.J. (2019). Regionalización biogeográfica y evolución biótica de México: encrucijada de la biodiversidad del Nuevo Mundo. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 90 (1), 1-68. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2019.90.2980>
- Morley, S.A., Niaz, A. & Brent, L.N. (2019). Plant organelle genome replication. *Plants*, 8(10), 2-18. <https://doi.org/10.3390/plants8100358>
- Mitteröcker, P. (2021). Morphometrics in Evolutionary Developmental Biology. En Nuño, R.L. & Mullerm, G.B. (Ed). *Evolutionary Developmental Biology: A Reference Guide* (pp. 941-950). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-32979-6>
- Mower, J.P. & Vickrey, T.L. (2018) Chapter nine—structural diversity among plastid genomes of land plants. *Advances in Botanical Research*, 85, 263–29. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2017.11.013>

NCI [National Cancer Institute]. (2023 ,22 de abril). Diccionario del cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/marcador-molecular>

Oldenburg, D.J. & Bendich, A.J. (2016). The linear plastid chromosomes of maize: terminal sequences, structures, and implications for DNA replication. *Current Genetics*, 62, 431-442. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0548-0>

Orlói, L. (1975). *Multivariate Analysis in Vegetation Research*. Springer, The Hague. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-94-017-5608-2>

Ortiz, C.M. y España, P.C. (2000). *Plantas medicinales del estado de Morelos*. CONABIO.

Otero, G.J.C. (2020). *La geografía de la vida: la biogeografía*. Mc Graw Hill.

Papavero, N., Martins, T.D., Llorontes, B.J. y Bueno, A. (2004). *Historia de la Biogeografía I. El periodo preevolutivo*. Fondo de Cultura Económica. Ciudad de México.

Pérez-Luis, J.I. (2023). Uso actual de camorreal en la comunidad de San Pedro El Alto, Zimatlán, Oaxaca [Tesis de maestría]. Tecnológico Nacional De México: Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, Santa Cruz Xoxocotlán. <https://rinacional.tecnm.mx/jspui/handle/TecNM/6966>

Rashad, F.A.S. & Al-Kazaz, A.A. (2015). Molecular Markers: Introduction and Applications. *European Journal of Molecular Biotechnology*, 9(3), 118-130. <http://dx.doi.org/10.13187/ejmb.2015.9.118>.

- Rentaría, A. M. (2007). Breve Revisión De Los Marcadores Moleculares. En L. E. Eguiarte, V. Sauza, X. Aguirre (Eds). *Ecología Molecular* (pp. 541-562). Instituto de Ecología.
<https://hopelchen.tecnm.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r119349.PDF>
- Robinson, B.L. (1894). Contributions from the Gray Herbarium, of Harvard University, new series, No. VI. *University Press: John Wilson And Son*. 11 (14), 273-380.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539-542.
<https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Rzedowski, J. (1991). Diversidad y Orígenes de la Flora Fanerogámica de México. *Acta Botánica Mexicana*, 14, 3-21.
<https://www.redalyc.org/pdf/574/57401402.pdf>
- Salvaña, F.R., Eco, K., Rosietess, M.N. & Bautista. (2019). Leaf morphological characterization and cluster analysis of *Vitex negundo* morphotypes. *Environmental and Experimental Biology*, 17, 75-83.
<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20219933279>
- Sessé, M. y Mociño, J. M. (1894). *Flora Mexicana* (2.ª ed.). Secretaria de Fomento.

SCJN [Suprema Corte de Justicia de la Nación] (2023, 20 de marzo). Convenio Sobre La Diversidad Biológica, Adoptada En Rio De Janeiro, Brasil, El 5 De Junio De 1992.

<https://legislacion.scjn.gob.mx/Buscador/Paginas/wfOrdenamientoDetalle.aspx?q=zmlkJ/89AXJJKRY4OR4AdMD1cbWaKt5CX6bRtAAkpUddS7p+hWBaN e5Xv/vfihEo>

Staehelein, L.A. (1986). Chloroplast structure and supramolecular organization of photosynthetic membranes. En: Staehelein LA, Arntzen CJ, (Eds). Photosynthesis III, encyclopedia of plant physiol, vol. 19 (pp- 1-84). Berlin, Germany: Springer.

