



**Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo**

---

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA**

**ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA**

**DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD**

**Y CONSERVACIÓN**

**Caracterización morfológica, genética y antidiabética de tres especies de plantas medicinales en el estado de Hidalgo, México.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS PRESENTA:**

**M. en C. ANTONIO ALVAREZ DELGADILLO**

**DIRECTOR: Dr. Pablo Octavio Aguilar CODIRECTOR: Dr.**

**Miguel Ángel Villavicencio Nieto**

Mineral de la Reforma, Hidalgo, 2019



Mineral de la Reforma, Hgo., a 29 de enero de 2019.

**Número de control:** ICBI-D/085/2019  
**Asunto:** Autorización impresión de Tesis.

**M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO**  
**DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR**

Por este conducto le comunico que después de revisar el trabajo titulado **“Caracterización morfológica, genética y antidiabética de tres especies de plantas medicinales en el estado de Hidalgo, México”**, que presenta el alumno del Doctorado en Ciencias en Biodiversidad y Conservación **M. en C. Antonio Álvarez Delgadillo**, el Comité Revisor de tesis ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Comité Revisor.

|            |                              |
|------------|------------------------------|
| PRESIDENTE | Dra. Maritza López Herrera   |
| SECRETARIO | Dr. Roberto Ávila Pozos      |
| VOCAL      | Dr. Pablo Octavio Aguilar    |
| SUPLENTE   | Dra. Leticia Romero Bautista |

Sin otro particular, reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente  
**“Amor, Orden y Progreso”**  
  
 Dr. Oscar Rodolfo Suárez Castillo  
 Director del ICBI

GPF/CIAF

Ciudad del Conocimiento  
 Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia Carboneras,  
 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42184  
 Teléfono: +52 (771) 71 720 00 ext. 2231 Fax 2109  
 direccion\_icbi@uaeh.edu.mx



## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres Gaudencio Alvarez Ostría, Ma. Concepción Delgadillo Martínez, por brindarme todo su apoyo durante todo este tiempo, pero sobre todo por guiarme y el haberme dado la vida.

A mis sinodales: Dr. Roberto Ávila Pozos y Dra. Maritza López Herrera, Dra. Leticia Romero Bautista, Dr. Pablo Octavio Aguilar y al Dr. Miguel Ángel Villavicencio Nieto quienes enriquecieron y mejoraron esta tesis con sugerencias y comentarios acertados.

A demás agradezco a los Doctores Pablo Octavio Aguilar y al Dr. Miguel Ángel Villavicencio Nieto por su dirección de esta tesis y por dejarme formar parte de su equipo de trabajo.

También agradezco al Biol. Mario Garcés por su apoyo en el laboratorio de genética evolutiva y ambiental, al Dr. Alan Reyes Silva y la Dra. Berenice Nataly López Gutiérrez, al Biol. Jaime Angeles Mota, al Dr. Miguel Ángel Islas Santillán y a la Sra. Victoria Solis Ortiz, por su apoyo en campo.

A mis amigas Miriam y Esme, mil gracias por todo su apoyo del día a día.

De igual manera agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada con número 226071 del Doctorado En Ciencias en Biodiversidad y Conservación.

A todos ellos gracias...

# ÍNDICE

|  | Página |
|--|--------|
| <b>Resumen</b> .....   | i      |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....  | 1      |
| <b>ANTECEDENTES</b> .....  | 4      |
| Historia de la Diabetes mellitus (DM).....                                       | 4      |
| Síntomas de la DM.....   | 4      |
| Clasificación de la DM.....  | 5      |
| a) Diabetes mellitus tipo 1 (DM 1) .....   | 5      |
| b) Diabetes mellitus tipo 2 (DM2).....   | 5      |
| c) Diabetes mellitus gestacional (DMG) .....                                     | 6      |
| Diagnóstico de la DM.....  | 6      |
| Problemática de la diabetes a nivel mundial.....                                 | 7      |
| Control de la DMT2.....  | 7      |
| I. Modificación del estilo de vida .....   | 8      |
| II. Dieta.....   | 8      |
| III. Ejercicio.....  | 8      |
| IV. Tratamientos farmacológicos .....  | 8      |
| Las plantas como una forma de medicina alternativa .....                         | 14     |
| Plantas medicinales que inhiben la actividad enzimática de alfa glucosidasa..... | 17     |
| Diversidad química y genética de las plantas medicinales.....                    | 19     |
| Factores que modifican la diversidad y diferenciación genética .....             | 20     |
| 1) El tamaño de la población .....   | 21     |
| 2) Sistemas de apareamiento o reproductivos.....                                 | 21     |
| 3) Flujo genético.....   | 21     |
| 4) Deriva genética .....   | 22     |
| 5) Mutación.....   | 22     |
| 6) Cuellos de botella “bottleneck” y efecto fundador .....                       | 22     |
| Problemática sobre el uso de medicamentos herbolarios.....                       | 23     |
| <b>JUSTIFICACIÓN</b> .....   | 26     |
| <b>HIPÓTESIS</b> .....   | 27     |
| <b>OBJETIVOS</b> .....   | 27     |
| <b>OBJETIVO GENERAL</b> .....  | 27     |
| Objetivos particulares.....  | 27     |

|   |    |
|---|----|
| <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....   | 28 |
| Selección de especies con potencial antidiabético .....   | 28 |
| Descripción de especies .....   | 28 |
| Área de estudio .....   | 37 |
| Recolecta de material vegetal .....   | 38 |
| a) Datos morfológicos .....   | 39 |
| b) Datos genéticos.....   | 41 |
| c) Obtención de extractos .....   | 42 |
| d) Pruebas de inhibición de alfa glucosidasa ( $\alpha$ -glucosidasa) .....                                     | 42 |
| Análisis de datos .....   | 43 |
| Datos morfológicos .....  | 43 |
| Datos genéticos.....  | 45 |
| Datos de Inhibición de $\alpha$ -glucosidasa .....  | 47 |
| <b>RESULTADOS</b> .....   | 50 |
| <b>Resultados morfológicos de <i>Cecropia obtusifolia</i></b> .....   | 50 |
| Diferenciación morfológica de <i>C. obtusifolia</i> a nivel local.....  | 50 |
| Dimorfismo sexual en <i>C. obtusifolia</i> .....  | 52 |
| Diferenciación morfológica entre sexos entre localidades .....  | 54 |
| <b>Resultados genéticos de <i>C. obtusifolia</i></b> .....  | 58 |
| Diversidad genética .....   | 58 |
| Estructura genética.....  | 59 |
| Efecto de las variables geográficas en los datos genéticos .....  | 61 |
| <b>Inhibición de <math>\alpha</math>-glucosidasa de los extractos etanólicos de <i>C. obtusifolia</i></b> ..... | 65 |
| Inhibición de $\alpha$ -glucosidasa de acuerdo al sexo de los individuos de <i>C. obtusifolia</i> .....         | 67 |
| Correlación entre fenotipo, genotipo con las variables geográficas.....   | 71 |
| Relación del porcentaje de inhibición de $\alpha$ -glucosidasa con las variables geográficas .....              | 77 |
| <b>Discusión</b> .....  | 80 |
| Dimorfismo sexual.....  | 80 |
| Efecto del dimorfismo sexual en el porcentaje de Inhibición de $\alpha$ -glucosidasa .....                      | 83 |
| <b>Resultados morfológicos de <i>Costus scaber</i></b> .....  | 86 |
| Análisis de funciones discriminantes (AFD).....   | 86 |
| Análisis de varianza anidada (ANOVA) .....  | 87 |
| <b>Resultados genéticos de <i>C. scaber</i></b> .....   | 88 |

|  |     |
|--|-----|
| Riqueza alélica .....  | 88  |
| Diversidad genética .....  | 89  |
| Estructura genética.....   | 90  |
| Relaciones genéticas y de parentesco.....  | 92  |
| Historia demográfica de las poblaciones de <i>C. scaber</i> .....                            | 94  |
| <b>Inhibición de alfa glucosidasa de <i>C. scaber</i></b> .....                              | 97  |
| Correlación entre fenotipo, genotipo con las variables geográficas de <i>C. scaber</i> ..... | 99  |
| <b>Discusión</b> .....   | 105 |
| <b>Resultados Morfológicos de <i>Tecoma stans</i></b> .....                                  | 108 |
| Análisis discriminante .....   | 108 |
| Análisis de varianza anidada (ANOVA) .....   | 111 |
| <b>Resultados genéticos de <i>T. stans</i></b> .....   | 112 |
| Riqueza alélica .....  | 112 |
| Diversidad genética .....  | 112 |
| Estructura genética.....   | 114 |
| Relaciones genéticas y de parentesco.....  | 116 |
| Historia demográfica de las poblaciones.....   | 118 |
| Inhibición de $\alpha$ -glucosidasa de <i>T. stans</i> .....                                 | 122 |
| Correlación datos morfológicos, genéticos e inhibición de $\alpha$ -glucosidasa .....        | 126 |
| Determinación de la especie con mayor inhibición de $\alpha$ -glucosidasa .....              | 131 |
| <b>Discusión</b> .....   | 133 |
| <b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....   | 137 |
| <b>CONCLUSIÓN</b> .....  | 139 |
| <b>LITERATURA CITADA</b> .....   | 140 |
| <b>ANEXOS</b> .....  | 168 |
| Anexo 1.....   | 168 |
| Anexo 2.....   | 170 |
| Anexo 3.....   | 171 |
| Anexo 4.....   | 172 |
| Anexo 5.....   | 173 |

## INDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Clasificación de los medicamentos utilizados en el tratamiento de DMT2. ....                      | 10 |
| <b>Tabla 2.</b> Tipos de $\alpha$ -glucosidasa y sus requerimientos de pH y temperatura (T). ....                 | 11 |
| <b>Tabla 3.</b> Concentraciones de $\alpha$ -glucosidasa utilizadas en ensayos de inhibición. ....                | 12 |
| <b>Tabla 4.</b> Diversidad florística por región para tratar diabetes. ....                                       | 16 |
| <b>Tabla 5.</b> Plantas medicinales que inhbien la actividad enzimátic de $\alpha$ -glucosidasa. ....             | 18 |
| <b>Tabla 6.</b> Características generales de los sitios de muestreo para las tres especies. ....                  | 38 |
| <b>Tabla 7.</b> Caracteres morfológicos analizados en las tres especies. ....                                     | 39 |
| <b>Tabla 8.</b> AFD en las tres poblaciones de <i>C. obtusifolia</i> . ....                                       | 50 |
| <b>Tabla 9.</b> ANOVA anidado de las diez variables morfológicas de <i>C. obtusifolia</i> . ....                  | 52 |
| <b>Tabla 10.</b> Media y e.e de las diez variables morfológicas de <i>C. obtusifolia</i> . ....                   | 53 |
| <b>Tabla 11.</b> Media y e.e de las diez variables morfológicas entre sexos de <i>C. obtusifolia</i> . ....       | 55 |
| <b>Tabla 12.</b> AFD por sexos en <i>C. obtusifolia</i> . ....  | 57 |
| <b>Tabla 13.</b> Descripción de los tres loci de microsatélites usados en <i>C. obtusifolia</i> . ....            | 59 |
| <b>Tabla 14.</b> Sumario de diversidad genética <i>C. obtusifolia</i> ....  | 59 |
| <b>Tabla 15.</b> Prueba de AMOVA entre poblaciones de <i>C. obtusifolia</i> . ....                                | 60 |
| <b>Tabla 16.</b> Prueba de AMOVA dentro de las poblaciones de <i>C. obtusifolia</i> . ....                        | 60 |
| <b>Tabla 17.</b> Flujo genético y valores de $F_{ST}$ de <i>C. obtusifolia</i> . ....                             | 61 |
| <b>Tabla 18.</b> Prueba de ANOVA de los extractos de <i>C. obtusifolia</i> ....                                   | 65 |
| <b>Tabla 19.</b> Media y Ds del porcentaje de inhibición de $\alpha$ -glucosidasa de <i>C. obtusifolia</i> . .... | 66 |
| <b>Tabla 20.</b> $Cl_{50}$ de los extractos etanólicos de <i>C. obtusifolia</i> por localidad. ....               | 66 |
| <b>Tabla 21.</b> ACC entre genotipos y fenotipos de <i>C. obtusifolia</i> . ....                                  | 71 |
| <b>Tabla 22.</b> ACC entre genotipos, fenotipos y variables geográficas de <i>C. obtusifolia</i> por sexo. 74     |    |
| <b>Tabla 23.</b> AFD de las tres poblaciones de <i>C. scaber</i> . ....   | 86 |
| <b>Tabla 24.</b> ANOVA anidada de las tres poblaciones de <i>C. scaber</i> ....                                   | 88 |
| <b>Tabla 25.</b> Diversidad genética por loci de <i>C. scaber</i> . ....  | 89 |
| <b>Tabla 26.</b> Sumario de diversidad genética en las tres poblaciones de <i>C. scaber</i> . ....                | 90 |
| <b>Tabla 27.</b> Prueba de AMOVA de <i>C. scaber</i> . ....   | 90 |
| <b>Tabla 28.</b> Flujo genético entre pares de poblaciones de <i>C. scaber</i> . ....                             | 91 |
| <b>Tabla 29.</b> Análisis de parentesco en las tres poblaciones de <i>C. scaber</i> . ....                        | 93 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabla 30.</b> Prueba de neutralidad Fu en las tres poblaciones de <i>C. scaber</i> ..                  | 94  |
| <b>Tabla 31.</b> Prueba de mis match en <i>C. scaber</i> .  | 95  |
| <b>Tabla 32.</b> ANOVA factorial de la inhibición de $\alpha$ -glucosidasa en <i>C. scaber</i> .          | 97  |
| <b>Tabla 33.</b> Media, DS del porcentaje de inhibición y $C_{150}$ por población de <i>C. scaber</i> .   | 97  |
| <b>Tabla 34.</b> ACC entre fenotipos y genotipos de <i>C. scaber</i> .                                    | 100 |
| <b>Tabla 35.</b> ACC entre variables fenotípicas y geográficas en <i>C. scaber</i> .                      | 101 |
| <b>Tabla 36.</b> ACC entre variables fenotípicas, genotípicas y geográficas de <i>C. scaber</i> .         | 103 |
| <b>Tabla 37.</b> AFD de las siete poblaciones de <i>T. stans</i> .  | 108 |
| <b>Tabla 38.</b> Distancias de Mahalanobis entre pares de poblaciones de <i>T. stans</i>                  | 110 |
| <b>Tabla 39.</b> Matriz de asignación correcta de los individuos de <i>T. stans</i> .                     | 110 |
| <b>Tabla 40.</b> ANOVA anidado de las nueve variables morfológicas de <i>T. stans</i> .                   | 111 |
| <b>Tabla 41.</b> Sumario de diversidad genética para las siete poblaciones de <i>T. stans</i>             | 113 |
| <b>Tabla 42.</b> Índices de diversidad genética por grupos en <i>T. stans</i> .                           | 114 |
| <b>Tabla 43.</b> Análisis de parentesco en las tres poblaciones de <i>T. stans</i> .                      | 118 |
| <b>Tabla 44.</b> Prueba de neutralidad para las poblaciones silvestres de <i>T. stans</i> .               | 118 |
| <b>Tabla 45.</b> Distribución mismatch de las poblaciones silvestres de <i>T. stans</i> ..                | 120 |
| <b>Tabla 46.</b> Media y e.e del porcentaje de Inhibición de $\alpha$ -glucosidasa <i>T. stans</i> .      | 122 |
| <b>Tabla 47.</b> ANOVA factorial de los datos de inhibición de $\alpha$ -glucosidasa de <i>T. stans</i> . | 123 |
| <b>Tabla 48.</b> Media y Ds de la inhibición de $\alpha$ -glucosidasa en <i>T. stans</i> .                | 124 |
| <b>Tabla 49.</b> $C_{150}$ y promedio en la inhibición de $\alpha$ -glucosidasa de <i>T. stans</i> .      | 125 |
| <b>Tabla 50.</b> AFD con los tres tipos de datos de <i>T. stans</i> .                                     | 128 |
| <b>Tabla 51.</b> ACC entre genotipos, fenotipos y las variables geográficas de <i>T. stans</i> .          | 130 |
| <b>Tabla 52.</b> ANOVA factorial para las tres especies en la inhibición de $\alpha$ -glucosidasa         | 132 |



## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Árbol femenino de <i>Cecropia obtusifolia</i> .....   | 29 |
| <b>Figura 2.</b> Distribución de <i>C. obtusifolia</i> .....   | 30 |
| <b>Figura 3.</b> Algunos constituyentes de <i>C. obtusifolia</i> .....   | 31 |
| <b>Figura 4.</b> Una planta de <i>Costus scaber</i> .....  | 32 |
| <b>Figura 5.</b> Distribución de <i>C. scaber</i> .....  | 33 |
| <b>Figura 6.</b> Algunos constituyentes químicos de <i>C. scaber</i> .....   | 34 |
| <b>Figura 7.</b> Una planta de <i>T. stans</i> .....   | 35 |
| <b>Figura 8.</b> Distribución de <i>T. stans</i> .....   | 36 |
| <b>Figura 9.</b> Algunos constituyentes químicos de <i>T. stans</i> .....  | 37 |
| <b>Figura 10.</b> Caracteres morfológicos medidos en <i>C. obtusifolia</i> , <i>C. scaber</i> y <i>T. stans</i> .....            | 40 |
| <b>Figura 11.</b> AFD de <i>C. obtusifolia</i> con las diez variables morfológicas. ....   | 51 |
| <b>Figura 12.</b> AFD entre sexos de <i>C. obtusifolia</i> .....   | 54 |
| <b>Figura 13.</b> AFD de los individuos femeninos de <i>C. obtusifolia</i> .....   | 56 |
| <b>Figura 14.</b> AFD de los individuos masculinos de <i>C. obtusifolia</i> .....  | 58 |
| <b>Figura 15.</b> Estadísticos F de Wright de <i>C. obtusifolia</i> .....  | 60 |
| <b>Figura 16.</b> Distribución alélica por locus de <i>C. obtusifolia</i> con respecto a la latitud. ....                        | 62 |
| <b>Figura 17.</b> Distribución alélica por locus de <i>C. obtusifolia</i> en relacion con la longitud. ....                      | 63 |
| <b>Figura 18.</b> Distribución alélica por locus <i>C. obtusifolia</i> con respecto a la altitud. ....                           | 64 |
| <b>Figura 19.</b> Porcentaje de inhibición de $\alpha$ -glucosidasa por localidad en <i>C. obtusifolia</i> .....                 | 67 |
| <b>Figura 20.</b> Porcentaje de inhibición de $\alpha$ -glucosidasa por individuo en <i>C. obtusifolia</i> .....                 | 67 |
| <b>Figura 21.</b> Porcentaje de inhibición de los extractos etanólicos de <i>C. obtusifolia</i> por sexos...                     | 68 |
| <b>Figura 22.</b> $Cl_{50}$ en los individuos femeninos y masculinos de <i>C. obtusifolia</i> .....                              | 68 |
| <b>Figura 23.</b> Inhibición de $\alpha$ -glucosidasa por sexo en las tres localidades de <i>C. obtusifolia</i> .....            | 70 |
| <b>Figura 24.</b> ACC entre datos genéticos y morfológicos de los arboles masculinos de <i>C. obtusifolia</i> .....              | 72 |
| <b>Figura 25.</b> ACC entre datos genéticos, fenotípicos y geográficos en arboles masculinos de <i>C. obtusifolia</i> .....      | 75 |
| <b>Figura 26.</b> ACC entre genotipos e inhibición de $\alpha$ -glucosidasa en arboles masculinos de <i>C. obtusifolia</i> ..... | 76 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 27.</b> ACC entre fenotipos y datos geográficos de los arboles femeninos de <i>C. obtusifolia</i> . | 77  |
| <b>Figura 28.</b> ACC entre el porcentaje de inhibición y datos geográficos en <i>C. obtusifolia</i>          | 79  |
| <b>Figura 29.</b> AFD de <i>C. scaber</i> con las variables morfológicas.                                     | 87  |
| <b>Figura 30.</b> Estadísticos F de Wright en <i>C. scaber</i> .  | 91  |
| <b>Figura 31.</b> Análisis de asignación bayesiana para <i>C. scaber</i> .                                    | 92  |
| <b>Figura 32.</b> Dendrograma UPGMA de las tres poblaciones de <i>C. scaber</i> .                             | 92  |
| <b>Figura 33.</b> Relaciones genotípicas entre los individuos de las poblaciones de <i>C. scaber</i> .        | 93  |
| <b>Figura 34.</b> Distribución mismatch por cada una de las poblaciones de <i>C. scaber</i>                   | 96  |
| <b>Figura 35.</b> Porcentaje de inhibición en las tres localidades de <i>C. scaber</i> .                      | 98  |
| <b>Figura 36.</b> Porcentaje de inhibición por individuo en <i>C. scaber</i> .                                | 99  |
| <b>Figura 37.</b> ACC entre variables genéticas y morfológicas de <i>C. scaber</i> .                          | 100 |
| <b>Figura 38.</b> ACC entre fenotipos y las variables geográficas de <i>C. scaber</i> .                       | 102 |
| <b>Figura 39.</b> ACC entre fenotipos, genotipo y variables geográficas en <i>C. scaber</i> .                 | 104 |
| <b>Figura 40.</b> AFD de <i>T. stans</i> con las diez variables morfológicas.                                 | 109 |
| <b>Figura 41.</b> Dendrograma de UPGMA entre grupos de <i>T. stans</i> .                                      | 115 |
| <b>Figura 42.</b> Análisis de asignación bayesiana para <i>T. stans</i> .                                     | 116 |
| <b>Figura 43.</b> Relaciones genotípicas entre los individuos de <i>T. stans</i> .                            | 117 |
| <b>Figura 44.</b> Distribución mismatch por población en <i>T. stans</i> .                                    | 121 |
| <b>Figura 45.</b> Porcentaje de inhibición de <i>T. stans</i> a diferentes concentraciones.                   | 123 |
| <b>Figura 46.</b> Porcentaje de inhibición para las siete poblaciones de <i>T. stans</i> .                    | 125 |
| <b>Figura 47.</b> Porcentaje de inhibición de alfa glucosidasa por individuo en <i>T. stans</i> .             | 126 |
| <b>Figura 48.</b> Dendrograma de distancias genéticas versus morfológicas de <i>T. stans</i> .                | 127 |
| <b>Figura 49.</b> Prueba de Mantel entre las variables morfológicas y genéticas en <i>T. stans</i> .          | 127 |
| <b>Figura 50.</b> AFD con datos fenotípicos y genéticos de <i>T. stans</i> .                                  | 129 |
| <b>Figura 51.</b> ACC entre genotipos, fenotipos y las variables geográficas de <i>T. stans</i> .             | 131 |

## Resumen

La diabetes es una enfermedad crónica de causas múltiples y considerada como un padecimiento de alto costo. En México cerca del 10% del gasto en salud, es destinado a la atención de esta enfermedad y sus complicaciones. Existen tres tipos de diabetes: tipo 1 (DMT1) conocida como diabetes insulina dependientes o juvenil (DMID), tipo 2 (DMT2) y diabetes gestacional (DMG). Dado que las plantas son consideradas como una fuente potencial de sustancias químicas con diferentes actividades en los organismos, y que la flora medicinal del estado de Hidalgo posee un gran número de especies. Es necesario contar con productos capaces de tratar enfermedades tales como la diabetes. Por lo que este estudio tuvo como objetivo caracterizar tres especies de plantas medicinales (*Cecropia obtusifolia* n=24, *Costus scaber* n=24 y *Tecoma stans* n=50), mediante su morfología, información genética (microsatélites) e inhibición de alfa glucosidasa ( $\alpha$ -glucosidasa) para identificar los mejores genotipos con potencial antidiabético. Las cuales se analizaron con estadística multivariada (análisis de funciones discriminates, y análisis de varianza anidada), pruebas de Tukey, análisis de varianza factorial y análisis de genética de poblaciones.

Los resultados obtenidos en general indican que las tres especies vegetales presentaron una alta plasticidad fenotípica y genética, que les permite adaptarse a las diferentes presiones de selección y a cambios ambientales. Además, mantienen un alto flujo genético entre poblaciones, lo que indica poca diferenciación y a su vez comportarse como una población panmictica. El potencial de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa de las tres especies de plantas medicinales es un factor dependiente de la localidad, de los genotipos y de la concentración de los extractos etanólicos y así como del factor tiempo. Por lo que la concentración de inhibición del cincuenta por ciento de la actividad enzimática ( $CI_{50}$ ) difiere entre localidades. La  $CI_{50}$  para las tres especies fue menor comparada con el medicamento comercial acarbose ( $CI_{50} = 167.45 \mu\text{g/mL}$ ). Lo que demuestra que estas plantas pueden ser utilizadas para tratar diabetes.

De igual manera, se encontró que existe una correlación entre las variables morfológicas y el porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa con los datos genéticos, que a su vez se correlacionaron de manera significativa con las variables geográficas. Lo que indica que las características fenotípicas se deben a una interacción del genotipo con el ambiente.

La especie con mayor actividad de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa fue *T. stans* (65%), sin embargo se debe considerar otros factores como: los individuos (genotipos), el factor localidad, la concentración y el factor tiempo. Así como, la biología de las especies (sexo, eventos reproductivos, edad, etc.). Además, los mecanismos micro evolutivos pueden influir sobre la actividad y contenido de metabolitos secundarios de las plantas medicinales, como fue el caso de *C. scaber*, donde el flujo genético en algunos casos tiende a homogeneizar el potencial de inhibición en  $\alpha$ -glucosidasa, posiblemente debido a que sus constituyentes químicos se encuentran en cantidades semejantes en la mayoría de sus individuos.

## INTRODUCCIÓN

La *Diabetes mellitus* (DM), se define como un desorden metabólico complejo que aparece cuando el páncreas no produce suficiente insulina o cuando el organismo no es capaz de utilizarla eficazmente y este padecimiento se caracteriza por un incremento de los niveles de glucosa en sangre (Sancheti *et al.*, 2009<sup>233</sup>, Din *et al.*, 2011<sup>62</sup>, Manaharan *et al.*, 2012<sup>157</sup>; Ahmed *et al.*, 2012<sup>11</sup>).

Existen tres tipos de diabetes: **Diabetes mellitus tipo 1** (DM1) también conocida como diabetes mellitus insulino dependientes o juvenil (DMID), presenta una destrucción autoinmune de las células  $\beta$ , lo cual origina una deficiencia de insulina y una tendencia a cetoacidosis. **Diabetes mellitus tipo 2** (DM2) es la más común y con frecuencia se asocia con obesidad, se origina por una resistencia a la insulina acompañada con una deficiencia de esta hormona. **Diabetes mellitus gestacional** (DMG) agrupa específicamente la intolerancia a la glucosa durante el embarazo (Ahmed *et al.*, 2012)<sup>11</sup>.

La diabetes es una de las mayores emergencias mundiales de salud ,además es considera como una epidemia que afecta aproximadamente a 346 millones de personas. En México existen alrededor de 10.3 millones de diabéticos (Instituto Mexicano del Seguro Social, IMSS, 2010<sup>118</sup>; Federación Internacional de Diabetes, IFD, 2012<sup>120</sup>), por lo que se encuentra entre los diez primeros países con mayor número de diabéticos según la Federación Internacional de Diabetes (Alexiou y Demopoulos, 2010<sup>15</sup>; Scully, 2012<sup>239</sup>).

En el estado de Hidalgo, México, la diabetes es uno de los mayores retos que enfrenta el Sistema de Salud Estatal. En el 2012 fue la primera causa de mortalidad, ocasionó una mayor demanda de atención en consulta externa y de hospitalización. Además es una de las enfermedades a las que se le asigna un alto porcentaje del gasto público (Secretaría de Salud y Servicios de Salud de Hidalgo, 2011-2016)<sup>240</sup>.

Los tratamientos actualmente disponibles para la diabetes incluyen insulina y diversos agentes antidiabéticos orales tales como sulfonilureas, biguanidas, inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa y glinidinas, cuyos beneficios son indudables, pero algunos de estos productos producen efectos adversos como acidosis láctica, dolor abdominal, náuseas y diarrea (Garber *et al.*, 1997<sup>83</sup>; Nasri and Rafieian-Kopaei, 2014<sup>182</sup>). Además, de que, en los países en vías de desarrollo estos productos tienen un alto costo y lo que los hace poco accesibles al público, lo

que ocasiona una gran carga económica para los individuos y sus familias, así como para los sistemas sanitarios nacionales. Actualmente, existe un interés en la búsqueda de alternativas para el manejo de la diabetes, como lo son los medicamentos herbolarios (MH) que tienen como base a las plantas medicinales, muchas de las cuales han sido descritas en la literatura científica como antidiabéticas (Giovannini et al., 2016<sup>88</sup>; Singab et al., 2014<sup>245</sup>; Patel et al., 2012c<sup>200</sup>).

En México se utilizan 326 especies de plantas para el control de diabetes (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005)<sup>20</sup>, con lo cual pueden ayudar a disminuir algunas de sus complicaciones microvasculares (retinopatía, neuropatía y nefropatía) y macrovasculares (principalmente enfermedades arteria-coronarias, infartos de miocardio, cetoacidosis diabética y coma diabético). Por lo que la DM se ha convertido en una de las principales enfermedades con múltiples desordenes en el metabolismo de lípidos y proteínas (Ahmed, 2009<sup>10</sup>; Ahmed y Uroo, 2010<sup>9</sup>; Ahmad *et al.*, 2014<sup>8</sup>).

En los últimos años, los fármacos modernos han sustituido a los medicamentos herbolarios, considerándolos como poco seguros o como carentes de las pruebas científicas que se exigen actualmente (Ramanathan, 2000<sup>216</sup>; Kumar *et al.*, 2011<sup>144</sup>; Gurudeeban *et al.*, 2012<sup>103</sup>). Sin embargo, a nivel mundial se está llevando a cabo una búsqueda incesante de nuevos tratamientos provenientes de plantas medicinales para tratar problemas relacionados con las principales causas de muerte como diabetes, enfermedades del corazón y cáncer (Cowan, 1999<sup>57</sup>; Sujatha y Shalin, 2012<sup>255</sup>).

Las diferencias en los componentes químicos de las plantas pueden afectar la calidad de los productos farmacéuticos y la estandarización de la medicina tradicional. Aunado a lo anterior, la calidad de la materia prima de una planta medicinal depende significativamente de los factores intrínsecos (variación genética) y extrínsecos (condiciones ambientales, métodos de colecta, cultivo, procesamiento que se realiza antes y después de la cosecha, transportación y prácticas de almacenamiento). Por lo que es necesario estimar la variación de los componentes químicos y variables ambientales relacionadas con la diversidad genética de las plantas medicinales (Hu *et al.*, 2007)<sup>115</sup>.

A medida que los mecanismos de defensa de las plantas se fueron perfeccionando, originó una amplia variedad de mecanismos de defensa hacia agentes herbívoros, fúngicos,

bacterianos y virus. Esta amplia diversidad de productos naturales de origen vegetal tiene más importancia desde el punto de vista medicinal para el descubrimiento de nuevos compuestos farmacéuticos (Herrmann *et al.*, 2011<sup>110</sup>; Abdel-Monein, 2015<sup>5</sup>).

Aunado a lo anterior, se están identificando químicamente principios activos (son sustancias que se encuentran en las distintas partes de las plantas que a su vez alteran o modifican el funcionamiento de órganos o sistemas del cuerpo humano y animal) de numerosas plantas u otros organismos naturales utilizados como medios curativos. Entre los principios activos más importantes desde el punto de vista de la salud, destacan: los alcaloides, flavonoides, saponinas y taninos (Cowan, 1999)<sup>57</sup>.

Las plantas medicinales con actividad antidiabética pueden ser una fuente importante para la obtención de nuevos productos orales hipoglucémicos en la industria farmacéutica (McCune y Johns, 2002<sup>163</sup>; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005<sup>20</sup>; Torres *et al.*, 2013<sup>266</sup>).

El objetivo de este trabajo fue evaluar especies de la flora del estado de Hidalgo mediante pruebas de inhibición enzimática de alfa glucosidasa para obtener productos verdes como una alternativa para tratar la diabetes, así como proporcionar información sobre su diversidad genética para promover la conservación de las plantas medicinales y su fitomejoramiento.

## **ANTECEDENTES**

### **Historia de la Diabetes mellitus (DM)**

En 1862, George Ebers descubrió en una tumba de Tebas, en Egipto, un papiro escrito aproximadamente en el año 1550 AD, que describía una enfermedad caracterizada por la emisión abundante de orina y en cuyo tratamiento se recomendaba el uso de extractos de plantas. Otras civilizaciones como los hindúes y los chinos hicieron descripciones de los padecimientos de esta enfermedad, aunque el término de diabetes se debe a Aretaeos de Capadocia en el siglo II A.D (Carretero-Rodrigo, 2000<sup>44</sup>).

En 1869 Paul Langerhans descubrió en el páncreas unas pequeñas islas, independientes del resto de la estructura de la glándula, pero no explicó cuál era su función. En julio de 1921, Banting y Best lograron disminuir la glucemia de 400 mg/dl a 100 mg/dl en 8 horas a la perra “Marjory”, inyectándole un extracto pancreático y obteniendo, por ello, el premio Nobel de Medicina en el año de 1925. Estos fueron los primeros pasos que llevaron a la utilización de la insulina en el tratamiento de la enfermedad (Carretero-Rodrigo, 2000<sup>44</sup>; Requejo y Ortega, 2000<sup>220</sup> y Torres *et al.*, 2013<sup>266</sup>).

Algunas de las complicaciones de la DM a largo plazo se encuentran la disminución del funcionamiento en varios órganos, especialmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos. En el desarrollo de la DM están involucrados varios procesos patológicos, los cuales van desde la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas, acompañada de una deficiencia en la secreción de insulina (hormona producida por grupos de células denominadas islotes, situados dentro del páncreas, cuya función es la de regular los niveles de azúcar en la sangre (Klug y Cummings, 1999<sup>140</sup>, Prabhakar y Doble, 2008<sup>211</sup>), hasta la generación de resistencia a la insulina. Por lo que origina alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas debido a la falta de insulina en los tejidos muscular, adiposo y hepático (Expert Committee, 2003a<sup>71</sup>; Banderas-Rodante, 2006<sup>30</sup>; OMS, 2012<sup>191</sup>).

### **Síntomas de la DM**

La DM presenta síntomas característicos tales como: sed intensa (polidipsia), micción frecuente y abundante (poliuria), pérdida de peso, algunas veces con gran apetito (polifagia), visión borrosa, náuseas, vómito, debilidad o cansancio excesivo, altas concentraciones de glucosa en sangre y en orina, incremento en la susceptibilidad a enfermedades e infecciones,



tales como vaginitis, irritabilidad, apatía, impotencia (en hombres) y cetoacidosis (acumulación de cetonas en el torrente sanguíneo), como consecuencia de la utilización de ácidos grasos en lugar de glucosa, y que incrementa la acidez en la sangre (Bilous y Donnelly, 2010<sup>36</sup>; OMS, 2012<sup>191</sup>).

Las complicaciones a largo plazo de la DM se encuentran un desarrollo progresivo de deficiencia vasculares (macro y microvasculares). Las anormalidades macrovasculares producen aterosclerosis, con un aumento en enfermedades cerebrovasculares e infarto de miocardio. Las afecciones neuropatológicas afectan al sistema nervioso autónomo y nervios periféricos. Así como también daños en las extremidades y producir ulceración crónica, comúnmente conocido como pie diabético (Kalailingam *et al.*, 2013)<sup>124</sup>.

Las anormalidades microvasculares comprenden cicatrización proliferativa de la retina (retinopatía diabética) y enfermedad renal (nefropatía diabética). Las complicaciones microvasculares se explican en gran parte por la hiperglucemia crónica. Los pacientes con DM tienen alta incidencia de enfermedades ateroscleróticas cardiovasculares, vasculares periféricas y cerebrovasculares; frecuentemente hipertensión, alteraciones en el metabolismo de lipoproteínas y enfermedades dentales (Abdel-Monein y Fayez, 2015)<sup>5</sup>.

### **Clasificación de la DM**

Existen tres tipos de diabetes (DM tipo 1, DM tipo 2 y DM gestacional), las cuales se distinguen por su sintomatología:

#### **a) Diabetes mellitus tipo 1 (DM 1)**

La DM1 se subdivide en DM T1a que presenta una destrucción autoinmune de las células  $\beta$  como resultado de una deficiencia en la utilización de insulina. Diabetes tipo 1b conocida como diabetes idiofática. Algunas enfermedades autoinmunes pueden estar asociadas con este tipo de diabetes (Enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto y la enfermedad de Addison) no se conocen las bases etológicas de este tipo de diabetes (Ahmed *et al.*, 2012)<sup>11</sup>.

#### **b) Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)**

Es el tipo de diabetes más común y es conocida como no dependientes de insulina. Este tipo de diabetes se caracteriza por un desorden en la secreción o resistencia a la insulina. En poblaciones desarrolladas afecta entre el 5 a 7% de su población. Se asocia con obesidad, se

origina por una resistencia a la insulina acompañada con una deficiencia de la hormona, hasta un progresivo defecto de su secreción (Patel *et al.*, 2012a<sup>198</sup>; Abdel-Monein y Fayez, 2015<sup>5</sup>).

### **c) Diabetes mellitus gestacional (DMG)**

Agrupar específicamente la intolerancia a la glucosa durante el embarazo (Ahmed *et al.*, 2012<sup>11</sup>). La definición aplica sin tomar en cuenta si la administración de insulina o sólo la modificación en la dieta se usan para el tratamiento o si la condición persiste después del embarazo. Seis meses después del término del embarazo la paciente debe realizar una nueva prueba para ser diagnosticada (Banderas-Dorantes, 2006<sup>30</sup>; Abdel-Monein y Fayez, 2015<sup>5</sup>).

### **d) Otros tipos específicos DM**

#### **I. Efectos genéticos de las células $\beta$ pancreáticas**

Por mutaciones en el cromosoma 12 en el factor de transcripción hepático (factor nuclear de hepatocitos HNF-1-alfa). Por mutaciones en el gen que codifica a glucosidasa, en el cromosoma 7p produciendo una deficiencia en la molécula de glucosidasa (la glucosidasa hepática es una enzima que convierte la glucosa en glucosa-6-fosfato en la vía metabólica glucólisis), que estimula la secreción de insulina por parte de las células  $\beta$  pancreáticas y de esta manera incrementa los niveles de glucosa plasmática (Expert Committee, 2003b<sup>72</sup>; Banderas-Dorantes, 2006<sup>30</sup>).

#### **II. Defectos genéticos en la acción de la insulina**

En el pasado este síndrome era llamado resistencia a insulina tipo A. Las alteraciones metabólicas asociadas con mutaciones en el receptor de insulina abarcan desde hiperinsulinemia, hiperglucemia moderada hasta diabetes severa (Riddle, 2008)<sup>223</sup>.

### **Diagnóstico de la DM**

Existen diferentes tipos de pruebas para diagnosticar diabetes, entre las cuales se encuentran: la glucosa plasmática en ayuno (FPG del inglés *fasting plasme glucose*), prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT del inglés *oral glucose tolerance test*), hemoglobina glucosilada (HbA1c o A1C) (Bilous y Donnelly, 2010;<sup>36</sup> Banderas-Dorantes, 2006<sup>30</sup>).

Estas pruebas requieren una pequeña muestra sanguínea obtenida mediante el picar la yema de un dedo con una lanceta. La glucosa plasmática se determina usando tiras reactivas y un aparato para la determinación cuantitativa de la glucosa en sangre. Las tres maneras de emitir un diagnóstico positivo para diabetes son los siguientes:

Una concentración de glucosa plasmática  $\geq$  a 200 mg/dL (11.1 mmol/L), que los niveles de glucosa plasmática en ayuno (ausencia de ingesta de calorías en un periodo mínimo de 8 horas)  $\geq$  126 mg/dL (7.0 mmol/L). Presentar una concentración  $\geq$  a 200 mg/dL (11.1 mmol/L) durante la prueba de tolerancia oral a la glucosa, después de dos horas de ingerir 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua. (Expert-Committee, 2003a<sup>71</sup>; Bilous y Donnelly, 2010<sup>36</sup>).

### **Problemática de la diabetes a nivel mundial**

La Diabetes mellitus es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, esto debido principalmente a que en los países industrializados afecta entre el 6 y 20% de la población. En el año 2000 a nivel mundial el número de personas con diabetes fue de 150 millones, se ha estimado que para el 2030 el número de personas afectadas con este padecimiento será aproximadamente 350 millones (Whiting *et al.*, 2011)<sup>291</sup>. Lo cual, originará un alto índice de mortalidad y las personas afectadas presentarán una pérdida de salud debido a complicaciones en corazón, riñón y ojos (Requejo y Ortega, 2000<sup>220</sup>; Alexiou y Demopoulos, 2010<sup>14</sup>; Fazil-Ahmed *et al.*, 2010<sup>74</sup>; Torres *et al.*, 2013<sup>266</sup>).

Cada año se producen en el mundo aproximadamente 4 millones de muertes a causa de la diabetes, y a nivel mundial se calculó que el gasto en salud por atención de este padecimiento y sus complicaciones fue alrededor de 410 mil millones de dólares (OMS, 2012)<sup>191</sup>.

En México, la población de diabéticos oscila entre 6.5 y 10 millones (Federación Mexicana de Diabetes 2010 (FMD)<sup>75</sup>; Whiting *et al.*, 2011<sup>291</sup>; Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANU, 2012<sup>68</sup>). La DM es una de las enfermedades que necesita una alta inversión del gasto público, por lo que en el 2010 los gastos en atención de la diabetes y sus complicaciones fue alrededor de 778.5 millones de dólares (Hernández-Ávila *et al.*, 2013<sup>106</sup>). En Hidalgo existen aproximadamente 63 mil diabéticos, por lo que de esta manera en el 2012 se catalogó como la principal causa de muerte en 40 municipios del estado. Los municipios Cardonal, Tenango de Doria y Alfajayucan fueron los que presentaron un mayor índice de mortalidad (ENSANU, 2012)<sup>68</sup>.

### **Control de la DMT2**

Los principales objetivos del control de la DM son: 1) mantener la concentración de glucosa en sangre, así como de lípidos y lipoproteínas, en rangos normales o cercanos a éstos

(FPG < 110 mg/dL, OGTT < 140 mg/dL) con el propósito de reducir los riesgos de las complicaciones vasculares de la DM, 2) prevenir y tratar las complicaciones de la DM mediante la modificación del stilo de vida, 3) administración de insulina o antidiabéticos orales cuando la dieta o el ejercicio no son suficientes para reducir la glucemia (Mayer, 1991)<sup>162</sup>. De esta manera, los pilares del tratamiento del diabético son: régimen dietético, ejercicio, educación del paciente y tratamiento farmacológico (Govindappa, 2015)<sup>96</sup>.

### **I. Modificación del estilo de vida**

El punto de partida y el tratamiento para controlar la DMT2 es dieta y otras modificaciones de estilo de vida, tales como, incremento de ejercicio y dejar de fumar. Los objetivos en pacientes con obesidad es la reducción de peso y mejorar el control de glucosa, así como reducir los riesgos de enfermedades cardiovasculares, tales como hiperlipidemia e hipertensión (Bilous y Donnelly, 2010<sup>36</sup>; Govindappa, 2015<sup>96</sup>; Migdal *et al.*, 2017<sup>168</sup>).

### **II. Dieta**

Con la dieta se propone mantener o disminuir el peso corporal de los pacientes en los límites fisiológicos. Por lo que, es necesario ingerir alimentos en pequeñas cantidades a lo largo de todo el día para no sobrepasar la capacidad metabólica de la insulina; es decir, minimizar la cantidad de calorías y evitar el consumo de alimentos ricos en lípidos y proteínas, por lo que debe de estar relacionados con la actividad física del paciente (van Dam, 2006<sup>276</sup>; Maryniuk y Christian, 2008<sup>160</sup>; Bilous y Donnelly, 2010<sup>36</sup>; Bisht *et al.*, 2013<sup>37</sup>).

### **III. Ejercicio**

El ejercicio juega un papel muy importante en el control de la DM2, debido a que permite la disminución de la concentración de glucosa plasmática y ayuda a que la insulina trabaje de una manera más eficiente, además de la disminución de peso corporal; el ejercicio, también incrementa la salud cardiovascular, mejora la presión sanguínea y reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Banderas-Dorantes, 2006<sup>30</sup>; Consitt *et al.*, 2008<sup>53</sup>; Bilous y Donnelly, 2010<sup>36</sup>).

### **IV. Tratamientos farmacológicos**

Cuando la dieta y el ejercicio no son suficientes para controlar los niveles de glucosa, se inicia una etapa de medicación. Actualmente se encuentran disponibles una gran cantidad de medicamentos anti hiperglucémicos orales e inyectables. Los medicamentos para los

pacientes con DMT2 se incluyen, los sensibilizadores de insulina (biguanidinas como metformina y tiazolideinedionas), los agentes que retardan la absorción de carbohidratos en el intestino delgado (inhibidores de alfa glucosidasa) y secretores de insulina (sulfonilureas, antagonistas GLP-1 e inhibidores de DPP-4) (Scapin, 2008<sup>237</sup>; Bisht *et al.*, 2013<sup>37</sup>; Migdal *et al.*, 2017<sup>168</sup>).

#### **a) Insulina**

La insulina es liberada por de las células  $\beta$  pancreáticas de los islotes de Langerhans en respuesta a altas concentraciones del trifosfato de adenosina (ATP), glucosa, manosa, leucina y arginina. La liberación de insulina por la acción de glucosa es resultado de un estado de hiperglucemia que incrementa los valores intracelulares de ATP, que provoca el bloqueo de los canales de potasio dependientes de ATP (KATP) (Banderas-Dorantes, 2006<sup>30</sup>; Riddle, 2008<sup>223</sup>). Lo que produce la disminución de la corriente de potasio con la despolarización de las células  $\beta$  y la apertura de los conductos de calcio. El aumento de calcio intracelular desencadena la secreción de insulina, para que se una a los receptores de la membrana de músculo, adipocitos y hepatocitos con el objetivo de introducir la glucosa a las células y, en caso de un exceso, almacenarla en forma de glucógeno (Doyle y Egan, 2003<sup>63</sup>).

#### **b) Hipoglucemiantes orales**

Algunos de los medicamentos orales más usados en el tratamiento de DMT2 se encuentran biguanidinas, inhibidores de alfa glucosidasa, derivados de tiazolidinediona y sulfonilureas, que tienen diferentes funciones y mecanismos de acción en los pacientes diabéticos (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Clasificación de los medicamentos más usados en el tratamiento de diabetes tipo 2.

| Categoría                       | Medicamento   | Función  | Mecanismo de acción   |
|---------------------------------|---|--|---|
| Sulfonilureas                   | Glibenclamida   | Incrementa la secreción de insulina.   | Células $\beta$ -pancreáticas   |
| Biguanidinas                    | Metformina  | Aumenta la sensibilidad a la insulina en tejido hepático y periférico.   | Reduce la resistencia a la insulina. Así como en la reducción en la salida de glucosa hepática. Activa la proteincinasa activada por adenosina monofosfato (AMPK) hepática y muscular Promueve la oxidación de los ácidos grasos. |
| Derivados de tiazolidinedionas  | glitazonas<br>ciglitazona,<br>englitazona,<br>pioglitazona,<br>troglitazona y<br>rosiglitazona. | Disminución de la resistencia a insulina.  | Son agonistas del receptor de proliferación peroxisoma gama (PPAR $\gamma$ ).   |
| Inhibidores de alfa glucosidasa | Miglitol  | Disminuye la absorción de disacáridos (maltosa y sacarosa) en las microvellosidades de la mucosa intestinal (principalmente en el yeyuno). | Inhibe $\alpha$ -1,4-glucosidasa del intestino delgado.   |
|                                 | Acarbosa  | Disminuye la absorción de carbohidratos.   | Inhibe alfa glucosidasa en el intestino.  |

\*Tomada de Bilous y Donnelly, 2010<sup>36</sup>.