Stoeckle, M. (2003). Taxonomy, DNA, and the Bar Code of Life. *BioScience*, 53 (9), 796-797. [https://doi.org/10.1641/00063568\(2003\)053\[0796:TDATBC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/00063568(2003)053[0796:TDATBC]2.0.CO;2)

Sun-Kim, E., Zaya, D.N., Fant, J.B. & Asheley, M.V. (2015). Genetic factors accelerate demographic decline in rare *Asclepias* species. *Conserv Genet*, 16, 359–369. DOI 10.1007/s10592-014-0663-3

Tablero, M., Arreguín, R., Arreguín B., Soriano, M., Sánchez, R.I., Rodríguez R.A. & Hernández-Anaya, A. (1991). Purification and characterization of multiple forms of Asclepain g from *Asclepias glaucescens* H.B.K. *Plant Science*, 74(1), 7-15. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(91\)90250-C](https://doi.org/10.1016/0168-9452(91)90250-C)

Tropicos (2022, 16 de noviembre). *Asclepias jaliscana*. Tropicos. <https://www.tropicos.org/name/Search?name=Asclepias%20jaliscana>

- Valadez M.E. y Kahl G. (2000). *Huellas De ADN En Genomas De Plantas (Teoría y Protocolos De Laboratorio)*. Mundi-Prensa.
- Vannette, R.L. & Hunter, M.D. (2010). Plant defense theory re-examined: nonlinear expectations based on the costs and benefits of resource mutualisms. *Journal of Ecology*, 99(1), 66-77. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2010.01755.x>
- Vannette, R.L., Hunter, M.D. & Rasmann, S. (2013). Arbuscular mycorrhizal fungi alter above and below ground chemical defense expression differentially among *Asclepias* species. *Frontiers in Plant Science*, 4(361), 1-9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00361>
- Villalobos-Leiva, A. y Benítez, H.A. (2020). Morfometría geométrica y sus nuevas aplicaciones en la ecología y biología evolutiva. Parte 2. *International Journal Morphology*, 36 (6), 1818-1836. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022020000601818>
- Villaseñor, J.L. y Ortiz, E. (2014). Biodiversidad de las plantas con flores (División Magnoliophyta) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84 (1), 134-142. <https://doi.org/10.7550/rmb.31987>
- Villaseñor, J.L. (2016). Catálogo de las plantas vasculares de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86 (3), 559-902. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.06.017>.

- Vries, J. & Archibald, J.M. (2018). Plant evolution: landmarks on the path to terrestrial life. *New Phytologist*, 217(4), 1428-1434.
<https://doi.org/10.1111/nph.14975>
- Wiley, E.O. & Lieberman, B.S. (2011). *Phylogenetics; Theory and Practice of Phylogenetic Systematics*. Wiley-Blackwell. New Jersey.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118017883>
- Wyatt, R. & Broyles, S.B. (1994). Ecology and Evolution of Reproduction in Milkweeds. *Annu. Rev. Ecol. Sys*, 25, 423-441.
<https://www.jstor.org/stable/2097319>
- Woodson, R.E. (1954). The North American Species of *Asclepias* L. *Annales of the Missouri Botanical Garden*. 41 (1), 1-211.
- Xue, H. (2022). Phylogenetics and its Application in Biodiversity Conservation. En Kumar, A., Choudhury, B., Dayanandan, S. & Latif, K.M. (Ed.). *Molecular Genetics and Genomics Tools in Biodiversity Conservation*. Springer. Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-16-6005-4>
- Záveská, D.L. (2021). Herbarium Specimens: A Treasure for DNA Extraction, an Update. En Besse, P. (Ed). *Molecular Plant Taxonomy Methods and Protocols* (2. ^a ed.) (pp.69-88). Springer Protocols-Humana Press. New York.
<https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0997-2>

Zhang, W. (2000). Phylogeny of the Grass Family (Poaceae) from rpl16 Intron Sequence Data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 15 (1), 135-146.

<https://doi.org/10.1006/mpev.1999.0729>

Zoschke, R., Liere, K. & Börner, T. (2007). From seedling to mature plant: *Arabidopsis* plastidial genome copy number, RNA accumulation and transcription are differentially regulated during leaf development. *The Plant Journal*, 50, 710–722 <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03084.x>

VIII Anexos

Anexo 1

Tabla 11. Localidades visitadas para buscar material vegetal de *A. jaliscana*.