### c) Inhibidores de alfa glucosidasa ( $\alpha$ -glucosidasa)

#### 1) $\alpha$ -glucosidasa

Son enzimas que hidrolizan glucósidos utilizando como sustrato metil  $\alpha$ -D-glucopiranosido (Lehninger, 1995)<sup>145</sup>. Estas enzimas se encuentran en las microvellosidades de la pared del intestino delgado (Ebadi, 2007)<sup>64</sup>, su función principal es catalizar el paso final en la digestión de carbohidratos (Sivasothy *et al.*, 2015)<sup>246</sup>. Se clasifica en  $\alpha$ -1,1-,  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,4- y  $\alpha$ -1,6-glucosidasa.  $\alpha$ -1,4- glucosidasa puede ser aislada de diversos organismos (Hulin, 1994<sup>117</sup>; Pagano *et al.*, 1995<sup>195</sup>; Minatoguchi *et al.*, 1999<sup>170</sup>; Yamamoto *et al.*, 2004<sup>299</sup>). De acuerdo con Ota y colaboradores (2009)<sup>193</sup> las enzimas presentan características específicas de acuerdo al sustrato, temperatura y pH (Tabla 2).

**Tabla 2.** Tipos de  $\alpha$ -glucosidasa y sus requerimientos de pH y temperatura (T).

| Organismo                          | pH        | T (°C) | Referencia                                     |
|------------------------------------|-----------|--------|--|
| <i>Aspergillus niger</i>           | 4.5       | 40     | (Kim <i>et al.</i> , 2005) <sup>133</sup>      |
| <i>Bacillus stearothermophilus</i> | 6.8       | 37     | (Tagami <i>et al.</i> , 2013) <sup>260</sup>   |
| <i>Candida tsukubaensis</i>        | 2.4 – 4.8 | 55     | (Kinsella <i>et al.</i> , 1991) <sup>136</sup> |
| <i>Oryza sativa</i>                | 4         | 37     | (Nakai <i>et al.</i> , 2007) <sup>180</sup>    |
| <i>Rhizopus</i> sp.                | 6         | 37     | (Chen <i>et al.</i> , 2012b) <sup>50</sup>     |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>    | 6.8       | 37     | (Elya <i>et al.</i> , 2012) <sup>68</sup>      |
| <i>S. cerevisiae</i> (maltosa)     | 6.4 – 6.8 | 40     | (Frandsen <i>et al.</i> , 2002) <sup>79</sup>  |

Por lo que es importante tener en cuenta la concentración final de  $\alpha$ -glucosidasa, durante el ensayo de evaluación de actividad inhibitoria. De acuerdo con la literatura, las concentraciones requeridas de  $\alpha$ -glucosidasa, cambian con respecto al solvente de los extractos vegetales

**Tabla 3.** Concentraciones de  $\alpha$ -glucosidasa utilizadas en ensayos de inhibición a partir de extractos crudos vegetales donde AcEt= acetato de etilo.

| Alfa glucosidasa     | Concentración(U/mL) | Extracto evaluado | Referencia                                    |
|----------------------|---------------------|-------------------|---|
|                      | 0.1                 | Etanol-agua (8:2) | (Kim <i>et al.</i> , 2011) <sup>132</sup>     |
|                      | 0.6                 | Etanol-agua (5:5) | (Lordan <i>et al.</i> , 2013) <sup>152</sup>  |
| <i>S. cerevisiae</i> | 1                   | Etanol            | (Shai <i>et al.</i> , 2010) <sup>241</sup>    |
|                      | 0.6                 | Acetona           | (Rubilar <i>et al.</i> , 2011) <sup>229</sup> |
|                      | 0.1                 | Hexano-AcEt (7:3) | (Damsud <i>et al.</i> , 2013) <sup>58</sup>   |

## **2) Inhibidores enzimáticos**

La inhibición enzimática es de gran importancia desde el punto de vista fisiológico, ya que a veces la inhibición de una sola enzima involucrada en varias reacciones metabólicas puede inhibir por completo a todo el proceso metabólico al que se encuentra asociado, puede ejercer un efecto irreversible sobre el organismo. La importancia de este fenómeno radica sobre sus aplicaciones en farmacología como anticancerígenos, anti-VIH (Pluempanupat *et al.*, 2007<sup>208</sup>; Garlapati *et al.*, 2013<sup>84</sup>), toxicología y en la agricultura (en el desarrollo de herbicidas e insecticidas). De ahí la importancia de realizar estudios sobre el mecanismo de acción de los inhibidores enzimáticos (Boyer, 1999)<sup>40</sup>.

La acción enzimática puede ser inhibida por la presencia de otros agentes químicos que se unen con las moléculas de la enzima; y los inhibidores enzimáticos se clasifican en dos categorías: reversibles e irreversibles, los cuales se unen mediante enlaces no covalentes, a su vez, se clasifican en tres categorías (competitivos, no competitivos e incompetivos (a competitivos), esta clasificación se base de acuerdo a la forma en la que interactúan los inhibidores con la enzima (Lehninger, 1995<sup>145</sup>; Boyer, 1999<sup>40</sup>).

**2.1) Inhibidores competitivos:** presentan una estructura similar a la del sustrato y se une en el sitio activo. Los inhibidores competitivos más eficaces son análogos del estado análogos del estado de transición (Lehninger, 1995<sup>145</sup>; Boyer, 1999<sup>40</sup>).

**2.2) Inhibidores no competitivos:** este tipo de inhibidores, se unen en una región distinta del sitio activo e interfieren con la función catalítica de la enzima (Lehninger, 1995<sup>145</sup>; Boyer, 1999<sup>40</sup>).



**2.3) Inhibidores incompetitivos o a competitivos:** El inhibidor no se combina con la enzima liberada ni afecta su reacción con el sustrato; sin embargo, el inhibidor se combina con el complejo enzima-sustrato para formar un nuevo complejo inactivo (enzima-sustrato-inhibidor), el cual no experimenta su transformación posterior en el producto habitual de la reacción (Lehninger, 1995)<sup>145</sup>.

#### **Principales inhibidores de $\alpha$ -glucosidasa**

Como se mencionó anteriormente existen diferentes inhibidores de  $\alpha$ -1-4-glucosidasa de origen microbiano y químico como miglitol (N-hidroxi-etil-1-deoxi-nojirimicina), acarbosa y voglibosa (Minatoguchi *et al.*, 1999<sup>170</sup>; Garlapati *et al.*, 2013<sup>84</sup>). Los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa, reducen la absorción de dextrina y disacáridos al inhabilitar la acción de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa en el intestino delgado, cuando existe un aumento de glucosa en sangre después de los alimentos, por lo que se reduce la absorción de carbohidratos en sujetos con diabetes (Ebadi, 2007)<sup>64</sup>.

Los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa no estimulan la secreción de insulina, por lo tanto, no hay un efecto hipoglucémico. Estos agentes pueden ser considerados como una monoterapia en los pacientes con una predominante hiperglucemia postprandial o en pacientes con prediabetes. Los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa, regularmente son utilizados en combinación con otros agentes antidiabéticos orales o insulina. Estos medicamentos pueden ser administrados antes de los alimentos y ser absorbidos rápidamente (Ebadi, 2007)<sup>64</sup>.

**Acarbosa** es un oligosacárido de origen microbiano y miglitol es un derivado de desoxinojirimicina y son un ejemplo claro de inhibidores competitivos de alfa-glucosidasa (Minatoguchi *et al.*, 1999<sup>170</sup>; Shai *et al.*, 2010<sup>241</sup>) con glucoamilasa y sucrosa, pero tienen poco efecto en alfa amilasa pancreática. Estos medicamentos reducen los niveles de glucosa en sangre en individuos con DMT1 y DMT2. Los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa, pueden ayudar a mejorar significativamente los niveles de glucosa en pacientes con DMT2 (Ebadi, 2007)<sup>64</sup>.

**Miglitol** es un inhibidor de alfa glucosidasa que disminuye la actividad de las enzimas que ayudan en la digestión de carbohidratos, de esta manera se reduce la utilización de carbohidratos después de ser ingeridos los alimentos, por lo que, se disminuye los niveles de glucosa postprandial en diabéticos. También, suele ser empleado en pacientes diabéticos no insulino dependientes (Minatoguchi *et al.*, 1999<sup>170</sup>; Ebadi, 2007<sup>64</sup>; Sivasothy *et al.*, 2015<sup>246</sup>). Sin

embargo, causa algunos efectos adversos tales como flatulencias y diarrea. Así que, la síntesis de inhibidores naturales de  $\alpha$ -glucosidasa, han atraído la atención de los investigadores en la búsqueda de terapias para el tratamiento de hiperglucemia postprandial (Garlapati *et al.*, 2013)<sup>84</sup>.

### **Las plantas como una forma de medicina alternativa**

Los medicamentos disponibles actualmente tienen desventajas debido a que se emplean en dosis altas por largos periodos de tiempo o de por vida, lo que hace que se presenten varios efectos adversos. En los pacientes que se emplea insulina, regularmente tienden a presentar eventos hipoglucémicos, aterosclerosis prematura, hiper-insulinemia, lipodistrofia (Khan y Anderson, 2003<sup>131</sup>, Aggarwal y Shishu, 2014<sup>6</sup>).

En las personas que se emplea sulfonilureas pueden presentarse eventos hipoglucémicos, flatulencias, aumento de peso, hiper-insulinemia, parestesia, leucopenia transitoria, agranulocitosis y demencia (Hsu *et al.*, 2011<sup>114</sup>; Aggarwal y Shishu, 2014<sup>6</sup>).

En pacientes que se utilizan biguanidinas pueden inducir acidosis láctica, percepción de un sabor metálico, anorexia, deficiencia de vitamina B<sub>12</sub>, no se puede suministrar en pacientes con problemas cardio-respiratorios, hepáticos y renales (Pongwecharak *et al.*, 2009)<sup>209</sup>. Meglitinida, puede provocar dispepsia, artralgia y enfermedades hepáticas (Black *et al.*, 2007)<sup>38</sup> y tiazolidinedionas pueden causar un aumento de volumen sanguíneo, anemia, mialgia y disfunción hepática (Tolman y Chandramouli, 2003)<sup>265</sup>.

El empleo de los medicamentos que inhiben la actividad de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa regularmente presentan problemas gastrointestinales (Van de Laar *et al.*, 2005)<sup>277</sup>. Por lo tanto, los problemas más frecuentes asociados a los medicamentos para el tratamiento de DM2, se encuentran los gastrointestinales, de riñón (Pearson *et al.*, 1986<sup>199</sup>; Kuhlmann y Puls, 1996<sup>143</sup>) y daños hepáticos (Pearson *et al.*, 1986)<sup>202</sup>.

Las PM han sido utilizadas desde hace varios años como una alternativa para prevención y tratamiento de enfermedades. Por mencionar algunos ejemplos, Europa presenta una importante historia sobre la medicina tradicional, donde destacan dos personajes Hipócrates y Dioscórides, quienes describieron hace 2000 años más de 400 remedios provenientes de plantas medicinales, muchos de los cuales se utilizan actualmente (Herrmann *et al.*, 2011)<sup>110</sup>.

La versatilidad de su acción biológica puede ser atribuida al alto contenido y amplia variedad de metabolitos secundarios (Canuto *et al.*, 2012)<sup>43</sup> tales como: alcaloides que inhiben a  $\alpha$ -glucosidasa y disminuyen el transporte de glucosa a través del epitelio intestinal. Compuestos de imidazolina que estimulan la secreción de insulina. Polisacáridos, así como flavonoides ayudan a incrementar la cantidad de insulina sérica y una reducción de los niveles de glucosa en sangre (Bhushan *et al.*, 2010)<sup>35</sup>.

Los flavonoides, además, reducen significativamente los altos valores de colesterol y triglicéridos en sangre e incrementan la actividad de glucosidasa hepática. Fuentes de fibra que ayudan a absorber y retardar la glucosa e inhiben la actividad de alfa amilasa. Saponinas y ácido ferúlico, ayudan a estimular la secreción de insulina (Bhushan *et al.*, 2010<sup>35</sup>; Patel *et al.*, 2011<sup>197</sup>; Patel *et al.*, 2012b<sup>199</sup>).

Las PM no son únicamente importantes como sustancias biológicas activas, sino también como reservorios para el descubrimiento de futuros fármacos que pueden ayudar a resolver enfermedades emergentes, por ejemplo: AIDS, influenza H1N1 (Sharma y Arora, 2006<sup>243</sup>; Arora, 2010<sup>24</sup>, Arora *et al.*, 2010<sup>25</sup>), enfermedades transmitidas por vectores (dengue, malaria (Pluempanupat *et al.*, 2007<sup>208</sup>), chikunkuya, Chagas), Alzheimer (Dhanasekaran *et al.*, 2009<sup>61</sup>) y problemas del síndrome metabólico como obesidad y diabetes (Wang *et al.*, 2005)<sup>287</sup>.

En años recientes una amplia gama de medicamentos proviene de PM, entre ellos se encuentran: reserpina un alcaloide antihipertensivo derivado de *Rauvolfia serpentina*, vinblastina agente antitumoral que proviene de *Catharantus roseus*, podofilotoxina (*Podophyllum hexandrum* y *P. peltatum*), morfina (*Paper semniferum*), taxol agente anticancerígeno proveniente de *Taxus brevifolia* y *Taxus baccata*, etc. (Sharma y Arora, 2006<sup>243</sup>; Arora, 2010<sup>24</sup>, Arora *et al.*, 2010<sup>25</sup>), metformina un medicamento utilizado para controlar los niveles de glucosa en sangre, este compuesto deriva de *Galega officianalis* (Patel *et al.*, 2012b<sup>199</sup>).

Actualmente se han reportado el uso de PM en el tratamiento de diabetes a nivel mundial y han sido empleadas de manera empírica como remedios antidiabéticos y anti-hiperlipídicos, por lo tanto se muestra su habilidad de las plantas medicinales para restaurar la función del tejido pancreático, ya que se incrementa la liberación de insulina, así como

también, la inhibición en la absorción de glucosa intestinal, por lo que se facilita la liberación de metabolitos funcionales para los procesos que requieren insulina (Patel *et al.*, 2012a)<sup>198</sup>.

Por otra parte, en los países occidentales el empleo de remedios provenientes de PM es poco utilizados debido a la llegada de la insulina y fármacos orales antidiabéticos, pero en países subdesarrollados son la fuente primordial para el tratamiento de diabetes (Torres *et al.*, 2013)<sup>266</sup>.

En el mundo existen aproximadamente 1,200 especies que se utilizan para tratar esta problemática (Trojan-Rodriguez *et al.*, 2012)<sup>269</sup>. De acuerdo con Andrade-Cetto y Heinrich (2005)<sup>20</sup>, en México, la diversidad florística que se utiliza para solucionar esta afección es de 306 especies (Tabla 4).

**Tabla 4.** Diversidad florística por región utilizada para tratar diabetes.

| País           | Número de especies | Referencia   |
|----------------|--------------------|--|
| Estados Unidos | 70                 | Barbosa-Filho, 2005 <sup>31</sup>  |
| México         | 306                | Andrade y Heinrich, 2005 <sup>19</sup>   |
| China          | 241                | Yang, 2012 <sup>300</sup>  |
| Turquía        | 126                | Parildar <i>et al.</i> , 2011 <sup>196</sup>   |
| África         | 92                 | Eddouks <i>et al.</i> , 2002 <sup>65</sup>   |
| India          | 46                 | Tag <i>et al.</i> , 2012 <sup>259</sup>  |
| Brasil         | 82                 | Volpato <i>et al.</i> , 2002 <sup>283</sup> ; Trojan-Rodriguez <i>et al.</i> , 2012 <sup>269</sup> |

Aproximadamente existen 410 estudios que promueven el uso de plantas medicinales que actúan en diferentes vías de la glicolisis (ciclo de Krebs, gluconeogénesis, síntesis y degradación del glicógeno, síntesis del colesterol, metabolismo y absorción de carbohidratos, síntesis y liberación de insulina, vía de la aldosa reductasa y búsqueda de radicales libres en el cuerpo humano) y solo se conocen los mecanismos de acción para 113 especies de plantas medicinales (Prabhakar y Doble, 2008)<sup>211</sup>.

Diversos trabajos reportan algunas plantas con actividad antidiabética, las cuales han sido evaluadas con técnicas *in vivo* (en ratones tal es el caso de *Colubrina elliptica*, en esta especie se obtuvieron extractos de la corteza y se evaluó su actividad antidiabética,

(Marroquín-Segura *et al.*, 2005)<sup>158</sup>, en *Tecoma stans* (Al-Azzawi, 2012)<sup>14</sup>, *Cecropia obtusifolia* (Andrade-Cetto y Wiendenfel, 2001)<sup>21</sup> o *in vitro*, en pruebas de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa (Andrade-Cetto *et al.*, 2008)<sup>22</sup> y  $\alpha$ -amilasa (Cengiz *et al.*, 2010)<sup>47</sup>.

Pero la mayoría de los tratamientos tradicionales se recomienda como medicina complementaria o alternativa para el tratamiento de DM, basada en las encomiendas de la OMS, donde los compuestos anti-hiperglucémicos de origen vegetal usados en la medicina tradicional son menos tóxicos y libres de efectos secundarios (Kalailingam *et al.*, 2013)<sup>124</sup>.

### **Plantas medicinales que inhiben la actividad enzimática de $\alpha$ -glucosidasa**

La relación que existe entre los flavonoides y la actividad antidiabética ha sido estudiada en modelos *in vivo*. Zhang y colaboradores (2011)<sup>305</sup> estudiaron el efecto del flavonoide isoquercitina en ratones con diabetes mellitus inducida. Los autores plantearon que la isoquercitina inhibe la acción de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa localizada en el epitelio del intestino delgado, y al inhibir la actividad de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa se retarda la absorción de carbohidratos en el intestino delgado y con ello se disminuyen los niveles de azúcar en sangre.

Además de los productos comerciales, existe una amplia diversidad de plantas medicinales que inhiben la actividad enzimática de  $\alpha$ -glucosidasa (Tabla 5), donde se demuestra que la mayoría de las PM tienen un mejor efecto con respecto al referente acarbosa. Por lo que su investigación de sus metabolitos secundarios pueden ayudar a disminuir los efectos adversos de los productos comerciales (acarbosa, miglitol y viglibosa) en pacientes diabéticos (Sivasothy, 2015)<sup>246</sup>.

**Tabla 5.** Plantas medicinales que se han comprobado su actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa, donde IC<sub>50</sub>= concentración requerida para inhibir el 50% la actividad enzimática, C= corteza, Fl= flor F= fruto, h= hojas, TPA= todas las partes aéreas, R= raíz.

| Especie (Autor)                            | Familia        | Parte utilizada | Solvente   | IC <sub>50</sub> (µg/mL) | Referencia   |
|--|----------------|-----------------|------------|--------------------------|--|
| <i>Malmea depressa</i> (Baill) R.E. Fries. | Annonaceae     | R               | Butanol    | 21                       | Andrade-Cetto <i>et al.</i> , 2008 <sup>22</sup>     |
| <i>Annona squamosa</i> (L.)                | Annonaceae     | H               | Etanol 80% | 90.47                    | Mun'im <i>et al.</i> , 2013 <sup>177</sup>           |
| <i>Catharanthus roseus</i> (L.G. Don)      | Apocynaceae    | H               | Etanol 80% | 36.08                    | Mun'im <i>et al.</i> , 2013 <sup>177</sup>           |
| <i>Tecoma stans</i> (L.) Kunth             | Bignoniaceae   | TPA             | Etanol 60% | 320                      | Ramírez <i>et al.</i> , 2012 <sup>217</sup>          |
|  |                | H               | Agua       | 730                      | Aguilar-Santamaría <i>et al.</i> , 2009 <sup>7</sup> |
| <i>Ceiba pentandra</i> (L.)                | Bombaceae      | C               | Etanol 80% | 5.16                     | Mun'im <i>et al.</i> , 2013 <sup>177</sup>           |
| <i>Cecropia obtusifolia</i> (Bertol.)      | Cecropiaceae   | H               | Butanol    | 14                       | Andrade-Cetto <i>et al.</i> , 2008 <sup>22</sup>     |
| <i>Ipomoea pes-caprae</i>                  | Convolvulaceae | TPA             | Hexano     | 4                        | Gurudeeban <i>et al.</i> , 2012 <sup>103</sup>       |
| <i>Costus speciosus</i> (Koenig)           | Costaceae      | H               | Metanol    | 67.5                     | Perera <i>et al.</i> , 2016 <sup>203</sup>           |
| <i>Citrullus colocynthis</i>               | Cucurbitaceae  | TPA             | Hexano     | 8                        | Gurudeeban <i>et al.</i> , 2012 <sup>103</sup>       |
| <i>Acosmium panamense</i> (Benth.) Yacolev | Fabaceae       | C               | Butanol    | 109                      | Andrade-Cetto <i>et al.</i> , 2008 <sup>22</sup>     |
| <i>Salvia officinalis</i>                  |                | TPA             | Etanol     | 30.67                    | Shori, 2015 <sup>244</sup>                           |
| <i>Persea americana</i> (Mill.)            | Lauraceae      | C               | Etanol 80% | 10.83                    | Mun'im <i>et al.</i> , 2013 <sup>177</sup>           |
| <i>Derris indica</i> (Lam.)                | Leguminosae    | R               | Methanol   | 103.5                    | Rao <i>et al.</i> , 2009 <sup>219</sup>              |
| <i>Myristica cinnamomea</i> (King)         | Myristicaceae  | C               | Hexano     | 5.05                     | Sivasothy <i>et al.</i> , 2015 <sup>246</sup>        |
| <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels         | Myrtaceae      | F               | Etanol     | ----                     | Trinh <i>et al.</i> , 2016 <sup>268</sup>            |
|  |                |                 | Butanol    | 8.2                      | Omar <i>et al.</i> , 2012 <sup>190</sup>             |
| <i>Rhizophora mucronata</i> (Lam.)         | Rhizophoraceae | C               | Etanol     | 126.6                    | Trinh <i>et al.</i> , 2016 <sup>268</sup>            |
|  |                |                 | Acuoso     | 3.3                      | Trinh <i>et al.</i> , 2016 <sup>268</sup>            |
| <i>Aegle marmelos</i>                      | Rutaceae       | H y F           | Hexano     | 4                        | Gurudeeban <i>et al.</i> , 2012 <sup>103</sup>       |
| Acarbosa                                   |                |                 |            | 128-363                  | Todas las anteriores                                 |

## **Diversidad química y genética de las plantas medicinales**

Los organismos han pasado por diferentes procesos de adaptación para aumentar su sobrevivencia a su entorno cambiante, reproducirse y transferir estas características a su descendencia. Por lo que la presencia en diversos ambientes es la evidencia de que morfológica y anatómicamente los individuos de una especie se han adaptado a su ambiente a través del tiempo (Harborne, 1993)<sup>106</sup>.

Las plantas muestran una amplia gama de variación morfológica, genética y química que reflejan las diferentes adaptaciones ambientales a través de la interacción con los factores bióticos y abióticos (Ben-Israel *et al.* 2009)<sup>33</sup>. Así, el efecto del ambiente sobre los individuos de una especie no únicamente afecta, sobre su espacio de distribución (plasticidad fenotípica), sino también sobre escalas de tiempo ecológico y evolutivo que involucra la adaptación local y diferenciación ontológica (Chung *et al.*, 2002<sup>51</sup>; Hufford y Mazer, 2003<sup>116</sup>; Ávila-Díaz y Oyama, 2007<sup>26</sup>).

En el caso particular de las hojas, entre y dentro de las especies, individuos o poblaciones, éstas pueden cambiar su estructura morfológica en función de las interacciones entre los factores ambientales (variables geográficas, precipitación, temperatura, características edáficas, calidad y cantidad de luz) y los factores biológicos (herbivoría, tipo de vegetación, arquitectura y densidad del dosel), que determinan presiones selectivas a nivel foliar debido a la gran heterogeneidad ambiental (Rico-Gray y Palacios-Ríos, 1996<sup>222</sup>; King y Mandonald, 1999<sup>135</sup>; Mitchell *et al.*, 1999<sup>171</sup>; Klich, 2000<sup>139</sup>; Valladares *et al.*, 2000<sup>275</sup>; Mallarino *et al.*, 2001<sup>156</sup>; Valladares *et al.*, 2002<sup>275</sup>; McDonald *et al.*, 2003<sup>164</sup>; Valladares, 2003<sup>273</sup>).

Por lo que también tienen que presentar adaptaciones bioquímicas y que se encuentran relacionadas con adaptaciones fisiológicas, las cuales pueden operar a diferentes niveles: I) en el metabolismo, afectando la actividad de las enzimas, II) en la sustitución de amino ácidos de las proteínas. III) En el metabolismo intermediario (por ejemplo, en la vía del carbono en la fotosíntesis), iv) en el metabolismo secundario para combatir herbívoros. Adaptaciones al frío, por lo que la planta incrementa el contenido de azúcares en la célula, los azúcares identificados en las plantas resistentes a las heladas cambian de una planta a otra, los carbohidratos más comunes son la glucosa, sucrosa y fructuosa (Harborne, 1993)<sup>106</sup>.

De esta manera, el contenido de los diferentes metabolitos secundarios se ven afectados por varios factores: genéticos (genotipos, quimiotipos), fisiológicos (ritmo circadiano, fenología, edad), ambientales (clima, exposición a la luz solar, disponibilidad de agua, suelo, condiciones agronómicas) y condiciones de manufactura (cosecha, almacenamiento y procesamiento) (Gobbo-Beto y Lopes, 2007<sup>91</sup>; Sahoo *et al.*, 2010<sup>232</sup>; Canuto *et al.*, 2012<sup>43</sup>). Por lo que la variación en el contenido químico puede ser un factor importante para establecer las bases en cuanto a su uso medicinal, debido a que los metabolitos secundarios son los responsables de la diversidad fitoquímica y de su eficacia terapéutica (Chen *et al.*, 2014)<sup>48</sup>.

La producción de compuestos secundarios al estar influenciados los por factores ambientales y genéticos, las poblaciones geográficamente distantes e incluso de la misma especie pueden tener muy diferentes cualidades médicas (Chen *et al.*, 2014<sup>48</sup>; Hu *et al.*, 2007)<sup>115</sup>.

Wu y colaboradores (2000)<sup>297</sup>, analizaron la composición química de los frutos de *Vitex rotundifolia* provenientes de diferentes localidades de China, empleando cromatografía líquida de alto rendimiento, con lo que obtuvieron una compleja diversidad de compuestos químicos. A su vez, la cantidad del compuesto mayoritario de los extractos etanólicos *V. rotundifolia* cambió entre poblaciones.

Vega-Vela y colaboradores (2013)<sup>279</sup>, analizaron la estructura genética y la diversidad en la composición de los aceites esenciales de *Lippia organoides* en dos poblaciones en el norte de Colombia, encontraron una gran cantidad de compuestos químicos que difieren entre localidades y entre los individuos de la misma población, de esta manera al realizar un agrupamiento de las poblaciones obtuvieron cuatro quimiotipos, los cuales concuerdan con la agrupación de los datos genéticos.

### **Factores que modifican la diversidad y diferenciación genética**

Entre los factores que modifican la dinámica y estructura genética de las poblaciones, se encuentran, el tamaño de la población, sistemas de apareamiento o reproductivos y los factores evolutivos, tales como: mutación, flujo genético, deriva genética, cuellos de botella “bottleneck”, efecto fundador y la selección (Finkeldy y Hattermer, 2007)<sup>77</sup>.



### **1) El tamaño de la población**

Los tamaños de las poblaciones naturales pueden ser diversos y ocupar una extensión geográfica determinada de acuerdo con sus requerimientos reproductivos, ambientales, genéticos, entre otros (Pico y Quintana, 2005)<sup>206</sup>.

Los cambios en las frecuencias alélicas están relacionados con el tamaño de la población. En poblaciones pequeñas es más probable que cambien las frecuencias alélicas por deriva genética, efecto fundador (Gram y Sork, 1999)<sup>98</sup> o por la fragmentación del hábitat originando una reducción en el tamaño de su población efecto conocido como cuello de botella (Gaur *et al.*, 2010)<sup>85</sup>.

### **2) Sistemas de apareamiento o reproductivos**

Los sistemas reproductivos son de suma importancia para la fusión de gametos femeninos y masculinos. El flujo genético por medio de polen es un prerequisite para reproducirse dos plantas y formar la semilla. Así, el flujo genético y el sistema de reproducción están estrechamente relacionados y son los dos aspectos importantes en los sistemas de reproducción de las plantas. Los sistemas de reproducción de genotipos se basan en la combinación de alelos. La estructura de los genotipos de la siguiente generación está determinada por los sistemas de reproducción (Finkeldy y Hattermer, 2007)<sup>77</sup>.

### **3) Flujo genético**

El flujo genético mantiene la conectividad entre poblaciones en un paisaje e influye en la capacidad de responder a cambios ambientales, además permite entender la estructura genética de las poblaciones (Bakker *et al.*, 2006)<sup>27</sup>. En plantas el flujo genético ocurre vía polinización y dispersión de las semillas (Lowe *et al.*, 2004)<sup>154</sup>. El flujo genético a través de la dispersión de las semillas determina la estructura genética espacial de las poblaciones (SGS), la cual depende de la distancia de dispersión. Las características del paisaje tales como montañas, ríos y gradientes de humedad, son barreras geográficas para el flujo genético y que promueven la discontinuidad de las poblaciones (Moreira y Fernandes, 2013)<sup>174</sup>.

Los estudios basados en SGS proporcionan información relevante sobre los sistemas de reproducción y la dinámica demográfica de una población, con lo que pueden ser empleadas para definir estrategias de mejora y conservación de los recursos genéticos. Así también,

representan la magnitud de las relaciones genéticas entre individuos de una misma población (Moreira *et al.*, 2009<sup>175</sup>; Moreira *et al.*, 2015<sup>176</sup>).

#### **4) Deriva genética**

La deriva genética se define como la variación aleatoria de las frecuencias genéticas de generación en generación. Se observa más frecuentemente en poblaciones pequeñas. En los casos extremos la deriva genética puede dar lugar a la fijación por azar de un alelo y a la eliminación de otro (Klug y Cummings, 1999)<sup>140</sup>.

#### **5) Mutación**

La mutación es un prerequisite para la variación genética de las poblaciones. Las mutaciones son cambios al azar en el material genético de un organismo y se producen con poca frecuencia. Lo cual puede producir cambios espontáneos de un nucleótido (originando SNP), en la estructura de un cromosoma (fisión, translocación e inversión) o en el número de genes (duplicación o poliploide). La mayoría de las mutaciones son determinantes o neutrales. Muy pocas mutaciones son ventajosas, con lo cual aumenta la adecuación de los individuos. Por ejemplo, en la capacidad de producir progenie o descendencia (Finkeldy y Hattemer, 2007<sup>77</sup>; Van y Dorken, 2012<sup>278</sup>).

#### **6) Cuellos de botella “bottleneck” y efecto fundador**

Un cuello de botella “bottleneck” de las poblaciones puede ser utilizado para inferir su historia demográfica, así como, sus efectos en la variación genética. Es importante detectar cuellos de botella históricos, así como su magnitud y consecuencias en los cambios genéticos, asociados con eventos de efecto fundador. En el campo de la conservación, el tipo de cuello de botella es importante para detectar sus efectos en el tamaño efectivo de la población (Gaur *et al.*, 2010)<sup>85</sup>.

Existen tres pruebas para evaluar el exceso o deficiencia de heterocigosidad (prueba de rango-senal, diferencias en la desviación estándar y prueba de Wilcoxon), las cuales se basan en los tres modelos de evolución del polimorfismo genético; el modelo de alelos infinitos (MAI, Kimura y Crow, 1964)<sup>134</sup> donde cada mutación crea un nuevo alelo a una tasa constante de mutación ( $\mu$ ). Este modelo no contempla la posibilidad de homoplasia (creación de un alelo determinado más de una vez), asume que los alelos de igual tamaño comparten el mismo ancestro y son idénticos por descendencia.

Modelo de balance mutación-selección (MMS), se basa en una población de  $n$  individuos, cuyo tamaño se incrementa indefinidamente, mientras que el tamaño efectivo de la población ( $N_e$ ) y la tasa de mutación ( $\mu$ ) permanecen constantes. De esta manera, los alelos pueden presentar mutaciones por la ganancia o pérdida de una unidad de repetición ( $i$ ) (Gaur *et al.*, 2010)<sup>85</sup>. El modelo de mutación paso a paso (MMP) este modelo contempla a los dos modelos anteriores.

### **Problemática sobre el uso de medicamentos herbolarios**

El amplio uso de los medicamentos herbolarios (MH) a pesar de la eficacia de los medicamentos farmacéuticos, se debe en gran parte a la creencia de que los MH no son tóxicos o que tienen pocos efectos secundarios. Ante la necesidad de contar con terapias alternativas y su bajo costo. En países en desarrollo, los MH son la forma principal para el cuidado de salud. Así también representan un importante mercado en algunos países industrializados como Alemania (Canuto *et al.*, 2012)<sup>43</sup>.

Por otro lado, los medicamentos herbolarios son desacreditados por la mayoría de los médicos, debido principalmente a que no cuentan con conocimiento científico que soporte su eficacia y seguridad, lo que genera desconfianza a la hora de prescribir productos provenientes de plantas medicinales, esto debido a que los MH no cuentan o no han sido sometidos a pruebas clínicas, análisis fitoquímicos y por ende sus principios activos no han sido determinados (Canuto *et al.*, 2012<sup>43</sup>; Ouarguidi *et al.*, 2012<sup>194</sup>).

De igual manera, los MH no tienen una dosis bien definida, no cuentan con la información de su composición química y no se advierte sobre los posibles riesgos que pueden presentar en la salud de las personas (Ouarguidi *et al.*, 2012)<sup>194</sup>. Adicionalmente, la falta sobre el control de calidad, así como de los factores intrínsecos relacionados con la materia prima de MH, pueden estar sujetos a adulteraciones y producir efectos variables e inconsistentes. Además, la mayoría de los MH provienen de recursos silvestres, por lo que su producción industrial se ve limitada y el uso de estas especies puede ponerlas en un estado de amenaza (Canuto *et al.*, 2012)<sup>43</sup>.

De acuerdo con la organización mundial de la salud (OMS, WHO por sus siglas en inglés) define a los medicamentos herbolarios como preparaciones que contienen partes de una planta (hojas, raíces, semillas, tallo o corteza, etc.) o algún material de la planta en forma cruda

o procesada con ingredientes activos además de algunos excipientes. Las preparaciones herbales pueden presentarse de diferentes formas: tabletas orales, cápsulas, gel, jarabe, extractos e infusiones. En general la combinación con sustancias químicas activas o constituyentes aislados no son considerados como medicamentos herbolarios (Calixto, 2000<sup>42</sup>; Canuto *et al.*, 2012<sup>43</sup>).

La información acerca de las propiedades terapéuticas sobre el uso de las plantas medicinales está basado en conocimiento tradicional de las personas, el cual fue transmitido de generación en generación, originando los sistemas de la medicina tradicional, los cuales se utilizan en todo el mundo. Existen aproximadamente 50, 000 especies de plantas que se emplean con fines medicinales, de estas el 11% de un total de 250 medicamentos enlistados como esenciales por la OMS provienen de plantas (Sahoo *et al.*, 2010<sup>232</sup>; Canuto *et al.*, 2012<sup>43</sup>).

Los MH son consumidos por tres cuartas partes de la población mundial para el tratamiento de enfermedades de dolor crónico, desordenes reumatológicos y asma. En países en vías de desarrollo, la población utiliza plantas medicinales para atender problemas de salud primaria, principalmente debido a que los medicamentos sintéticos son de alto costo y no son de fácil acceso. Sin embargo, los MH son ampliamente utilizados en países desarrollados (Canuto *et al.*, 2012)<sup>43</sup>.

La fitoterapia es popular en varios países europeos (Alemania, Francia, Italia), puesto que la gente cree que los MH no presentan efectos secundarios o buscan mejorar el estilo de vida (Calixto, 2000<sup>42</sup>; Canuto *et al.*, 2012<sup>43</sup>). Los MH tienen ciertas características que los distinguen de los fármacos. Los MH están formados de una mezcla compleja de compuestos químicos y a su vez están constituidos de varias plantas, por lo que los MH muestran un amplio uso terapéutico, motivo por el cual las plantas medicinales pueden ser utilizadas para diversos problemas de salud (Calixto *et al.*, 2000<sup>42</sup>; Sahoo *et al.*, 2010<sup>232</sup>; Canuto *et al.*, 2012<sup>43</sup>).

La combinación de varias plantas que contiene diversas sustancias bioactivas o un acervo de estructuras análogas, pueden producir una acción sinérgica con un mejor resultado. Por lo tanto, permiten una reducción de dosis a emplear y con ello se reducen los riesgos de intoxicación o efectos secundarios. En algunas enfermedades (por ejemplo, AIDS, varios tipos de cáncer y diabetes) donde se presentan una multitud de causas etiológicas y una compleja

patofisiología, un tratamiento médico puede ser más efectivo si se elige bien la combinación de medicamentos que el empleo de un solo fármaco (Wagner, 2011)<sup>285</sup>.

Los productos que tienen como base fundamental a las plantas medicinales no cuentan con la información suficiente acerca de su composición química, debido principalmente a la complejidad química. De esta manera los principios activos de los MH son frecuentemente desconocidos, así como su estandarización y control de calidad son una de las principales preocupaciones para las autoridades de salud y el público en general (Hu *et al.*, 2007<sup>115</sup>; Vega-Vela *et al.*, 2013<sup>279</sup>).

La autenticación de las identidades botánicas de los MH incluyendo genotipos y quimiotipos es también un problema en algunos casos. Variaciones en los ecotipos y genotipos son un obstáculo en el desarrollo de la fitomedicina (Heubl, 2013)<sup>111</sup>. Esto puede ser superado a tal grado por la implementación de la agrotecnología (mejorar las condiciones de cultivo) para aumentar la eficacia de las plantas medicinales usando los mejores genotipos y fenotipos, con el propósito de obtener una calidad uniforme de la materia prima para la elaboración de los MH basados en plantas (Subramoniam, 2003<sup>252</sup>, 2014<sup>253</sup>, 2016<sup>254</sup>). La mayoría de las plantas antidiabéticas son colectadas de manera silvestre, por lo que pone en riesgo a estas especies y con ello se reduce su accesibilidad (Canuto *et al.*, 2012)<sup>43</sup>.

Por lo que, se requiere cultivar PM bajo condiciones controladas para mantener su eficacia y disponibilidad. La estandarización de las técnicas de cultivo es necesaria cuando se requiere establecer la calidad de las PM. El desarrollo de las técnicas de cultivo para las PM en particular las condiciones agroclimáticas y del suelo pueden no ser las adecuadas para aplicarse en otras zonas, por lo que deben desarrollarse de manera específica y local, de esta manera se puede lograr mantener las propiedades medicinales de las plantas candidatas (Orguidi *et al.*, 2012<sup>194</sup>; Subramoniam, 2016)<sup>254</sup>.

## JUSTIFICACIÓN

Dado que las plantas son consideradas como una fuente potencial de sustancias químicas con diferentes actividades en los organismos, y que la flora medicinal del Estado de Hidalgo cuenta con un gran número de especies y ante la necesidad de contar con productos capaces de tratar enfermedades tales como la diabetes, se planteó el presente estudio para explorar el potencial antidiabético de algunas especies que forman parte de la flora medicinal del estado.

De acuerdo con las estadísticas de mortalidad del INEGI 2010<sup>119</sup>, dentro de las principales causas de muerte de la población se encuentra la diabetes, enfermedad que a su vez se encuentra asociada con padecimientos del corazón, hígado y cerebrovasculares.

Aunado a esta problemática, este trabajo proporcionará información acerca de plantas con potencial para obtener nuevos fármacos orales para tratar diabetes y así mejorar la calidad de vida de las personas, y que además tienen la característica de ser un recurso sumamente accesible para la economía de la gente de escasos recursos.

Se han realizado un gran número de trabajos sobre la composición química y sobre diversidad genética de plantas medicinales de manera independiente, y existen pocos trabajos de manera conjunta. Por lo que la combinación de marcadores moleculares y la fitoquímica pueden ayudar a entender la diversidad genética y química de las plantas medicinales.

Aunado a lo anterior, se pueden tener plantas medicinales con diversas actividades biológicas, y al mismo tiempo tener otros usos medicinales (Hu *et al.*, 2007<sup>115</sup>; Vega-Vela *et al.*, 2013<sup>279</sup>).

Así mismo, al conjuntar información sobre la actividad biológica de estas plantas medicinales con datos morfológicos y genéticos, permitirá hacer una mejor aproximación a cerca de estrategias y áreas prioritarias para la conservación de los recursos naturales.

## **HIPÓTESIS**

Las plantas que se utilizan en el estado de Hidalgo para tratar diabetes inhibirán *in vitro* la actividad enzimática de alfa glucosidasa ( $\alpha$ -gluc.).

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar tres especies de plantas medicinales, mediante características morfológicas, genéticas e inhibición de alfa glucosidasa para seleccionar los mejores genotipos con potencial antidiabético.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar tres especies de plantas medicinales del estado de Hidalgo con potencial antidiabético, utilizando pruebas de inhibición de alfa glucosidasa, con la finalidad de comprobar su efecto y contribuir a validar su uso tradicional.
- Determinar la diversidad, la estructura genética y la dinámica de flujo genético de tres especies de plantas medicinales para tratar diabetes.
- Determinar las localidades con mayor potencial de inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa mediante pruebas de inhibición, datos genéticos y morfológicos.
- Determinar la especie con mayor porcentaje de inhibición de alfa glucosidasa, con la finalidad de potenciar su cultivo.

## METODOLOGÍA

### Selección de especies con potencial antidiabético

La selección de especies se realizó con base a su uso tradicional, así como la existencia de evidencia experimental sobre su actividad antidiabética, información detallada sobre sus compuestos hipoglucémicos, certeza de baja toxicidad, abundancia botánica y que fueran de importancia cultural.

Las especies seleccionadas *Cecropia obtusifolia* (Cecropiaceae), *Costus scaber* (Costaceae) y *Tecoma stans* (Bignoniaceae) como fuente potencial antidiabética (Pérez-Escandón *et al.*, 2003)<sup>204</sup>.

### Descripción de especies

#### *Cecropia obtusifolia*

**Nombres comunes:** guarumbo, hormiguillo, grayumbo, trompeto, trompetillo.

Árbol de hasta 15 (20) m de alto, corteza gris a blanquecina, con pocas ramas, cuyas porciones distales forman entrenudos de 1.5 a 4 cm de grosor; hojas aglomeradas, estípulas ovadas, de 5 a 12 cm de largo, peciolo de 25 a 60 (90) cm de largo, de 10 a 15 mm de grueso, provisto de puberulencia diminuta (de 0.1 a 0.3 mm) de color gris-blanquecino, triquillos en la base del peciolo cubiertos de pubescencia castaña velutina, lámina de 35 a 75 cm de largo, excéntricamente peltada y con (8)10 a 13(15) lóbulos profundos, oblongos a oblanceolados. Los lóbulos mayores con ápice redondeado u obtuso; inflorescencias masculinas con un pedúnculo común de (3)5 a 25 cm de largo y de 3 a 6 mm de grueso, llevando 12 a 18 espigas de 8 a 22 cm de largo, de (2)3 a 5 mm de diámetro, las inflorescencias femeninas sobre pedúnculo común de 6 a 23 (32) cm de largo y de 6 a 8 mm de grueso, llevando por lo común(3)4(6) espigas que surgen de una espata de 18 a 28 cm de largo y 2 cm de grosor, espigas de 18 a 50 cm de largo, de 3 a 6 mm de grueso; fruto de 2 mm de largo y de 1.2 mm de ancho, con frecuencia aplanado, abruptamente redondeado (Figura 1).





**Figura 1.** Árbol de *Cecropia obtusifolia* con presencia de inflorescencias femeninas.

*C. obtusifolia* presenta interacción mutualista con hormigas del género *Azteca*. Los arboles poseen tallos huecos, en el que las hormigas tienen sus nidos, y proporcionan glucógeno como fuente de energía para las hormigas en forma cuerpos de Müller, los cuales se encuentran en la base del pecíolo en una estructura especializada llamada triquilio. Esta estructura produce entre 2500 a 8000 cuerpos de Müller durante un periodo de 20-25 días y con una producción de 90 mg de glucógeno por día, por lo que, a cambio, las hormigas protegen a la planta contra los insectos fitófagos y de la competencia de otras plantas (Janzen, 1973<sup>121</sup>; Longino, 1989<sup>151</sup>; Lobo *et al.*, 2003<sup>150</sup>).

Especie ampliamente distribuida desde regiones cálidas-húmedas y semihúmedas de ambas vertientes de México hasta el norte de Sudamérica (Figura 2) en altitudes de 350-800 m.s.n.m. En el estado de Hidalgo se encuentra muy bien representada, pues abarca los municipios de Atlapexco, Calnali, Huautla, Huazalingo, Huehuetla, Huejutla, Orizatlán y Yahualica (Pérez-Escandón *et al.*, 2003)<sup>204</sup>.

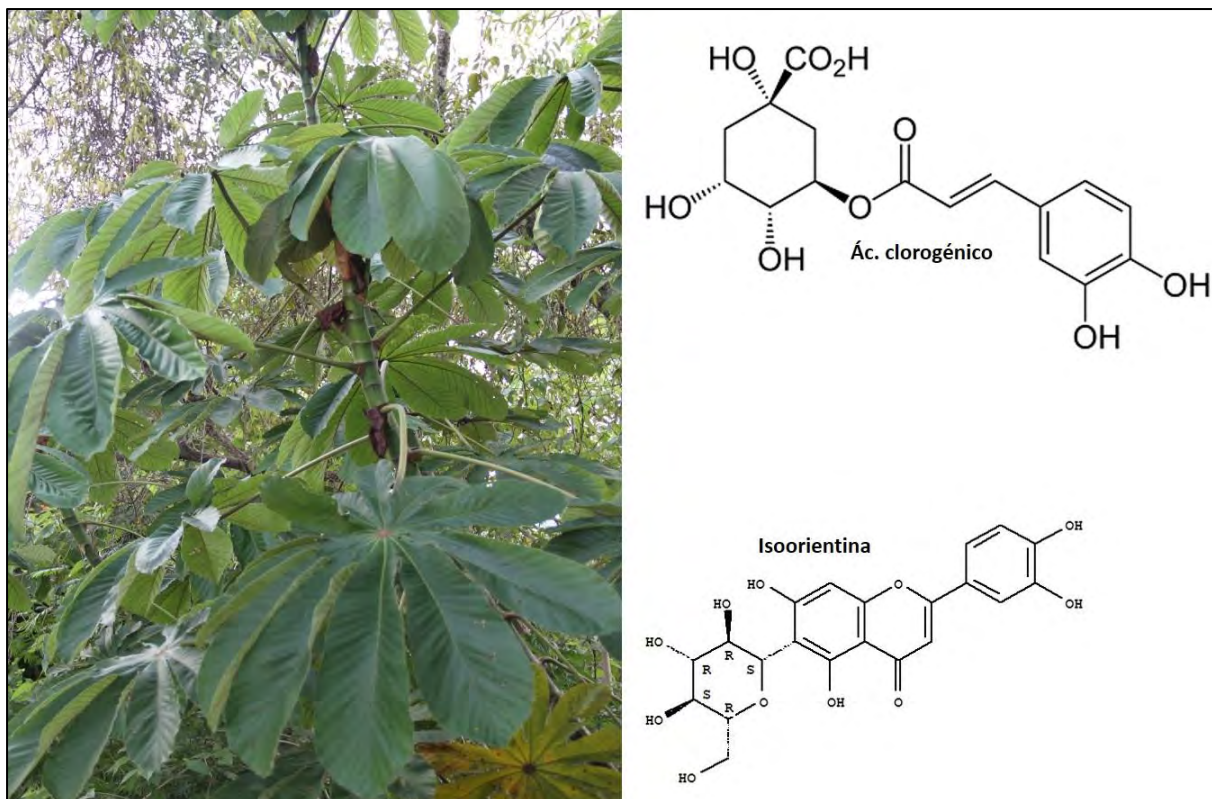


**Figura 2.** Distribución de *Cecropia obtusifolia*, fuente: <http://www.discoverlife.org>.

### **Usos y Composición fitoquímica**

Se conocen sus efectos analgésicos, antiinflamatorio, antihipertensivo, relajante muscular. También destaca por sus usos como tranquilizante del sistema nervioso central, sus efectos hipoglucémicos y diuréticos (Revilla-Monsalve *et al.*, 2007<sup>221</sup>; Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2001<sup>205</sup>). Los compuestos químicos que contiene *C. obtusifolia*, se encuentran el ácido clorogénico e isoorientina (Andrade-Cetto y Wiedenfeld, 2001<sup>21</sup>, Figura 3). Entre algunas propiedades que tiene la isoorientina, son actividad antimicrobiológica y antiespasmódica.

El ácido clorogénico tiene varios beneficios para la salud humana tales como antioxidante, antibacteriano, antiinflamatorio, cardio protector, anticancerígeno, anti obesidad y propiedades antidiabéticas (Meng *et al.*, 2013<sup>166</sup>; Plazas *et al.*, 2013<sup>207</sup>). En el metabolismo de las plantas juega un papel importante como defensa química contra herbívoros, antioxidante (Plazas *et al.*, 2013)<sup>207</sup> y en la regularización de la actividad enzimática (Sato *et al.*, 2013)<sup>236</sup>.



**Figura 3.** Algunos constituyentes de *C. obtusifolia*.

### ***Costus scaber***

**Nombres comunes:** Riñonina, caña de venado, caña agria, chile de perro y caña de jabalí.

Es una planta herbácea con rizomas rojizos a claros, de 5-15 cm o más de largo, 2-3 cm de diámetro con entrenudos de 0.7-1.2 cm de largo. Presenta tallos erectos de 0.6-3 m de alto o más, 0.5-1 cm de diámetro. Hojas angostamente elípticas, cuneadas a redondeadas, 9.5-34 cm de largo, 2.4-10.3 cm de ancho, superficie adaxial glabra o esparcidamente pubérula, superficie adaxial glabra a densamente puberulenta, el ápice acuminado, la base raramente cordada; pecíolos 0.3-1.1 cm de largo, glabros a puberulos, lígulas de 0.2-0.4 cm de largo, glabras a puberulas. Inflorescencias ovadas, de ápice redondeado, 2.4-14.5 cm de largo, 1.6-4.8 cm de diámetro, brácteas de color rojo a rojo-anaranjada, de 1.9-3.4 cm de largo, 1.9-3.1 cm de ancho, acudamente ovadas, coriáceas, obtusas, glabras a pubérulas, margen membranáceo, cortamente fimbriado, callo amarillo, de 0.2-0.7 cm de largo; labelo amarillo, angostamente obovado cuando extendido, de 1.6-2.0 cm de largo, 1.0-1.2 cm de ancho; lóbulos laterales doblados hacia adentro formando un tubo; estambre rojo, angostamente

elíptico, ovario glabro a pubérulo, de 0.5-0.6 cm de largo. Cápsula subglobosa, de 0.9-1.3 cm de largo, 0.7-0.9 cm de ancho; semillas negras (Vovides, 1994)<sup>284</sup>. Número cromosómico  $2n=18(82-279)$ .

**Floración** junio-agosto. *Costus scaber* se distingue por su inflorescencia pequeña y cilíndrica y sus flores rojo-amarillas (Figura 4).



**Figura 4.** *Costus scaber*

Se distribuye en México (Chiapas, Puebla, centro y sur de Veracruz, Hidalgo), Centroamérica (Guatemala Honduras, Costa Rica y Panamá), América del Sur (Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela), Las Antillas (Haití, Granada, Trinidad y Tobago, Figura 5). Altitud desde el nivel del mar hasta 1000 m (Vovides, 1994)<sup>284</sup>. En los tipos de vegetación donde se distribuye está, Selva alta perennifolia; selva mediana perennifolia, bosque mesófilo de montaña, y vegetación secundaria derivada de estos tipos de vegetación.

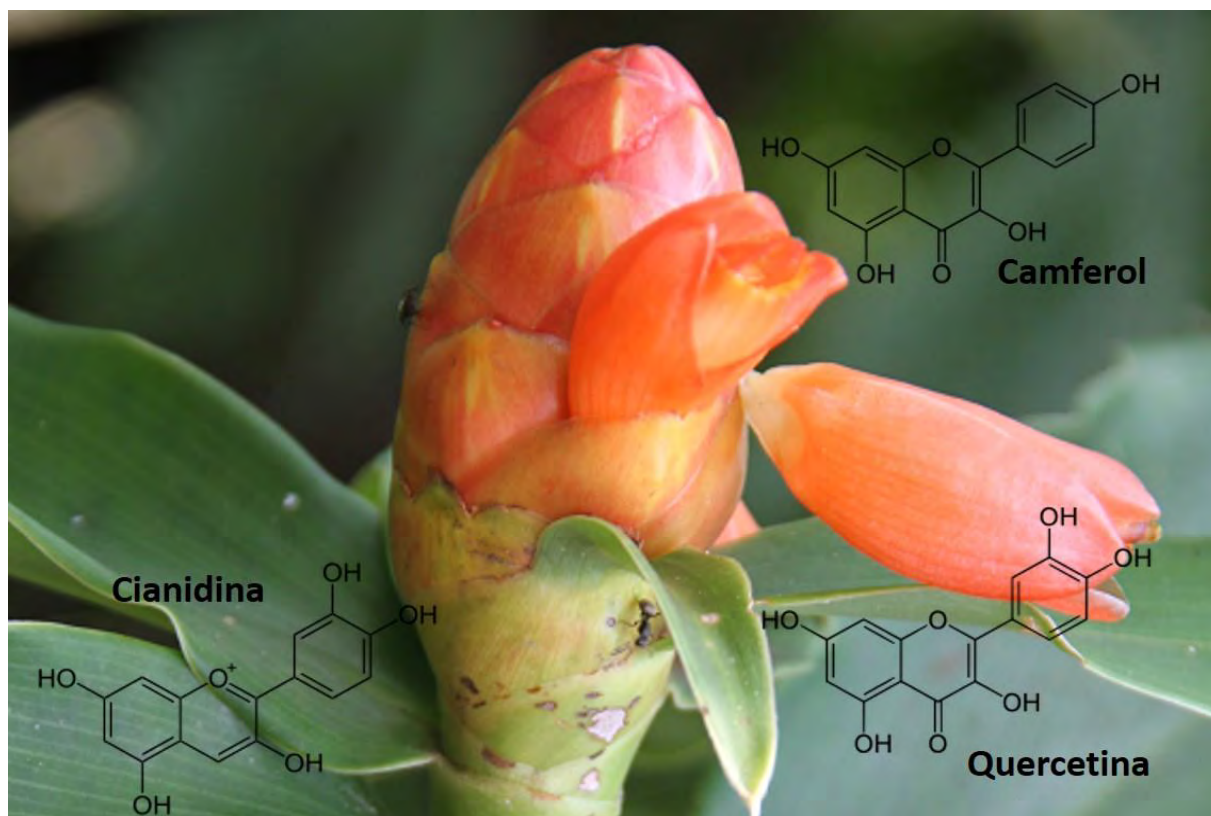


**Figura 5.** Distribución de *Costus scaber*, fuente <http://www.discoverlife.org>

### **Usos y Composición química**

Los usos tradicionales de esta planta son muy variados, destacando principalmente su uso antihipoglucémico y para tratar infecciones urinarias. También se ha reportado su uso para problemas gastrointestinales, tosferina, tos, gripa, fiebre amarilla, cálculos en vejiga y para presión alta, disentería sanguinolenta, conjuntivitis y dolor de cabeza (Pérez-Escandón, 2003<sup>204</sup>; Villavicencio-Nieto y Pérez-Escandón, 2013<sup>281</sup>). Entre los compuestos mayoritarios que se han identificado en *C. scaber* se encuentran, kamferol, cianidina y quercitina (Figura 6).

Kamferol juega un papel importante en las plantas, pues confiere resistencia a estrés abiótico (radiación ultravioleta, calor y propiedades anti-oxidativo y mantiene el estado redox de las células, reduce la producción de diversas reacciones del oxígeno (ROS) tales como: represión de un oxígeno, inhibición enzimática que genera ROS (ciclooxigenasa, lipoxigenasa, mono-oxigenasa, xantino oxigenasa, iones quelantes de los metales de transición con lo que se puede catalizar la elaboración de ROS (Leiss *et al.*, 2009)<sup>146</sup>.



**Figura 6.** Algunos constituyentes químicos de *C. scaber*.

### ***Tecoma stans***

**Nombres comunes:** Flor de San Pedro, hierba de San Pedro, retama, San Pedrito, San Pedro, tronadora, trompeta y catadé.

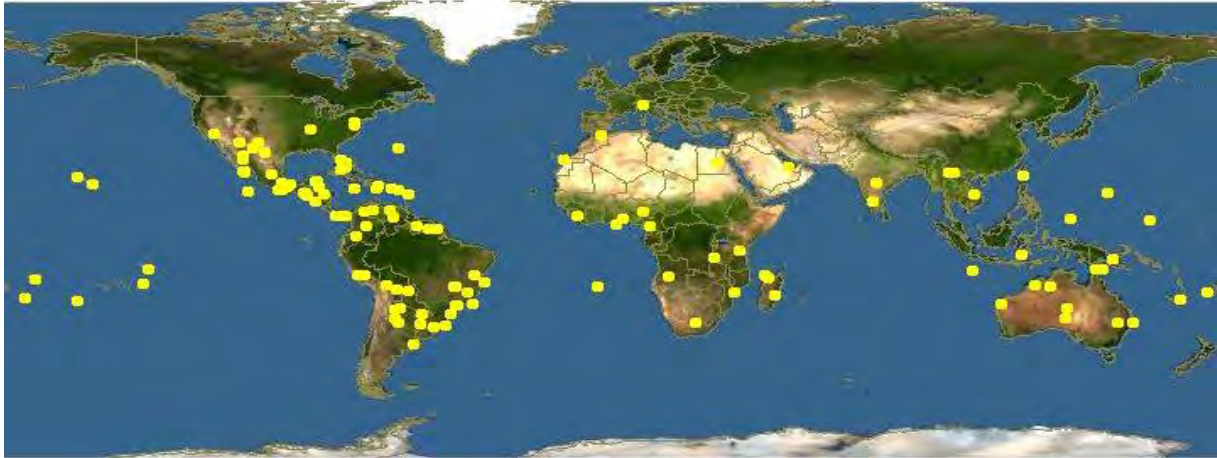
Son arbustos o árboles pequeños de hasta 10 m de altura, 25 de diámetro (d.a.p); corteza dura y acostillada; ramas secundarias lepidotas e irregularmente subpuberulentas. Hojas imparipinadamente compuestas, 3-9 folíolos opuestos, serrados, lanceolados, apicalmente agudos, basalmente cuneados, el folíolo terminal con frecuencia atenuado, 2.4-15 cm de largo, 0.8-6 cm de ancho. El folíolo terminal 4-20 mm de largo; pecíolo 1-9 cm de largo, pecíolo y raquis ausente (cuando las hojas 3-folioladas). Inflorescencia un racimo terminal o subterminal de hasta 20 flores; pedicelos y raquis de la inflorescencia lepidotos; cáliz alargado-cupular, parejamente 5-dentado, los dientes cerca de 1 mm de largo, usualmente apiculado, 3-7 mm de largo, 3-4 mm de ancho, algo lepidoto sobre toda la superficie, ciliado con glándulas conspicuas, hundidas, submarginales; corola amarilla con 7 líneas rojizas, 2 líneas rojas inconspicuas en la base de los 2 lóbulos superiores, tubular-

campanulada por encima de una base estrecha, 0.9-1 cm de largo, 3.5-5.8 cm de largo y 1.2-2.4 cm de ancho en la boca, el tubo 3-4.3 cm de largo, los lóbulos 1-1.6 cm de largo, los óvulos 2-seriados en cada lóculo; disco cupular pulviniforme, 1 mm de largo, 1 mm de ancho. Fruto una cápsula linear, ahusada hacia los extremos, semillas 3-5 mm de largo, 2.4-2.7 cm de ancho, las alas hialino-membranáceas (Gentry, 1982<sup>87</sup>; Rzedowski y Calderón, 1993<sup>231</sup>;Figura 7).



**Figura 7.**Una planta de *T. stans*.

Se distribuye desde el Sur de los Estados Unidos, en todo México, hasta el norte de Venezuela y a lo largo de los Andes hasta el norte de Argentina; con una amplia tolerancia ecológica (Figura 8). Se encuentra principalmente en la vegetación secundaria, tanto de bosques tropicales, como de encinares y matorral xerófilo. Se puede encontrar en altitudes desde los 250 a 2700 m.s.n.m. florece durante todo el año, principalmente en los meses de abril a noviembre. Frecuentemente cultivada en todo el trópico y subtrópico (Gentry, 1982<sup>87</sup>; Rzedowski y Calderón, 1993<sup>231</sup>).



**Figura 8.** Distribución de *T. stans*, fuente <http://www.discoverlife.org>.

### Usos y Composición química

*Tecoma stans* es ampliamente utilizada en México y América Central para tratar diabetes, problemas urinarios, digestivos (dolor de estómago y mala digestión) y de hígado. También, se utiliza para estimular el apetito y para dolor de muelas, disentería, bilis, gastritis, anorexia, para purificar la sangre, vigorizante y para alteraciones nerviosas (Winkelman, 1986<sup>292</sup>; Hernandez-Galicia *et al.*, 2002<sup>108</sup>; Pérez-Escandón *et al.*, 2003<sup>204</sup>; Aguilar-Santamaria *et al.*, 2009<sup>7</sup>; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005<sup>20</sup>).

A esta especie, también, se le atribuyen propiedades hipolipidémicas (Kameshwaran *et al.*, 2013)<sup>125</sup>, los extractos de los frutos presentan actividad antioxidante, citotóxica e inmunoestimulante (Marzouk *et al.*, 2006)<sup>161</sup>, los de raíces presentan actividad diurética, vermífuga (Roig, 1988<sup>225</sup>; Suárez, 1996<sup>251</sup>; Shanmukha *et al.*, 2012<sup>242</sup>), las estructuras florales presentan inhibición en el crecimiento de tumores (Kameshwaran *et al.*, 2012)<sup>125</sup> y actividad antiinflamatoria (Govindappa, *et al.*, 2011)<sup>97</sup>.

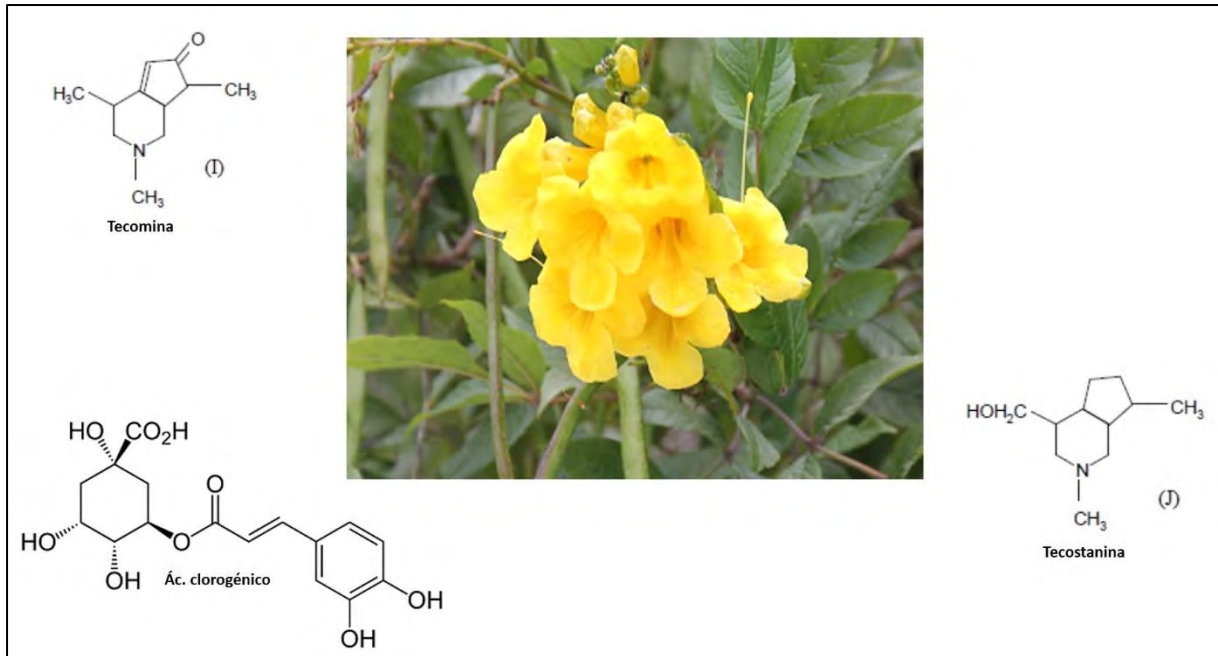
A través de pruebas *in vivo* con conejos (Román-Ramos *et al.*, 1991)<sup>226</sup> y en ratas se comprobó la actividad antidiabética de extractos de *T. stans* determinando la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa intestinal (Aguilar-Santamaría *et al.*, 2009<sup>7</sup>; Abdel-Hamid Taher *et al.*, 2016<sup>3</sup>) o midiendo el nivel de glucosa en sangre (Dhaked *et al.*, 2011<sup>60</sup>; Elish *et al.*, 2013<sup>67</sup>)

Por lo que, se propuso que el efecto antidiabético de *T. stans* se debe a la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa intestinal disminuyendo la hiperglucemia postprandial, además de modificar la glucosa en ayunas y que los flavonoides de esta planta son los componentes



antihiperoglucémicos en sinergia con los alcaloides tecomina y tecostanina (Aguilar-Santamaría et al., 2009<sup>7</sup>; Abdel-Hamid Taher et al., 2016<sup>3</sup>)(Figura 9).

Otros constituyentes de esta planta están 5β-hidroxisantina, base c y bosquiniacina, tecostidina, 4-noranctinidina, N-normetilescianina, 9-Hidro-xiescitantina 5-dehidroescitantina y ácido 2,3-dihidro-benzoico (Constantino et al., 2003<sup>54</sup>; Martínez-Alfaro, 2001<sup>159</sup>)



**Figura 9.** Algunos constituyentes químicos de *T. stans*.

Existen reportes acerca de sus efectos fitoquímicos e hipoglucémicos en diferentes modelos animales. Anteriormente los efectos antidiabéticos se atribuían a los alcaloides tecomina y tecostanina (Aguilar-Santamaría et al., 2009)<sup>7</sup>. Sin embargo, Constantino y colaboradores 2003<sup>54</sup>, no observaron un efecto hipoglucémico de cuatro extractos purificados de *T. stans* entre ellos tecomina y tecostanina. Por ello puede haber controversias acerca de su efecto hipoglucémico.

### Área de estudio

El muestreo se realizó en diferentes sitios del estado de Hidalgo para *Bidens odorata* (La Virgen, Carboneras y Zempoala), *Cecropia obtusifolia* (Cantarranas, El Camino y San Antonio), *Costus scaber* (El Río, La Calavera y Cantarranas) y *Tecoma stans* (Ixmiquilpan, Atempa, El Arenal y cuatro cultivos),(Tabla 6).

**Tabla 6.** Características generales de los sitios de muestreo para las cuatro especies. Precipitación media anual (Pma), temperatura media anual (Tma) y altitud.

| Especie                     | Localidad          | Pma (mm) | Tma (°C) | Altitud m.s.n.m |
|-----------------------------|--------------------|----------|----------|-----------------|
| <i>Bidens odorata</i>       | Carboneras         | 553.0    | 14.0     | 2 450           |
|                             | La Virgen          | 650.0    | 14.0     | 2 660           |
|                             | Zempoala           | 436.3    | 13.0     | 2 449           |
| <i>Cecropia obtusifolia</i> | Huehuetla          | 2,422.0  | 24.0     | 520             |
|                             | El Camino          | 2,422.0  | 24.0     | 520             |
|                             | San Antonio        | 2,422.0  | 24.0     | 520             |
| <i>Costus scaber</i>        | La Calavera        | 2,422.0  | 24.0     | 520             |
|                             | El Río             | 2,422.0  | 24.0     | 1 000           |
|                             | Cantarranas        | 2,422.0  | 24.0     | 520             |
| <i>Tecoma stans</i>         | Cerro de La Muñeca | 363.8    | 18.5     | 2 240           |
|                             | H. Maestra         | 363.8    | 18.5     | 1,700           |
|                             | H. Alejandra       | 363.8    | 18.5     | 1,700           |
|                             | H. Esperanza       | 363.8    | 18.5     | 1,700           |
|                             | H. Adela           | 540.3    | 13.9     | 2,200           |
|                             | El Arenal          | 2,200.0  | 20.0     | 300             |
|                             | Atempa             | 2,600 .0 | 19.0     | 475             |

### Recolecta de material vegetal

Se utilizó el método de muestreo simple sin réplica. Se eligieron 10 individuos por población con ambientes contrastantes, los cuales se eligieron al azar con la finalidad de abarcar una mayor área de distribución. Al mismo tiempo se tomaron 15 hojas de diferentes ramas con el propósito de poder obtener una mayor variación foliar.

Las muestras de las plantas se recolectaron por triplicado colocándolas en papel periódico. En cada uno de los ejemplares se anotó: el número de colecta, la fecha, localidad, recolector, fotografías de las plantas y con un geoposicionador satelital (GPS) se tomaron las coordenadas geográficas (latitud, longitud y altitud).

## Herborización

Los ejemplares se llevaron al laboratorio de etnobotánica de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, para su herborización. El secado de los ejemplares recolectados se hizo por medio de calor para preservar las estructuras de las plantas con el fin de permitir su identificación. Los ejemplares se mantuvieron en papel periódico y se colocaron entre dos cartones corrugados y posteriormente se pusieron en las rejillas de la prensa, sujetándolas con dos cintas resistente. Una vez prensados los ejemplares se introdujeron a una secadora de madera con fuente de calor con focos eléctricos. Se revisaron diariamente para evitar que los ejemplares se contaminaran por hongos (Lot y Chiang, 1986)<sup>153</sup>.

### a) Datos morfológicos

Se hizo una determinación de morfotipos con ayuda de morfometría lineal en *Cecropia obtusifolia*, *Costus scaber* y *Tecoma stans*. Se midieron entre ocho y diez caracteres morfológicos que se reportaron en otras especies de plantas foliadas (Tovar-Sánchez y Oyama, 2004<sup>267</sup>; González-Rodríguez y Oyama, 2005<sup>94</sup>, Tabla 7; Figura 10). Los datos discontinuos NV, NA, ND y NLOB se transformarán como  $X=(X)^{1/2}+ 0.5$  (Zar, 1996)<sup>302</sup>. Para todos los datos se probó la normalidad de los datos con pruebas de Korlmogorov-Smirnov.

**Tabla 7.** Lista de los caracteres morfológicos que se midieron en las tres especies de plantas medicinales.

| Carácter  | Descripción                            |
|-----------|--|
| LP        | Longitud del pecíolo (Todas)           |
| Llob      | Longitud del lóbulo (Cobt)             |
| LL        | Longitud de la lámina (Csca)           |
| Lfol      | Longitud del folíolo (Tsta)            |
| AnchMax.  | Ancho máximo (Todas)                   |
| NV        | Número de venas totales (Todas)        |
| Nas       | Número de aserraciones (Tsta)          |
| Nlob      | Número de lóbulos (Cobt)               |
| Anch 1/3B | Ancho del primer tercio basal (Todas)  |
| Anch 1/3A | Ancho del primer tercio apical (Todas) |
| DP        | Diámetro del pecíolo (Todas)           |
| DVM       | Diámetro de la vena media (Todas)      |

Cobt=*Cecropia obtusifolia*, Csa=*Costus scaber*, Tsta=*Tecoma stans*.

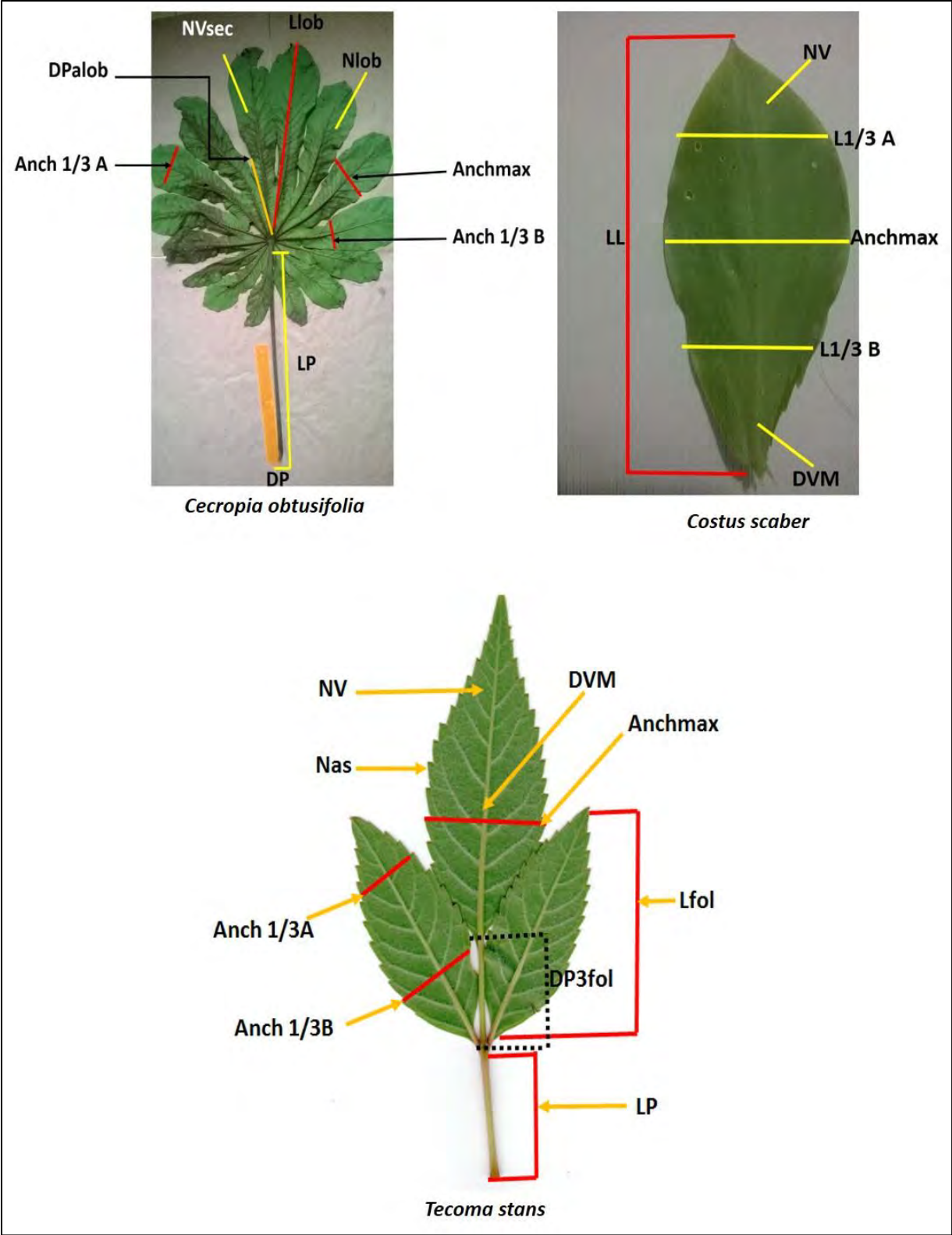


Figura 10. Caracteres morfológicos medidos en las tres especies de plantas antidiabéticas.

## b) Datos genéticos

Se tomaron hojas jóvenes sin daño aparente para la extracción de DNA, las cuales se colocaron en bolsas ziploc y se transportaron en una caja con hielo hasta el laboratorio. Posteriormente se depositaron en refrigeración a una temperatura de -20 °C hasta su uso.

El DNA genómico de las hojas de *C. obtusifolia*, *C. scaber* y *T. stans*, fueron extraídas usando la metodología de CTAB (Sánchez-Hernández y Gaytán-Oyarzún, 2006,<sup>234</sup>Anexo 1). La amplificación de los microsatélites se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en un termociclador marca Thermo scientific modelo 5020.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl. Cada reacción contenía 3 µl de DNA genómico (aproximadamente de 10-50 ng), 3 µl de dNTP's mix 5 mM, 10 µl de agua bidestilada, 5.1 µl de master stock con una concentración de 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub> que contenía 20 mM de Tris-HCl (pH 8.3) y una concentración de 100 mM de KCl, 2 µl de cada uno de los primers a una concentración de 50 µM y 1 U de Taq polimerasa.

***Cecropia obtusifolia***: Se utilizaron tres microsatélites desarrollados en *Cecropia insignis* Liebm, los loci seleccionados fueron Cec45, Cec46 y Cec64 (Wei y Dick, 2014)<sup>288</sup>. Las condiciones de PCR fueron: una desnaturalización 94 °C por 4 minutos, 35 ciclos a 94 °C por 45 segundos, 53 °C por 45 segundos y 72 °C por 45 segundos y una extensión final a 72 °C por 8 minutos.

***Costus scaber***: Las secuencias seleccionadas fueron tres *loci* desarrollados en el género *Costus*, *odc4g*, *odi48* y *cetri2d9* (Kay *et al.*, 2012)<sup>129</sup>. La amplificación de PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización 94 °C por 4 minutos, 30 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 40 segundos y 72 °C por 45 segundos y una extensión final a 72 °C por 8 minutos.

***Tecoma stans***: Las secuencias seleccionadas fueron dos *loci* desarrollados en *Jacaranda copaia* Jacc2 y Jacc22 (Jones y Hubbell, 2003)<sup>122</sup> y uno de *Incarvillea mairei*, IM7 (Hong-Lian *et al.*, 2009)<sup>112</sup>. La amplificación de PCR de los *loci* Jacc2 y Jacc 22, se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización 94 °C por 3 minutos, 30 ciclos a 94 °C por 45 segundos, 62 °C por 60 segundos y 72 °C por 60 segundos y una extensión final a 72 °C por 10 minutos.

Para el *Locus* IM7, la amplificación de PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización 94 °C por 4 minutos, 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 53 °C por 30 segundos y 72 °C por 45 segundos y una extensión final a 72 °C por 8 minutos.

Todos los productos de PCR fueron separados en geles de poliacrilamida al 8%, por lo que se utilizó un marcador de peso molecular de 100-bp y fueron teñidos con red gel 10,000 X.

### **c) Obtención de extractos**

Las muestras vegetales se trocearon con tijeras de podar y se secaron a temperatura de laboratorio. Los extractos se prepararon a partir de las partes vegetales utilizadas de acuerdo a la literatura (Pérez-Escandón *et al.*, 2003)<sup>204</sup>, para lo cual, se colocaron de 2-10 gr de planta seca en 20-100 mL de etanol al 100% y se dejaron macerar durante 20 días. Pasado este lapso, se molieron en un mortero y se filtraron con papel Watman con tamaño de poro de 1.0 mm. El disolvente se eliminó en un rota vapor y la concentración de cada extracto se calculó pesando el residuo obtenido después de evaporar una muestra de volumen conocido.

### **d) Pruebas de inhibición de actividad enzimática**

Se hicieron pruebas de inhibición de la actividad enzimática de  $\alpha$ -glucosidas, a partir de los extractos etanólicos de *C. obtusifolia*, *C. scaber* y *T. stans* de acuerdo al método reportado por Elya *et al.*, (2012)<sup>68</sup>. Para un mg de  $\alpha$ -glucosidasa de *Sacharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich, USA), fue disuelto en 10 ml de buffer fosfato de sodio pH 7.0 que se congeló a -20°C hasta su uso.

Las pruebas de inhibición de los extractos de las tres especies se realizaron a diferentes concentraciones (40, 80, 120, 160 y 200  $\mu$ g/mL), los cuales se pre mezclaron con 490  $\mu$ L de buffer fosfato de sodio pH 7.0 y el volumen del extracto a la concentración requerida, en tubos de 10 mL. Las disoluciones se dejaron reposar por 10-15 minutos para obtener una mezcla homogénea. Pasado este tiempo se tomaron 20  $\mu$ L de la muestra y se adicionaron 250  $\mu$ L de 5 mM p-nitrofenol de  $\alpha$ -D-glucosidasa. Las mezclas se encubaron a 37 °C por 5 minutos y terminado este tiempo se adicionó 25  $\mu$ L de  $\alpha$ -glucosidasa (0.15 U/mL) y se encubó a 37 °C por 15 minutos. La reacción fue terminada por la adición de 2000  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> con una concentración 200 mM.

La actividad de  $\alpha$ -glucosidasa fue determinada en un espectrofotómetro a 405 nm UV-visible marca Jaway modelo 220. El control positivo (acarbose, usada como inhibidor de  $\alpha$ -

glucosidasa) se preparó como las muestras sustituyendo el extracto por acarbosa en concentraciones de 200 y 400 µg/mL., esto en *T.stans*, mientras que en *C. scaber* y *C. obtusifolia* se utilizó acarbosa en las mismas concentraciones que la de los extractos. El buffer fosfato fue usado como blanco y el control negativo fue preparado como las muestras sin extracto, todos los tratamientos se corrieron por triplicado con dos repeticiones experimentales. El porcentaje de inhibición de α-glucosidasa, se determinó de la siguiente manera:

$$\% \alpha - \text{gluc.} = \frac{(\text{control} - \text{muestra})}{\text{área del control}} \times 100$$

## **Análisis de datos**

### **Datos morfológicos**

#### **a) Análisis de funciones discriminantes (AFD)**

Como todo análisis multivariado, el AFD debe cumplir con los siguientes supuestos : 1) que las variables continuas deber seguir una distribución normal multivariante, 2) que la variable categórica y el resto de las variables sean de intervalo o de razón por lo cual deben ser independientes respecto de ella, 3) que existan al menos dos grupos y para cada grupo se necesitan dos o más casos, por lo que el número de variables debe ser menor que el número de objetos, 4) ninguna variable discriminante puede ser combinación lineal de otras variables discriminantes, 5) homocedasticidad, esto es que las matrices de covarianzas dentro de cada grupo deben ser aproximadamente iguales (Green, 1980)<sup>101</sup>.

Para probar la normalidad de los datos, existen métodos descriptivos como histogramas, diagramas de cajas, y también, puede ser determinada por pruebas estadísticas como la de Shapiro-Whitne, Korlmogorov-Smirnov.

Las variables que no presenten una distribución normal se pueden transformar de diferente forma (por ejemplo, ln x, log 10 x, raíz cuadrada de x, etc.). La independencia de las variables se adquiere cuando los valores que toman no están influidos por los valores de otro caso (González-Estrada, 2008<sup>92</sup>; Porrás-Cerrón, 2016<sup>210</sup>). La linealidad es un supuesto implícito de todas las técnicas multivariadas basadas en medidas de correlación y se centra en el análisis de las matrices de correlaciones o de covarianzas y puede ser evaluada a través de la

examinación de los gráficos de dispersión de las variables o a través del análisis de regresión múltiple y realizar una evaluación de los residuos (Cea-D'Ancona,2016)<sup>46</sup>.

La homocedasticidad se refiere a que las variables dependientes tengan iguales varianzas a lo largo del rango del predictor de las variables. El método más común es el de Levene, que se utiliza para valorar si las varianzas de una única variable métrica son iguales a lo largo de cualquier cantidad de grupos, ya que, en muchos casos la heterocedasticidad es el resultado de la no normalidad de una de las variables y la corrección de la normalidad, resuelve igualmente la dispersión de la varianza (Green, 1980<sup>101</sup>; Cea-D'Ancona, 2016)<sup>46</sup>.

La homocedasticidad se refiere a la varianza de la variable continua es estadísticamente la misma en todos los grupos que la variable no métrica la cual delimita a los grupos. La homocedasticidad univariante se contrasta si la matriz de varianzas-covarianzas es la misma en todos los niveles (prueba de Levene). La homocedasticidad multivariante se puede comprobar con las pruebas de Wilks (lambda de Wilks) o la Hotelling (Green, 1980)<sup>101</sup>.

El AFD, se utilizó para conocer si la morfología foliar puede diferenciarse a nivel de localidad, con el método de paso a paso, lo que permite analizar variable por variable.

#### **b) Coeficiente de variación (CV)**

El CV de los caracteres morfológicos es utilizado como un estimador del grado de diversidad genética dentro y entre poblaciones. Un valor bajo en el CV es sinónimo de una baja heredabilidad de los caracteres (Rajanaidu *et al.*, 2000<sup>215</sup>; Bakoumé, 2016<sup>28</sup>). El CV se determinó para cada una de las variables y se obtuvo a partir de la desviación estándar(x)/media\*100.

#### **c) Análisis de Varianza Anidada**

Se realizó una estructura jerárquica del método, los individuos (Ind.) dentro de la localidad (Loc) y el factor localidad (Loc). Los individuos se tomarán como un factor aleatorio, debido a que son representativos de las poblaciones. La anidación se realizó manualmente, utilizando los nueve caracteres morfológicos, con la finalidad de saber si existe una influencia de la localidad en la morfología foliar de los individuos.

En este análisis se tomaron en cuenta la sumatoria de cuadrados para cada uno de los niveles y la suma de cuadrados totales, con lo cual se obtiene el porcentaje de varianza explicada por cada nivel (suma de cuadrados de cada nivel/suma de cuadrados totales x100)



para todos los análisis se utilizaron los paquetes estadísticos JMP v.7 (SAS, 2007)<sup>235</sup> y STATISTICA v.07 (Statsoft, 2007)<sup>249</sup>.

## **Análisis de Datos genéticos**

### **a) Diversidad genética**

Se calcularon las frecuencias alélicas, el número de alelos diferentes, heterocigosidad observada ( $H_o$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), número efectivo de alelos ( $N_e = 1/(1-H_e)$ ), donde  $H_e$ , es la diversidad genética por locus igual a  $1 - \sum p_i^2$ . A su vez  $p_i =$  frecuencia de cada uno de los alelos en cada población.

También, se determinó el porcentaje de loci polimórficos y el promedio de heterocigosidad esperada ( $\hat{H}_e$ ) utilizando los programas TPGA Versión 1.3 (Miller, 1997)<sup>169</sup> y POPGENE Versión 1.31, (Yeh *et al.*, 1999)<sup>301</sup>, generando árboles de similitud entre las especies, basados en las distancias genéticas.

Para cuantificar la diferenciación genética, se emplearon dos técnicas:

**I) Distancia genética de Nei (1978):**  $DG_{(i,j)} = \frac{1}{2} \cdot \sum_{k=1}^n [p_{ik} - p_{kj}]$ ; donde:  $i$  y  $j$  representan a las dos poblaciones,  $n =$  número de alelos y  $p_{ik} =$  frecuencia relativa de cada uno de los alelos en cada una de las poblaciones.

**II) Identidad genética (Nei, 1978b)<sup>185</sup>:**  $I = J_{xy} / (J_x \cdot J_y)^{1/2}$ ;  $J_{xy} = \sum_{k=1}^n P_{ix} \cdot P_{iy}$ .

Donde:  $P_{ix}$  y  $P_{iy}$  son las frecuencias de cada alelo en la población ( $x$ ) y ( $y$ ).

Para verificar las relaciones genéticas entre poblaciones se construyeron dendrogramas con el algoritmo de UPGMA (método de distancias medias sin peso), basado en las distancias genéticas de Nei (1978a)<sup>184</sup>; al mismo tiempo se utilizaron los valores de remuestreo (bootstrap) con reemplazo para todos los loci (10,000 réplicas), usando el programa TPGA.

### **b) Estructura genética**

La estructura genética se obtuvo mediante análisis molecular de la varianza (AMOVA) y análisis de inferencia bayesiana (Falush *et al.*, 2003)<sup>73</sup>; para verificar diferencias entre poblaciones con 10,000 iteraciones con intervalos de confianza del 95%. Con la finalidad de analizar la diferenciación alélica ( $F_{ST}$ ) entre poblaciones, entre individuos dentro de la población y entre individuos de cada población, utilizando el programa Arlequín versión 3.5.2.1 (Excoffier, 2015)<sup>69</sup>.

Los estadísticos “F” (índices de fijación de Wright, 1931<sup>293</sup>, 1951<sup>294</sup>; 1965<sup>295</sup>) se calcularon de acuerdo con lo propuesto por Nei (1972)<sup>183</sup>. La desviación en los niveles de la heterocigosidad esperada bajo la primicia de equilibrio Hardy-Weinberg se divide en tres componentes,  $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  y  $F_{IT}$ . El estadístico  $F_{IS}$  describe el nivel de endogamia o apareamiento entre individuos con relaciones cercanas. Los valores para este índice van de 0 a 1.  $F_{IS} = (h_e - h_o) / h_e$ , donde  $h_o$  = frecuencia de individuos heterocigotos observados de la población y  $h_s$  = frecuencia esperada de individuos heterocigotos.

$F_{ST}$  es la proporción de la desviación del equilibrio contenida dentro de las poblaciones y representa una medida de diferenciación entre poblaciones.  $F_{ST} = (h_t - h_s) / h_s$ , donde  $h_t$  representa la frecuencia esperada de individuos heterocigotos en una población con reproducción al azar, adquiriendo valores de 0 a 1.

El estadístico  $F_{IT}$  puede ser visto como el total de individuos heterocigotos del equilibrio Hardy-Weinberg, comparado entre  $F_{IS}$  y  $F_{ST}$ , es decir, es un balance entre deriva y flujo genético de los individuos dentro y entre poblaciones, adquiriendo valores de -1 a 1.

Se estimó el número de migrantes por generación ( $Nm$ ), donde  $N$  = tamaño efectivo de la población y  $m$  = proporción de intercambio de migrantes por generación entre poblaciones.  $Nm$  se estimó empleando el valor de  $F_{ST}$ , descrito previamente. De acuerdo con Wright (1931)<sup>277</sup>,  $F_{ST} = 1 / (1 - 4Nm)$ .

### **c) Análisis de parentesco y relaciones genéticas**

La evaluación de la estructura genética de las poblaciones es dividida regularmente para hacer comparaciones a tal grado que la variabilidad genética permita encontrar diferencias entre los individuos y dentro de las poblaciones. Por lo que la representación de la estructura de una población mediante un perfil de distancias genéticas y la utilización de la técnica de acoplamiento de individuos es adecuada para estudiar la estructura genética de las poblaciones, donde la relación entre los agentes depende de las diferencias genéticas entre ellos (Rozenfeld *et al.*, 2007)<sup>228</sup>.

Se utilizó el análisis de red de individuos con el programa EDENetwork versión 2.18 (Kivelä *et al.*, 2014)<sup>138</sup>, con lo cual se representó gráficamente las relaciones genéticas entre los individuos de las poblaciones. Así también, se realizó un análisis de parentesco entre los

individuos dentro de las poblaciones, con el programa Kingroup versión 2.01.202 (Konovalov *et al.*, 2004)<sup>141</sup>.

#### **d) Demografía histórica y prueba de neutralidad**

Se utilizó la distribución del número de alelos diferentes entre los individuos para explorar los patrones demográficos de las poblaciones, con el programa Arlequín versión 3.5.2.1 (Excoffier y Lischer, 2015)<sup>70</sup>. La desviación de la neutralidad selectiva se realizó mediante las pruebas de  $F_s$  (Fu, 1997)<sup>81</sup> y de Tajima  $D$  (Tajima, 1989)<sup>261</sup>, estas pruebas se basan en el modelo de sitios infinitos. Donde el estadístico  $F_{st}$  es muy sensible a la expansión demográfica de las poblaciones, por lo que generalmente la prueba de neutralidad presenta valores negativos, como producto de la desviación del equilibrio poblacional.

En la prueba de Tajima, valores significativos de “ $D$ ” pueden deberse a efectos de selección, expansión poblacional, cuello de botella o heterogeneidad en los rangos de mutación. Ambos modelos pueden determinar la misma cantidad de sitios infinitos, pero las diferencias pueden ser debidas a selección o heterogeneidad entre los rangos de mutación de los sitios (Excoffier y Lischer, 2015)<sup>70</sup>, estas pruebas se utilizaron como un indicador de la expansión reciente de las poblaciones.

La distribución de las diferencias entre pares de alelos (distribución mismatch) se calculó para determinar la prueba de expansión demográfica (Rogers y Harpending, 1992)<sup>224</sup>. El modelo de Rogers y Harpending (1992)<sup>224</sup>, se utilizó para calcular el tiempo de expansión de la población estimando la tasa de mutación,  $\tau$  (Tau) que es una media de crecimiento y declinación en unidades de tiempo mutación,  $\Theta_0$  y  $\Theta_1$ , son el tamaño de la población antes y después de la expansión respectivamente y la desviación de la suma de cuadrados (DSS).

#### **Datos de inhibición**

##### **a) Análisis de Varianza factorial**

Los análisis de varianza factorial (ANOVAf), es una herramienta muy utilizada en estadística cuando se tienen datos de pequeñas dimensiones, proporciona igual solución que la tradicional ANOVA cuando las variables dependientes son funcionales sin dejar de lado su poder de explicación y facilidad de interpretación. Para lo cual se suele emplear el siguiente modelo:  $Y_{pr}(t) = B_0(t) + \alpha_p(t) + \epsilon_{pr}(t)$ , donde  $B_0(t)$  es la función promedio de la característica de interés (% de inhibición de alfa glucosidasa),  $\alpha_p(t)$  es el efecto sobre la característica (Y) al

usar la cantidad de extracto de la planta  $p$ . El término  $\epsilon_{pr}(t)$  representa la función residual, la cual es la variación no explicada respecto a la  $r$ -ésima  $p$  (Ramsay y Silverman, 2005)<sup>218</sup>.