Num.	Fecha	Entidad Federativa	Municipio	Localidad/Referencia	Num. <i>Asclepias</i> <i>jaliscana</i>	Especies de <i>Asclepias</i>
20	10/22/22	Chiapas	Teopisca	Orilla del municipio	0	1
19	10/22/22	Chiapas	Chanal	Orilla del municipio	0	0
18	10/23/22	Chiapas	San Cristobal de las Casas	Orilla del municipio	0	0
17	01/10/2022	Hidalgo	Almoloya	La Coronilla	0	1
16	19/09/2022	Hidalgo	Apan	Cerro aldeños a Apan	0	0
15	10/09/2022	Tlaxcala	Cuaxomulco	Cerro la Cuatlapanga	0	2
14	21/08/2022	Ciudad de México	Milpa Alta	Volcan Cerro de San Miguel	0	0
13	19/08/2022	Tlaxcala	Aclangatepec	Cerros aledaños al lago de Aclangatepec	0	2
12	11/08/2022	Tlaxcala	Santorum	Orilla de Santorum	4	4
11	11/08/2022	Tlaxcala	Españita	Álvaro Obregón	0	4
10	29/07/2022	Puebla	Chignaguapan	Villa Cuauhtémoc	0	0
9	29/07/2022	Tlaxcala	Tlaxco	La Herradura	0	2
8	24/07/2022	Tlaxcala	Yahuquemecan	Atlihuetzía (2)	0	0
7	19/07/2022	Tlaxcala	Panotla	San Tadeo Huilapan	0	5
6	17/07/2022	Puebla	Tehuacan	Orilla de Tehuacan	0	0
5	14/07/2022	Puebla	Ocoyucan	Cerro entre Santa Maria Malacatepec y San José Zetina	0	3
4	11/07/2022	Tlaxcala	Ixtacuixtla	La Trinidad Tenexyacan cerros a la orilla de municipio	0	0
3	05/07/2022 - 22/09/22	Puebla	Amozoc	Parque Estatal Flor del Bosque (2)	0	1
2	26/06/2022	Tlaxcala	Ixtacuixtla	San Marcos Jilotepec (3)	5 a 18	4
1	26/09/2021	Estado de México	Otumban	-	3	3

Anexo 2

Tabla 12. Observaciones de las poblaciones encontradas de *A. jaliscana*.

Muestras de este estudio				
Población	Estado	Municipio/Localidad	Número de individuos	Observaciones
1	Tlaxcala	Ixtacuixtla-San Marco Jilotepec	20	Entre terrenos de cultivo, las hojas tenían nervadura atenuada de color rojo, muerte antes de alcanzar el ciclo reproductivo, no se observó la formación de frutos, infecciones por artrópodos y extracción de ejemplares para uso medicinal.
2	Tlaxcala	Sanctorum-a las afueras del municipio	4	Entre terrenos de cultivo, las hojas tenían nervadura atenuada de color rojo.
3	Estado de México	Otumba-periferia	5	Extracción de ejemplares para uso medicinal.
4	Guerrero	Eduardo Neri	-	Homocigosis (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2014)

Anexo 3

Tabla 13. Ejemplares.

NUMERO	CODIGO DE HERBARIO	HERBARIO	ESTATUS DE EJEMPLAR	REVISIÓN	NOMBRE DE REGISTRO	ESTADO
1	629528	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. CONTRAYERBA	CHIHUAHUA
2	67435	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. CONTRAYERBA	MORELOS
3	438141	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. CONTRAYERBA	JALISCO
4	261700	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. CONTRAYERBA	VERACRUZ
5	1014723	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. JALISCANA	NAYARIT
6	829054	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. CONTRAYERBA	NAYARIT
7	890341	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. CONTRAYERBA	PUEBLA
8	331513	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. EUPHORBIAEFOLIA	CHIHUAHUA
9	898232	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. JALISCANA	SONORA
10	839844	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. CONTRAYERBA	OAXACA
11	51859	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. CONTRAYERBA	AGUAS CALIENTES
12	938130	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. CONTRAYERBA	MORELOS
13	445256	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. CONTRAYERBA	CIUDAD DE MÉXICO