Este análisis se utilizó para evaluar las variaciones en la actividad enzimática en los diferentes individuos a diversos tiempos en las que se llevó a cabo la reacción enzimática. Además de que este tipo de análisis nos permite hacer predicciones en algún instante del tiempo  $t$  durante el experimento y la existencia de algún efecto significativo sobre la variable de interés ( $Y$ ), mediante la evaluación de la cinética de Menten (Aarts *et al.*, 2014)<sup>1</sup>.

También se calculó la concentración del 50% de inhibición enzimática ( $CI_{50}$ ,  $\mu\text{g/mL}$ ) según la relación:  $CI_{50} = C1 - DC$ , donde  $DC = [C1 - C2] \times (PI1 - 50) / (PI1 - PI2)$ . Los valores de  $PI1$  y  $PI2$  corresponden a los datos de los porcentajes de inhibición inmediatamente superiores al 50% de inhibición,  $C1$  y  $C2$  pertenecen a las concentraciones en las que se producen  $PI1$  y  $PI2$ , respectivamente. Este análisis se realizó para determinar la(s) localidad (es), la especie y los genotipos con mayor potencial de inhibición enzimática para promover su cultivo *ex situ* como una estrategia de conservación.

#### **b) Prueba de Tukey**

Se hizo una prueba de Tukey para ver si existen diferencias significativas entre los promedios de los extractos provenientes de plantas medicinales de las regiones del estado de Hidalgo, con la finalidad de ver la especie con mayor potencial de inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa.

#### **Determinación de ecotipos**

Se calcularon las medias de las variables morfológicas por individuo y se correlacionaron con los datos genéticos y de inhibición, utilizando análisis de correlaciones canónicas (ACC) y prueba de mantel.

El ACC calcula la correlación entre las variables dentro y entre grupos. Además, permite hacer mejores interpretaciones sobre los ejes de ordenación. El ACC, deriva teóricamente de la relación de máxima similitud bajo las condiciones de ordenación canónica. El supuesto que se debe cumplir es que la variable de respuesta sea unimodal. El modelo de respuesta de Gauss (forma de campana) son un ejemplo donde los métodos que se representan son

particularmente buenos. Los puntos en el centro del diagrama de ordenación pueden tener un óptimo de expresión (Teer-Braak, 1986)<sup>263</sup>. Se basa en la siguiente ecuación:

$$E(y_{ik}) = c_k \exp[1/2(x_i - u_k)^2/t_k^2]$$

Donde:  $Y_{ik}$  denota el valor promedio esperado de los sitios  $i$  que se encuentran en el eje de las ordenadas ( $X_i$ ).  $K$  representa a los grupos como  $C_k$ . El valor máximo de la curva o valor óptimo de la variable ( $\mu_k$ ), es el valor máximo de  $X$  cuando toma su máximo valor,  $t_k$  representa la tolerancia a lo largo de la variable de interés (geografía). Las condiciones son, 1) que la tolerancia de  $X$  sea igual ( $t_k=t$ ,  $k=1\dots m$ ), 2) que el máximo valor de las variables se a igual ( $C_k=C$ ,  $K=1, m$ ), 3) el valor óptimo de la variable de interés ( $\mu_k$ ) se distribuya de manera uniforme en el intervalo de  $A$ , que es mayor comparado con  $t$ , 4) los puntos de los datos sobre el eje ( $X$ ) se distribuyen de manera homogénea sobre el intervalo  $B$  que se encuentra en  $A$  (Teer-Braak, 1986)<sup>263</sup>.

Se realizaron dos tipos de ACC, el primero entre variables morfológicas y genéticas, con la finalidad de determinar si existe un condicionante genético en la morfología foliar. El segundo entre variables del primer ACC y las variables geográficas (latitud, longitud y altitud), con la finalidad de ver si existe un efecto de las variables micro geográficas en la distribución espacial de la morfología y la genética. En este análisis se explicaron por las dos primeras correspondencias canónicas (CC1 y CC 2), ya que la CC 3 no fue significativa.

## Resultados

### Resultados morfológicos de *Cecropia obtusifolia*

#### Diferenciación morfológica de *C. obtusifolia* a nivel local

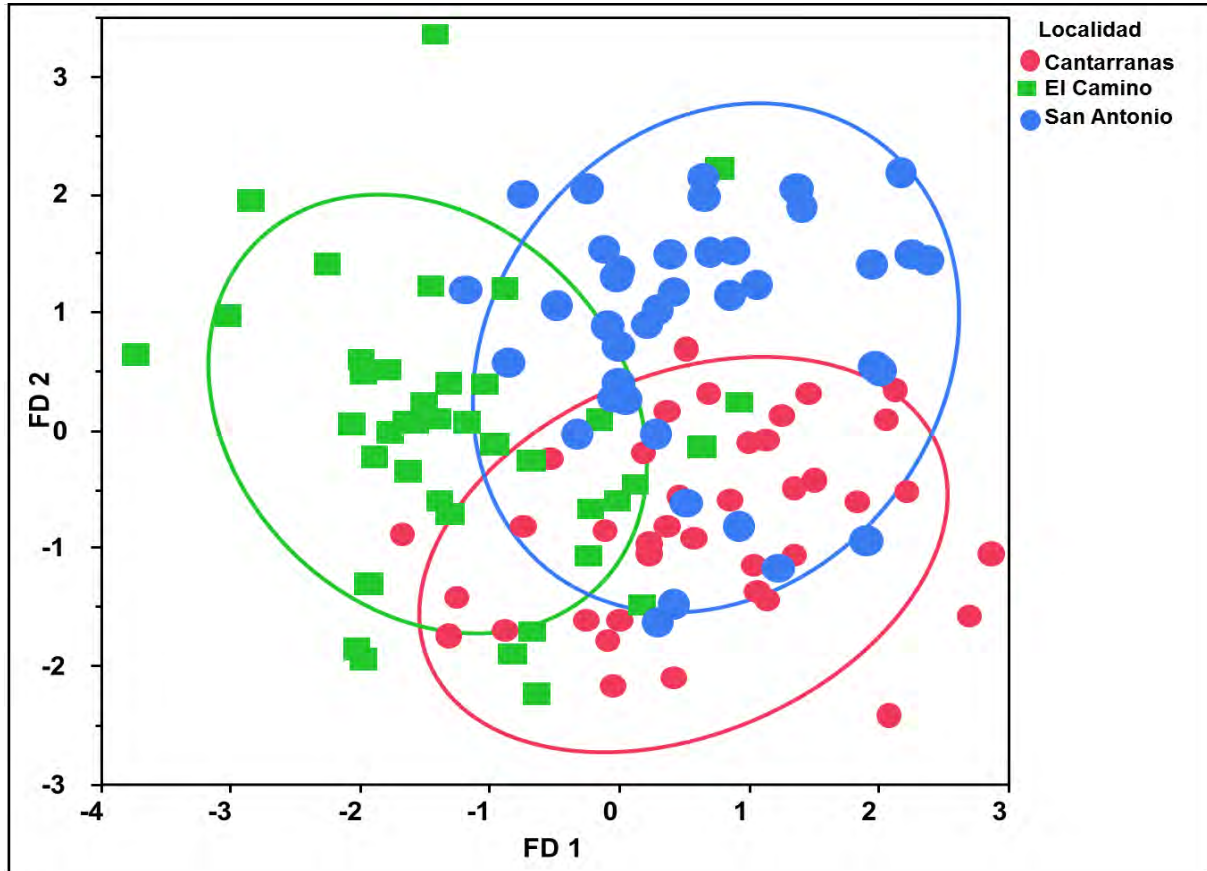
Con la utilización de las diez variables morfológicas analizadas en las tres poblaciones de *C. obtusifolia*, se obtuvo que el diámetro de la vena media (DVM), diámetro del pecíolo (DP) y Número de lóbulos (NLOB) se correlacionaron más con ambas funciones discriminantes (FD 1 y FD 2) con  $W\lambda = 0.355$ ,  $F_{(22,224)} = 6.58$   $p < 0.0001$ . El coeficiente de variación (CV) oscila entre 12.58 (Nlob) a 36.70 % en LP en promedio para todas las localidades (Tabla 8.).

**Tabla 8.** AFD de las diez variables morfológicas en las tres poblaciones de *C. obtusifolia*. Donde se indican la media, desviación estándar (DS), coeficiente de variación (CV), los valores propios (V. Prop.), %Var. = porcentaje de varianza explicada y significancia (P).

| Variable | DS     | Media (mm) | CV    | FD 1         | FD 2          |
|----------|--------|------------|-------|--------------|---------------|
| LP       | 146.57 | 399.3      | 36.70 | 0.002        | -0.005        |
| LLOB     | 72.32  | 244.71     | 29.55 | -0.025       | 0.013         |
| AnchMax  | 24.01  | 81.14      | 29.59 | 0.090        | 0.070         |
| DP       | 2.66   | 8.15       | 32.63 | <b>0.557</b> | <b>-0.185</b> |
| DVM      | 0.62   | 1.73       | 35.83 | <b>0.613</b> | <b>0.826</b>  |
| L 1/3 B  | 15.61  | 43.62      | 35.78 | -0.024       | 0.089         |
| L 1/3 A  | 23.23  | 64.36      | 36.09 | 0.075        | -0.054        |
| DPAlob   | 17.96  | 65.31      | 27.50 | 0.060        | 0.021         |
| Nlob     | 1.51   | 12.00      | 12.58 | <b>0.407</b> | <b>0.763</b>  |
| NVxlob   | 6.41   | 32.62      | 19.65 | -0.017       | -0.040        |
| V.Prop.  |        |            |       | 0.324        | 0.124         |
| P        |        |            |       | 0.0001       | 0.0001        |
| %Var.    |        |            |       | 60.48        | 39.52         |

En el AFD con las diez variables morfológicas, se obtuvieron tres grupos, el primero formado por San Antonio, el segundo por El Camino y el tercer grupo conformado por Cantarranas. La FD 1 explicó el 60.48% de la variación morfológica, mientras que FD 2 explicó un 39.52% (Figura 11). De acuerdo con las distancias de Mahalanobis calculadas entre pares de poblaciones, se encontró que la distancia más grande se encuentra entre El Camino y Cantarranas (4.63) y la distancia más corta entre San Antonio y Cantarranas (3.31) y una distancia de 4.14 entre El Camino y San Antonio. El porcentaje total de asignación correcta

para los grupos fue alto con un 74.16%. La población con el mayor porcentaje de asignación fue Cantarranas con 85% y la población con un menor porcentaje de asignación correcta fue El Camino con un 65% y un 72.5% para la población de San Antonio.



**Figura 11.** AFD de *C. obtusifolia* agrupación de las tres poblaciones utilizando las diez variables morfológicas.

#### **Análisis de varianza anidada (ANOVA)**

El análisis de ANOVA, muestra que el individuo con tiene el mayor porcentaje de la varianza explicada en los diez caracteres morfológicos analizados. En segundo lugar, fue el factor localidad y el factor que obtuvo un menor porcentaje de la varianza fue el sexo [Loc.], y en todos los factores se obtuvieron valores significativos  $P < 0.0001$ . En el que se demuestra un marcado efecto de la localidad sobre los individuos y que, a su vez, la existencia de diferencias significativa en las características morfológicas de los sexos a nivel local (Tabla 9).

**Tabla 9.** ANOVA de las diez variables morfológicas, donde se muestra el efecto para cada uno de los factores. Localidad [Loc], Individuo dentro de la localidad y por sexo (Ind. [Loc., sexo]) y el factor sexo dentro de la localidad (Loc.). Se indica el estadístico F, el porcentaje de varianza por cada factor (%Var.) con significancia de  $P < 0.0001$  (\*\*\*) y (\*\*) para  $P = 0.007$ .

| Variable | Loc (F <sub>2,119</sub> )<br>(%Var.) | Ind [Loc, Sexo]<br>(F <sub>18,119</sub> ) (%Var.) | Sexo [Loc] (F <sub>3,119</sub> )<br>(%Var.) |
|----------|--------------------------------------|---|---|
| LP       | 35.26 (20.59) ***                    | 7.52 (39.54) ***                                  | 13.5 (11.83) ***                            |
| Llob     | 39.96 (15.36) ***                    | 15.85 (54.84) ***                                 | 19.68 (11.35) ***                           |
| Anchmax  | 45.62 (15.46) ***                    | 18.67 (56.92) ***                                 | 22.35 (11.36) ***                           |
| DP       | 75.06 (24.62) ***                    | 17.03 (50.26) ***                                 | 19.06 (9.38) ***                            |
| DVM      | 83.09 (22.24) ***                    | 22.96 (55.31) ***                                 | 23.94 (9.61) ***                            |
| L1/3B    | 5.16 (2.74) **                       | 9.54 (45.53) ***                                  | 33.04 (26.28) ***                           |
| L1/3A    | 58.75 (18.33) ***                    | 18.95 (53.24) ***                                 | 28.74 (13.45) ***                           |
| DPAlob   | 28.61 (13.24) ***                    | 11.36 (47.32) ***                                 | 24.81 (17.22) ***                           |
| Nlob     | 53.27 (18.79) ***                    | 17.58 (55.8) ***                                  | 16.05 (8.49) ***                            |
| NVxlob   | 19.05 (6.91) ***                     | 18.71 (61.09) ***                                 | 26.84 (14.60) ***                           |

#### **Dimorfismo sexual en *C. obtusifolia***

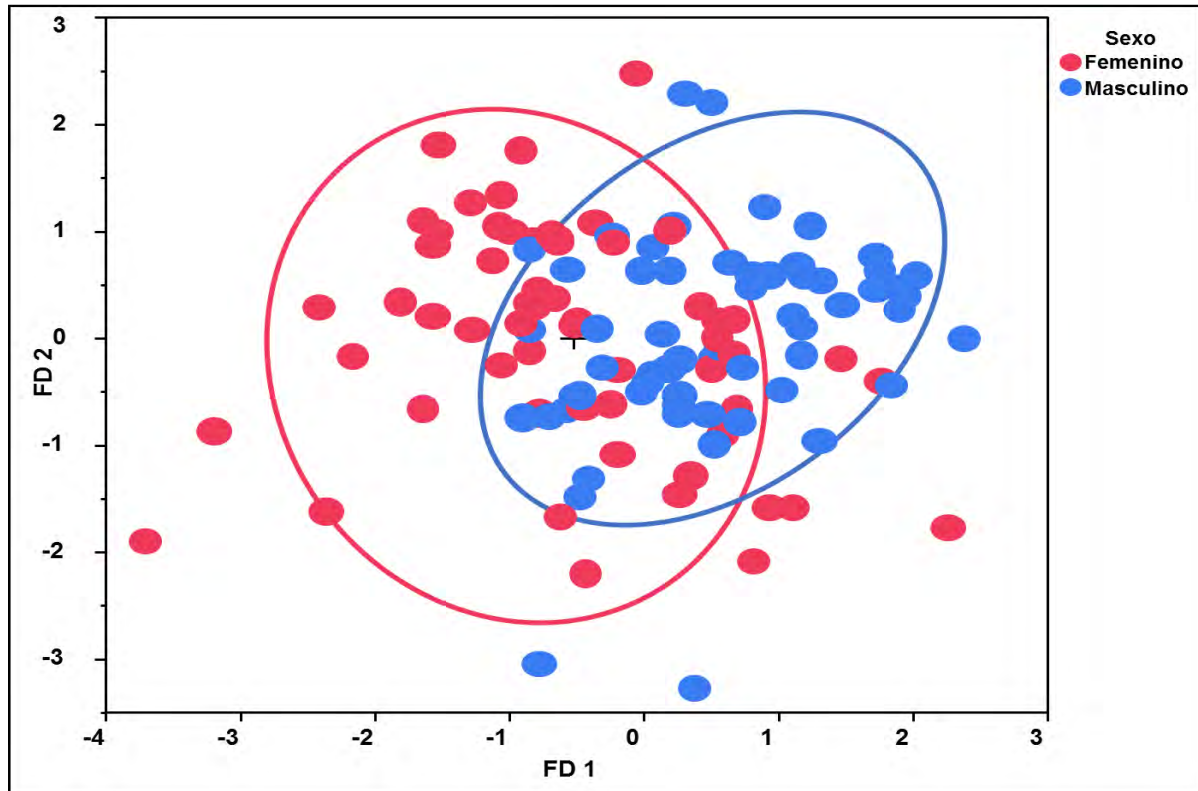
Se encontraron diferencias significativas entre los sexos ( $P < 0.0001$ ). Con la prueba de Tukey, se determinó que en el 80% de los caracteres foliares fueron mayores en los individuos femeninos que en los masculinos. Sin embargo, DPAlob y Nlob, no se encontraron diferencias significativas entre los sexos (Tabla 10).



**Tabla 10.** Media y error estándar (e.e) de las diez variables morfológicas, letras distintas en las filas denotan diferencias significativas para la Prueba de Tukey.

| Variable  | Femeninos (media $\pm$ e.e) | Masculinos (media $\pm$ e.e) |
|-----------|-----------------------------|------------------------------|
| LP        | 449.09 $\pm$ 17.86 a        | 349.51 $\pm$ 17.15 b         |
| DP        | 8.89 $\pm$ 0.33 a           | 7.39 $\pm$ 0.29 b            |
| Llob      | 267.56 $\pm$ 8.89 a         | 221.80 $\pm$ 8.30 b          |
| Anchmax   | 87.91 $\pm$ 2.99 a          | 74.36 $\pm$ 2.52 b           |
| L1/3 B    | 46.96 $\pm$ 1.97 a          | 40.27 $\pm$ 1.58 b           |
| L1/3 A    | 70.55 $\pm$ 2.90 a          | 58.16 $\pm$ 2.39 b           |
| DPAlob    | 68.26 $\pm$ 2.96 a          | 62.37 $\pm$ 2.40 a           |
| DVM       | 1.90 $\pm$ 0.07 a           | 1.56 $\pm$ 0.05 b            |
| NVsecxlob | 34.33 $\pm$ 0.80 a          | 30.91 $\pm$ 0.69 b           |
| Nlob      | 12.13 $\pm$ 0.19 a          | 11.87 $\pm$ 0.19 a           |

En el AFD, se formaron dos grupos bien diferenciados (Figura 12). Los caracteres que permitieron la discriminación entre los sexos y que más se correlacionaron con la FD 1 fueron: LP (-0.795), Llob (-1.023), NVsecxlob (-0.586) y Nlob (0.933) con lo cual se explicó el 100% de la variación.



**Figura 12.** AFD entre sexos de *C. obtusifolia*.

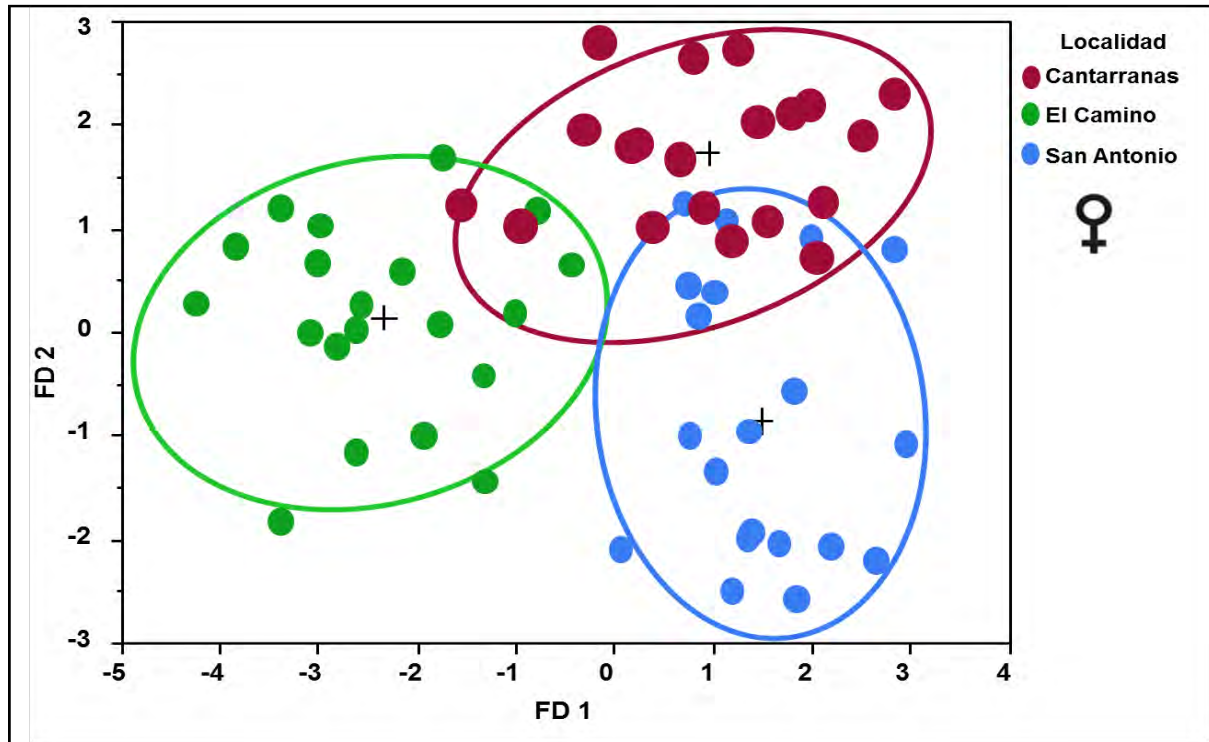
### **Diferenciación morfológica entre sexos entre localidades**

Se encontraron diferencias morfológicas entre individuos dentro y entre localidades, donde se obtuvo que los árboles femeninos de Cantarranas son más grandes que los individuos masculinos y femeninos de las localidades de San Antonio y El Camino en la mayoría de los caracteres. De acuerdo a las pruebas de Tukey dentro de las poblaciones se encontró que en Cantarranas el Nlob y NVsexlob no difieren entre individuos masculinos y femenino. En San Antonio fueron DP, Llob, Anchmax, L1/3 A y DVM, mientras que en el camino fueron el DP, DVM, Nlob y NVsexlob (Tabla 11).

**Tabla 11.** Media y error estándar de las diez variables morfológicas de *C. obtusifolia* en las tres localidades en los sexos. Pruebas de Tukey se determinaron dentro de las localidades (letras mayúsculas) y entre los sexos entre poblaciones (letras minúsculas).

| Variable  | Cantarranas                 |                              | San Antonio                  |                              | El Camino                    |                             |
|-----------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
|           | Femenino                    | Masculino                    | Femenino                     | Masculino                    | Femenino                     | Masculino                   |
| LP        | 542.13±31.78 A <sup>a</sup> | 441.74±24.34 B <sup>ab</sup> | 406.84±26.38 A <sup>bc</sup> | 323.28±31.29 B <sup>bc</sup> | 398.32±29.56 A <sup>cd</sup> | 283.98±21.82 B <sup>d</sup> |
| DP        | 11.00±0.36 A <sup>a</sup>   | 8.67±0.45 B <sup>bc</sup>    | 8.62±0.53 A <sup>c</sup>     | 7.33±0.48 A <sup>ab</sup>    | 7.06±0.65 A <sup>cd</sup>    | 6.21±0.45 A <sup>d</sup>    |
| Llob      | 311.88±11.85 A <sup>a</sup> | 252.59±12.51 B <sup>b</sup>  | 243.85±12.75 A <sup>c</sup>  | 224.78±17.56 A <sup>ab</sup> | 246.94±19.71 A <sup>b</sup>  | 188.22±9.29 B <sup>c</sup>  |
| Anchmax   | 102.17±4.21 A <sup>a</sup>  | 85.34±3.55 B <sup>b</sup>    | 76.92±5.00 A <sup>c</sup>    | 75.90±4.56 A <sup>ab</sup>   | 84.67±6.90 A <sup>b</sup>    | 61.83±3.36 B <sup>c</sup>   |
| L1/3 B    | 51.73±2.54 A <sup>ab</sup>  | 41.13±1.88 B <sup>bc</sup>   | 37.89±3.08 A <sup>cd</sup>   | 50.54±2.44 B <sup>a</sup>    | 51.28±5.25 A <sup>ab</sup>   | 29.14±1.29 B <sup>d</sup>   |
| L1/3 A    | 85.58±3.63 A <sup>a</sup>   | 68.58±3.00 B <sup>b</sup>    | 58.78±5.00 A <sup>c</sup>    | 62.33±4.13 A <sup>ab</sup>   | 67.31±6.87 A <sup>b</sup>    | 43.56±2.99 B <sup>c</sup>   |
| DPAlob    | 78.46±4.13 A <sup>a</sup>   | 65.73±3.47 B <sup>ab</sup>   | 60.74±3.69 A <sup>bc</sup>   | 73.89±3.94 B <sup>cd</sup>   | 65.57±2.53 A <sup>ab</sup>   | 47.5±2.65 B <sup>d</sup>    |
| DVM       | 2.42±0.12 A <sup>a</sup>    | 1.76b±0.11 B <sup>bc</sup>   | 1.76±0.13 A <sup>c</sup>     | 1.67±0.07 A <sup>d</sup>     | 1.53±0.17 A <sup>c</sup>     | 1.27±0.08 A <sup>ab</sup>   |
| NVsecxlob | 35.39±1.09 A <sup>a</sup>   | 34.60±0.85 A <sup>ab</sup>   | 35.61±1.58 A <sup>bc</sup>   | 27.27±1.13 B <sup>cd</sup>   | 32.00±1.83 A <sup>ab</sup>   | 30.86±1.07 A <sup>d</sup>   |
| Nlob      | 12.30±0.29 A <sup>a</sup>   | 12.90±0.25 A <sup>ab</sup>   | 13.00±0.21 A <sup>ab</sup>   | 11.6±0.35 B <sup>ab</sup>    | 11.1±0.38 A <sup>bc</sup>    | 11.1±0.26 A <sup>c</sup>    |

En el AFD entre individuos masculinos y femeninos, se obtuvo que para las plantas femeninas, las variables morfométricas que más se correlacionaron con la FD 1 fueron: Llob (1.009), DP (-2.728) y L1/3A (1.174, Tabla 12), con lo cual se explicó el 71.70% de la variación acumulada. En la FD 2 las variables más correlacionadas fueron: L1/3A (1.390) y Nlob (-1.291) con lo que se explicó el 28.30% de la variación de los datos (Figura 13).



**Figura 13.** AFD de los individuos femeninos en las tres localidades de *C. obtusifolia*.

**Tabla 12.** AFD por sexos de *C. obtusifolia*, donde se indican los valores propios (Val. Prop), el porcentaje de varianza explicada (%Varianza) y el grado de significancia para cada función discriminante(P).

| Variable   | FD 1      | FD 2     | FD 1       | FD 2     |
|------------|-----------|----------|------------|----------|
|            | Femeninos |          | Masculinos |          |
| LP         | -0.097    | 0.317    | 0.774      | -0.583   |
| Llob       | 1.009     | 0.304    | 0.630      | 1.588    |
| AnchMax    | 0.815     | -0.892   | -2.021     | -0.570   |
| DP         | -2.728    | 0.239    | 0.691      | 1.301    |
| DVM        | -0.945    | 0.729    | -1.197     | -2.057   |
| L1/3 B     | 0.503     | -0.841   | 1.143      | 0.294    |
| L1/3A      | 1.174     | 1.390    | 1.440      | 0.389    |
| DPAlob     | 0.397     | 0.242    | -0.047     | 0.529    |
| NVxlob     | 0.512     | -0.099   | -1.074     | 0.156    |
| Nlob       | -0.480    | -1.291   | 0.538      | 0.105    |
| Val. Prop. | 3.014     | 1.189    | 3.326      | 1.211    |
| %Varianza  | 71.70     | 28.30    | 73.30      | 26.70    |
| P          | < 0.0001  | < 0.0001 | < 0.0001   | < 0.0001 |

Con base en las distancias de Mahalanobis calculadas entre pares de poblaciones con respecto a los individuos femeninos, la distancia más grande se encontró entre El Camino y San Antonio (14.60) y la distancia más corta entre San Antonio y Cantarranas (6.70) y de 12.40 entre Cantarranas y El Camino.

El porcentaje total de asignación correcta para el grupo femenino fue alto con un 85%. Las poblaciones que obtuvieron el porcentaje más alto de asignación fueron Cantarranas y El Camino con el 90% y un 72.5% para la población de San Antonio.

En el caso de los individuos masculinos las variables que más se correlacionaron con la FD1 fueron: Anchmax. ( $r = -2.021$ ), DVM ( $r = -1.197$ ), L1/3B ( $r = 1.143$ ), L1/3A ( $r = 1.440$ ) y NVsexlob ( $r = -1.074$ ). Para la FD2 fueron: Llob ( $r = 1.588$ ), DP ( $r = 1.301$ ) y DVM ( $r = -2.057$ , Tabla 12). De acuerdo con las distancias de Mahalanobis calculadas, la distancia más grande fue entre San Antonio y el Camino (18.81) y la distancia más pequeña entre Cantarranas y El

Camino (8.87) y una distancia de 11.10 entre Cantarranas y San Antonio. El porcentaje de asignación correcta total fue del 91%. El mayor porcentaje se presentó en las poblaciones de Cantarranas y El Camino con 95% y un 85% para San Antonio (Figura 14).

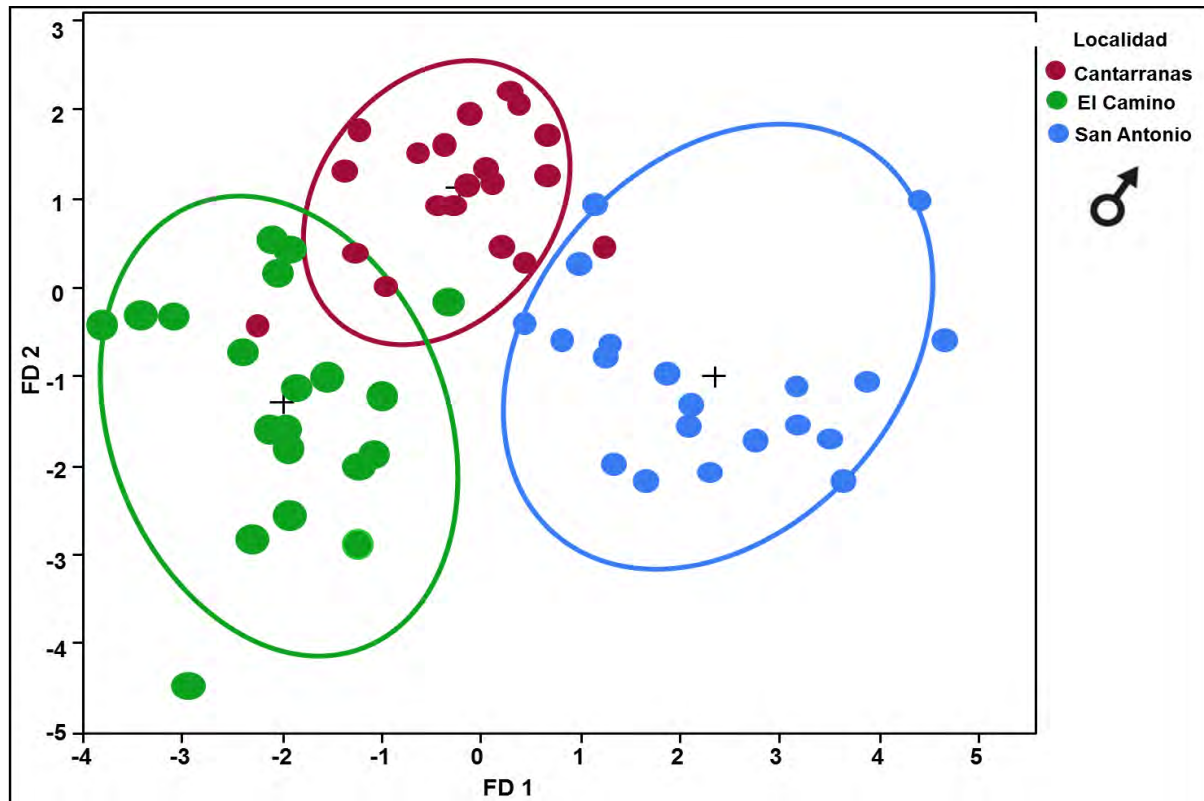


Figura 14. AFD de los individuos masculinos en las tres poblaciones de *C. obtusifolia*.

### Resultados genéticos de *Cecropia obtusifolia*

#### Diversidad genética

De las amplificaciones de los tres microsatélites con los 24 individuos de *C. obtusifolia*, solo se obtuvieron datos genéticos de los individuos masculinos. Por lo que se registraron 26 alelos con los tres *loci*, los cuales fueron 100% polimórficos. La heterocigosidad observada por *locus* ( $H_o$ ) fue de 0.58(Cec 46) a 0.75(Cec 45).

El número efectivo de alelos ( $N_e$ ) refleja diferentes polimorfismos de los *loci* (3.37-3.92). Se encontró un total de 5.33 alelos únicos ( $A_u$ ), los cuales se encuentran distribuidos de la siguiente manera: 1.33 en Cantarranas, 1.67 en la población de El Camino y 2.33 en San Antonio. La heterocigosidad esperada en el locus Cec 64 ( $H_e = 0.73$ ) y  $H_e = 0.70$  en el locus Cec 45, este último valor fue menor con respecto al  $H_o = 0.75$  (Tabla 13).

**Tabla 13.** Descripción de los tres *loci* usados en *C. obtusifolia*, se incluye tamaño de banda (Tb), número de alelos (Na), número efectivo de alelos (Ne), heterocigosidad observada (Ho), heterocigosidad esperada (He), y los estadísticos F de Wright ( $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$ ,  $F_{ST}$ ) y número de migrantes (Nm).

| Locus         | Tb      | Na   | Ne   | Ho    | He   | $F_{IS}$ | $F_{IT}$ | $F_{ST}$ | Nm   |
|---------------|---------|------|------|-------|------|----------|----------|----------|------|
| <b>Cec 45</b> | 116-196 | 4.67 | 3.92 | 0.75  | 0.70 | -0.075   | 0.10     | 0.16     | 1.32 |
| <b>Cec 46</b> | 124-194 | 4.00 | 3.37 | 0.58  | 0.70 | 0.164    | 0.32     | 0.19     | 1.09 |
| <b>Cec 64</b> | 120-190 | 4.67 | 3.73 | 0.67  | 0.73 | 0.086    | 0.22     | 0.15     | 1.42 |
| <b>Media</b>  |         | 4.45 | 3.67 | 0.666 | 0.71 | 0.058    | 0.213    | 0.166    |      |

La diversidad genética y riqueza alélica fueron ligeramente más alta en la población de El Camino ( $D_g = 0.88$ ,  $R_a = 4.26$ ) con respecto a Cantarranas que fue de 0.78 y 3.08 respectivamente. Los valores de heterocigosidad observada (Ho) fueron menores a lo esperado en dos poblaciones (Cantarranas y San Antonio) y la población de El Camino fue mayor a lo esperado  $H_o = 0.83$ ,  $H_e = 0.72$  (Tabla 14).

**Tabla 14.** Sumario de diversidad genética de *C. obtusifolia*

| Población   | $D_g$ | $R_a$ | Na   | Ne   | I    | Ho   | He   | $F_{IS}$ |
|-------------|-------|-------|------|------|------|------|------|----------|
| Cantarranas | 0.78  | 3.00  | 3.33 | 2.86 | 1.10 | 0.42 | 0.65 | 0.35     |
| El Camino   | 0.88  | 4.26  | 4.67 | 3.64 | 1.40 | 0.83 | 0.72 | -0.16    |
| San Antonio | 0.87  | 4.20  | 5.33 | 4.53 | 1.55 | 0.75 | 0.76 | 0.02     |

### Estructura genética

El análisis de varianza molecular (AMOVA) muestra que la mayor variación se encuentra dentro de las poblaciones con un 88% de la varianza y 12% de la varianza se encuentra entre poblaciones con un valor de  $F_{ST} = 0.119$  (Tabla 15). Los valores de  $F_{ST}$  entre pares de poblaciones, fueron altos y significativos.

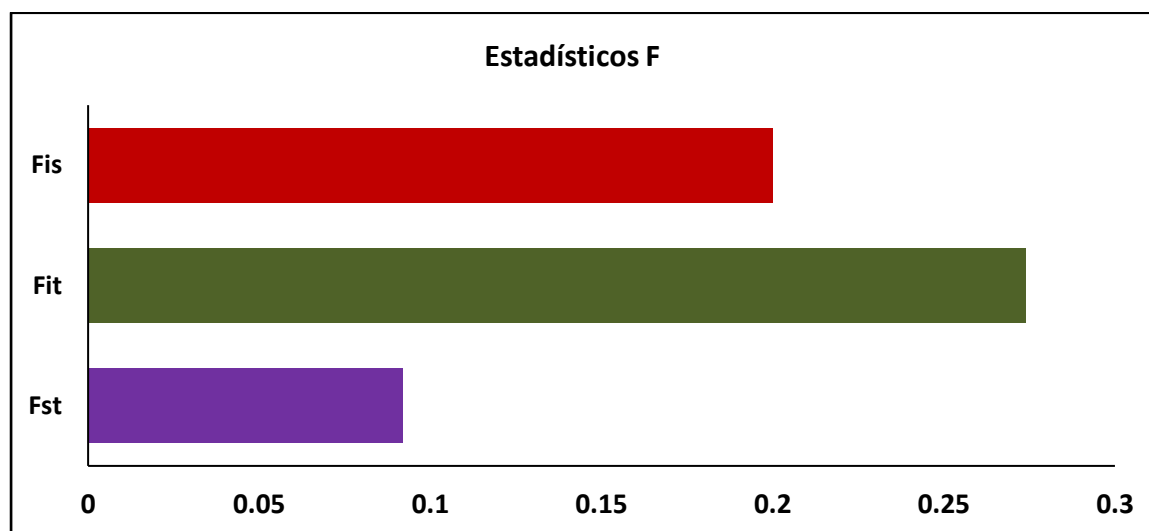
**Tabla 15.** Análisis de varianza molecular (AMOVA) entre poblaciones de *C. obtusifolia*.

| Factor                    | gl | SC    | MS   | %Varianza |
|---------------------------|----|-------|------|-----------|
| Entre poblaciones         | 2  | 5,042 | 2,52 | 12        |
| Dentro de las poblaciones | 21 | 25,5  | 1,21 | 88        |
| Total                     | 23 | 3,542 |      | 100       |

El AMOVA dentro de las poblaciones, se obtuvo que la estructuración genética se encontró a nivel intraindividual con un 72.59% de la variación genética (Tabla 16) y La estructuración de las poblaciones se encuentra determinada por los valores de  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$  (0.200 y 0.274) respectivamente. Además, presentaron una moderada diferenciación genética  $F_{ST}$ = 0.092 (Figura 15).

**Tabla 16.** AMOVA dentro de las poblaciones de *C. obtusifolia*

| Factor                   | gl | SC     | MS    | %Varianza |
|--------------------------|----|--------|-------|-----------|
| Entre poblaciones        | 2  | 5,042  | 0.127 | 9.26      |
| Entre individuos         | 9  | 13.50  | 0.250 | 18.15     |
| Dentro de los individuos | 12 | 12.00  | 1.000 | 72.59     |
| Total                    | 23 | 30.542 | 1.377 | 100       |



**Figura 15.** Estadísticos F de Wright.



Las poblaciones que mejor se diferenciaron genéticamente fueron El Camino y Cantarranas ( $F_{ST}= 0.173$ ). Las poblaciones que poco se diferenciaron genéticamente fueron San Antonio y El Camino ( $F_{ST}= 0.062$ ), que a su vez presentaron el valor más alto de  $N_m= 3.79$  individuos por generación (Tabla 17).

**Tabla 17.** Número de migrantes ( $N_m$ ), los valores se encuentran debajo de la diagonal y valores de  $F_{ST}$  entre pares de poblaciones se localizan arriba de la diagonal.

| Población   | Cantarranas | El Camino | San Antonio |
|-------------|-------------|-----------|-------------|
| Cantarranas | -           | 0.173 **  | 0.118 *     |
| El Camino   | 1.2         | -         | 0.062 ns    |
| San Antonio | 1.86        | 3.79      | -           |

#### **Efecto de las variables geográficas en los datos genéticos**

Se evidenció que los alelos de los tres loci presentaron una estructuración espacial (presencia o ausencia de los alelos ) con respecto a las variables geográficas (latitud, longitud y altitud), donde se observó que los alelos 124, 134 y 184 de los *locus* Cec 45, Cec 46 y Cec64 respectivamente, se encontraron a lo largo del gradiente latitudinal ( $20^{\circ}36'-20^{\circ}48'$ ), las variaciones a través del gradiente latitudinal fueron: el primero comprendido entre los  $20^{\circ}36'-20^{\circ}44'$  donde los alelos del *locus* Cec 45 se encontraron presentes los alelos 124 con una frecuencia ( $fr$ ) de 0.50, el alelo 134 ( $fr= 0.571$ ) y 174 ( $fr= 1.0$ ). En el *locus* Cec 46 los alelos que se expresaron fueron el 134 y 174 y dos alelos del *locus* Cec 64 (128 y 184).

El segundo rango latitudinal se comprendió entre los  $20^{\circ}45'-20.45'51''$ : donde se encontró un mayor número de alelos, ya que se presentaron un total de 15 alelos, de los cuales seis pertenecen al *locus* Cec 45 (114,124, 134, 154, 184 y 194), seis del *locus* Cec 46 (104, 124, 134, 154, 184 y 194) y tres alelos del *locus* Cec 64 (120, 184 y 192)

El tercer rango latitudinal fue entre los  $20^{\circ}47'5''-20^{\circ}48'$ : se evidenciaron dos alelos (124 y 184) del *locus* Cec 45, y dos del Cec 46 (134 y 194) y tres alelos(120, 184 y 192) del *locus* 64 (Figura 16).

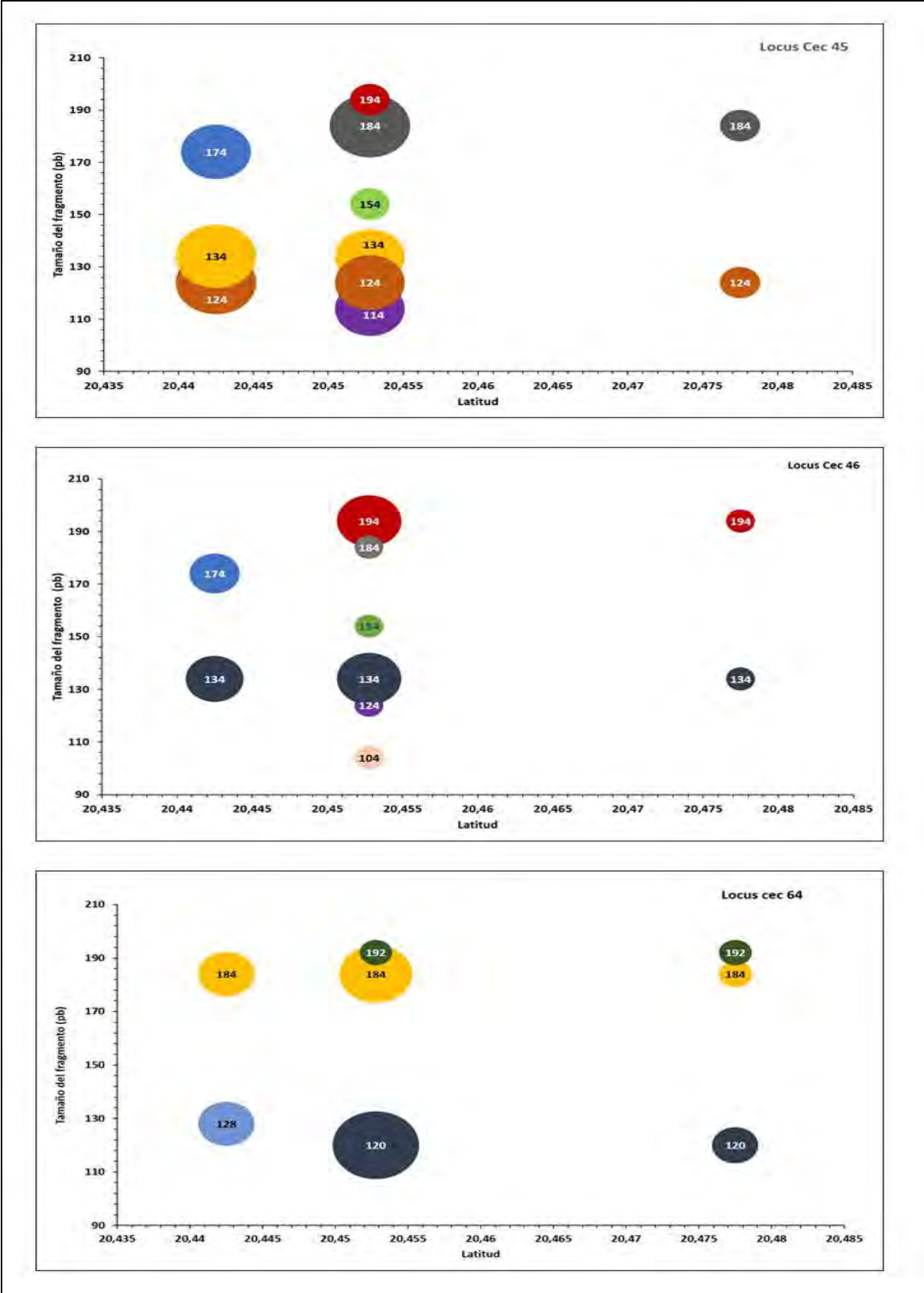
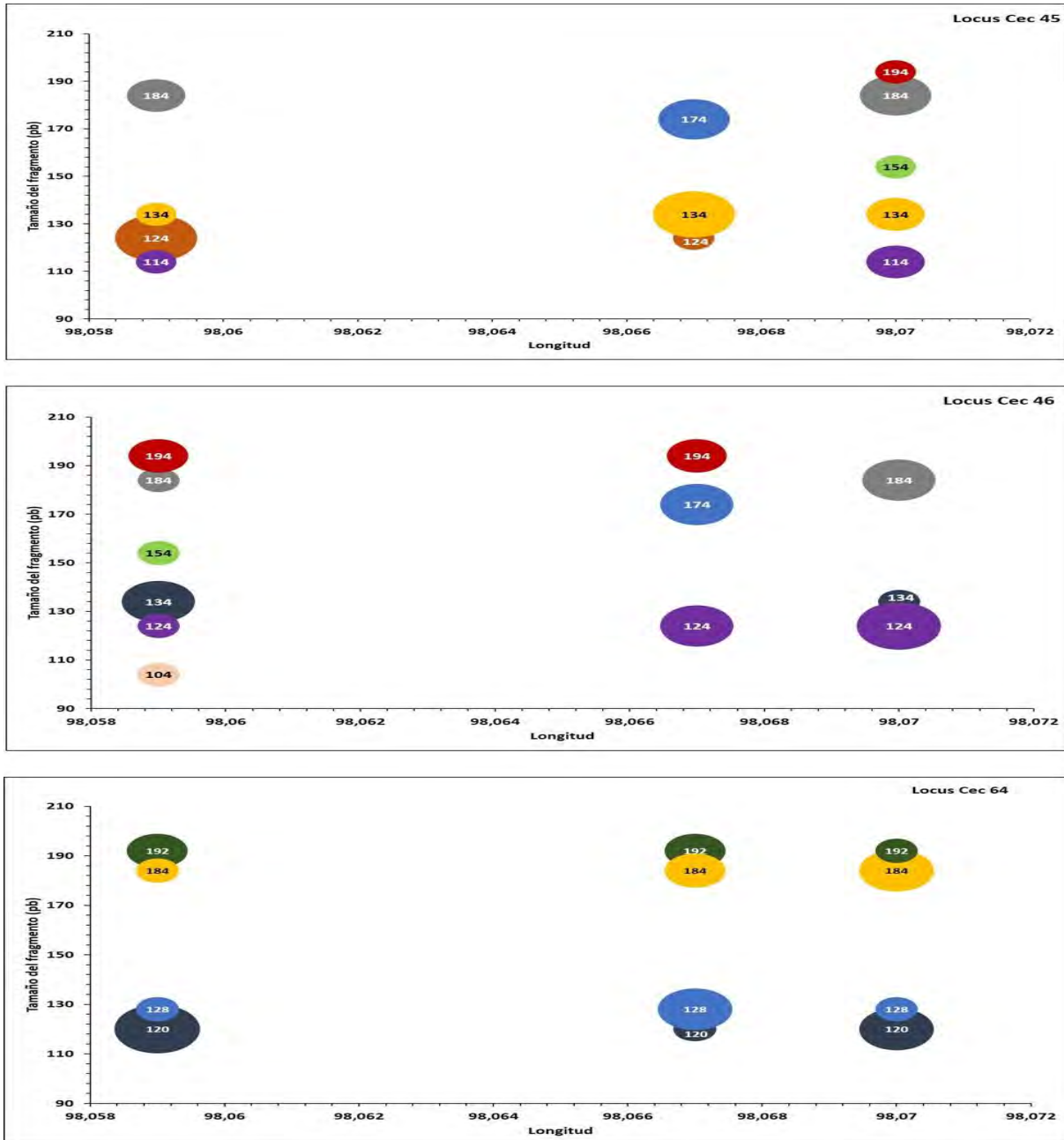


Figura 16. Distribución alélica por locus de *C. obtusifolia* con respecto a la latitud.

Con respecto a la variable geográfica longitud, se encontró un mayor número de alelos entre los 98°058' y 98°07'. Esto es que en el rango de 98°058'-98°062' se presentaron 14 alelos, de los cuales cuatro corresponden al *locus* Cec 45 (114,124,134 y 184), seis del *locus* Cec 46 (104, 124, 134,154, 184 y 194), y cuatro del *locus* Cec 64 (120, 128, 184 y 192). Además de que los cuatro alelos del *locus* Cec 64, el alelo 134 del *locus* Cec 45 y el alelo 124 del *locus* Cec 46, se encontraron a lo largo del gradiente longitudinal (Figura 17).



**Figura 17.** Distribución alélica de los tres loci de *C.obtusifolia* con respecto la longitud.

También, se evidenció de que los alelos de *C. obtusifolia* se distribuyen con respecto a la altitud. Donde 12 alelos se encontraron a los 650 m de altitud y 11 alelos a los 750 m. El número de alelos encontrados entre los 825 y 875 m fue de 6-8 alelos, respectivamente. Los alelos 134 (*locus Cec 45*), 124 (*locus Cec 46*), 120, 128 y 184 (*locus Cec 64*) se encontraron en todo el gradiente altitudinal (Figura 18).

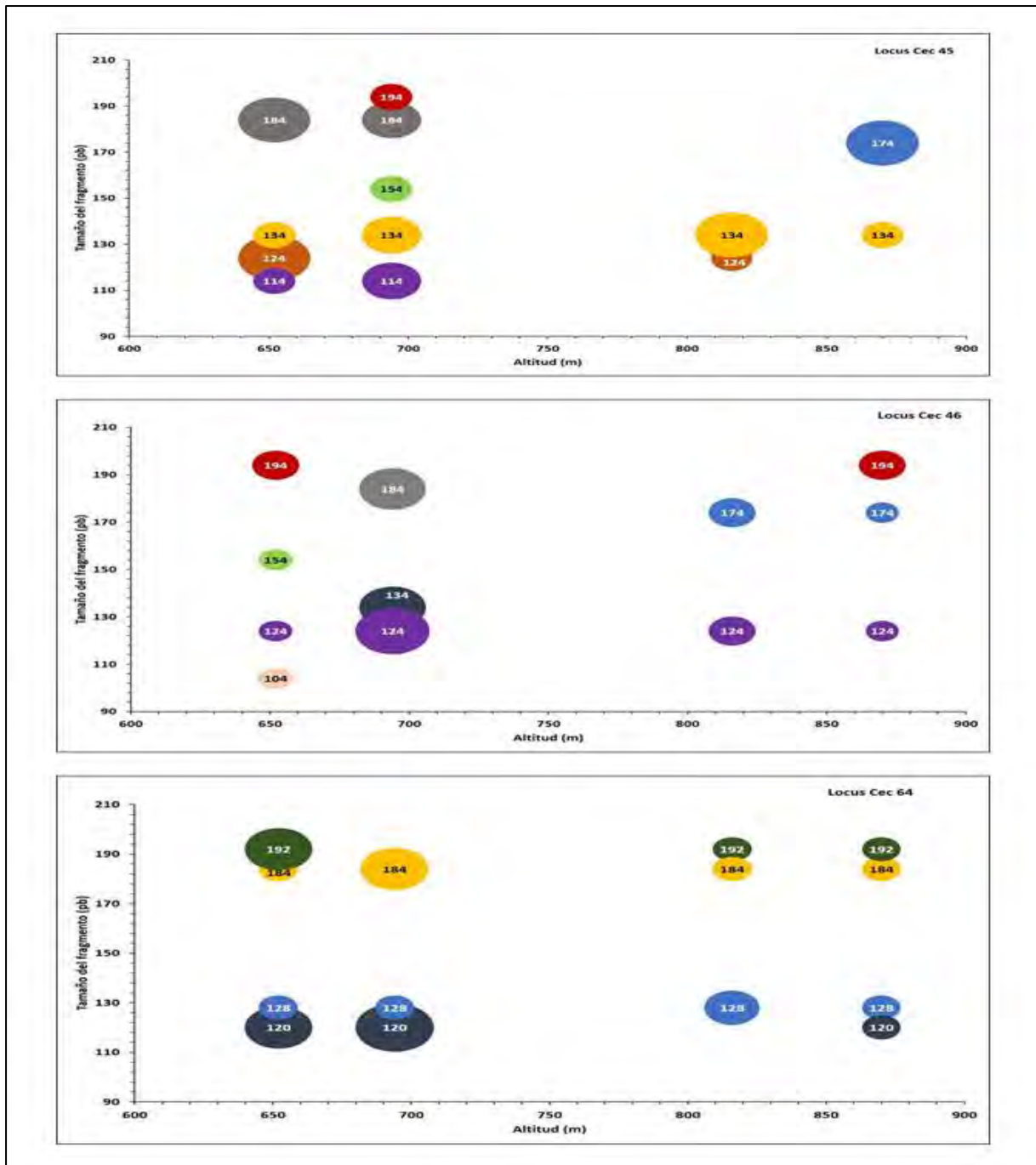


Figura 18. Distribución alélica de los tres loci de *C. obtusifolia* en relación a la altitud.

### **Inhibición de alfa glucosidasa de los extractos etanólicos de *Cecropia obtusifolia***

Los extractos etanólicos de *C. obtusifolia* provenientes de diferentes localidades, mostraron un efecto significativo ( $P < 0.0001$ ) entre los sitios de procedencia (localidades), entre sexos y entre las interacciones, sexo-localidad; sexo-individuo-localidad, en el porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de alfa glucosidasa (Tabla 18).

**Tabla 18.** ANOVA de los extractos de *C. obtusifolia*

| Factor                       | Nparam | gl | F      | P        |
|------------------------------|--------|----|--------|----------|
| Localidad                    | 4      | 2  | 177.67 | < 0.0001 |
| Sexo x individuo             | 27     | 5  | 27.78  | < 0.0001 |
| Localidad x sexo x individuo | 108    | 8  | 336.11 | < 0.0000 |

Se encontró que la concentración de 200  $\mu\text{g/mL}$  presentó una mayor inhibición de la actividad de alfa glucosidasa ( $75.40 \pm 3.77 \%$ ) y la concentración que menor porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -glucosidas, fue la de 40  $\mu\text{g/mL}$  ( $45.34 \pm 7.04\%$ ), mientras que, acarbosa presentó un  $90.57 \pm 0.28$ ,  $67.19 \pm 0.13\%$  y  $42.57 \pm 0.69\%$  de inhibición en las concentraciones de 400, 200 y 40  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Tabla 19).

**Tabla 19.** Media y desviación estándar (Ds) del porcentaje de inhibición de alfa glucosidasa de los extractos de *C. obtusifolia* y acarbosa.

| <b><i>C. obtusifolia</i></b>   |                        | <b>Acarbosa</b>                |                         |
|--------------------------------|------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| Concentración $\mu\text{g/mL}$ | Media $\pm$ DS         | Concentración $\mu\text{g/mL}$ | Media $\pm$ DS          |
| 40                             | 45.34 $\pm$ 7.04       | 40                             | 42.57 $\pm$ 0.69        |
| 80                             | 54.04 $\pm$ 7.66       | 80                             | 43.25 $\pm$ 0.26        |
| 120                            | 59.16 $\pm$ 7.66       | 120                            | 44.06 $\pm$ 0.38        |
| 160                            | 69.24 $\pm$ 4.4        | 160                            | 44.59 $\pm$ 0.08        |
| 200                            | 75.40 $\pm$ 3.77       | 200                            | 67.19 $\pm$ 0.13        |
|                                |                        | 240                            | 71.12 $\pm$ 0.39        |
|                                |                        | 280                            | 76.88 $\pm$ 0.41        |
|                                |                        | 320                            | 83.93 $\pm$ 0.33        |
|                                |                        | 360                            | 87.65 $\pm$ 0.19        |
|                                |                        | 400                            | 90.57 $\pm$ 0.28        |
| IC <sub>50</sub>               | 65.86 $\mu\text{g/mL}$ |                                | 166.30 $\mu\text{g/mL}$ |

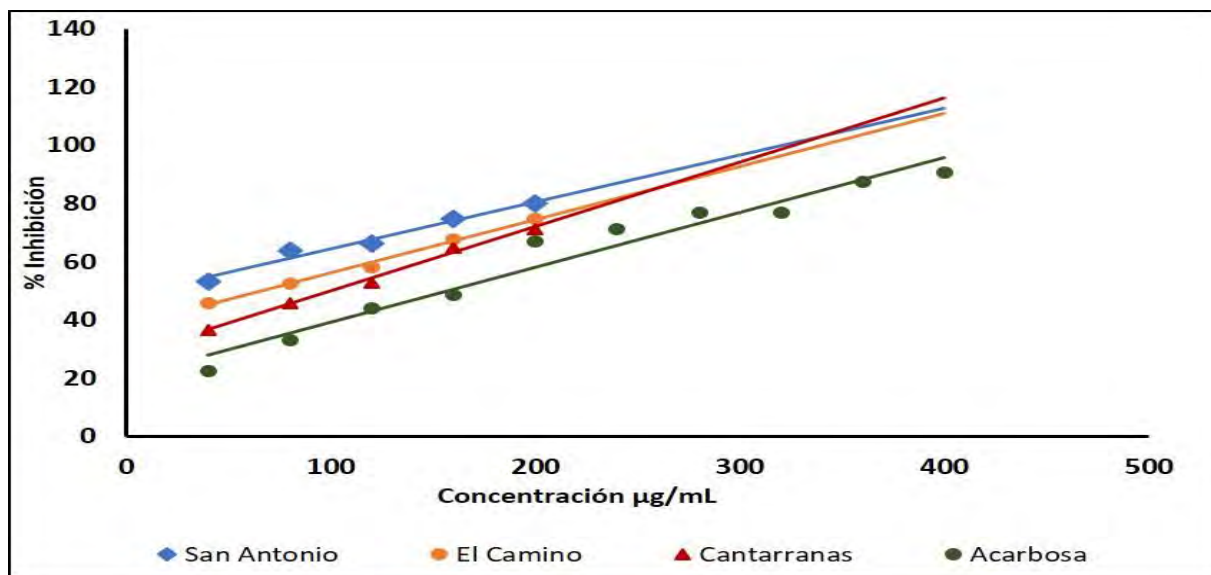
#### **Efecto de la localidad en el porcentaje de inhibición de alfa glucosidasa**

Se encontraron diferencias significativas entre localidades de acuerdo al porcentaje de inhibición de alfa glucosidasa ( $P < 0.0001$ ). Donde se observó que San Antonio presentó un mayor valor de inhibición de la enzima alfa glucosidasa en todas las concentraciones probadas en este trabajo y el valor más bajo de  $CI_{50} = 10.59 \mu\text{g/mL}$  (Tabla 20).

**Tabla 20.** Media, desviación estándar (Ds) del porcentaje de inhibición de alfa glucosidasa y  $CI_{50}$  de los extractos etanólicos de *C. obtusifolia* por localidad y para el control acarbosa.

| Localidad   | media $\pm$ DS    | $CI_{50} \mu\text{g/mL}$ |
|-------------|-------------------|--------------------------|
| San Antonio | 67.68 $\pm$ 9.46  | 10.59                    |
| El Camino   | 59.85 $\pm$ 10.59 | 66.08                    |
| Cantarranas | 54.38 $\pm$ 12.81 | 100.20                   |
| Acarbosa    | 61.87 $\pm$ 23.37 | 166.30                   |

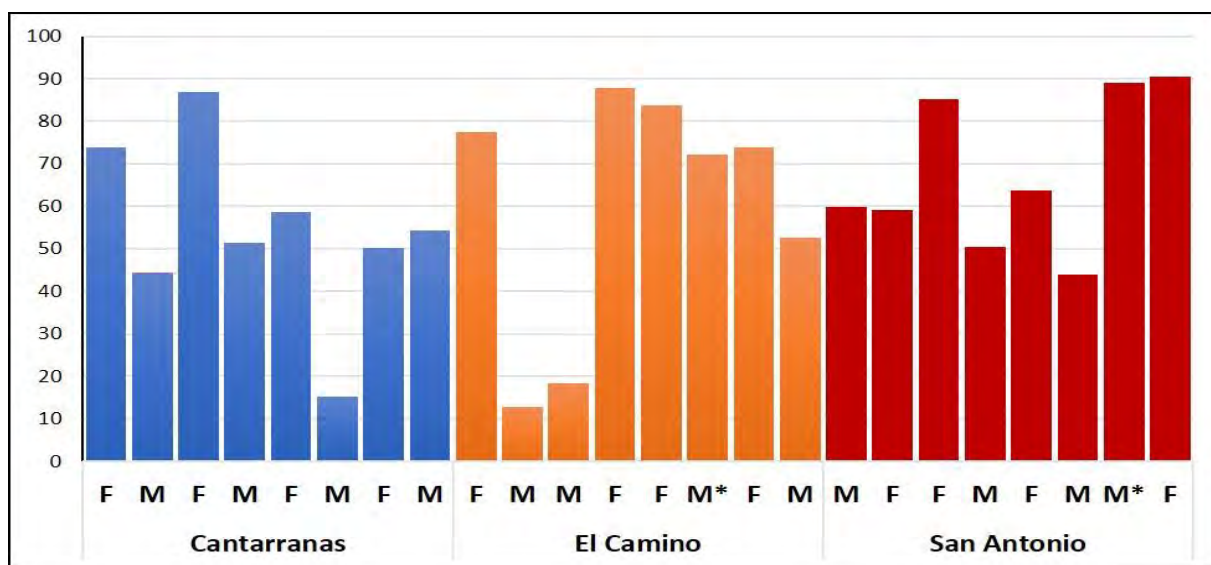
La localidad que obtuvo el porcentaje más bajo de inhibición fue Cantarranas con  $54.38 \pm 12.81$  ( $CI_{50} = 100.20 \mu\text{g/mL}$ ), mientras que acarbosa presentó una media  $61.87 \pm 23.37\%$  de inhibición y una  $CI_{50} = 166.30 \mu\text{g/mL}$  (Figura 19).



**Figura 19.** Porcentaje de inhibición de alfa glucosidasa por localidad de los extractos etanolicos de *C. obtusifolia*.

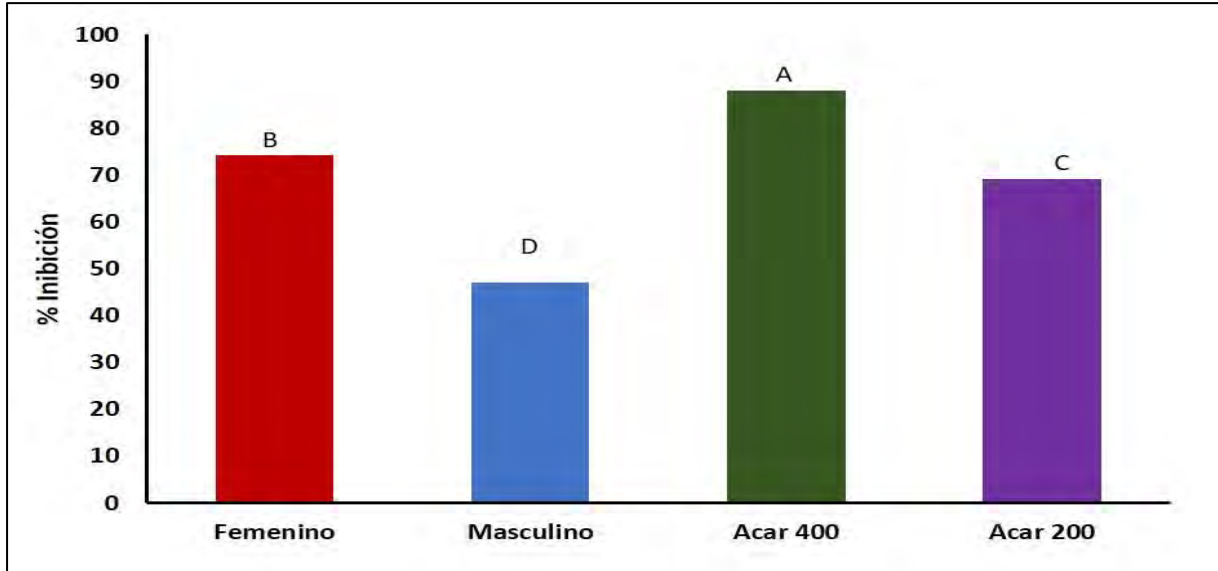
#### Inhibición de alfa glucosidasa de acuerdo al sexo de los individuos de *C. obtusifolia*

El porcentaje de inhibición de alfa glucosidasa fue variable entre individuos, los valores se encontraron entre  $12.94 \pm 0.59$  a  $90.55 \pm 0.11\%$  (Figura 20).



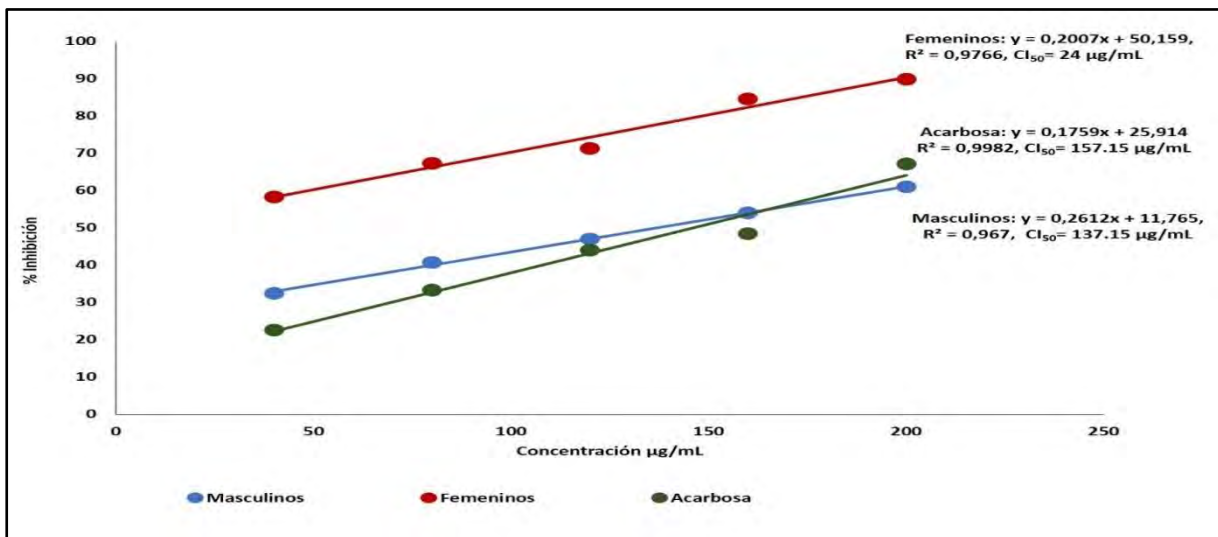
**Figura 20.** Porcentaje de inhibición por individuo en cada una de las localidades de *C. obtusifolia*, F= femenino, M= masculino, \*= individuos triploides.

También, se encontró que existen diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ) entre los sexos de los individuos. Donde los árboles femeninos mostraron un mayor porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa (74.20%) con respecto a los árboles masculinos 47.09% (Figura 21).



**Figura 21.** Porcentaje de inhibición de los extractos etanólicos de *C. obtusifolia* por sexos y los referentes de acarbosa (Acar) en las concentraciones de 400 y 200  $\mu\text{g/mL}$ .

La  $CI_{50}$  para los árboles femeninos fue de 24  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que en los árboles masculinos fue de 137.15  $\mu\text{g/mL}$ , y el control acarbosa se registró una  $CI_{50}$  = 157.15  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 22).



**Figura 22.** Las diferentes  $CI_{50}$  en los individuos femeninos, masculinos de *C. obtusifolia* y el referente acarbosa.



Con respecto a las  $CI_{50}$  entre localidades, se encontró que estos valores pueden cambiar de acuerdo al sexo de los individuos, en donde los árboles femeninos de Cantarranas registraron una  $CI_{50} = 39.39 \mu\text{g/mL}$ , sin embargo, en los individuos de El Camino y San Antonio no fue posible determinar la  $CI_{50}$  con las concentraciones probadas en este estudio, pero son menores a lo estimado para Cantarranas.

En los individuos masculinos las  $CI_{50}$ , fueron  $158.52 \mu\text{g/mL}$  para Cantarranas,  $194.33 \mu\text{g/mL}$  en El Camino y la localidad que presentó el valor más bajo de  $CI_{50}$  fue San Antonio con  $49.80 \mu\text{g/mL}$  (Figura 23).

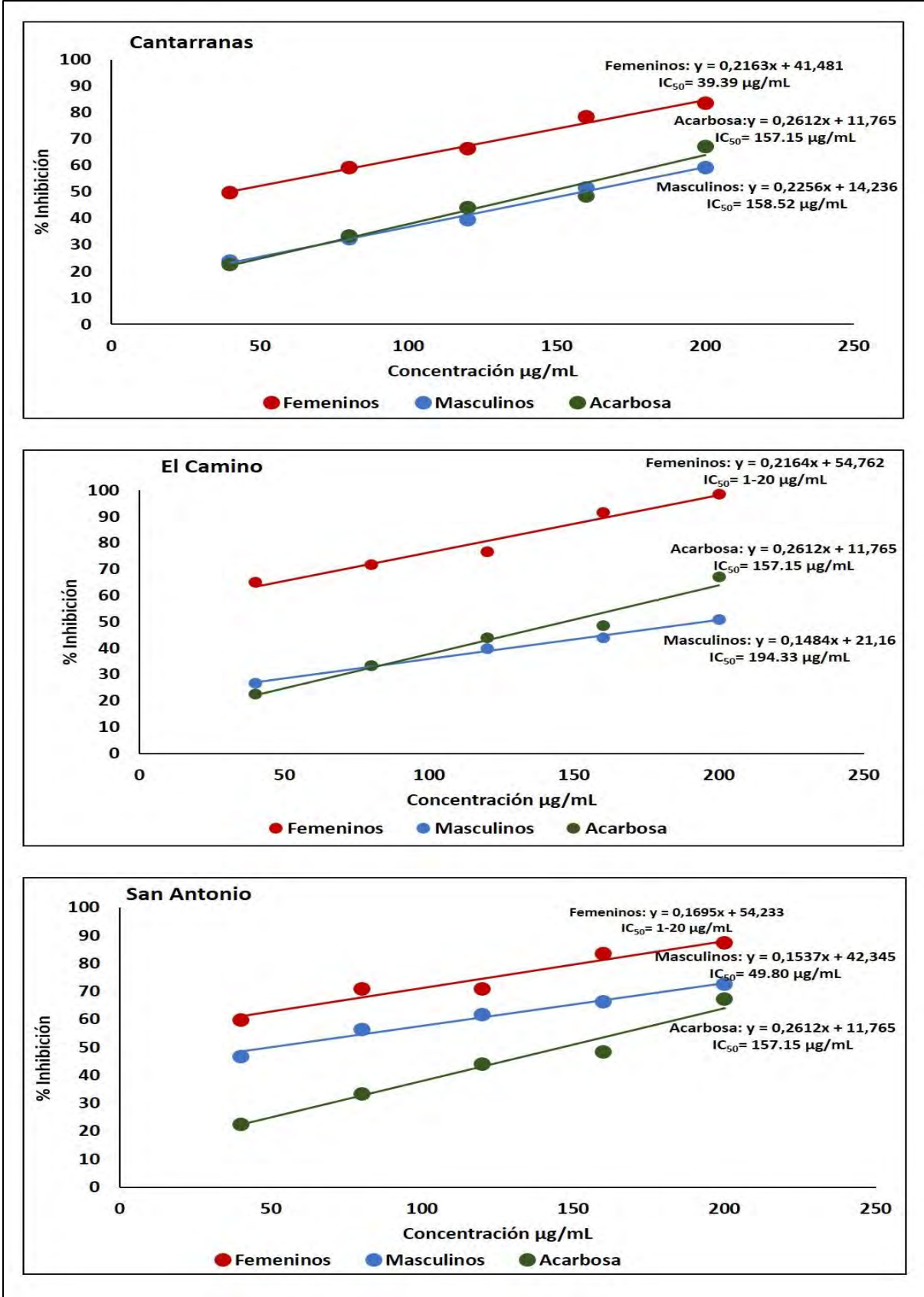


Figura 23. Inhibición de alfa glucosidasa por sexo en las tres localidades de *C. obtusifolia*.

## Correlación entre fenotipo, genotipo con las variables geográficas en *C. obtusifolia*

### Correlación entre fenotipo vs genotipo

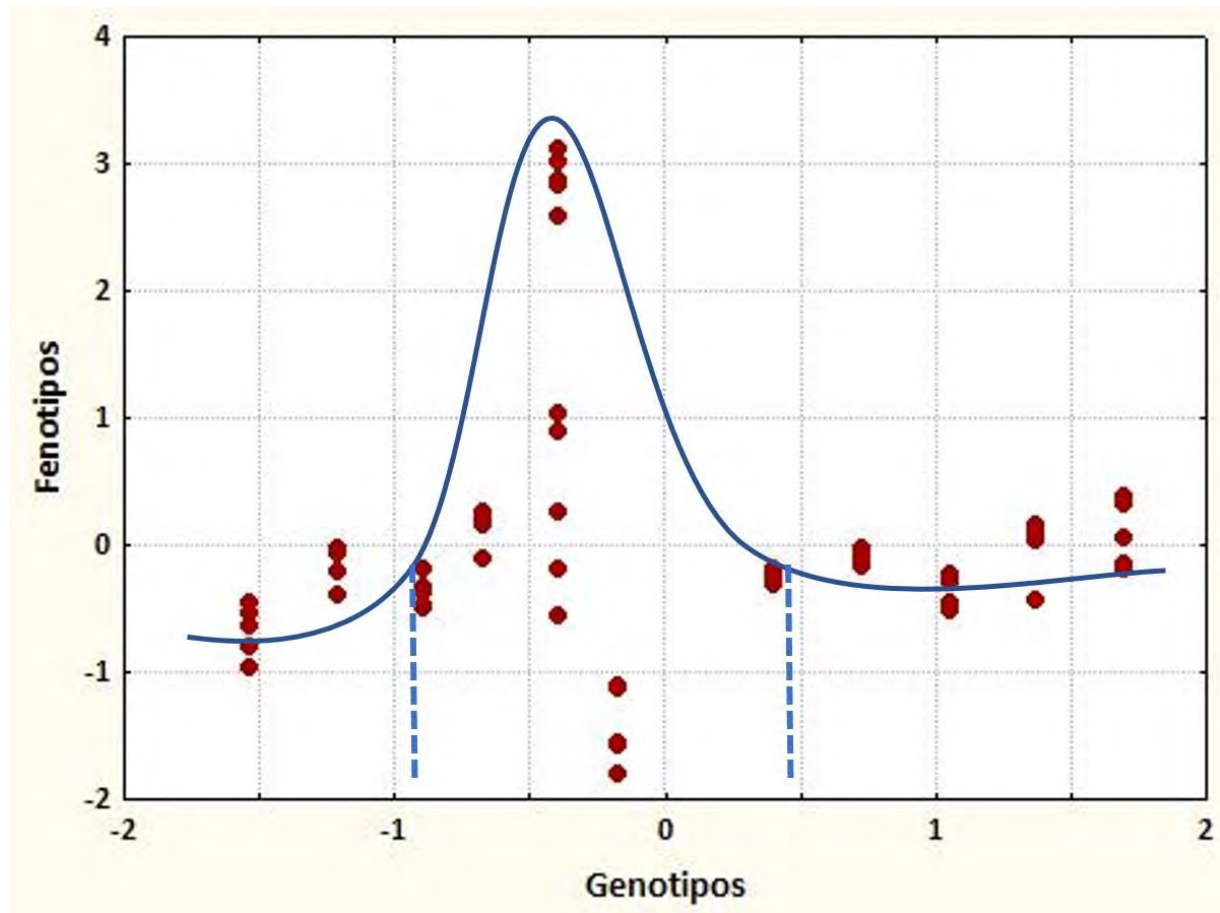
Con el Análisis de correspondencias canónicas (ACC) se obtuvo que las variables fenotípicas (morfología e inhibición de alfa glucosidasa) se correlacionaron de manera significativa ( $R^2= 0.992$ ,  $X^2_{60,33}= 160.37$ ,  $P=<0.00001$ ) con los datos genéticos de los tres *loci* de los individuos masculinos de *C. obtusifolia*. Donde el *locus* Cec45 se correlacionó de manera negativa con todas las variables morfológicas, el *locus* Cec46 se relacionó de manera positiva con LP ( $r= 0.061$ ), NVxlob ( $r= 0.459$ ), Nlob ( $r= 0.044$ ), y con el %inhibición ( $r= 0.190$ ) y el *locus* Cec64 se correlacionó de manera positiva con todas las variables morfológicas (

Tabla 21).

**Tabla 21.** ACC entre genotipos y fenotipos de *C. obtusifolia*

| Variable        | Cec 45   | Cec 46   | Cec 64 |
|-----------------|----------|----------|--------|
| LP              | -0,413   | 0,061    | 0,433  |
| LL              | -0,321   | -0,083   | 0,327  |
| Anchmax         | -0,358   | -0,154   | 0,386  |
| DP              | -0,338   | -0,041   | 0,401  |
| DVM             | -0,206   | -0,255   | 0,334  |
| L1/3 B          | 0,104    | -0,667   | 0,027  |
| L1/3A           | -0,311   | -0,274   | 0,396  |
| DPAlob          | 0,043    | -0,508   | 0,067  |
| NVxlob          | -0,516   | 0,439    | 0,463  |
| Nlob            | -0,430   | 0,044    | 0,492  |
| %inhibición     | -0,061   | 0,192    | 0,072  |
| valores propios | 0,850    | 0,602    | 0,255  |
| Rcanónica       | 0,922    | 0,776    | 0,505  |
| X2              | 160,368  | 62,647   | 15,190 |
| P               | 0,000000 | 0,000003 | 0,0858 |

De esta manera, se obtuvo que diversos genotipos producen diferentes fenotipos, los cuales presentaron una distribución normal, donde se observaron dos extremos, uno a la derecha que corresponde a fenotipos de hojas con tamaños pequeños y con menor porcentaje de inhibición de alfa glucosidasa, en la parte media se ubican los genotipos que presentan hojas con tamaño intermedio y valores entre 30-50% de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa y en la parte derecha los genotipos (individuos que presentan tres alelos en los locus Cec 45 y Cec 46) que exhiben hojas más grandes y con mayor porcentaje de inhibición enzimática (Figura 24).



**Figura 24.** ACC a partir de los datos genéticos y morfológicos de los individuos masculinos de *C. obtusifolia*.

De acuerdo al sexo de los individuos de *C. obtusifolia*, las variables geográficas tienen efectos diferentes. Donde se obtuvo que, para los árboles femeninos, la mayoría de las variables morfológicas se correlacionaron negativamente con la latitud, con la excepción del NVxlob ( $r = 0.19$ ), el Nlob ( $r = 0.06$ ) y el % de inhibición ( $r = 0.30$ ). Con respecto a la longitud las

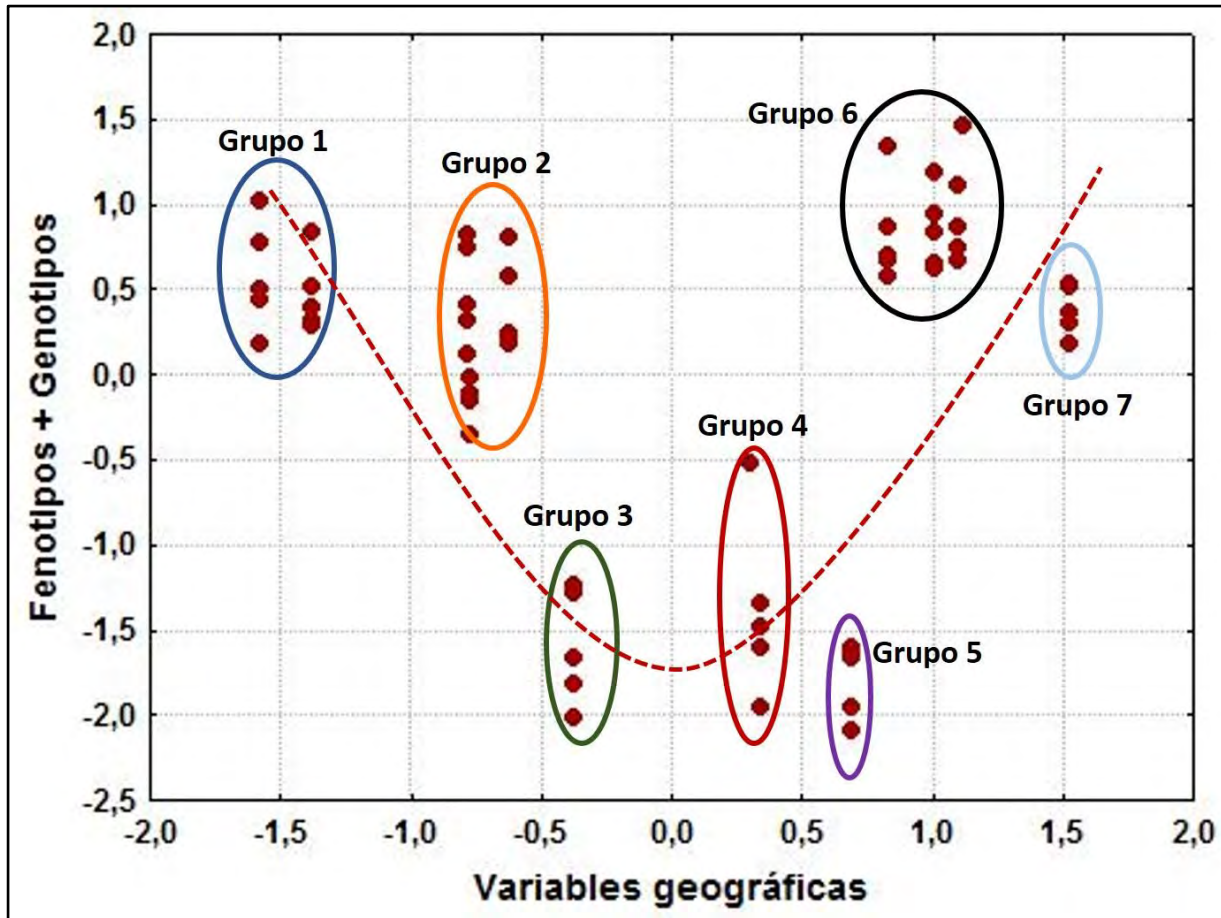
variables que se correlacionaron de manera negativa fueron NVxlob ( $r = -0.16$ ), el Nlob ( $r = -0.43$ ) y el % de inhibición con  $r = -0.02$ . Las variables NVxlob y el % de inhibición se correlacionaron de manera negativa con la altitud ( $r = -0.04$  y  $r = -0.209$ , respectivamente, Tabla 22).

En los individuos masculinos, la latitud se correlacionó de manera negativa con todas las variables morfológicas, y una correlación positiva con el % inhibición y con los datos genéticos de los tres *loci*. La LP, NVxlob, Nlob y los datos genéticos se correlacionaron positivamente con la longitud. Con respecto a la altitud, todas las variables morfológicas se correlacionaron positivamente, y negativamente con los datos genéticos y con el porcentaje de inhibición (Tabla 22).

**Tabla 22.** ACC entre las variables geográficas con los datos morfológicos, genéticos e inhibición de  $\alpha$ . glucosidasa de *C. obtusifolia* por sexo.

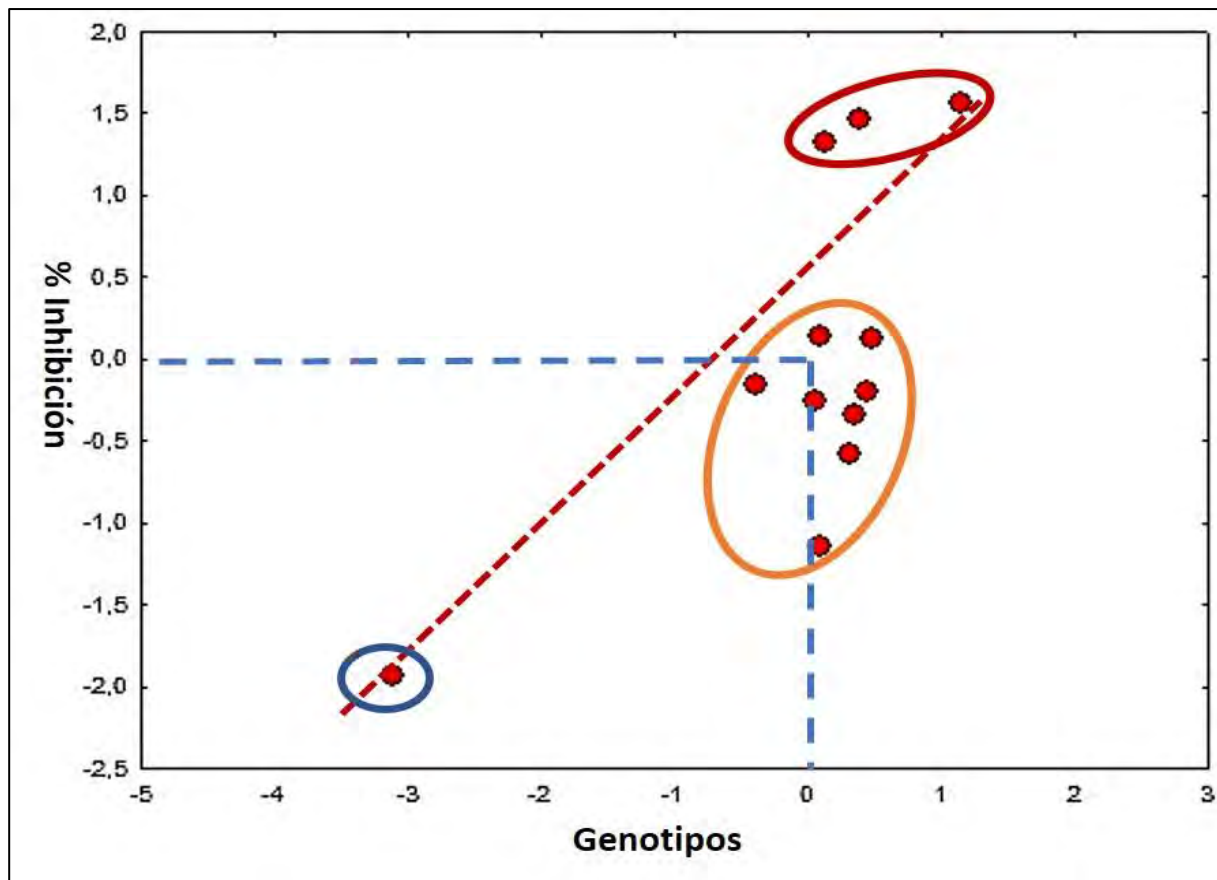
| Variable        | Femeninos |          |         | Variable        | Masculinos |          |         |
|-----------------|-----------|----------|---------|-----------------|------------|----------|---------|
|                 | Latitud   | Longitud | Altitud |                 | Latitud    | Longitud | Altitud |
| LP              | -0,36     | 0,15     | 0,45    | LP              | -0,41      | 0,06     | 0,43    |
| Llob            | -0,45     | 0,16     | 0,41    | Llob            | -0,32      | -0,08    | 0,33    |
| Anchmax         | -0,55     | 0,25     | 0,43    | Anchmax         | -0,36      | -0,15    | 0,39    |
| DP              | -0,37     | 0,00     | 0,52    | DP              | -0,34      | -0,04    | 0,40    |
| DVM             | -0,37     | 0,05     | 0,51    | DVM             | -0,21      | -0,26    | 0,33    |
| L1/3 B          | -0,44     | 0,34     | 0,26    | L1/3 B          | 0,10       | -0,67    | 0,03    |
| L1/3A           | -0,53     | 0,27     | 0,43    | L1/3A           | -0,31      | -0,27    | 0,40    |
| DPAlob          | -0,59     | 0,26     | 0,46    | DPAlob          | 0,04       | -0,51    | 0,07    |
| NVxlob          | 0,19      | -0,16    | -0,04   | NVxlob          | -0,52      | 0,44     | 0,46    |
| Nlob            | 0,06      | -0,43    | 0,12    | Nlob            | -0,43      | 0,04     | 0,49    |
| % de inhibición | 0,30      | -0,02    | -0,29   | Cec45           | 0,33       | 0,22     | -0,75   |
|                 |           |          |         | Cec46           | 0,38       | 0,03     | -0,78   |
|                 |           |          |         | Cec64           | 0,27       | 0,29     | -0,57   |
|                 |           |          |         | % de inhibición | 0,29       | -0,48    | -0,15   |
| V.propios       |           |          |         | V.propios       | 0,99       | 0,88     | 0,61    |
| Rcanónica       |           |          |         | Rcanónica       | 0,89       | 0,74     | 0,39    |
| X               |           |          |         | X               | 133.44     | 50.24    | 8.46    |
| lambda          |           |          |         | lambda          | 0.076      | 0.39     | 0.85    |
| Varianza        |           |          |         | Varianza        | 33%        | 60%      | 7%      |
| P               |           |          |         | P               | < 0.0000   | 0.0007   | 0.39    |

Aunado a lo anterior, en los individuos masculinos, se obtuvieron siete grupos que se distribuyen de manera normal invertida, esto debido a que el número de alelos y las características morfológicas disminuyen en las latitudes, longitudes y altitudes intermedias, mientras que en los extremos aumenta la diversidad genética y morfológica (Figura 25).



**Figura 25.** ACC entre variables geográficas con las variables fenotípicas y genéticas de los individuos masculinos de *C. obtusifolia*.

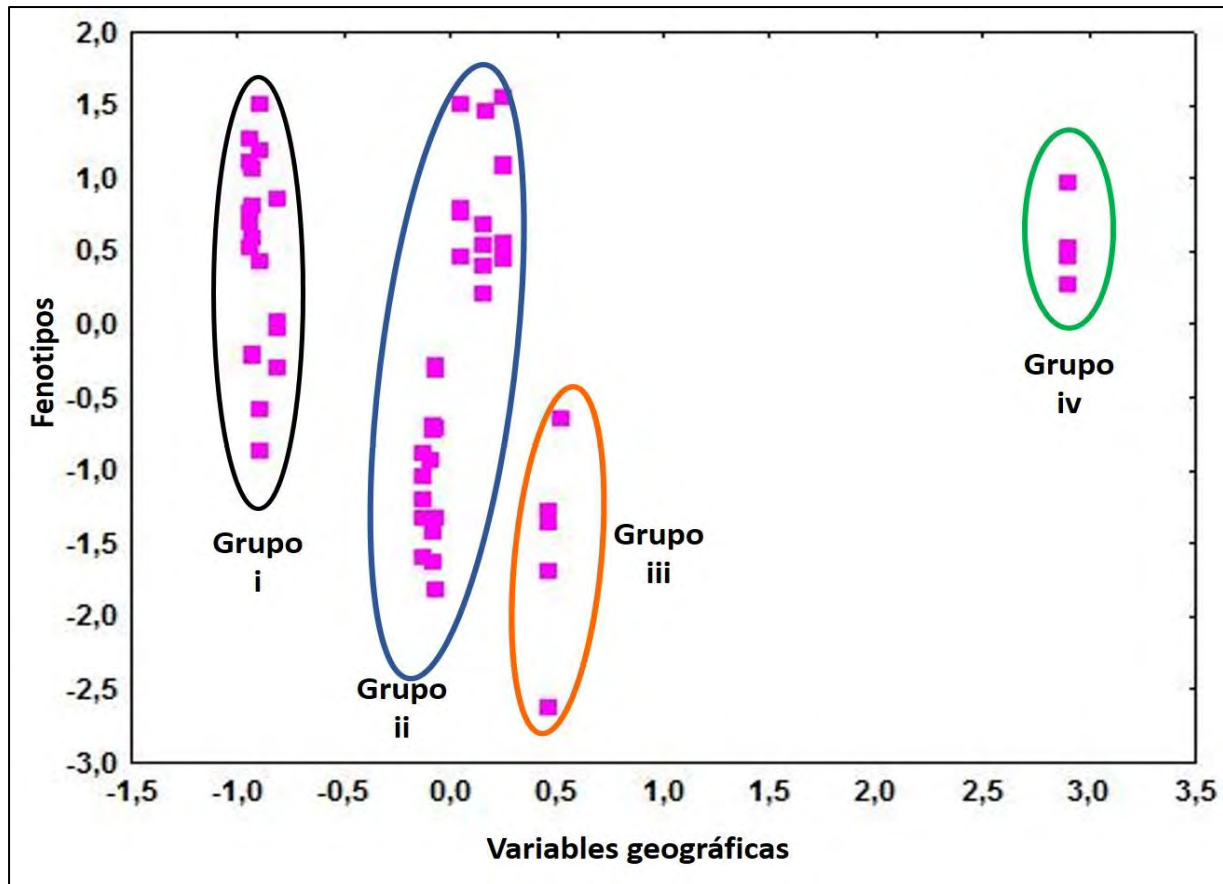
De acuerdo con el ACC de los individuos masculinos con las variables genéticas y el porcentaje de inhibición, se obtuvo que existe un condicionante genético de acuerdo con el *locus Cec46* ( $r=0.191$ ), con lo que se observan dos extremos (el inferior donde se encuentran los genotipos con un menor porcentaje de inhibición y en el extremo superior, los alelos que inhibieron en mayor cantidad a alfa glucosidasa) y en el centro se encontraron los genotipos con niveles intermedios de inhibición, lo que indica una selección direccional hacia los genotipos con mayor porcentaje de inhibición (Figura 26).