14	768398	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. JALISCANA	SONORA
15	564465	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. JALISCANA	OAXACA
16	1427558	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. JALISCANA	JALISCO
17	1209241	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. GLAUSCESCENS	GUERRO
18	926279	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. JALISCANA	CHIAPAS
19	763290	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. JALISCANA	CHIAPAS
20	744623	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. CONTRAYERBA	CHIAPAS
21	1375133	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. AURICULATA	CHIAPAS
22	552053	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. CONTRAYERBA	NAYARIT
23	1443906	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. CONTRAYERBA	CHIAPAS
24	1502820	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. JALISCANA	JALISCO
25	762586	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. CONTRAYERBA	JALISCO
26	24996	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. SETOSA	JALISCO
27	156351	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. CONTRAYERBA	CHIHUAHUA
28	577285	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. JALISCANA	CHIHUAHUA
29	149714	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. CONTRAYERBA	DURANGO
30	1494368	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. JALISCANA	DURANGO
31	344956	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. CONTRAYERBA	GUERRO
32	1032463	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. CONTRAYERBA	GUERRO
33	859441	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. JALISCANA	GUERRO
34	272053	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. CONTRAYERBA	ESTADO DE MÉXICO
35	1489146	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. JALISCANA	ESTADO DE MÉXICO
36	1032392	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. CONTRAYERBA	GUERRO
37	1161711	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. JALISCANA	SAN LUIS POTOSI
38	551788	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. CONTRAYERBA	VERACRUZ
39	1014390	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. JALISCANA	NAYARIT
40	23919	MEXU	EJEMPLAR SINTIPO	FISICA	A. SETOSA	JALISCO
41	23922	MEXU	EJEMPLAR SINTIPO	FISICA	A. JALISCANA	JALISCO
42	23925	MEXU	EJEMPLAR USADO CLAVE TAXONOMICA	FISICA	A. SETOSA	PUEBLA

43	23920	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. SETOSA	MICHOACAN
44	48322	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. SETOSA	SINALOA
45	5834	TLXM	EJEMPLAR COMÚN	FISICA	A. CONTRAYERBA	TLAXCALA
46	1337	USCG	EJEMPLAR COMÚN	DIGITAL	A. SETOSA	GUATEMALA
47	193635	ASU	EJEMPLAR COMÚN	DIGITAL	A. JALISCANA	SONORA
48	102991	DOV	EJEMPLAR TIPO	DIGITAL	A. JALISCANA	JALISCO
49	11019	LY	EJEMPLAR COMÚN	DIGITAL	A. SETOSA	JALISCO
50	4641	NY	EJEMPLAR TIPO	DIGITAL	A. SETOSA	AGUAS CALIENTES
51	211127	IBUG	EJEMPLAR COMÚN	DIGITAL	A. JALISCANA	JALISCO
52	26922	HARVARD	EJEMPLAR TIPO	DIGITAL	A. SETOSA	JALISCO
53	46404	BRU	EJEMPLAR TIPO	DIGITAL	A. JALISCANA	JALISCO
54	217591	IBUG	EJEMPLAR COMÚN	DIGITAL	A. JALISCANA	JALISCO
55	106071	F	EJEMPLAR TIPO	DIGITAL	A. JALISCANA	JALISCO
56	1046270	PH	EJEMPLAR TIPO	DIGITAL	A. JALISCANA	JALISCO
57	4804	NY	EJEMPLAR TIPO	DIGITAL	A. SETOSA	JALISCO
58	4650	NY	EJEMPLAR TIPO	DIGITAL	A. SETOSA	JALISCO
59	589508	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	DIGITAL	ASCLEPIAS	SINALOA
60	552051	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	DIGITAL	ASCLEPIAS	NAYARIT
61	474192	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	DIGITAL	A. JALISCANA	OAXACA
62	543400	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	DIGITAL	A. JALISCANA	VERACRUZ
63	1347077	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	DIGITAL	A. JALISCANA	MICHOACAN
64	1347055	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	DIGITAL	A. JALISCANA	MICHOACAN
65	1347059	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	DIGITAL	A. JALISCANA	GUANAJUATO
66	460008	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	DIGITAL	A. JALISCANA	JALISCO
67	937483	F	EJEMPLAR COMÚN	DIGITAL	A. CONTRAYERBA	ESTADO DE MÉXICO
68	461398	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	DIGITAL	A. JALISCANA	JALISCO
69	140355	GA	EJEMPLAR COMÚN	DIGITAL	A. CONTRAYERBA	CHIAPAS
70	1367123	MEXU	EJEMPLAR COMÚN	DIGITAL	A. JALISCANA	MICHOACAN