**Figura 26.** Correlación entre variables genéticas y porcentaje de inhibición de alfa glucosidasa de los individuos masculinos de *C. obtusifolia*.

En los individuos femeninos, se observa una distribución normal al correlacionar las variables morfológicas y geográficas, con una tendencia de selección disruptiva hacia los morfotipos con mayor tamaño y un alto porcentaje de inhibición de alfa glucosidasa (Figura 27).





**Figura 27.** ACC entre datos morfológicas de los individuos femeninos de *C. obtusifolia* y las variables geográficas.

#### **Relación del porcentaje de inhibición de alfa glucosidasa con las variables geográficas**

Con respecto al porcentaje de inhibición de alfa glucosidasa y su relación con las variables geográficas se obtuvo diferentes formas de distribución:

**Altitud:** se observa una distribución al azar (Figura 28 A), donde los individuos masculinos se conformaron cinco grupos, el primero se encontró a 850 m con 40-60% de inhibición, el segundo grupo entre 800-850 m de altitud con un 70-80% de inhibición de alfa glucosidasa, el grupo 3 a una altitud de 725 m que presentó una inhibición del 30%, el grupo cuatro se localizó en un rango altitudinal de 700-750 m con inhibición de 40-60% de inhibición enzimática y el grupo cinco a una altitud de 500-600 m con valores más bajos de inhibición (10-20%).

En los árboles femeninos el grupo seis presentó un 70% de inhibición y se ubicó en los 600 m., el grupo siete comprendió dos altitudes, la primera a 700-750 m con registros de inhibición de 50-60%, el segundo de 750-800 m con 70-90% de inhibición y el grupo nueve se conformó por individuos que presentaron una inhibición de 70-90% a 900 m de altitud.

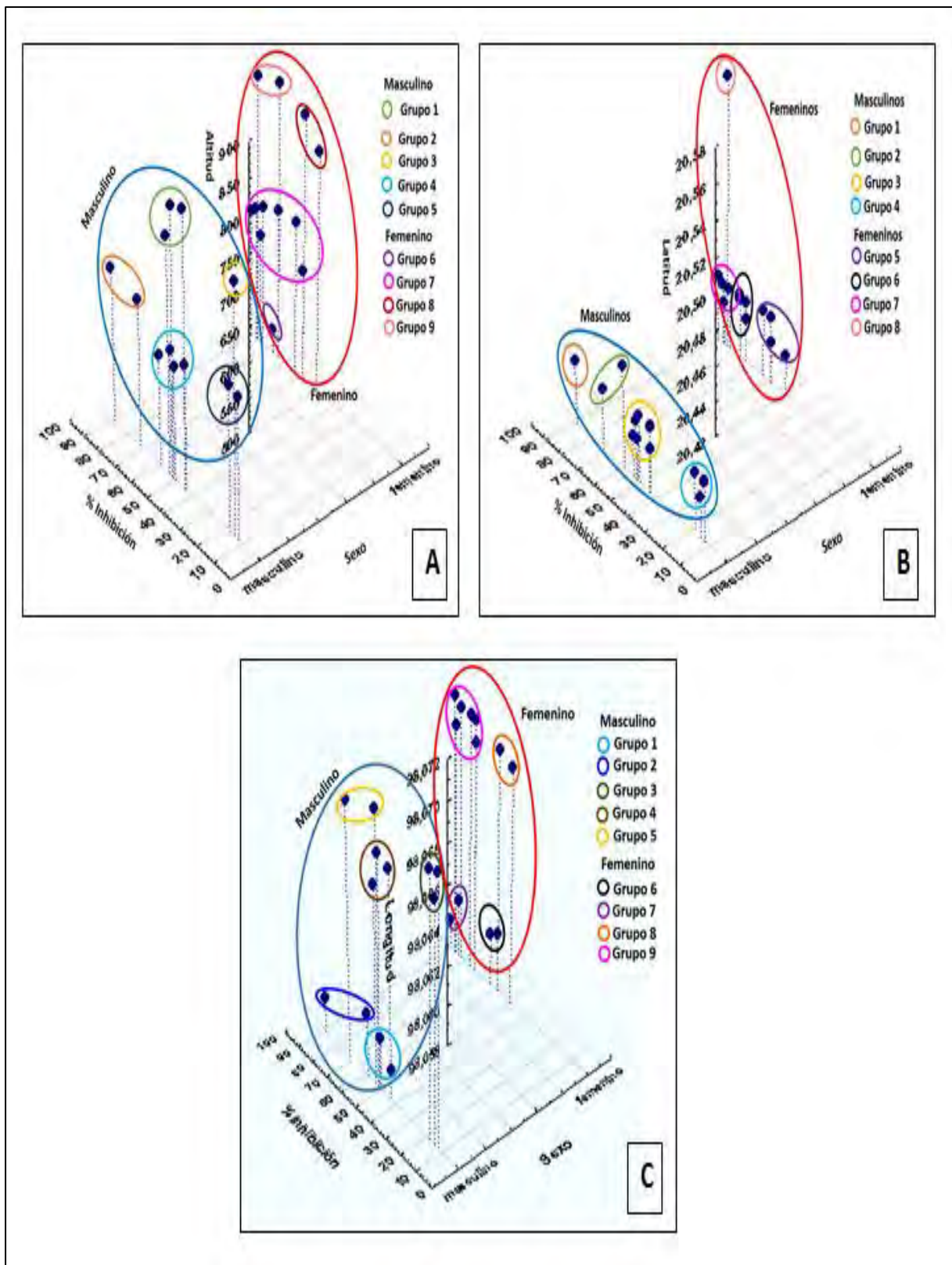
**Latitud:** esta variable se correlacionó positivamente con el porcentaje de inhibición ( $r=0.30$ ) en ambos sexos. Donde se observa una distribución aglomerada. En los individuos masculinos con mayor porcentaje de inhibición (89%) se encontraron en las latitudes de  $20^{\circ}50'$  (grupo uno), mientras que los individuos femeninos del grupo siete adquirieron valores de un 80-100% de inhibición. A una altitud de  $20^{\circ}44'-20^{\circ}48'$  se ubicaron el grupo dos (árboles masculinos) y el grupo seis (femeninos) que presentaron un 60-70% de inhibición.

En la latitud de  $20^{\circ}42'$  se ubicó el grupo tres que presentó el menor grado de inhibición (10-20%) por parte de los individuos masculinos, a su vez los árboles femeninos presentaron un 50-62 % de inhibición enzimática (grupo 6) y a los  $20^{\circ}48'$  se encontró el grupo cuatro (masculino) y grupo siete (femenino) que exhibieron un 90% de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa. En las latitudes  $20^{\circ}58'$  se localizó el grupo ocho que se integró por individuos femeninos con mayores porcentajes (90-100%) de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa (Figura 28 B).

**Longitud:** la longitud se correlacionó negativamente con el porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa ( $r= -0.48$ ), es decir se presentó una distribución dispersa de los individuos con esta variable. En los rangos de los  $98^{\circ}056-98^{\circ}062$  se encontraron individuos que inhiben 40-50% la actividad enzimática esto es en el grupo uno de los individuos masculinos y los grupos seis y nueve de los árboles femeninos (Figura 28 C).

En el segundo gradiente ( $98^{\circ}062-98^{\circ}064$ ) se encontraron individuos que inhiben cerca de 60-90% la actividad en alfa glucosidasa (grupo 2 y 7, de los individuos masculinos y femeninos, respectivamente). En un gradiente intermedio ( $98^{\circ}066$ ) se encontraron individuos masculinos con 10% de inhibición (grupo 3).

Entre los  $98^{\circ}068-98^{\circ}070$  se encontraron individuos masculinos con valores de 50-60% de inhibición de alfa glucosidasa (grupo 4). El gradiente más heterogéneo fue el  $98^{\circ}072$ , ya que comprende individuos femeninos con valores de 50-100% de inhibición enzimática y (grupo 8 y 9) árboles masculinos con 60-70% en la reducción de la actividad enzimática (grupo 5).



**Figura 28.** Correlación entre variables geográficas y el porcentaje de inhibición entre los sexos de *C. obtusifolia*, A) altitud, B) longitud y C) latitud.

## Discusión

### Diferencias morfológicas a nivel local

En el AFD se evidenció una clara diferenciación entre poblaciones como una adaptación a escala local, donde las características morfológicas de las hojas permitieron la agrupación de los sitios. Este grado de diferenciación probablemente se deba a las variables ambientales, geográficas, características edáficas, interacciones intra e interespecíficas, la cantidad de luz incidente en cada una de las localidades (Cornelissen y Stirling, 2005<sup>56</sup>; Cavallero *et al.*, 2011<sup>45</sup>; Brus *et al.*, 2011<sup>41</sup>; Van *et al.*, 2012<sup>277</sup>; Kabir *et al.*, 2014<sup>123</sup>).

### Dimorfismo sexual

En este estudio, se obtuvo que los individuos femeninos de *C. obtusifolia* presentaron hojas más grandes comparadas con los árboles masculinos, lo que demuestra una alta plasticidad fenotípica de esta planta. Al mismo tiempo muestra un marcado dimorfismo sexual entre los individuos masculinos y femeninos. Este grado de variación es comúnmente encontrado en otros estudios, como resultado de varios factores, incluyendo la plasticidad fenotípica y la edad de los individuos (González-Rodríguez y Oyama, 2005)<sup>94</sup>. Así también, este alto grado de diferenciación a este nivel, puede deberse al efecto de la adaptación fenotípica a diferentes condiciones micro ambientales que experimenta cada individuo (Sultan y Spencer, 2002<sup>257</sup>; Midgley, 2010<sup>167</sup>; Brus *et al.*, 2011<sup>41</sup>; Wheelwright *et al.*, 2012<sup>290</sup>). Estos resultados son similares a los encontrados en *Ocotea tenera* (Wheelwright *et al.*, 2012)<sup>290</sup>, *Juniperus oxycedrus* (Brus *et al.*, 2011)<sup>41</sup>, *Silene latifolia* (Steven *et al.*, 2007)<sup>250</sup> y en algunas especies del género *Leucadendron* (*L. rubrum*, *L. tererifolium*, *L. ericifolium*, Bond y Midgley, 1988)<sup>39</sup>, donde se encontró una alta variación morfológica dentro de los individuos en la mayoría de los caracteres analizados.

### Diferencias morfológicas entre los sexos dentro de las poblaciones

En el análisis jerárquico ANOVA, se evidenció un efecto de la localidad en ocho caracteres foliares de los árboles masculinos, mientras que en los árboles femeninos se observó un efecto significativo del factor individuo en todos los caracteres de la hoja (Tabla 9). Este marcado dimorfismo sexual refleja diferentes papeles funcionales para los sexos (Barret y Hough, 2013)<sup>32</sup>.

El efecto de la localidad sobre la morfología es diferente entre individuos femeninos y masculinos. Las hojas de los individuos femeninos de las poblaciones de El Camino y Cantarranas presentaron tallas más grandes en todos los caracteres analizados con respecto a los masculinos, mientras que, en San Antonio los valores más altos para las hojas femeninas fueron el Nlob, NVsecxlob y LP. Las hojas masculinas fueron más grandes en L1/3B y el DPAlob. Éste grado de diferenciación, puede deberse a diferentes presiones de selección en las características de las hojas entre árboles femeninos y masculinos al presentar un mayor tamaño de hoja pueden incrementar la fotosíntesis como respuesta a los niveles de luz incidente y, por lo tanto, aumentar la capacidad de la hoja para la captura de fotones en los sitios sombreados (Scarano *et al.*, 2002<sup>238</sup>; Cavallero *et al.*, 2011<sup>45</sup>).

En el AFD se observó una mejor agrupación de los árboles masculinos mientras que los árboles femeninos presentaron una agrupación más heterogénea, lo que sugiere una alta plasticidad fenotípica foliar. Los caracteres que más se correlacionaron con las FD 1 y 2, son caracteres que están asociados con el soporte de la hoja (DVM y DP), los cuales le ayudan a mantener su estructura tridimensional, orientación en el espacio y soporte contra las corrientes de aire (Nardini *et al.*, 2005)<sup>181</sup>. Otro carácter que fue importante para la discriminación entre poblaciones fue el Nlob, los cuales determinan la forma de la hoja, este atributo se ha visto que en *C. obtusifolia* cambia de acuerdo con la edad de los individuos (Alvarez-Buylla y Martínez-Ramos, 1992)<sup>17</sup> y en este estudio se observó que este atributo cambia entre individuos femeninos y masculinos como sucede en la localidad de San Antonio. Pero que, a su vez, se ve afectado por la altitud, la cual tiende a modificar el número de lóbulos conforme aumenta o disminuye dicha variable geográfica, como se ha demostrado en *Quercus rugosa* (Uribe-Salas *et al.*, 2008)<sup>271</sup>, *Hippophae rhamnoides* (Li *et al.*, 2007)<sup>147</sup> y como lo sugieren los resultados ACC.

De acuerdo con las hipótesis propuestas para la evolución del dimorfismo sexual, los individuos femeninos y masculinos tendrán diferentes requerimientos ecológicos, por lo tanto, ocuparán diferentes hábitats (hipótesis ecológica). La competencia intrasexual entre individuos masculinos puede favorecer los patrones de dispersión de polen y de manera indirecta, diferentes tamaños de hojas en las plantas femeninas (hipótesis de selección sexual). Las correlaciones genéticas entre las características foliares o entre la historia de vida, puede

influir diferencialmente en la morfología de la hoja en árboles femeninos y masculinos (hipótesis de la correlación genética).

La hipótesis ecológica, se puede descartar para *C. obtusifolia*, esto debido a que los árboles femeninos y masculinos se encuentran en el mismo hábitat, comúnmente como vecinos más cercanos, por lo que las diferencias sexuales en las dimensiones de la hoja no se debieron a la segregación espacial de los sexos en hábitats distintos, como ocurre también en *Ocotea tenera* (Wheelwright *et al.*, 2012)<sup>290</sup>.

Los árboles femeninos de *C. obtusifolia* al presentar hojas más grandes, puede representar un mayor costo reproductivo que puede favorecer diferentes atributos relacionados con la adquisición de los recursos, historia de vida y en las relaciones ecológicas inter-específicas con herbívoros y competidores (Geber, 1999)<sup>86</sup>. Éste alto costo reproductivo puede ser compensado por un aumento en el tamaño de la semilla y la tasa de crecimiento (Obeso, 2002<sup>188</sup>; Cipollini, 2013<sup>52</sup>; Berjano *et al.*, 2014<sup>34</sup>; Nakagawa *et al.*, 2015<sup>179</sup>). En estudios previos sobre las relaciones entre el tamaño del tallo y el tamaño de las hojas de plantas femeninas puede estar relacionado con un incremento de biomasa para proporcionar un mayor soporte mecánico a la semilla (Kavanagh *et al.*, 2011)<sup>126</sup>. Por lo que los individuos femeninos de *C. obtusifolia* al tener hojas más grandes y espaciadas, pueden aumentar la exposición de sus frutos y al mismo tiempo hacerlos visibles a los dispersores de semillas (Wheelwright *et al.*, 2012)<sup>290</sup>. También, se ha determinado que las plantas femeninas son más susceptibles a cambios ambientales (Berjano *et al.*, 2014)<sup>34</sup>. De esta manera, la selección natural puede favorecer el dimorfismo sexual para reducir la competencia entre los sexos por los recursos, o elevar la fecundidad de los árboles femeninos (Kavanagh *et al.*, 2011<sup>126</sup>; Gao *et al.*, 2012<sup>82</sup>).

La diversidad genética en *C. obtusifolia* ha sido investigada anteriormente con isoenzimas (Alvarez-Buylla y Garay, 1994<sup>16</sup>; Alvarez-Buylla *et al.*, 1996<sup>18</sup>), donde se detectaron altos niveles de variación genética y una baja diferenciación entre poblaciones. En este estudio se evidenció nuevamente que *C. obtusifolia* presenta una alta diversidad genética, pero con niveles moderados de diferenciación genética entre poblaciones ( $F_{ST} = 0.093$ ). El número de alelos por locus (4.45) es comparable con los valores obtenidos por Alvarez-Buylla y Garay, 1994<sup>16</sup>. La  $H_e$  en *C. obtusifolia* (0.710) fue mayor que lo observado. La variación genética en *C.*

*obtusifolia* se registró dentro de las poblaciones como ocurre en otras especies. Estos resultados muestran la existencia de altos niveles de flujo genético mediado por los individuos masculinos vía polen, ya que el polen puede dispersarse a distancias de hasta 100 km y la semilla entre rangos de 0.3-0.5 km (Alvarez-Buylla y Garay, 1994<sup>16</sup>, Alvarez-Buylla *et al.*, 1996<sup>18</sup>). Lo que hace suponer que el flujo genético es mayor vía polen (sexo masculino) que por semilla (individuos femeninos).

#### **Efecto del dimorfismo sexual en el porcentaje de Inhibición de alfa glucosidasa**

Se encontró que los individuos femeninos presentaron un mayor porcentaje de inhibición de alfa glucosidasa que los individuos masculinos, este grado de inhibición, puede deberse a un alto contenido de metabolitos secundarios que poseen los árboles femeninos. Donde uno o más de sus constituyentes presentes en los extractos de *Cecropia obtusifolia*, juegan un papel importante en la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa (Andrade-Cetto *et al.*, 2008<sup>22</sup>).

De acuerdo con las  $CI_{50}$  los valores son comparables a los obtenidos por Andrade-Cetto y colaboradores (2008)<sup>21</sup>,  $CI_{50}= 14 \mu\text{g/mL}$  y en este trabajo se obtuvo una concentración de  $28.66 \mu\text{g/mL}$ , sin embargo, los bajos valores obtenidos de  $CI_{50}$  en este trabajo se deben a que los extractos se obtuvieron con solventes diferentes, lo que reduce su efecto en la inhibición de alfa glucosidasa. A demás, al obtener las concentraciones en los individuos femeninos, se obtuvo que las localidades de San Antonio y El Camino se requiere una  $CI_{50}= < 20 \mu\text{g/mL}$ .

En diversos trabajos se ha reportado que los extractos de *C. obtusifolia* presentan un alto contenido de ácido clorogénico (ACI), el cual ha resultado tener una significativa reducción en los niveles de glucosa en sangre (Herrera-Arellano *et al.*, 2004)<sup>109</sup>.

La actividad del ACI puede estar relacionada con el metabolismo de la glucosa, debido principalmente a que retarda la absorción de glucosa en el intestino a través de la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa y la reducción en el gradiente de sodio. También ayuda a disminuir los niveles de glucosa hepática, al inhibir la actividad de glucosa-6-fosfatasa. El ACI puede inhibir la formación de compuestos N-nitroso en el tracto gastrointestinal (Van Dam, 2006)<sup>276</sup>.

#### **Correlación entre variables morfológicas, genética e inhibición de alfa glucosidasa**

Se encontró una alta variación genética, donde los individuos muestran diferentes grados de adaptación a diversos ambientes, lo que refleja una supervivencia y reproducción diferencial de algunos genotipos sobre otros. De esta manera, la selección natural representa

una desviación de los supuestos de Hardy-Weinberg de que todos los genotipos tienen igual viabilidad y fecundidad (Klug y Cummings, 1999)<sup>140</sup>.

Debido a que la selección natural es una consecuencia de las combinaciones genotipo, fenotipo del organismo y ambiente, los caracteres poligénicos o cuantitativos (aquellos controlados por cierto número de genes y que pueden ser susceptibles de influencias ambientales) también responden a la selección (Freeman y Herron, 2002<sup>80</sup>).

En el caso del efecto de las variables geográficas (latitud, longitud y altitud) sobre las características morfológicas foliares, porcentaje de inhibición y en los datos genéticos de los individuos masculinos de *C. obtusifolia* se evidenció una selección estabilizadora, puesto que favorece a los tipos intermedios, siendo seleccionados en contra de los fenotipos extremos. De tal forma que la selección estabilizadora actúa manteniendo a las poblaciones bien adaptadas a su ambiente, mientras que los individuos más próximos a la media de un carácter dado presentan una mayor eficacia biológica (Klug y Cummings, 1999<sup>140</sup>; Freeman y Herron, 2002<sup>80</sup>).

La variable geográfica que afecta la actividad biológica de los individuos masculinos y femeninos fue la latitud, ya que al aumentar esta variable geográfica se incrementa el porcentaje de inhibición de alfa glucosidasa, lo que hace suponer que sus constituyentes químicos suelen cambiar con esta variable.

El patrón de variación en la mutación neutral selectiva puede estar determinada por deriva genética, por el tamaño de la población y los rangos de mutación. Donde las mutaciones favorables pueden aumentar en frecuencia, pero todavía no se han fijado, en este caso la población presentará variación genética para la eficacia (Freeman y Herron, 2002)<sup>80</sup>, tal es el caso de las poblaciones de San Antonio y El Camino, donde algunos de los individuos presentaron tres alelos en los *loci* Cec 45 y Cec 46 (organismos triploides), los cuales presentaron hojas más grandes y altos valores en el porcentaje de inhibición de alfa glucosidasa, similares a los que presentaron los árboles femeninos (100% de inhibición).

La poliploidía es un modo de variación genética muy común en poblaciones naturales de especies vegetales, estos cambios pueden tener importancia desde el punto de vista fenotípico y ecológico tales como, incremento en la variación de las características



morfológicas, capacidad para adaptarse a nuevos ambientes (Liu *et al.*, 2015)<sup>148</sup>, tamaño de las células, cambios en el hábito de crecimiento y tiempo de floración (Rosellini *et al.*, 2013)<sup>227</sup>.

Con respecto a los individuos femeninos, presentaron una selección direccional hacia los fenotipos con mayor tamaño y mayor porcentaje de inhibición. A su vez, es necesario obtener datos genéticos que corroboren este patrón, ya que al existir alelos que determinen el alto contenido de metabolitos secundarios deberán presentarse con mayor frecuencia (Klug y Cummings, 1999)<sup>140</sup>.

Este hecho es importante pues nos hace referencia sobre los diferentes mecanismos evolutivos entre los sexos sobre la morfología de la hoja, sin embargo, es necesario llevar a cabo estudios en *C. obtusifolia* sobre la morfología de las estructuras florales, ya que esto puede ayudar a entender los mecanismos evolutivos entre los sexos en las estructuras reproductivas, ya que al presentarse antes los periodos de floración por parte de los árboles masculinos, la selección actuará sobre este morfotipo, con lo cual se verá favorecido por la presencia de los polinizadores y tener un mayor acceso a los eventos reproductivos (Forrest, 2014)<sup>78</sup>.

## Resultados morfológicos de *Costus scaber*

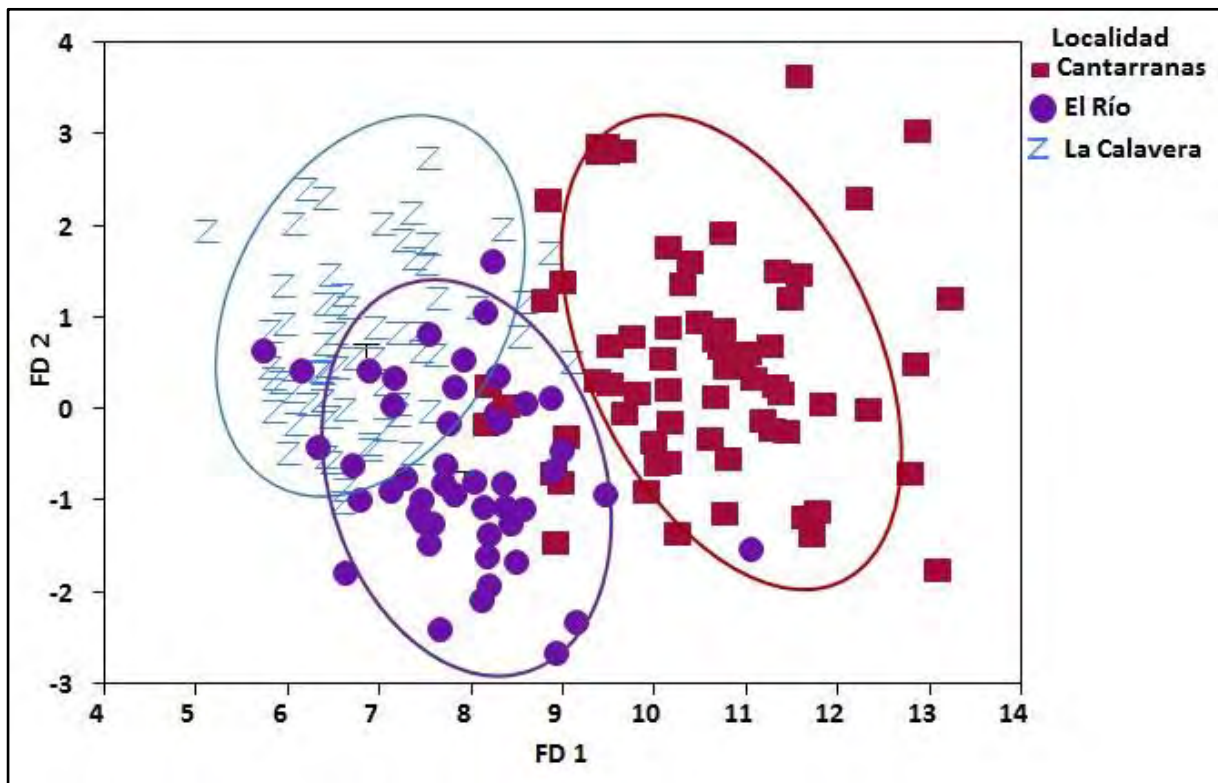
### Análisis de funciones discriminantes (AFD)

En el AFD de *C. scaber* se obtuvo un valor de  $W\lambda=0.202$ ,  $F_{(14,334)}=29.22$  con  $P<0.0001$ . Las variables que se correlacionaron positivamente con la FD1 fueron el DP ( $r=0.320$ ), DVM ( $r=0.739$ ), NVT ( $r=0.161$ ). En la FD 2 los caracteres foliares más correlacionados positivamente eran L1/3A (0.141) y negativamente con DVM  $r=-1.008$  (Tabla 23).

**Tabla 23.** Análisis de funciones discriminantes de las tres poblaciones de *C. scaber*. Donde se indican: la media (MD), desviación estándar (DS), el coeficiente de variación (CV), los valores propios (V. Prop.), correlación canónica (Rcanónica), Lambda de Wilks ( $W\lambda$ ), estadístico chi-cuadrada ( $\chi^2$ ), P= significancia para cada función discriminante, %Var. = porcentaje de varianza explicada.

| Variable   | MD   | DS   | CV    | FD 1    | FD 2    |
|------------|------|------|-------|---------|---------|
| LP         | 1.87 | 0.33 | 17.65 | -0.066  | 0.057   |
| DP         | 1.75 | 0.31 | 17.71 | 0.320   | -0.045  |
| LL         | 5.39 | 0.29 | 5.38  | -0.004  | 0.013   |
| AnChmax.   | 4.45 | 0.22 | 4.94  | -0.002  | -0.103  |
| L1/3 B     | 3.97 | 0.24 | 6.05  | 0.044   | -0.014  |
| L1/3 A     | 4.03 | 0.27 | 6.70  | -0.048  | 0.141   |
| DVM        | 0.9  | 0.35 | 38.89 | 0.739   | -1.008  |
| NVT        | 3.68 | 0.19 | 5.16  | 0.161   | 0.036   |
| V.Prop     |      |      |       | 2.630   | 0.325   |
| Rcanónica  |      |      |       | 0.851   | 0.518   |
| $W\lambda$ |      |      |       | 0.207   | 0.731   |
| $\chi^2$   |      |      |       | 271.870 | 0.731   |
| P          |      |      |       | <0.0001 | <0.0001 |
| %Var       |      |      |       | 89.00   | 11.00   |

El AFD con los ocho caracteres foliares, se pudo obtener tres grupos bien definidos (Figura 29). La FD 1 explicó el 89% de la variación acumulada y FD 2 un 11 % de la variación de los datos. Los porcentajes de asignación correcta para los grupos fue alta 82.38%. El grupo que obtuvo un mayor porcentaje de asignación fue Cantarranas con un valor de 86.06%, precedida por la población de La Calavera con 85.94% y el valor menor de asignación 68.75% en El Río.



**Figura 29.** Análisis discriminante de las tres poblaciones de *C. scaber*. La FD 1 explicó el 87.66% y la FD 2 12.34%, con lo que se explicó el 100% de la variación acumulada.

Con respecto a las distancias de Mahalanobis entre pares de poblaciones, se registró que entre las poblaciones de La Calavera y El Río presentaron la distancia más grande (3.59) y las poblaciones más distantes fueron La Calavera y Cantarranas (13.78) y una distancia de 7.62 entre el Río y Cantarranas.

#### **Análisis de varianza anidada (ANOVA)**

En el análisis de varianza anidada se obtuvo un efecto significativo con  $P < 0.001$  de la localidad en siete caracteres foliares de *C. scaber* (LL, DP, AnchMax, L1/3B, L1/3A, DVM y

NVxlob) y el efecto del individuo sobre la LP con un 27.64% de la varianza total y un menor efecto (12.33%) para la localidad (Tabla 24).

**Tabla 24.** ANOVA anidada de las tres poblaciones de *C. scaber*. Donde se indican el efecto para cada uno de los factores. Individuo dentro de la localidad (Ind. [Loc.]) y el factor localidad (Loc.). El estadístico F con  $P < 0.0001$  (\*\*\*).

| Variable | Loc (F2,175)<br>(%Var) | Ind[Loc] (F19,175)<br>(%Var) |
|----------|------------------------|------------------------------|
| LP       | 15.81 (12.33) ***      | 3.73(27.64) ***              |
| LL       | 48.98 (29.53) ***      | 4.19(24.00) ***              |
| DP       | 171.61(55.06) ***      | 6.67(20.30) ***              |
| AnchMax  | 86.29(36.82) ***       | 7.45(30.20) ***              |
| L1/3B    | 97.20(42.20) ***       | 5.93(24.46) ***              |
| L1/3A    | 79.21(34.63) ***       | 7.64(31.74) ***              |
| DVM      | 85.77(41.39) ***       | 4.67(21.42) ***              |
| NVxlob   | 193.09(60.90) ***      | 4.97(14.88) ***              |

## Resultados genéticos de *Costus scaber*

### Riqueza alélica

La amplificación de los 24 individuos que representan a las tres poblaciones de *C. scaber* se probaron con los tres oligonucleótidos (Tabla 25 ). Con lo cual se identificaron un total de 27 alelos, distribuidos de la siguiente manera: ocho alelos en los *loci cdi4g6* y *cetri2d9*, 11 en *ncdi8a*.

**Tabla 25.** Promedios de diversidad genética por loci para todas las poblaciones de *C. scaber*. Donde Tb= Tamaño de la banda en pares de bases, Na= Número de alelos, Au= alelos únicos, He= heterocigosidad esperada, Ho= heterocigosidad observada, F<sub>ST</sub>=índice de fijación o de diferenciación, F<sub>IS</sub>= coeficiente de endogamia.

| Locus           | Secuencia   | Tb (kb) | Na | Au | He    | Ho    | F <sub>ST</sub> | F <sub>IS</sub> |
|-----------------|---|---------|----|----|-------|-------|-----------------|-----------------|
| <i>cdi4g6</i>   | F:tagcccgagtcaagcagatt<br>R: gttcgcccgtgatacaact    | 210-290 | 8  | 1  | 0.868 | 0.758 | 0.160           | 0.454           |
| <i>ncdi8a</i>   | F: ggggtttcttctccgagtct<br>R: ggataacacacacgcctcc   | 150-210 | 11 | 4  | 0.892 | 0.852 | 0.018           | 0.698           |
| <i>cetri2d9</i> | F: ggagagcgcagcagagaacac<br>R: attgaacagggcgtcgatag | 124-184 | 8  | 1  | 0.870 | 0.819 | 0.062           | 0.234           |

En cuanto al número de alelos únicos (Au) se registraron seis alelos, lo que representa el 22.22% del total. El alelo seis de los *loci ncdi8a, cetri2d9* y el alelo tres de *cetri2d9* se encuentran en las tres poblaciones. Los alelos que presentaron una mayor frecuencia en el locus *cdi4g6* fueron: el alelo uno (fr= 0.50), siete (fr=0.438) y el dos (fr=0.375). En el *locus ncdi8a* el alelo tres con fr= 0.375 y final mente en el *locus cetri2d9* los alelos uno y cuatro presentaron frecuencias de 0.29 y 0.313 respectivamente (Anexo 2). Los tres microsatélites fueron 100% polimórficos.

### Diversidad genética

Los niveles de diversidad genética fueron diferentes entre poblaciones para cada *locus* analizado. La población que presentó una mayor diversidad genética (Dg) y riqueza alélica (Ra) fue Cantarranas 0.914 y 6.511 respectivamente. La población que mostró una menor Dg fue La Calavera con 0.776. El valor más alto de ( $\hat{H}_o$ ) se encontró en la población de El Río con un valor de 0.666 y una baja  $\hat{H}_o$ = 0.279 en la población de La Calavera (Tabla 26).

**Tabla 26.** Sumario de diversidad genética en las tres poblaciones de *C. scaber*. Na= el número de alelos observados, Ne= número efectivo de alelos,  $\hat{H}$ = heterocigosidad promedio de Nei,  $\hat{H}_o$ = promedio de heterocigotos observados,  $\hat{H}_e$ = heterocigosidad esperada, Dg= diversidad genética y Ra= riqueza alélica.

| Estadístico | El Río | La Calavera | Cantarranas |
|-------------|--------|-------------|-------------|
| Na          | 6.667  | 4.333       | 6.666       |
| Ne          | 4.855  | 3.333       | 5.653       |
| $\hat{H}$   | 0.771  | 0.6938      | 0.820       |
| $\hat{H}_o$ | 0.666  | 0.279       | 0.333       |
| $\hat{H}_e$ | 0.8123 | 0.7425      | 0.875       |
| Dg          | 0.821  | 0.776       | 0.914       |
| Ra          | 5.887  | 4.286       | 6.511       |

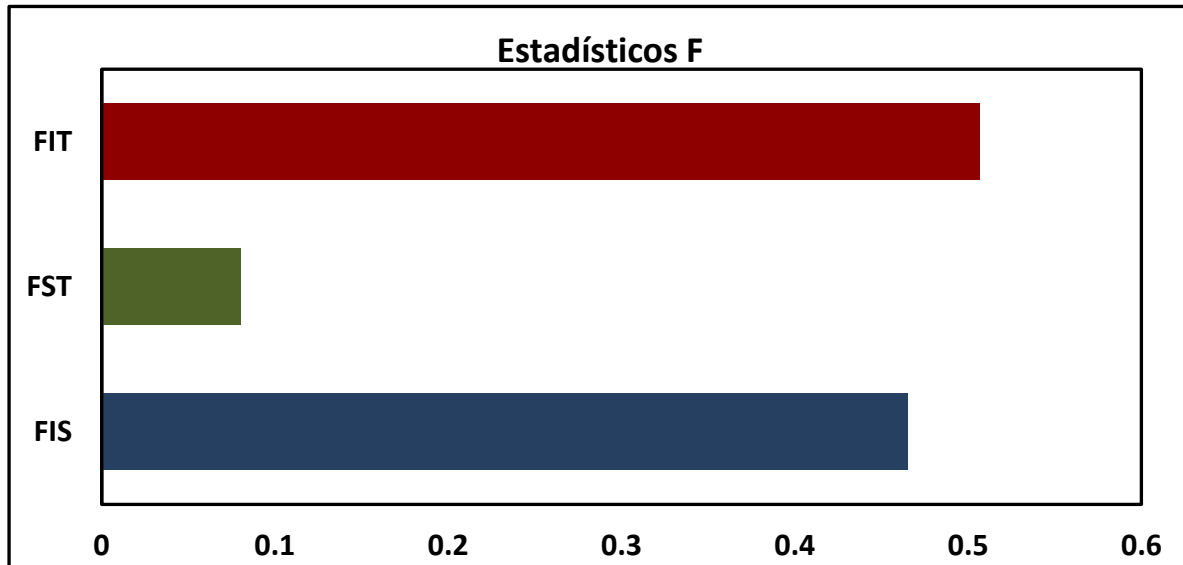
### Estructura genética

El análisis de varianza molecular (AMOVA) indica que la mayor parte de la variación genética de *C. scaber* se encontró dentro de los individuos de las poblaciones (49.25%), mientras que entre poblaciones es de 7.99% (Tabla 27).

**Tabla 27.** AMOVA, donde gl= grados de libertad, SC= suma de cuadrados, Comvar= componente de la varianza.

| Fuente de variación      | gl | SC     | Comvar | %Variación |
|--------------------------|----|--------|--------|------------|
| Entre poblaciones        | 2  | 7.235  | 0.106  | 7.99       |
| Entre Ind. [Pob]         | 23 | 41.150 | 0.568  | 42.76      |
| Dentro de los individuos | 26 | 17.000 | 0.659  | 49.25      |

El índice de diferenciación ( $F_{ST}$ ) entre poblaciones es 0.106, lo que indica que existe cierto grado de subdivisión entre las tres poblaciones. Sin embargo, se detectó que la estructura genética suele estar dada por las diferencias dentro de los individuos de las poblaciones ( $F_{IT}=0.507$ ) y por los niveles de consanguinidad o de fijación ( $F_{IS}= 0.465$ , Figura 30).



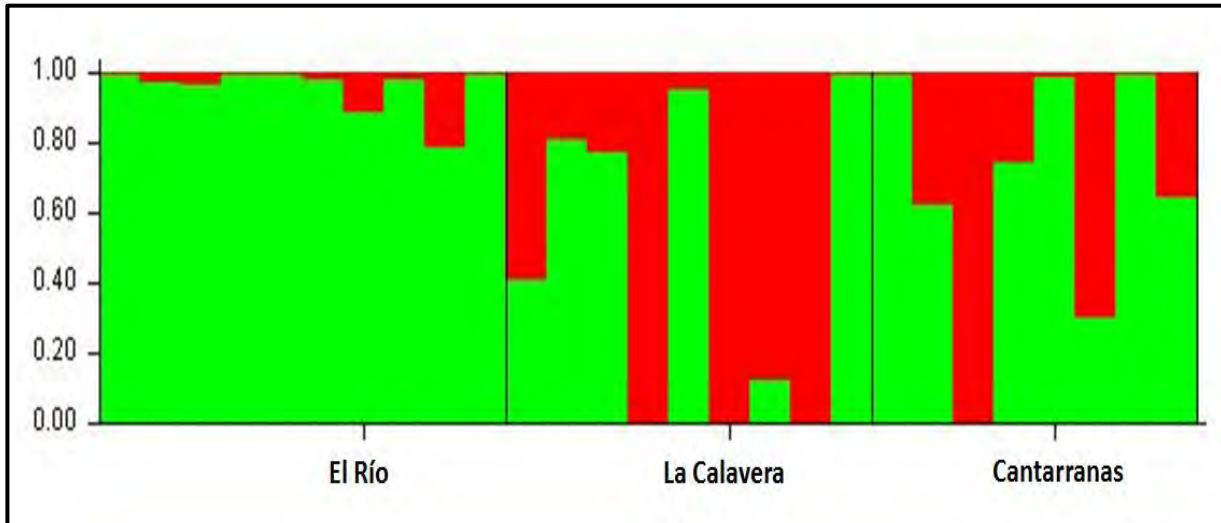
**Figura 30.** Estadísticos F de Wright de las tres poblaciones de *C. scaber*.

Los índices de migración o de flujo genético entre pares de poblaciones fue mayor el intercambio de genes entre El Río y Cantarranas ( $Nm= 7.01$ ), precedida por las poblaciones de La Calavera y Cantarranas con 5.67 migrantes por generación y la menor estimación de intercambio genético se presentó entre las poblaciones de El Río y La Calavera ( $Nm=2.53$ , Tabla 28).

**Tabla 28.** Matriz del número de migrantes por generación entre pares de poblaciones.

| Población   | El Río | La Calavera |
|-------------|--------|-------------|
| El Río      |        |             |
| La Calavera | 2.53   |             |
| Cantarranas | 7.01   | 5.67        |

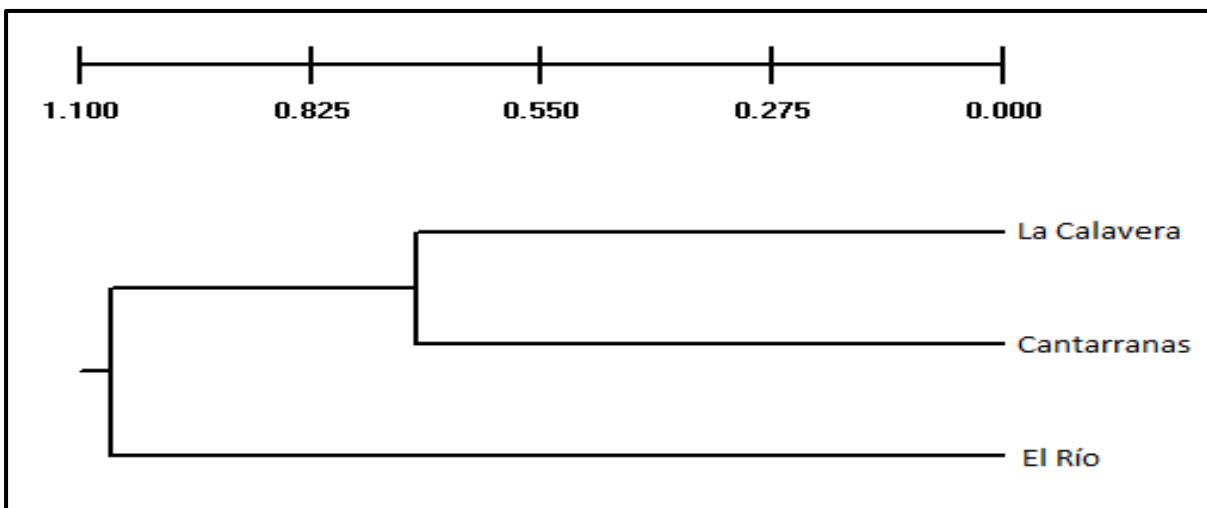
Con el análisis bayesiano, se determinó  $K=2$  como el número de grupos genéticos más probables para *C. scaber*, donde se observó que la población de El Río presenta una mayor proporción del grupo verde. En la población de La Calavera presenta una mayor proporción del grupo genético rojo y una incorporación intermedia del grupo verde. La población que presentó una incorporación intermedia entre ambos grupos genéticos fue la población de Cantarranas (Figura 31).



**Figura 31.** Análisis de asignación bayesiana para dos grupos genéticos ( $K=2$ ), la frecuencia de cada color es la proporción de ancestría derivada de cada uno de los tres grupos genéticos.

### Relaciones genéticas y de parentesco

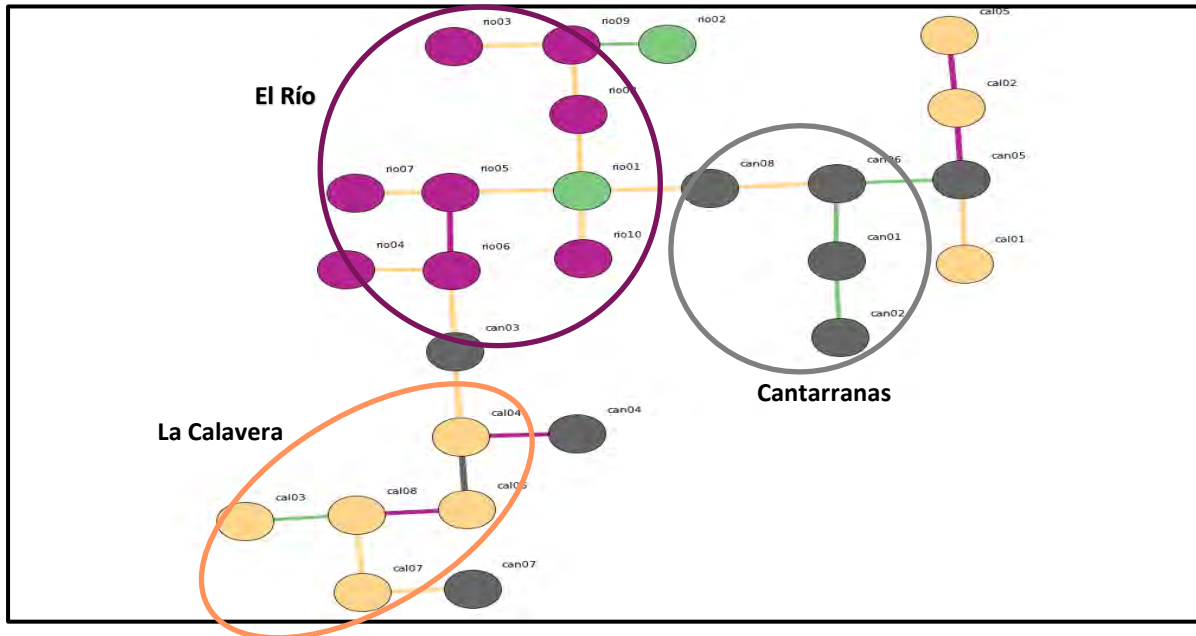
Se calcularon las distancias genéticas de Nei (1978a)<sup>184</sup> entre pares de poblaciones, en las cuales las poblaciones de Cantarranas y La Calavera presentaron el valor más pequeño de distancia genética ( $D_{ij}=0.698$ ) y una identidad genética mayor ( $I_{ij}=0.497$ ). Las poblaciones que presentaron una mayor distancia genética fue El Río y La Calavera  $D_{ij}=1.386$  y a su vez un valor bajo de  $I_{ij}=0.249$ . De esta manera se generó un dendrograma UPGMA con el programa TPGA, que utiliza las distancias genéticas entre poblaciones, donde se agruparon la Calavera y Cantarranas y posteriormente la población de El Río (Figura 32).



**Figura 32.** Dendrograma UPGMA de las tres poblaciones de *C. scaber*.



Se determinó que las relaciones genéticas de la población de El Río se mantiene como un grupo bien diferenciado de las otras dos poblaciones. Sin embargo, los individuos 1, 2 y 5 de La Calavera se agruparon con la población de Cantarranas. Los individuos 3 y 4 de la población de Cantarranas se relacionaron con el grupo de La Calavera. En la población de El Río se identificaron dos posibles alelos ancestrales que pertenecen a los individuos 1 y 2 (Figura 33).



**Figura 33.** Relaciones genotípicas entre los individuos de las poblaciones de *C. scaber*.

Con el análisis de parentesco entre poblaciones de *C. scaber*, se identificaron 16 posibles relaciones (nueve para El Río, cinco para La Calavera y dos en Cantarranas, Tabla 29). Las poblaciones de El Río y La Calavera presentaron todos los posibles grados de parentesco, mientras que la población de Cantarranas solo presentó la relación de medios hermanos (hss= 2).

**Tabla 29.** Análisis de parentesco en las tres poblaciones de *C. scaber*.

| Parentesco                  | El Río | La Calavera | Cantarranas |
|-----------------------------|--------|-------------|-------------|
| Full-siblings (Fs.)         | 9      | 5           | 2           |
| Parent off spring (Pfs)     | 1      | 1           | 0           |
| Half sublings (Hss)         | 5      | 2           | 2           |
| Cousins, Nephew-uncle (Cnu) | 3      | 2           | 0           |

## Historia demográfica de las poblaciones de *C. scaber*

### Prueba de neutralidad de Tajima y Fu

En la prueba de neutralidad de Tajima no fue significativa. Sin embargo, la prueba de Fu (1997) presentó valores negativos pero significativos en las tres poblaciones de *C. scaber*, lo que indica la existencia de reciente expansión poblacional. Los estadísticos  $F_s$  de Fu fueron significativamente diferentes de cero en todas las poblaciones, sugiriendo una reciente expansión en *C. scaber*. Valores no significativos en la prueba de Tajima ( $D$ ) y valores significativos de Fu ( $F_s$ ), han sido interpretados por Fu (1997), como ausencia esencial de la selección (Tabla 30). Además, soporta la idea a cerca de una expansión demográfica.

**Tabla 30.** Prueba de neutralidad Fu por población. Donde,  $N_a$ = número de alelos,  $\Theta\pi$ = número promedio de diferencias pareadas,  $N_{aes}$ = número de alelos esperados y el estadístico ( $F_s$ .) que determina la probabilidad de observar el número diferente de alelos en una población.  $P_f$ = significancia.

| Estadístico | El Río  | La Calavera | Cantarranas |
|-------------|---------|-------------|-------------|
| Fu's        |         |             |             |
| $N_a$       | 18      | 13          | 15          |
| $\Theta\pi$ | 4.915   | 5.073       | 5.052       |
| $N_{aes}$   | 8.396   | 8.521       | 8.504       |
| $F_s$       | -13.013 | -10.295     | -10.170     |
| P           | 0.0000  | 0.0017      | 0.0000      |

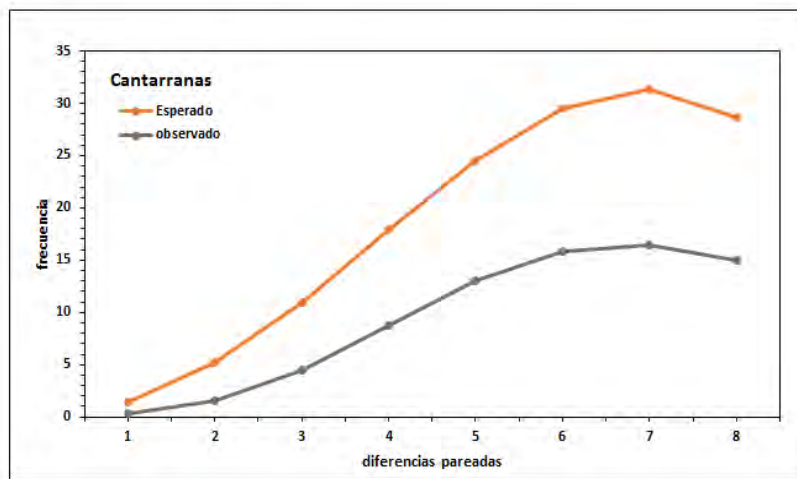
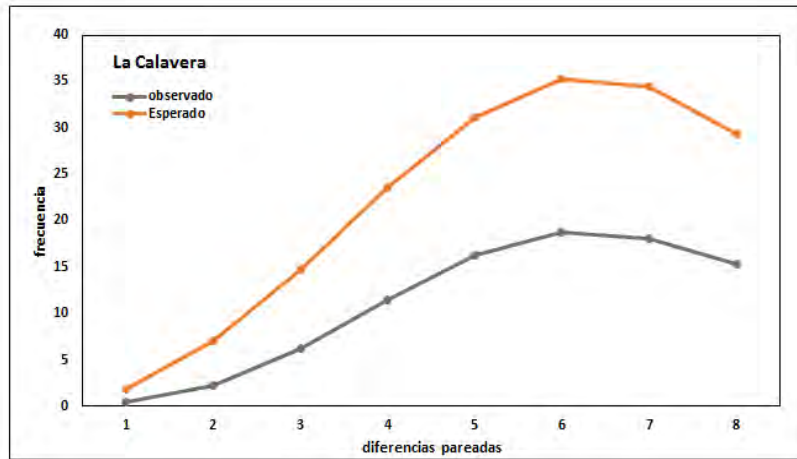
### Distribución mismatch

Los resultados de la prueba de neutralidad fueron corroborados con la distribución mismatch, con lo cual se utilizó para detectar expansiones poblacionales (Tabla 31). Así también se registró un tiempo de expansión para las poblaciones que fue de 3,414.978 años con una tasa de mutación ( $\tau$ ) de 4.6 sitios. Con tamaños poblacionales iniciales ( $\Theta_0$ ) de 5.937 para la población de El Río, Cantarranas (5.25) y  $\Theta_0 = 4.516$  para La Calavera. Así también se determinó el crecimiento poblacional después de la expansión ( $\Theta_1$ ) para cada una de las poblaciones. Donde se determinó que la población de Cantarranas presentó  $\Theta_1 = 913.758$  y el valor más bajo fue para la población de El Río con  $\Theta_1 = 534.365$  (Tabla 31).

**Tabla 31.** Valores de los parámetros estimados y el tiempo de expansión poblacional, mediante el análisis de distribución mismatch. Los parámetros  $\Theta_0$  y  $\Theta_1$  son el tamaño poblacional antes y después de la expansión respectivamente,  $\tau$  (Tau)= media de crecimiento y declinación en unidades de tiempo mutacional.

| <b>Estadístico</b>         | <b>El Río</b> | <b>La Calavera</b> | <b>Cantarranas</b> |
|----------------------------|---------------|--------------------|--------------------|
| <b>Modelo de expansión</b> |               |                    |                    |
| $\tau$ (Tau)               | 4.000         | 5.000              | 5.000              |
| $\tau$ qt 95%              | 6.884         | 7.060              | 7.961              |
| $\Theta_0$                 | 5.937         | 4.516              | 5.250              |
| $\Theta_0$ 95%             | 5.937         | 4.130              | 7.264              |
| $\Theta_1$                 | 3414.978      | 3414.978           | 3414.978           |
| $\Theta_1$ 95%             | 534.365       | 752.495            | 913.758            |
| DSS                        | 0.261         | 0.191              | 0.362              |
| $p$                        | 0.002         | 0.000001           | 0.00007            |

De acuerdo con la prueba de mis match, todas las poblaciones presentaron una curva con distribución unimodal, como es de esperarse en poblaciones en expansión. De igual manera todas las sumas de desviación estándar al cuadrado (DSS) fueron significativos, lo que corrobora que las curvas de la prueba testifican el modelo en expansión (Figura 34).



**Figura 34.** Distribución mismatch por cada una de las poblaciones de *Costus scaber*, para las frecuencias observadas y los intervalos de confianza del 95%.

### Inhibición de alfa glucosidasa de *C. scaber*

En el análisis de varianza (ANOVA) se encontró que existe un efecto significativo del factor localidad ( $P < 0.0001$ ), del individuo ( $P 0.0000$ ), de la concentración ( $P 0.0000$ ), de la interacción localidad-concentración, así como de la interacción localidad-individuo-concentración ( $P < 0.0001$ ) en la inhibición de alfa glucosidasa. Sin embargo, no existen diferencias significativas con el factor tiempo (Tabla 32).

**Tabla 32.** ANOVA de inhibición de alfa glucosidasa de los extractos de *C. scaber*.

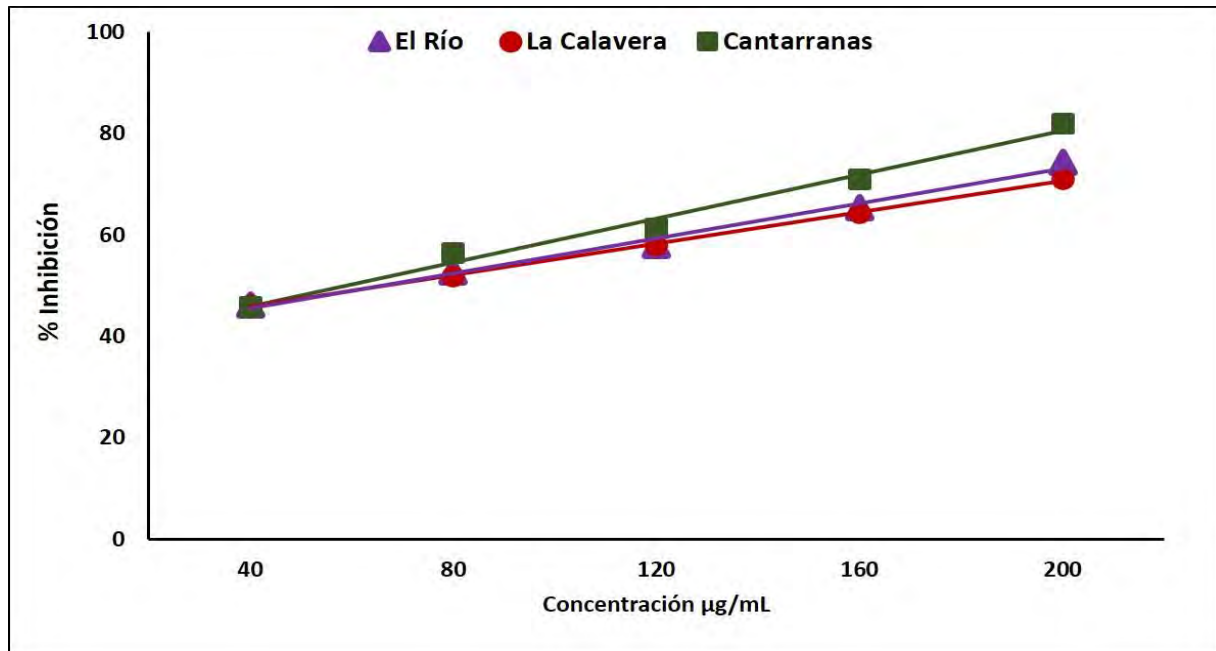
| Factor                                | gl | SC        | F       | P        |
|---------------------------------------|----|-----------|---------|----------|
| Localidad                             | 2  | 16783.22  | 125.74  | < 0.0001 |
| Individuo                             | 7  | 162895.41 | 348.68  | 0.0000   |
| Concentración                         | 4  | 381951.4  | 1430.76 | 0.0000   |
| Localidad x Concentración             | 8  | 8821.15   | 16.52   | < 0.0001 |
| Localidad x Individuo x Concentración | 56 | 42265.31  | 11.31   | < 0.0001 |
| Individuo x Concentración             | 28 | 50733.63  | 27.15   | < 0.0001 |
| Localidad x Individuo                 | 14 | 621043.54 | 664.68  | 0.0000   |

De igual manera, se encontraron diferencias entre localidades sobre el porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa. La población de Cantarranas presentó el valor más alto con un  $63.23 \pm 10.96\%$ , con una  $CI_{50} = 55.93 \mu\text{g/mL}$  y la localidad inhibió en menor proporción fue La Calavera con  $58.21 \pm 9.83\%$ . y las localidades que requirieron una mayor  $CI_{50}$  fueron el Río y La Calavera. Sin embargo, estos valores fueron menores a los del control acarbossa  $CI_{50} = 161.98 \mu\text{g/mL}$  (Tabla 33).

**Tabla 33.** Media, desviación estándar (DS) del porcentaje de inhibición (%Inh.) y  $CI_{50}$  por población de *C. scaber*.

| Localidad   | Media $\pm$ DS (%Inh.) | $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|-------------|------------------------|--------------------------------|
| El Río      | $59.26 \pm 10.96$      | 63.74                          |
| La Calavera | $58.21 \pm 9.83$       | 67.43                          |
| Cantarranas | $63.23 \pm 13.79$      | 55.93                          |
| Acarbosa    | $52.37 \pm 25.45$      | 161.98                         |

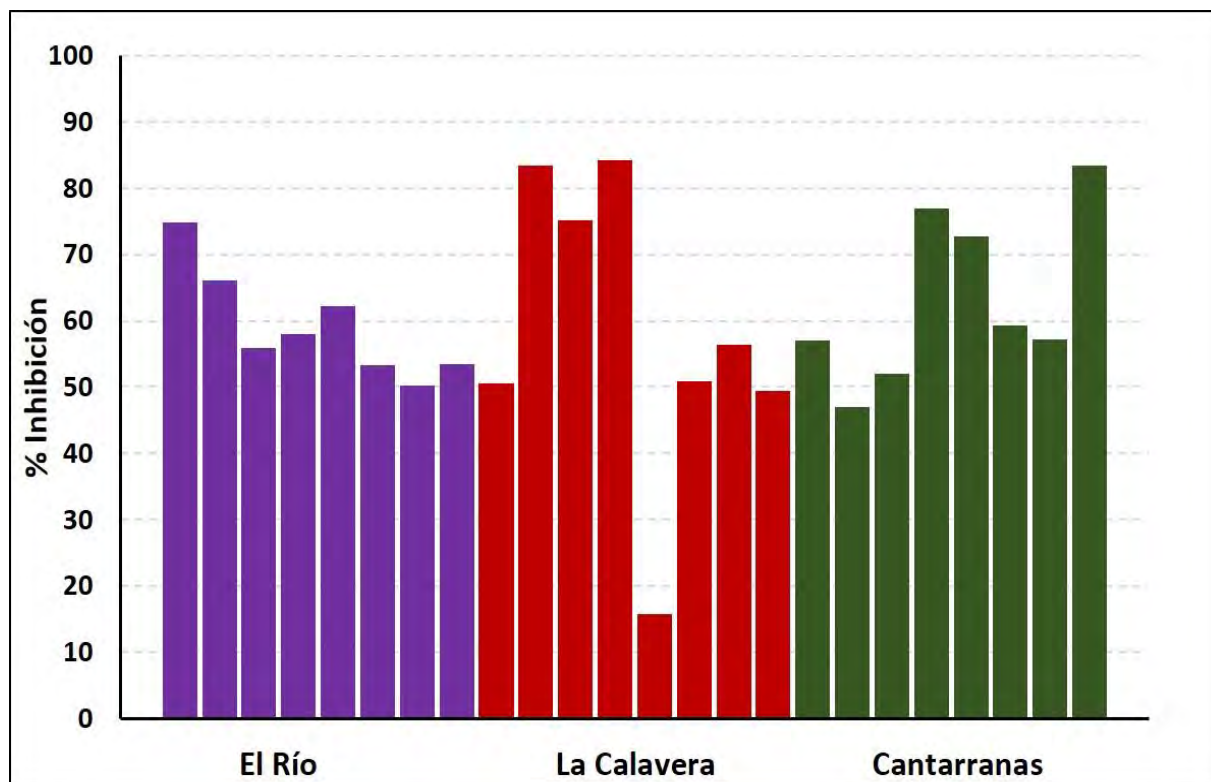
Los porcentajes de inhibición de alfa glucosidasa fueron muy similares en las concentraciones de 40, 80 y 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en las tres poblaciones (40-50%). Sin embargo, en las concentraciones de 160 y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  la localidad de Cantarranas presentó los valores más altos en el porcentaje (60-75%, respectivamente) de inhibición de alfa glucosidasa (Figura 35).



**Figura 35.** Porcentaje de inhibición de alfa glucosidasa en las tres localidades de *C. scaber*.

De igual manera, se evidenció un efecto significativo en la inhibición de alfa glucosidasa entre individuos con valores que van de 15.69 a un 83.39% de inhibición. La mayoría de los individuos inhiben más del 50% la actividad de alfa glucosidasa y únicamente el individuo 5 de la localidad de La Calavera fue el que presentó el porcentaje más bajo de inhibición (15%).

Los individuos que presentaron un porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa superiores al 60% fueron el individuo 1, 2 y 5 de la localidad de El Río. En la Calavera fueron los individuos 2, 3 y 4, mientras que en Cantarranas fueron los individuos 4, 5 y 8 (Figura 36).



**Figura 36.** Porcentaje de inhibición de alfa glucosidasa por individuo en las diferentes localidades de *C. scaber*.

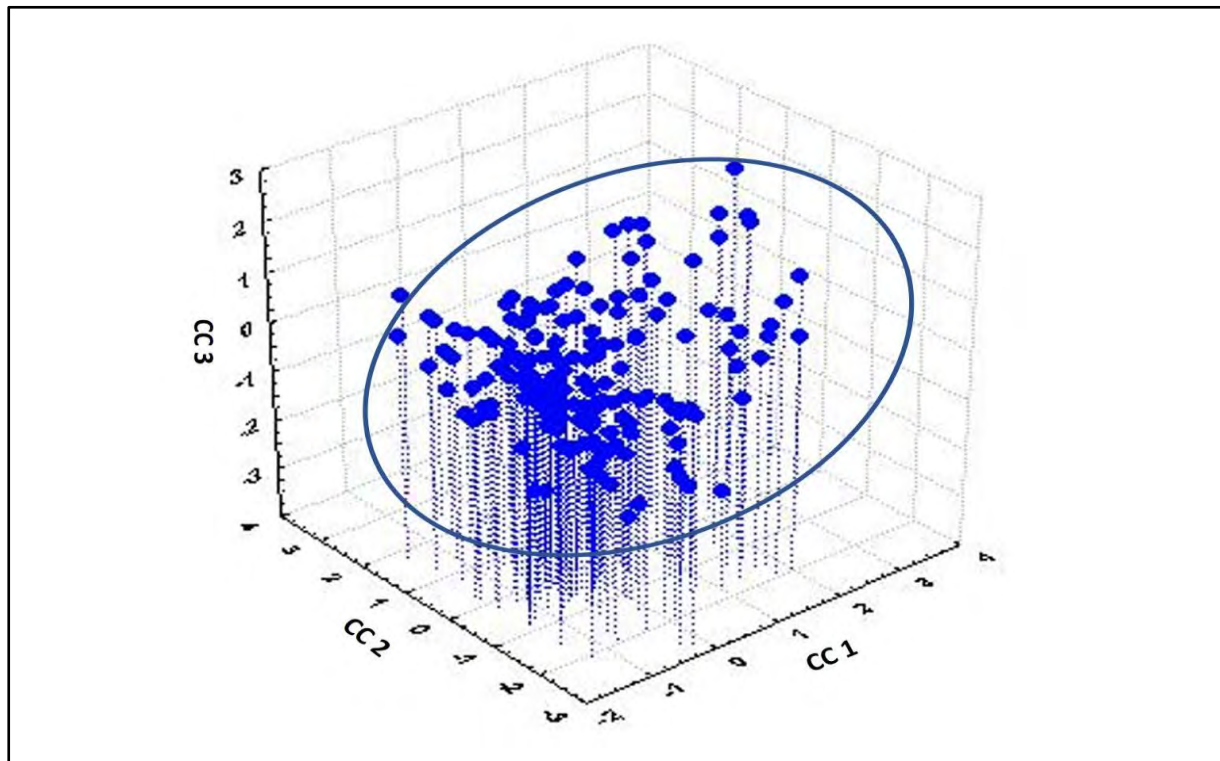
#### **Correlación entre fenotipo, genotipo con las variables geográficas de *C. scaber***

En el ACC, entre las variables morfológicas y genéticas se encontró que todas las variables morfológicas se correlacionaron positivamente con los tres *loci*, con la excepción del porcentaje de inhibición (%Inhib.), las variables que más se correlacionaron con el locus *cdi4g6* fueron L1/3 A y NVxlob.

El porcentaje de inhibición se correlacionó negativamente con los *loci* *ncdi8a10* y *cetri2d9* ( $r = -0.012$  y  $r = -0.025$ , respectivamente; Tabla 34). Donde se determinó que la mayoría de los alelos se encuentran presentes a través del gradiente latitudinal, longitudinal y altitudinal, por lo que tienen el potencial de responder de manera similar a variaciones microclimáticas donde regularmente las condiciones ambientales son homogéneas (Figura 37, Anexo 3A).

**Tabla 34.** Análisis de correlaciones canónicas entre variables fenotípicas (morfología e inhibición de alfa glucosidasa en las tres poblaciones de *C. scaber*.

| Variable     | Loc-cdi4g6 | loc-ncdi8a10 | loc-cetri2d9 |
|--------------|------------|--------------|--------------|
| LP           | 0,263      | 0,307        | 0,220        |
| DP           | 0,480      | 0,325        | 0,229        |
| LL           | 0,424      | 0,264        | 0,218        |
| Anchmax      | 0,475      | 0,235        | 0,192        |
| L1/3 B       | 0,487      | 0,242        | 0,186        |
| L1/3 A       | 0,539      | 0,352        | 0,246        |
| DVM          | 0,250      | 0,071        | 0,023        |
| NVxlob       | 0,574      | 0,393        | 0,390        |
| %inhibición  | 0,031      | -0,012       | -0,025       |
| Val. Propios | 0,449      | 0,150        | 0,051        |
| P            | <0,00001   | 0,0001       | 0,1401       |



**Figura 37.** Análisis de correlaciones canónicas entre las variables genéticas y morfológicas de las poblaciones de *C. scaber*.



El ACC entre los datos fenotípicos y geográficos se obtuvo que la latitud se correlacionó negativamente con todas las características fenotípicas, mientras que, la altitud y longitud se correlacionaron positivamente tanto con las variables morfológicas como con el porcentaje de inhibición. La longitud se correlacionó de manera negativa ( $r = -0.809$ ) con la CC 1 y un alto valor propio (0.645,  $P < 0.0000001$ ).

Las variables que más se correlacionaron con la longitud fueron el DP ( $r = 0.637$ ), Anchmax ( $r = 0.548$ ), L1/3 B ( $r = 0.579$ ) y NVxlob (0.555). En el CC 2 se integró por las variables geográficas altitud y latitud en relación con LP y % de inhibición (Tabla 35, Anexo 3. ACC factor de estructura entre variables morfológicas y genéticas (A), entre variables geográficas y morfológicas (B) de *C. scaber*).

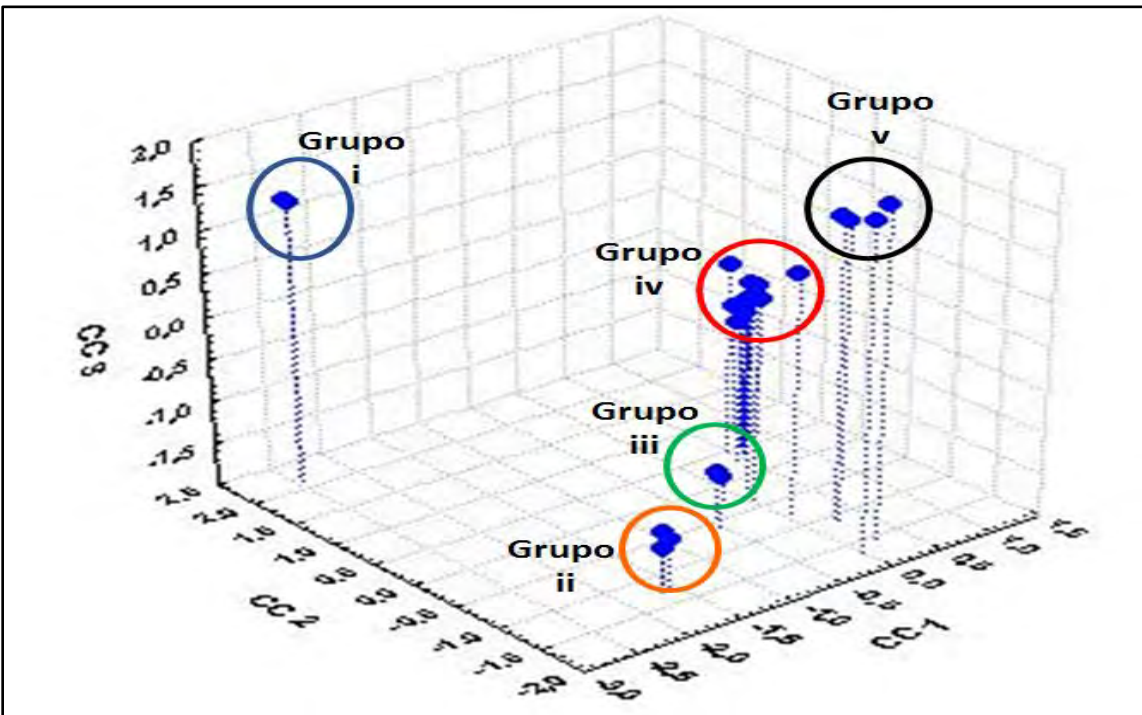
**Tabla 35.** ACC entre variables fenotípicas y geográficas en *C. scaber*.

| Variable     | latitud    | longitud | Altitud |
|--------------|------------|----------|---------|
| LP           | -0.241     | 0.373    | 0.222   |
| DP           | -0.310     | 0.637    | 0.268   |
| LL           | -0.140     | 0.457    | 0.228   |
| AnchMax      | -0.217     | 0.548    | 0.239   |
| L1/3 B       | -0.220     | 0.579    | 0.259   |
| L1/3 A       | -0.201     | 0.539    | 0.254   |
| DVM          | -0.148     | 0.415    | 0.111   |
| NVxlob       | -0.145     | 0.555    | 0.226   |
| %inhibición  | -0.090     | 0.168    | 0.207   |
| Val. Propios | 0.645      | 0.170    | 0.029   |
| R            | 0.803      | 0.412    | 0.170   |
| x2           | 259.414    | 44.636   | 6.073   |
| Lambda       | 0.286      | 0.806    | 0.971   |
| P            | <0.0000001 | 0.00016  | 0.53128 |
| Varianza     | 0.536      | 0.068    | 0.067   |

Lo que permitió diferenciar entre grupos morfológicos a diferentes escalas geográficas, en donde se obtuvieron cinco grupos, el primero conformado por fenotipos que presentan reducción en el tamaño de la hoja y un menor porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa, este fenotipo se encuentra entre los 20°43' longitud, 98°06' de latitud y entre los rangos de 677-692 m de altitud.

Los grupos ii y iii, se integraron por individuos que disminuyen en el DVM y el número de venas, pero con un incremento en LP, DP, LL y Anchmax, L1/3B y L1/3A. En el caso del grupo i, los fenotipos se presentaron en altitudes de 75 y 196 m. El grupo iii, se encontró en altitudes intermedias 365-500 m y que presentaron valores intermedios (49-58%) de inhibición de alfa glucosidasa.

El grupo iv se conformó por fenotipos que se localizan en un rango de 674-701 m de altitud con un 60-72% de inhibición. El grupo v se integró por los fenotipos con un mayor tamaño en los caracteres morfológicos, y que se encontraron a mayores altitudes (692-838 m) y con un 73-83.39% de inhibición de alfa glucosidasa (Figura 38).



**Figura 38.** ACC entre variables fenotípicas (morfología e inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa) y geográficas de *C. scaber*.

El ACC entre los datos fenotípicos y genotipos con las variables geográficas se obtuvo que la latitud se correlacionó negativamente con todas las características fenotípicas y con el locus *ncdi8a10*, mientras que, la altitud y longitud se correlacionaron positivamente con las variables fenotípicas como con los genotipos.

En el CC1 se correlacionó positivamente con la longitud y la altitud ( $r= 0.908$  y  $r= 0.496$ , respectivamente) y obtuvo un alto valor propio (0.778,  $P<0.0000001$ ). Las variables morfológicas que más se correlacionaron con la variable geográfica longitud fueron: el DP ( $r= 0.637$ ), *Anchmax* ( $r= 0.548$ ), L1/3 B ( $r= 0.579$ ), *NVxlob* (0.555), los *loci cdi4g6* ( $r= 0.639$ ) y *ncdi8a10* ( $r= 0.562$ ).

En el CC 2 se integró por la latitud en relación con LP ( $r= -0.367$ ), DP ( $r= 0.206$ ), % de inhibición ( $r= 0.318$ ), los *loci cetri2d9* ( $r= -0.465$ ) y *cdi4g6* ( $r= -0.449$ ) y presentó un valor propio de 0.240 ( $P <0.00001$ ). El CC 3 se estructuró por la altitud ( $r= -0.866$ ), longitud y latitud ( $r= -0.419$ ,  $r= -0.426$ , respectivamente), y un significativo valor propio (0.180 con  $P 0.00001$ ).

Las variables que se correlacionaron con este coordinado fueron DP ( $r= 0.320$ ), DVM ( $r= 0.416$ ), datos genéticos de los tres *loci cdi4g6* ( $r= -0.333$ ) *ncdi8a10* ( $r= -0.483$ ), *cetri2d9* ( $r= -0.359$ ) y  $r= -0.390$  con el porcentaje de inhibición de alfa glucosidasa (Tabla 36).

**Tabla 36.** ACC entre variables fenotípicas, genotípicas y geográficas de *C. scaber*.

| Variable        | Latitud  | Longitud | Altitud |
|-----------------|----------|----------|---------|
| LP              | -0.241   | 0.373    | 0.222   |
| DP              | -0.310   | 0.637    | 0.268   |
| LL              | -0.140   | 0.457    | 0.228   |
| <i>Anchmax</i>  | -0.217   | 0.548    | 0.239   |
| L1/3 B          | -0.220   | 0.579    | 0.259   |
| L1/3 A          | -0.201   | 0.539    | 0.254   |
| DVM             | -0.148   | 0.415    | 0.111   |
| <i>NVxlob</i>   | -0.145   | 0.555    | 0.226   |
| <i>cdi4g6</i>   | 0.118    | 0.639    | 0.424   |
| <i>ncdi8a10</i> | -0.052   | 0.562    | 0.440   |
| <i>cetri2d9</i> | 0.198    | 0.347    | 0.270   |
| %inhibición     | -0.090   | 0.168    | 0.207   |
| Val. Propios    | 0.778    | 0.240    | 0.180   |
| R               | 0.882    | 0.490    | 0.424   |
| P               | <0.00001 | <0.00001 | 0.00001 |

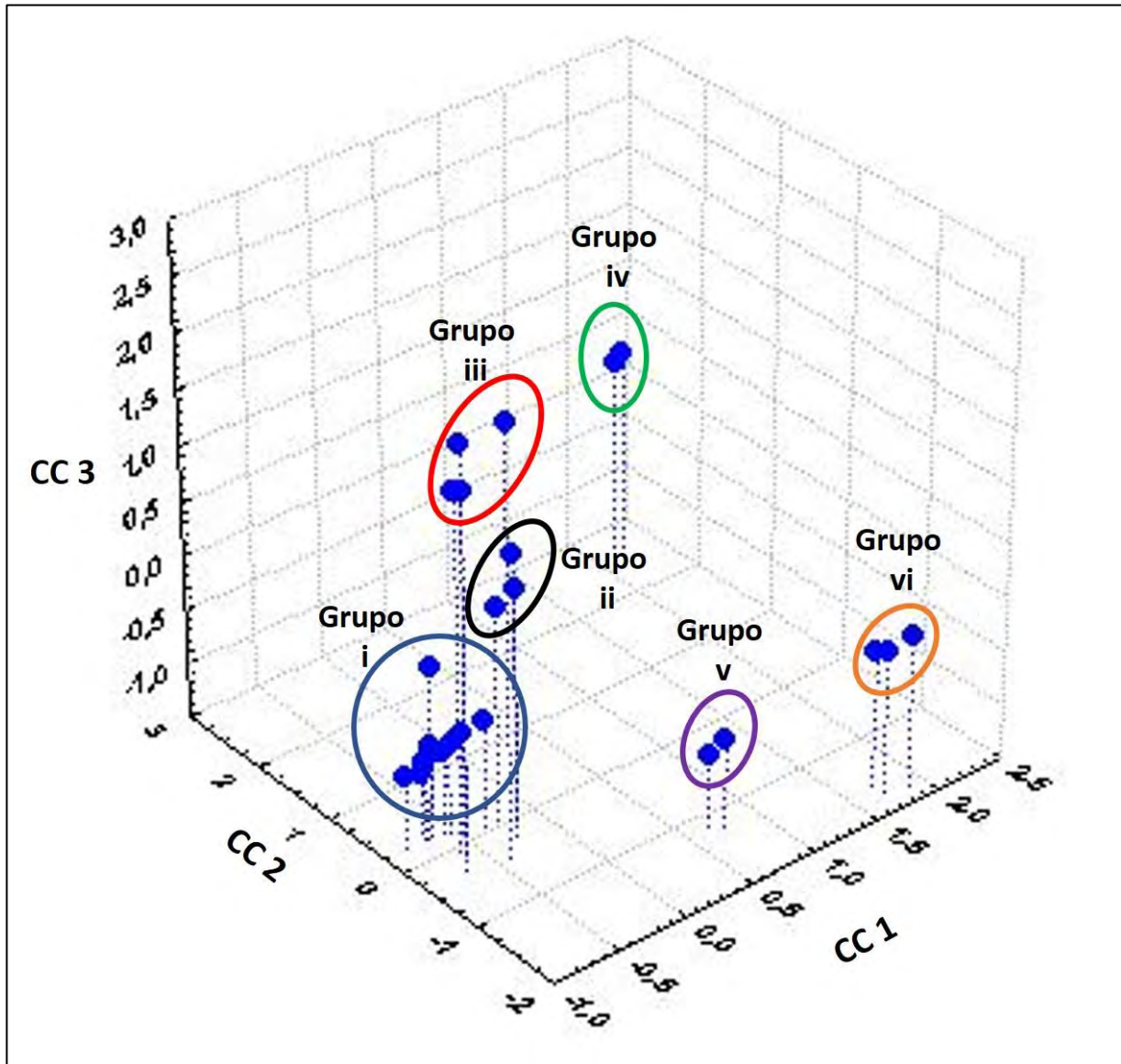


Figura 39. ACC entre fenotipos, genotipo y variables geográficas en *C. scaber*.

## Discusiones

### Morfología de *Costus scaber*

Los resultados morfológicos foliares descritos por los análisis de funciones discriminantes y ANOVA anidado demuestran la existencia de tres diferentes formas de hojas en *C. scaber*. Los cambios en la forma y el tamaño de la hoja pueden atribuirse a cambios ontogénicos (diferentes edades y desarrollo de las plantas). Previos estudios realizados han registrado cambios en el tallo y la longitud de la hoja en otras especies del género *Costus* (Smith, 1941<sup>247</sup>; Kirchoff y Rutishauser, 1990<sup>137</sup>; Cooley *et al.*, 2004<sup>55</sup>; Guzmán, 2015<sup>104</sup>).

De acuerdo con el AFD, las variables que permitieron la discriminación entre grupos (DP, NVT, DVM), son caracteres asociados con propiedades biomecánicas, de transporte de nutrientes y de agua. *Costus scaber* se caracteriza por presentar hojas con poca flexibilidad, crece principalmente en zonas sombrías y húmedas, ante estas condiciones ambientales, presentan un bajo crecimiento (Cooley *et al.*, 2004)<sup>55</sup>. Por lo que, la plasticidad morfológica puede ser interpretada como una estrategia para incrementar la captura de luz en ambientes más sombríos y con ello realizar sus funciones vitales como la fotosíntesis (Givnish, 1987<sup>89</sup>; Valladares *et al.*, 2002<sup>274</sup>; Gratani *et al.*, 2014<sup>100</sup>; Puglielli *et al.*, 2015<sup>213</sup>).

### Genéticos

#### Diversidad genética

En este estudio se encontró una alta diversidad genética ( $D_g = 0.914-0.776$ ) y riqueza alélica ( $R_a = 5.55$ ). Los niveles de heterocigosidad observada fueron altos en la población de El Río ( $H_o = 0.666$ ), sin embargo, la  $H_o$  fue baja en las poblaciones de La Calavera y Cantarranas ( $H_o = 0.279$ ,  $H_o = 0.333$ ) respectivamente. El número de alelos ( $N_a$ ) por locus fue de 4.61 por población. Estos resultados son similares a los reportados en *Costus pulverulentus* y *C. scaber*, donde los rangos de  $H_o$  fueron de 0.29-0.55 y  $N_a = 3.04$  por población (Surget-Groba y Kay, 2013)<sup>258</sup>. Además, difieren a lo reportado en *Costus pictus*, donde la diversidad genética con ISSR y RAPD, fueron relativamente bajos, y todas las poblaciones pertenecen al mismo acervo genético (Naik *et al.*, 2017)<sup>178</sup>.

#### Estructura genética

Las poblaciones de *C. scaber* presentaron una moderada diferenciación genética, de acuerdo con los valores de  $F_{st}$  de *C. scaber*, por lo que al compararlos con los resultados

obtenidos por Kay *et al.*, 2005<sup>130</sup> en *C. pulverulentus* y *C. scaber* son bajos en algunos casos, sin embargo, son similares tomando los resultados únicamente de *C. scaber* donde los valores oscilan entre 0.165-0.923 (Wright, 1978<sup>296</sup>; Balloux y Lugon-Moulin, 2002<sup>29</sup>; Oleas *et al.*, 2012)<sup>189</sup>En el AMOVA, el 89.38% de la variación genética se encontró dentro de las poblaciones, donde el flujo genético entre poblaciones es alto ( $Nm= 2- 7$  migrantes por generación), el cual tiende a homogenizar las diferencias entre poblaciones y este efecto puede atribuirse al tipo de polinizadores que presenta (colibríes) (Kay *et al.*, 2005<sup>130</sup>; Kay y Schemske, 2008<sup>128</sup>).

En el análisis bayesiano se identificaron dos grupos genéticos. El primero conformado por la Población de El Río y el otro por las poblaciones de La Calavera y Cantarranas. La población de El Río presentó el mayor número de alelos únicos ( $A_u=4$ ) y la población de Cantarranas 2 alelos privados. Los individuos de la población de El Río se mantuvieron como un grupo bien definido, donde se detectaron alelos ancestrales en los individuos 1 y 2.

### **Historia demográfica**

Los resultados de la prueba de mismatch, indica que las poblaciones de *Costus scaber* experimentaron un rápido crecimiento poblacional después de la fragmentación de las poblaciones ( $\Theta=$ ). La actual fragmentación del bosque templados en los diferentes sistemas montañosos aparentemente experimentó repetidos procesos de expansión y contracción durante el Pleistoceno con al menos una expansión que resultó en una biota templada continua y efímera (Sullivan *et al.* 1997<sup>256</sup>, Kay *et al.*, 2005<sup>130</sup>; Ortíz-Medrano *et al.*, 2008<sup>192</sup>; Surget-Groba y Kay, 2013<sup>258</sup>).

El género *Costus* ha presentado una rápida diversificación y en este estudio se observa que las poblaciones de *C. scaber* presentan una rápida expansión poblacional, lo cual es congruente con otros estudios realizados para el género *Costus* y para esta especie en particular (Specht *et al.*, 2001<sup>248</sup>; Kay *et al.*, 2005<sup>130</sup>, Surget-Groba y Kay, 2013<sup>258</sup>). Además, coincide con eventos que surgieron en el Continente Americano (vulcanismo), lo que ha propiciado una radiación en los neotropicos, y cambios en los sistemas de polinización (Gentry, 1982<sup>87</sup>; Kay *et al.*, 2005<sup>130</sup>).

### **Inhibición de alfa glucosidasa**

Se encontró un efecto dependiente de la localidad, del individuo y de la concentración en la inhibición de alfa glucosidasa. La  $IC_{50}$  de las hojas de *C. scaber* fue de 62.37  $\mu\text{g/mL}$ , los cuales fueron similares a los encontrados en *Costus speciosus* con una  $IC_{50}$ = 67.50  $\mu\text{g/mL}$  (Perera *et al.*, 2016)<sup>203</sup> y los rizomas de *C. speciosus* no inhibieron a  $\alpha$ -glucosidasa (Alagesan *et al.*, 2012)<sup>13</sup>, estos valores fueron superiores que los de acarbosa ( $IC_{50}$ = 162.37  $\mu\text{g/mL}$ ). Así como a los encontrados en *Costus afer* con extractos metanólicos con  $IC_{50}$ = 590  $\mu\text{g/mL}$  en hojas,  $IC_{50}$ = 630  $\mu\text{g/mL}$  en tallos y  $IC_{50}$ =480  $\mu\text{g/mL}$  en rizomas (Tchamgoue *et al.*, 2015)<sup>262</sup>.

Estos resultados hacen suponer que *C. scaber*, al presentar un alto flujo genético, así como la cercanía que existe entre las poblaciones, es suficiente para homogeneizar la variación en sus constituyentes químicos, lo cual se ve reflejado en su actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa.

En este estudio se encontró que *C. scaber* las características morfológicas foliares son altamente variables, pero su actividad inhibitoria de alfa glucosidasa se mantiene estable en las tres poblaciones, pero ambos caracteres son altamente heredables. Este trabajo es similar a lo obtenido por Ami *et al.*, 2017<sup>19</sup>, quienes observaron una estable y alta heredabilidad morfológica en *Costus pictus*, así como también en las características fitoquímicas en todas las poblaciones.

Por otra parte, el potencial de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa de los individuos de *C. scaber* presentó una distribución espacial con la altitud, los cuales difieren tanto en morfología y estructura genética (Figura 43).

De acuerdo con un estudio realizado por Annadurai *et al.*, 2012<sup>23</sup>, encontraron que bixina, norobixina, geraniol, pueden ser algunos de los constituyentes activos involucrados en la actividad antidiabética de las plantas medicinales. Con respecto a esto, las hojas del género *Costus*, contienen el compuesto bixina, por lo tanto, pueden ser utilizadas como una fuente alternativa de bixina, compuesto que suele activar los receptores de liberación de  $\alpha$ -peroxisoma (Annadurai *et al.*, 2012<sup>23</sup>; Subramoniam, 2016<sup>254</sup>).

Por otra parte, se ha reportado que los constituyentes antidiabéticos tienen un determinante genético. En *Costus speciosus* se encontró que el gen *CsOSCI* actúa sobre la biosíntesis de terpenos (Kawano *et al.*, 2002)<sup>127</sup>.

## Resultados Morfológicos de *Tecoma stans*

### Análisis discriminante

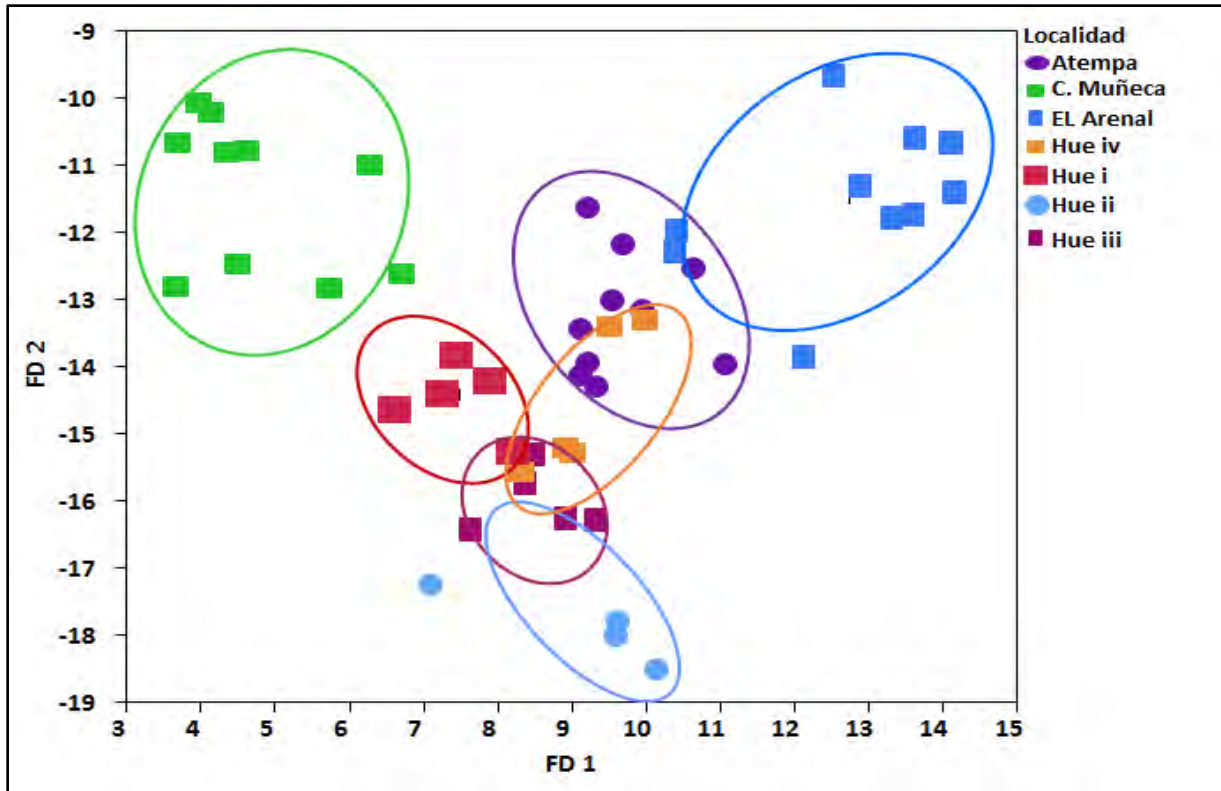
En el AFD se obtuvo un valor de  $W\lambda = 0.0054$   $F_{60,183} = 5.197$   $P = 0.00001$  y las variables que más se correlacionaron con la FD 1 fueron: LL ( $r = 0.690$ ) y L1/3 B ( $r = 0.610$ ). En la FD 2, fueron: DP ( $r = -1.604$ ), DP ( $r = -1.604$ ), DP2Fol. ( $r = -1.269$ ) y la L1/3 B ( $r = 0.778$ ). Los coeficientes de variación más altos se encontraron en el L1/3B y L1/3A con valores de 30.01 y 29.53, respectivamente (Tabla 37).

**Tabla 37.** Análisis de funciones discriminantes de las siete poblaciones de *T. stans*. Donde se indican: la media, desviación estándar (DS), el coeficiente de variación (CV), los valores propios (V. Prop.), Lambda de Wilks ( $W\lambda$ ), estadístico chi-cuadrada ( $\chi^2$ ),  $P =$  significancia para cada función discriminante, %Var. = porcentaje de varianza explicada.

| Variable                     | Media (mm) | DS    | CV    | FD 1         | FD 2          |
|------------------------------|------------|-------|-------|--------------|---------------|
| LP                           | 40.35      | 9.97  | 24.70 | -0.264       | 0.568         |
| DP                           | 1.11       | 0.25  | 22.52 | -0.245       | <b>-1.604</b> |
| DP2Fol.                      | 28.69      | 6.10  | 21.26 | -0.080       | <b>-1.269</b> |
| LL                           | 59.79      | 16.24 | 27.16 | <b>0.690</b> | 0.578         |
| AnchMax.                     | 20.41      | 5.62  | 27.54 | -0.334       | 0.655         |
| L1/3 B                       | 16.09      | 4.83  | 30.01 | <b>0.610</b> | <b>0.778</b>  |
| L1/3A                        | 11.75      | 3.47  | 29.53 | 0.373        | -0.156        |
| DVM                          | 22.87      | 5.44  | 23.78 | 0.382        | 0.111         |
| NAT                          | 16.74      | 3.16  | 18.88 | -0.214       | -0.179        |
| NVT                          |            |       |       | 0.486        | 0.215         |
| <b>Constante</b>             |            |       |       | -8.825       | 13.506        |
| <b>V.Prop</b>                |            |       |       | 7.842        | 4.611         |
| <b><math>W\lambda</math></b> |            |       |       | 0.005        | 0.048         |
| <b><math>\chi^2</math></b>   |            |       |       | 210.953      | 122.683       |
| <b>P</b>                     |            |       |       | <0.0001      | <0.0001       |
| <b>%Varianza</b>             |            |       |       | <b>55.80</b> | <b>32.81</b>  |



En el AD utilizando las diez variables morfológicas, se obtuvieron cuatro grupos. El primero formado por El C. Muñeca, el segundo por las poblaciones de los cuatro huertos y el grupo tres conformado por El Arenal y el grupo cuatro se integró Atempa. La FD 1 explicó el 52.12% de la variación morfológica, mientras que la FD 2 explicó el 29.14% (Figura 40).



**Figura 40.** Análisis discriminante de *T. stans* agrupación de las tres poblaciones utilizando las diez variables morfológicas.

La distancia más grande se encontró entre las poblaciones de El Cerro de La Muñeca (CMuñeca) con 22.45 y la distancia más corta fue de 1.86 para las poblaciones del huerto ii y el Huerto iv. Se encontró que las poblaciones naturales difieren morfológicamente de las cultivadas, ya que las distancias fueron más grandes 13.19 y 22.45 (Tabla 38). El porcentaje de asignación correcta de los individuos fue alta (80-90%) respecto a su grupo (Tabla 39).

**Tabla 38.** Distancias de Mahalanobis entre pares de poblaciones de *T. stans* (debajo de la diagonal), por arriba de la diagonal se representan los valores de (P) ns= no significativo y \*\*\*=<0.0001.

| Población        | Atempa  | El Arenal | C. Muñeca | Hue i   | Hue ii   | Hue iii | Hue iv |
|------------------|---------|-----------|-----------|---------|----------|---------|--------|
| <b>Atempa</b>    | -       | ***       | ***       | 0.002   | ***      | 0.002   | 0.1247 |
| <b>El Arenal</b> | 15.848  | -         | ***       | ***     | ***      | ***     | ***    |
| <b>C. Muñeca</b> | 30.526  | 64.056    | -         | ***     | ***      | ***     | ***    |
| <b>Hue i</b>     | 13.532  | 39.758    | 21.331    | -       | 0.004    | 0.033   | ns     |
| <b>Hue ii</b>    | 21.684  | 49.146    | 53.693    | 16.669  | -        | ns      | 0.015  |
| <b>Hue iii</b>   | 13.932  | 39.272    | 37.224    | 11.738  | 5.927    | -       | ns     |
| <b>Hue iv</b>    | 6.39635 | 24.77001  | 31.84520  | 6.79767 | 13.52235 | 6.95216 | -      |

**Tabla 39.** Matriz de asignación correcta de los individuos en los diferentes grupos morfológicos.

| Localidad | %Asignación | Atempa | El Arenal | C. Muñeca | Hue i | Hue ii | Hue iii | Hue iv |
|-----------|-------------|--------|-----------|-----------|-------|--------|---------|--------|
| Atempa    | 90          | 9      | 0         | 0         | 0     | 0      | 0       | 1      |
| El Arenal | 90          | 0      | 9         | 0         | 0     | 0      | 0       | 1      |
| C. Muñeca | 100         | 0      | 0         | 10        | 0     | 0      | 0       | 0      |
| Hue i     | 80          | 0      | 0         | 0         | 4     | 0      | 1       | 0      |
| Hue ii    | 80          | 0      | 0         | 0         | 0     | 4      | 1       | 0      |
| Hue iii   | 80          | 0      | 0         | 0         | 0     | 0      | 4       | 1      |
| Hue iv    | 100         | 0      | 0         | 0         | 0     | 0      | 0       | 5      |
| Total     | 90          | 9      | 9         | 10        | 4     | 4      | 6       | 8      |

### Análisis de varianza anidada (ANOVA)

El análisis de varianza anidada (ANOVA), muestra que la localidad tiene el mayor porcentaje de la varianza en ocho caracteres morfológicos analizados. El carácter que presentó mayor porcentaje de varianza explicada para el factor Ind. [Loc.] fue el número de aserraciones totales (NAT) con el 27.84% de la varianza acumulada (Tabla 40).

**Tabla 40.** ANOVA de las nueve variables morfológicas de *T. stans*, donde se muestra el efecto para cada uno de los factores. Individuo dentro de la localidad (Ind. [Loc.]) y el factor localidad (Loc.). El estadístico F con  $P < 0.0001$  (\*\*\*) y  $P < 0.001$  (\*\*) y porcentaje de varianza explicada (%Var).

| Variable | Loc ( $F_{6,524}$ ) (%Var) | Ind [Loc] ( $F_{28,524}$ ) (%Var) |
|----------|----------------------------|-----------------------------------|
| LP       | 49.69 (27.80) ***          | 10.15 (26.51) ***                 |
| DP       | 62.95 (36.96) ***          | 5.50 (15.08) ***                  |
| DP2Fol   | 51.34 (29.39) ***          | 8.93 (23.86) ***                  |
| LL       | 147.54 (51.79) ***         | 11.93 (19.54) ***                 |
| AnchMax  | 99.18 (41.66) ***          | 12.26 (24.03) ***                 |
| L1/3B    | 115.94 (45.23) **          | 12.58 (22.91) ***                 |
| L1/3A    | 104.83 (43.18) ***         | 12.06 (23.18) ***                 |
| NAT      | 23.07 (15.90) ***          | 8.65 (27.84) ***                  |
| NVxlob   | 58.74 (34.44) ***          | 6.45 (17.65) ***                  |

## **Resultados genéticos de *Tecoma stans***

### **Riqueza alélica**

Los tres microsatélites fueron 100% polimórficos en *T. stans*, se registró un total de 29 alelos, de los cuales 5 alelos fueron exclusivos para una población lo que representa el 15.15% de la diversidad total y 8 (24.24%) alelos exclusivos en dos poblaciones (Anexo 4).

El alelo seis del locus Jacc2 fue el más frecuente con 0.700 en la población del Cerro de la Muñeca (CMuñeca). La riqueza alélica fue mayor en las poblaciones silvestres con 5.369 por población, mientras que en los cultivados fue de 4.167 alelos.

Los alelos comunes se encuentran distribuidos de la siguiente manera: 2 alelos (6.06%) son compartidos en siete poblaciones, 4 alelos (12.12%) se encuentran en seis poblaciones, 3 alelos (9.09%) se comparten en cinco poblaciones, 4 alelos (12.12%) se distribuyen en al menos cuatro poblaciones, 7 alelos (21.21%) se presentaron en tres poblaciones y 8 alelos (33.33%) son compartidos en dos poblaciones.

### **Diversidad genética**

La diversidad genética cambia entre poblaciones silvestres vs cultivadas, siendo mayor en las silvestres con  $D_g = 0.823$  y en los cultivos  $D_g = 0.746$ . Las poblaciones que presentaron una mayor  $D_g$  fueron: El Arenal (0.890), Atempa (0.820) y un cultivo (Hue iii con  $D_g = 0.810$ ) y la menor diversidad genética se registró en el cultivo del Hue iv. Los valores de la heterocigosidad promedio de Nei y la riqueza alélica fueron mayores en las poblaciones silvestres con respecto a los cultivos (Tabla 41).

Con respecto al tamaño efectivo, las tres poblaciones requieren de tres a cuatro veces el tamaño real de sus poblaciones.

**Tabla 41.** Sumario de diversidad genética por población para las siete poblaciones de *T. stans*. Donde se indica el número de alelos observados ( $N_a$ ),  $N_e$ = número efectivo de alelos,  $\hat{H}$ = heterocigosidad promedio de  $N_e$ ,  $\hat{H}_o$ = promedio de heterocigotos observados,  $\hat{H}_e$ = heterocigosidad esperada,  $D_g$ = diversidad genética y  $R_a$ = riqueza alélica y  $T_{ef}$ = Tamaño efectivo de la población.

| Parámetro  | CMuñeca | Atempa | El Arenal | Hue i | Hue ii | Hue iii | Hue iv |
|------------|---------|--------|-----------|-------|--------|---------|--------|
| <b>Na</b>  | 6.333   | 6.333  | 7.667     | 3.00  | 4.666  | 4.666   | 3.000  |
| <b>Ne</b>  | 4.829   | 4.783  | 6.120     | 2.272 | 3.117  | 3.591   | 2.797  |
| <b>Ĥ</b>  | 0.7133  | 0.783  | 0.834     | 0.666 | 0.666  | 0.700   | 0.580  |
| <b>Ho</b>  | 0.600   | 0.866  | 0.825     | 0.666 | 0.733  | 0.533   | 0.333  |
| <b>He</b>  | 0.750   | 0.750  | 0.881     | 0.740 | 0.741  | 0.778   | 0.644  |
| <b>Dg</b>  | 0.760   | 0.820  | 0.890     | 0.750 | 0.740  | 0.810   | 0.680  |
| <b>Ra</b>  | 5.019   | 5.044  | 6.043     | 4.333 | 4.667  | 4.667   | 3.000  |
| <b>Fis</b> | 0.209   | -0.054 | 0.132     | 0.111 | 0.011  | 0.340   | 0.512  |
| <b>Tef</b> | 1255.64 | 601.84 | 976.30    | -     | -      | -       | -      |

### Silvestres vs cultivados

Para ver las diferencias en los parámetros genéticos entre silvestres vs cultivados, con FSTAT, se definió al grupo de poblaciones silvestres (CMuñeca, Atempa y El Arenal) y el grupo cultivo (Hue i, Hue ii, Hue iii y Hue iv). Con lo que se determinó que la  $D_g$ ,  $R_a$  y la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) fueron mayores en las poblaciones silvestres ( $D_g=0.823$ ,  $R_a=5.369$ ,  $H_o=0.760$ ). Sin embargo, las variaciones genéticas en las poblaciones cultivadas suelen estar determinadas por los parámetros  $F_{is}$  y  $F_{st}$  (0.240 y 0.118) respetivamente (Tabla 42).

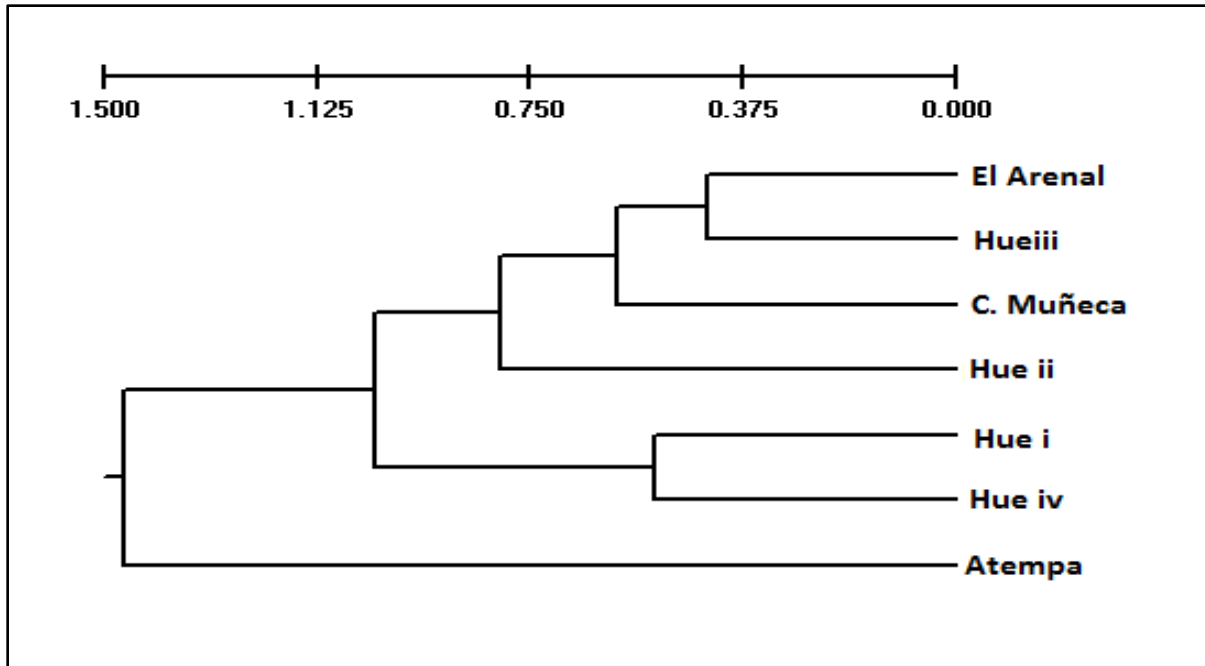
**Tabla 42.** Índices de diversidad genética por grupo, silvestres y cultivos. Donde se indica la diversidad genética (Dg), riqueza alélica (Ra), heterocigosidad observada (Ho), heterocigosidad esperada (He), índice de balance entre deriva y selección (Fis) y el índice de fijación o de diferenciación entre poblaciones (Fst).

| Parámetro genético | Silvestres | Cultivos |
|--------------------|------------|----------|
| Dg                 | 0.823      | 0.745    |
| Ra                 | 5.369      | 4.167    |
| Ho                 | 0.760      | 0.567    |
| He                 | 0.819      | 0.746    |
| Fis                | 0.072      | 0.240    |
| Fst                | 0.072      | 0.118    |

#### **Estructura genética**

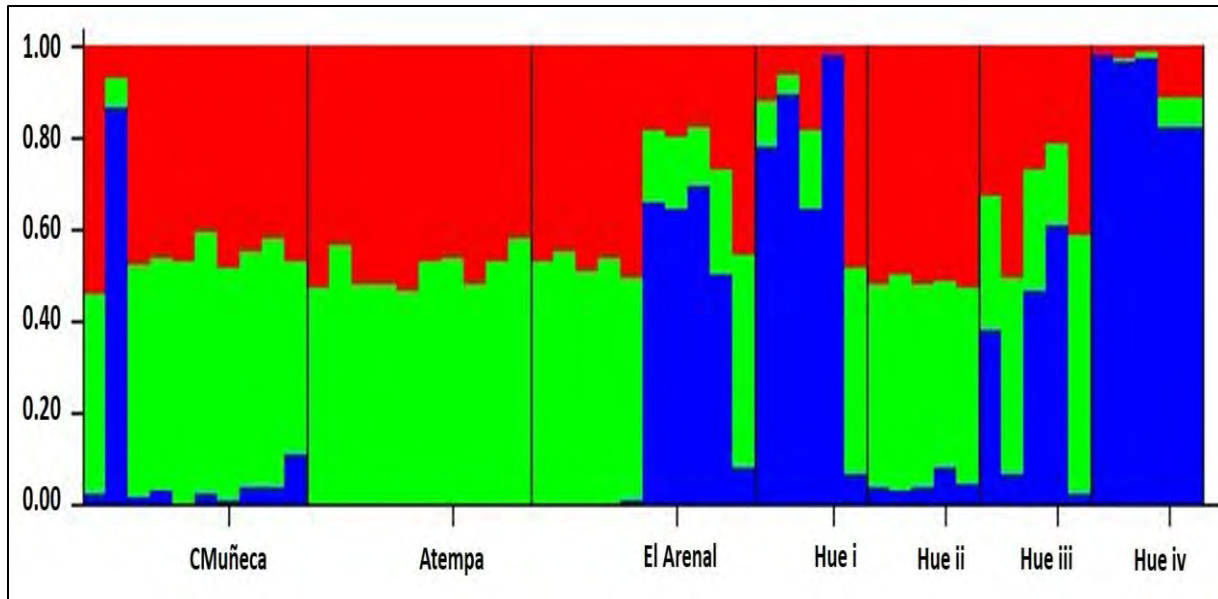
Para este análisis solo se realizó para las poblaciones silvestres. En el análisis de varianza molecular (AMOVA), se registró que el 83.59% de la diversidad se encuentra dentro de los individuos, posteriormente entre individuos dentro de las poblaciones 9.08% de la variación y finalmente con un 7.33% de la diversidad entre poblaciones. El estadístico  $F_{ST}$  global indica una baja diferenciación entre poblaciones con  $F_{ST}=0.0732$ .

De acuerdo con las distancias genéticas de Nei (1978a)<sup>184</sup>, se observa que el Hue ii se agrupó con la población de El Arenal, precedida por la población de El CMuñeca, posteriormente se encuentra el huerto tres (Hue iii), un cuarto grupo lo conformaron los huertos Hue i, Hue iv y la población más distante fue la de Atempa (Dg=1.5, Figura 41).



**Figura 41.** Dendrograma de UPGMA de las poblaciones silvestres y de los cultivos de *T. stans*.

Se determinó  $K=3$  ( $p=0.001$ ) es el número de grupos genéticos más probable de acuerdo con los datos, ambos grupos genéticos se encuentran presentes en la mayoría de las poblaciones. Donde se destaca que las poblaciones CMuñeca y El Arenal presentaron los tres grupos genéticos (el color rojo, el verde y el azul) con una mayor frecuencia. La población de Atempa presentó solo dos grupos (el verde con una alta proporción y el grupo rojo). Los huertos i y iii (Hue i y Hue iii) presentaron los tres grupos genéticos, pero con bajas proporciones y el Huerto iv (Hue iv) presentó dos grupos genéticos, el primer grupo fue el de color azul que se observó con mayor proporción y el grupo rojo con una baja frecuencia (Figura 42).



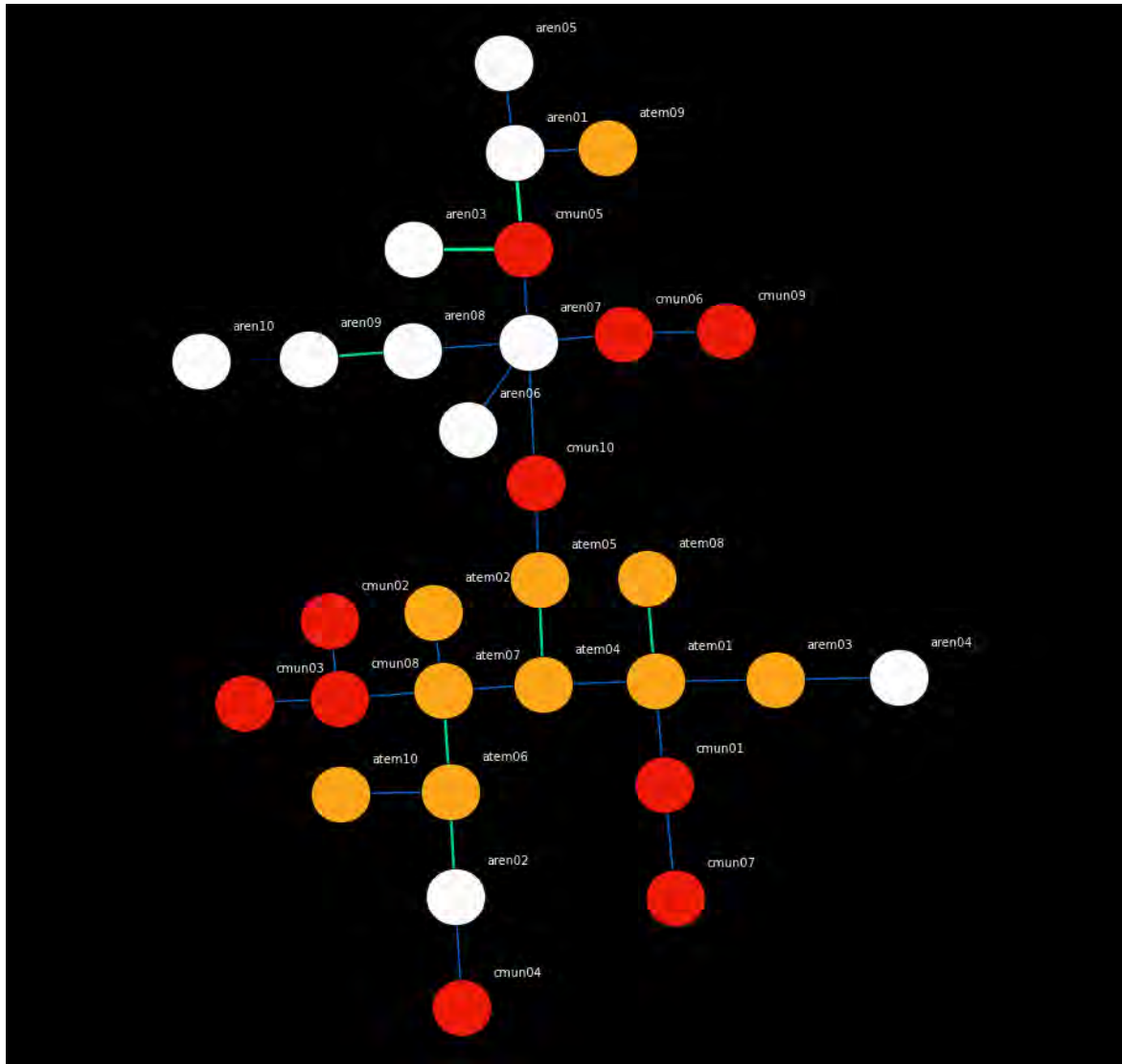
**Figura 42.** Análisis de asignación bayesiana para tres grupos genéticos (K=3), la frecuencia de cada color es la proporción de ancestría derivada de cada uno de los tres grupos genéticos.

El flujo genético entre poblaciones es alto, donde la población de El Arenal y Atempa presentaron un mayor número de migrantes ( $Nm=11.299$  individuos por generación) y el valor más bajo se encuentra entre las poblaciones de Atempa y C. Muñeca con  $Nm= 2.784$ .

#### **Relaciones genéticas y de parentesco**

Se determinó las relaciones genéticas entre los individuos de las poblaciones silvestres, se obtuvo que la mayoría de los individuos de la población de Atempa y el Arenal se mantienen como entidades bien diferenciadas. Sin embargo, el individuo 9 de Atempa y los individuos 2, 4 de la población de El Arenal no se agruparon con su población correspondiente. Mientras que los individuos de El CMuñeca no se encuentran conformando un grupo, sino más bien puede tratarse como la población que intercambia genes con las otras dos poblaciones y la que a su vez, permite el intercambio de genes de una población a otra (Figura 43).





**Figura 43.** Relaciones genotípicas entre los individuos de las poblaciones de *Tecoma stans*.

En el análisis de parentesco entre poblaciones de *T. stans*, con el programa Kingroup, se identificaron 53 posibles relaciones (18 para C. Muñeca, 21 en Atempa y 14 para el Arenal). Las poblaciones El CMuñeca y Atempa fueron las que presentaron todos los grados de parentesco, mientras que la población de Atempa presentó 4 individuos como posibles hermanos gemelos y la que presentó el mayor número de medios hermanos fue la población de El Arenal ( $hss=2$ ) Tabla 43.

**Tabla 43.** Análisis de parentesco en las tres poblaciones de *T. stans*.

| Parentesco                  | C. Muñeca | Atempa | El Arenal |
|-----------------------------|-----------|--------|-----------|
| Full-siblings (Fs)          | 18        | 21     | 14        |
| Parent off spring (ps)      | 10        | 8      | 0         |
| Half sblings (hss)          | 5         | 8      | 12        |
| Cousins, Nephew-uncle (cnu) | 2         | 1      | 1         |
| Self-identical twin         | 1         | 4      | 1         |

### Historia demográfica de las poblaciones

#### Prueba de Neutralidad de Tajima y Fu

En la prueba de neutralidad de Tajima (1989)<sup>261</sup>, no fue significativa en ninguna de las localidades. Con la prueba de Fu (1997), fue significativa para las tres poblaciones. El número de alelos fue alto con respecto a lo esperado  $N_a = 16$  y  $17$ ,  $N_{aes} = 7$  y  $8.05$  (Tabla 44).

**Tabla 44.** Prueba de neutralidad de Tajima y de Fu por población. Donde  $N$ =número de muestra,  $S$ = sitios segregados en la población,  $\pi$ = número de diferencias pareadas,  $D$ = diferencias,  $p$ = significancia,  $N_a$ = número de alelos,  $\Theta\pi$ = número promedio de diferencias pareadas,  $N_{aes}$ = número de alelos esperados y el estadístico (Fs) que determina la probabilidad de observar el número diferente de alelos en una población.

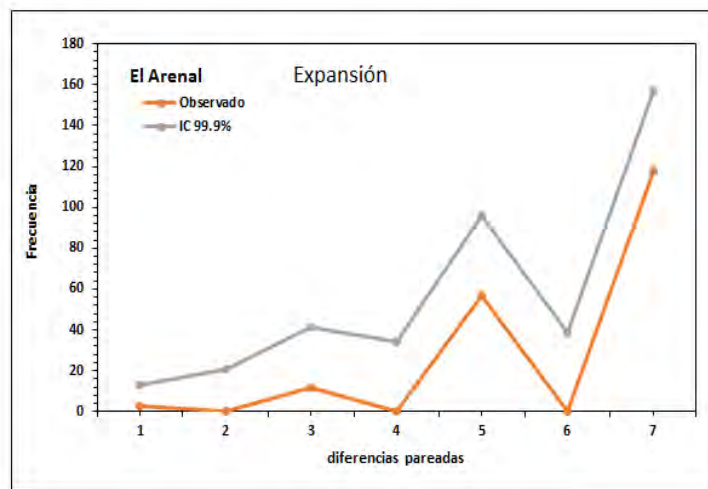
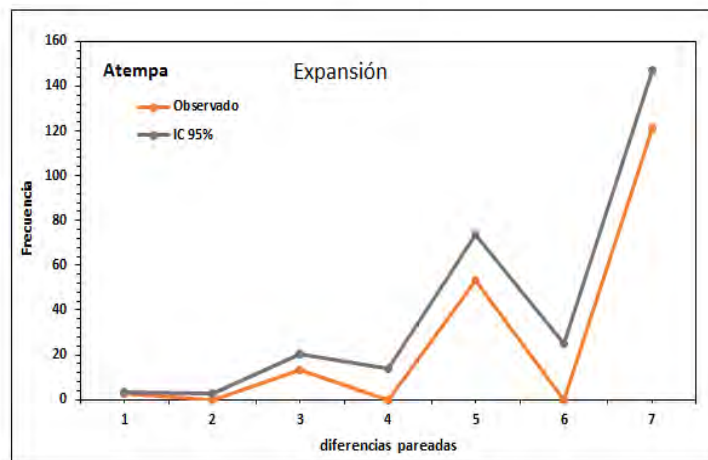
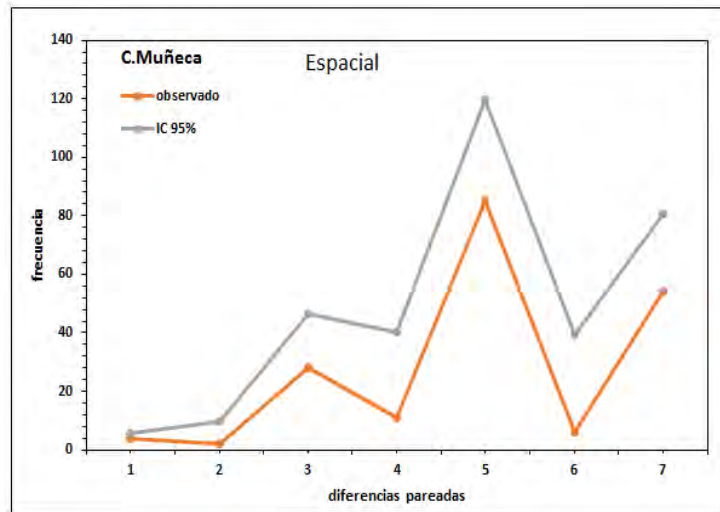
| Estadístico | CMuñeca | Atempa  | El Arenal |
|-------------|---------|---------|-----------|
| Tajima      |         |         |           |
| N           | 20      | 20      | 20        |
| S           | 16      | 17      | 17        |
| $\pi$       | 0.021   | 0.157   | 0.018     |
| $N_{aes}$   | 7.753   | 8.521   | 8.504     |
| $pD_j$      | 0.776   | 0.746   | 0.746     |
| Fu's        |         |         |           |
| $N_a$       | 16      | 17      | 17        |
| $\Theta\pi$ | 4.131   | 5.073   | 5.052     |
| $N_{aes}$   | 7.725   | 8.521   | 8.504     |
| Fs          | -9.884  | -10.295 | -10.331   |
| $pF_s$      | 0.0001  | 0.0002  | 0.000     |

### **Distribución mismatch**

Los resultados de la prueba de neutralidad fueron corroborados con la distribución mismatch, la cual se utilizó para detectar eventos de expansión poblacionales. El tiempo de expansión para las poblaciones aproximadamente 3, 414.978 años con una tasa mutacional ( $\tau$ ) de 4.6 sitios. Con tamaños poblacionales iniciales ( $\Theta_0$ ) de 5.937 para la población de El Río, Cantarranas (5.25) y  $\Theta_0 = 4.516$  para La Calavera. Así también se determinó el crecimiento poblacional después de la expansión ( $\Theta_1$ ) para cada una de las poblaciones. Donde se determinó que la población de Cantarranas presentó  $\Theta_1 = 913.758$  y el valor más bajo fue para la población de El Río con  $\Theta_1 = 534.365$  (Tabla 45). Donde obtuvo una distribución bimodal para las tres poblaciones. La población de CMuñeca fue la única población que se ajustó al modelo de distribución espacial de contracción y expansión (Figura 44).

**Tabla 45.** Valores de los parámetros estimados y el tiempo de expansión poblacional, mediante el análisis de distribución mismatch. Los parámetros  $\Theta_0$  y  $\Theta_1$  son el tamaño poblacional antes y después de la expansión respectivamente,  $\tau$  (Tau)= media de crecimiento y declinación en unidades de tiempo mutacional.

| Estadístico                            | CMuñeca    | Atempa      | El Arenal   |
|--|------------|-------------|-------------|
| <b>Modelo de expansión demográfico</b> |            |             |             |
| $\tau$ (Tau)                           | 5.000      | 5.00        | 5.00        |
| $\tau$ qt 95%                          | 5.853      | 7.42        | 7.39        |
| $\Theta_0$                             | 0.000      | 1.90        | 1.90        |
| $\Theta_0$ 95%                         | 2.32       | 6.58        | 6.84        |
| $\Theta_1$                             | 3414.98    | 3414.98     | 3414.98     |
| $\Theta_1$ 95%                         | 586.24     | 1002.51     | 1016.26     |
| DSS                                    | 0.13       | 0.30        | 0.30        |
| $\rho$                                 | 0.000000   | 0.00001     | 0.00001     |
| <b>Modelo de expansión espacial</b>    |            |             |             |
| $\tau$ (Tau)                           | 4.759      | 5.629       | 5.212       |
| $\tau$ qt 95%                          | 5.234      | 6.123       | 6.084       |
| $\Theta_0$                             | 0.010      | 0.506       | 0.804       |
| $\Theta_0$ 95%                         | 2.546      | 3.954       | 4.452       |
| M                                      | 8,144.128  | 10, 865.579 | 10, 891.833 |
| M 95%                                  | 1, 148.921 | 988.996     | 1, 104.758  |
| DSS                                    | 0.124      | 0.284       | 0.279       |
| $\rho$ DSS                             | 0.001      | 0.00000     | 0.00000     |



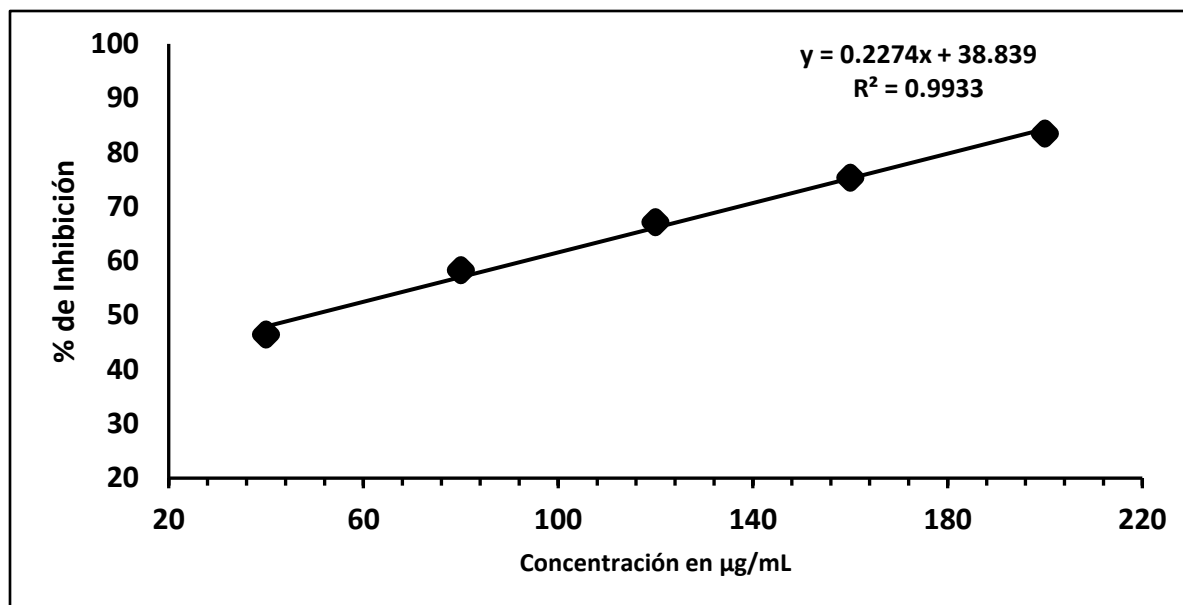
**Figura 44.** Distribución mismatch por cada una de las poblaciones de *Tecoma stans*, para las frecuencias observadas entre las bases pareadas y los intervalos de confianza del 95%.

### Inhibición de alfa glucosidasa a partir de los extractos etanólicos de *T. stans*

La actividad de inhibición de alfa glucosidasa de los extractos etanólicos de *Tecoma stans* muestran que a una concentración de 200  $\mu\text{g/ml}$  tiene un valor de  $83.44 \pm 25.03\%$  y una menor actividad a una concentración de 40  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que el control (Acarbosa) adquirió un  $62.8 \pm 11.4\%$  de inhibición a una concentración de 400  $\mu\text{g/ml}$  y  $31.8 \pm 10.1$  en la concentración de 200  $\mu\text{g/ml}$  (Tabla 46). Además, los extractos presentaron una concentración de inhibición del 50% ( $\text{CI}_{50}$ ) a 51.95  $\mu\text{g/ml}$  contra 317.8  $\mu\text{g/ml}$  del control (Figura 45).

**Tabla 46.** Media y desviación estándar (Ds) del porcentaje de Inhibición de alfa glucosidasa de los extractos etanólicos de *T. stans* a diferentes concentraciones y el control (Acarbosa).

| Concentración $\mu\text{g/ml}$ | % Inhibición $\pm$ Ds  |
|--------------------------------|------------------------|
| 40                             | 46.5 $\pm$ 13.4        |
| 80                             | 58.3 $\pm$ 15.5        |
| 120                            | 67.1 $\pm$ 17.8        |
| 160                            | 75.3 $\pm$ 20.6        |
| 200                            | 83.4 $\pm$ 25.0        |
| $\text{CI}_{50}$               | 51.95 $\mu\text{g/ml}$ |
| Acarbosa 400 $\mu\text{g/ml}$  | 62.8 $\pm$ 11.4        |
| Acarbosa 200 $\mu\text{g/ml}$  | 31.8 $\pm$ 10.1        |
| $\text{CI}_{50}$               | 317.8                  |



**Figura 45.** Porcentaje de inhibición de los extractos de *T. stans* a diferentes concentraciones.

En el ANOVA indica que la actividad de inhibición de *T. stans* difiere significativamente entre localidades ( $P=0.0000$ ). A su vez, por los individuos dentro y entre localidades ( $P=0.0000$ ), y por la interacción con el factor tiempo en el que se lleva la reacción  $P < 0.0001$  y por la concentración con  $P=0.0000$  (Tabla 47). Donde el efecto de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa aumentó en relación a estos factores (Tabla 48).

**Tabla 47.** ANOVA factorial a partir de los extractos etanólicos de los 50 individuos de *T. stans*.

| <b>Factor</b>     | <b>gl</b> | <b>SCM</b> | <b>F</b> | <b>P</b> |
|-------------------|-----------|------------|----------|----------|
| Loc.              | 6         | 459090.9   | 3227.92  | 0.0000   |
| Conct.            | 4         | 1079168.9  | 11381.64 | 0.0000   |
| Tpo.              | 4         | 3817.4     | 40.26    | <0.0001  |
| Ind*Loc           | 43        | 447837.3   | 439.36   | 0.0000   |
| Ind*Tpo           | 44        | 248.5      | 6.19     | <0.0001  |
| Ind. *Conct. *Loc | 172       | 38594.4    | 94.62    | 0.0000   |
| Conct*Tpo         | 16        | 150.6      | 0.397    | 0.983    |
| Conct*Loc         | 24        | 346411.6   | 608.92   | 0.0000   |
| Tpo. *Loc.        | 24        | 10846.6    | 19.06    | <0.0001  |
| Conct*Tpo*Ind*Loc | 640       | 4265.7     | 0.048    | <0.0001  |

**Tabla 48.** Media y desviación estándar (Ds) del porcentaje de inhibición de alfa glucosidasa a diferentes concentraciones y el tiempo en el que se llevó a cabo la reacción.

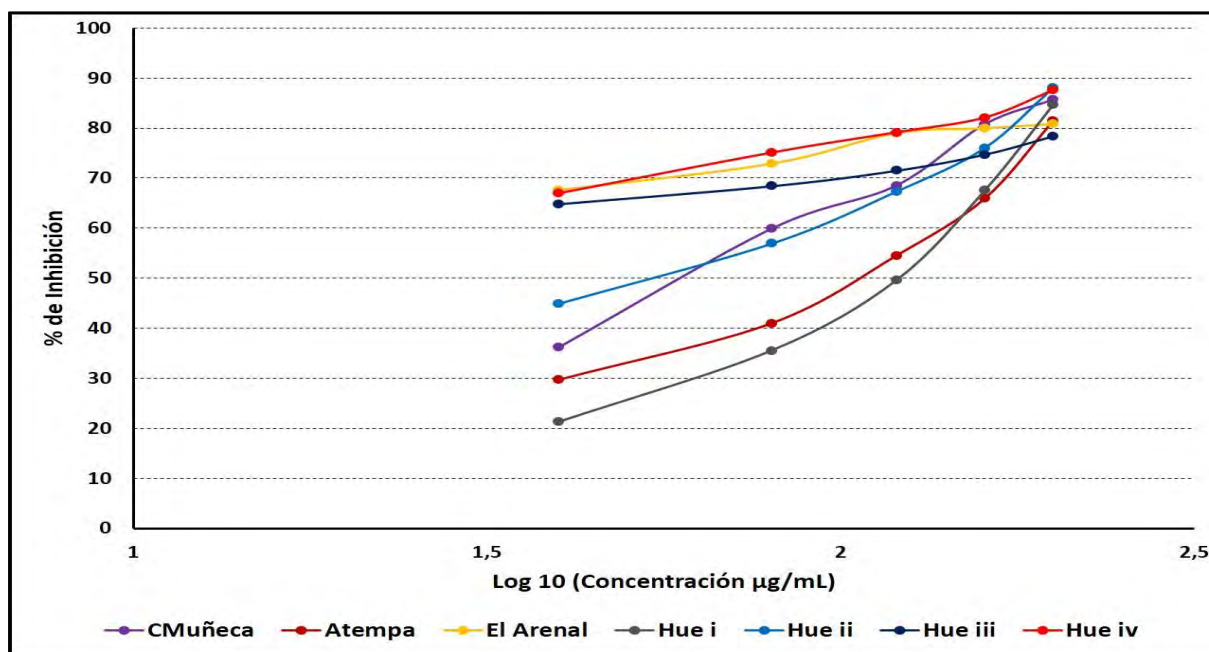
| Localidad/Tpo     | Concentración µg/mL |              |              |             |             |
|-------------------|---------------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
|                   | 40                  | 80           | 120          | 160         | 200         |
| <b>5 minutos</b>  |                     |              |              |             |             |
| CMuñeca           | 35.3 ± 23.8         | 58.1 ± 15.8  | 65.9 ± 11.8  | 78.2 ± 14.2 | 83.8 ± 15.4 |
| Atempa            | 28.1 ± 17.1         | 39.9 ± 19.5  | 54.3 ± 20.9  | 64.6 ± 22.3 | 80.9 ± 19.2 |
| El Arenal         | 66.9 ± 19.9         | 71.9 ± 15.7  | 77.7 ± 11.2  | 79.0 ± 10.9 | 79.8 ± 10.9 |
| Hue i             | 15.3 ± 15.8         | 30.9 ± 9.9   | 43.0 ± 18.4  | 62.9 ± 14.0 | 81.7 ± 9.9  |
| Hue ii            | 42.1 ± 15.6         | 55.2 ± 18.6  | 64.9 ± 15.4  | 74.5 ± 7.4  | 86.5 ± 7.7  |
| Hue iii           | 63.5 ± 12.4         | 67.3 ± 11.4  | 70.1 ± 9.4   | 72.9 ± 9.3  | 76.9 ± 9.7  |
| Hue iv            | 63.4 ± 6.5          | 72.23 ± 4.6  | 75.7 ± 4.7   | 78.9 ± 4.9  | 83.6 ± 5.1  |
| <b>10 minutos</b> |                     |              |              |             |             |
| CMuñeca           | 36.1 ± 23.9         | 59.7 ± 15.1  | 68.4 ± 11.9  | 80.9 ± 14.5 | 85.2 ± 15.3 |
| Atempa            | 28.8 ± 16.6         | 40.6 ± 18.9  | 54.3 ± 20.9  | 65.8 ± 22.2 | 81.0 ± 19.2 |
| El Arenal         | 67.2 ± 21.1         | 72.3 ± 16.3  | 78.8 ± 11.2  | 79.9 ± 10.9 | 80.6 ± 10.8 |
| Hue i             | 17.5 ± 14.9         | 31.9 ± 9.89  | 45.9 ± 18.1  | 64.7 ± 14.4 | 83.4 ± 10.0 |
| Hue ii            | 43.9 ± 15.3         | 56.2 ± 18.9  | 66.5 ± 15.1  | 75.5 ± 7.2  | 87.6 ± 7.8  |
| Hue iii           | 64.6 ± 12.3         | 68.1 ± 11.2  | 71.3 ± 9.3   | 74.4 ± 8.8  | 78.0 ± 9.1  |
| Hue iv            | 65.3 ± 6.74         | 73.9 ± 5.2   | 77.8 ± 5.2   | 80.7 ± 4.9  | 85.6 ± 5.3  |
| <b>15 minutos</b> |                     |              |              |             |             |
| CMuñeca           | 36.3 ± 23.9         | 60.3 ± 15.1  | 68.9 ± 11.4  | 81.1 ± 13.9 | 86.1 ± 15.1 |
| Atempa            | 29.5 ± 16.6         | 41.1 ± 18.8  | 54.2 ± 21.1  | 66.0 ± 22.2 | 81.4 ± 19.0 |
| El Arenal         | 67.4 ± 21.0         | 72.9 ± 16.5  | 79.1 ± 11.3  | 80.0 ± 11.0 | 80.9 ± 10.9 |
| Hue i             | 18.4 ± 14.3         | 32.0 ± 9.8   | 46.5 ± 18.0  | 65.0 ± 14.7 | 83.6 ± 10.2 |
| Hue ii            | 45.1 ± 14.8         | 57.0 ± 18.9  | 67.5 ± 14.7  | 76.1 ± 7.1  | 88.2 ± 7.9  |
| Hue iii           | 65.2 ± 12.3         | 68.8 ± 11.0  | 71.2 ± 10.9  | 75.2 ± 8.5  | 78.8 ± 8.8  |
| Hue iv            | 66.9 ± 6.1          | 75.1 ± 5.1   | 79.2 ± 5.0   | 82.1 ± 4.6  | 87.5 ± 5.8  |
| <b>20 minutos</b> |                     |              |              |             |             |
| CMuñeca           | 36.4 ± 23.9         | 60.5 ± 14.9  | 69.0 ± 10.9  | 81.5 ± 13.8 | 86.5 ± 14.8 |
| Atempa            | 30.7 ± 16.7         | 41.6 ± 18.7  | 54.7 ± 20.9  | 66.5 ± 22.4 | 82.0 ± 19.0 |
| El Arenal         | 67.8 ± 21.0         | 73.3 ± 16.45 | 79.5 ± 11.3  | 80.2 ± 11.0 | 81.2 ± 11.0 |
| Hue i             | 26.2 ± 16.3         | 40.1 ± 12.6  | 54.8 ± 19.8  | 70.1 ± 18.4 | 86.2 ± 12.4 |
| Hue ii            | 46.1 ± 14.2         | 57.7 ± 18.9  | 68.4 ± 14.4  | 76.7 ± 7.1  | 88.8 ± 8.1  |
| Hue iii           | 65.3 ± 12.3         | 68.8 ± 10.88 | 72.3 ± 8.8   | 75.4 ± 8.3  | 78.9 ± 8.6  |
| Hue iv            | 68.5 ± 5.7          | 76.3 ± 5.4   | 80.7 ± 5.3   | 83.7 ± 5.0  | 89.5 ± 6.9  |
| <b>30 minutos</b> |                     |              |              |             |             |
| CMuñeca           | 36.5 ± 24.0         | 60.6 ± 14.9  | 69.9 ± 12.21 | 81.8 ± 13.8 | 86.6 ± 14.7 |
| Atempa            | 31.1 ± 16.8         | 41.6 ± 18.8  | 54.9 ± 20.7  | 66.5 ± 22.4 | 82.0 ± 19.0 |
| El Arenal         | 68.2 ± 20.9         | 73.7 ± 16.5  | 79.6 ± 11.3  | 80.5 ± 10.9 | 81.5 ± 10.9 |
| Hue i             | 28.7 ± 16.5         | 42.6 ± 10.9  | 57.4 ± 19.0  | 74.8 ± 15.7 | 88.6 ± 10.3 |
| Hue ii            | 47.2 ± 13.6         | 58.4 ± 19.0  | 69.2 ± 14.1  | 77.3 ± 7.0  | 89.4 ± 8.4  |
| Hue iii           | 65.4 ± 12.4         | 68.9 ± 10.9  | 72.5 ± 8.8   | 75.6 ± 6.3  | 79.1 ± 8.6  |
| Hue iv            | 70.3 ± 5.3          | 77.5 ± 5.8   | 82.1 ± 5.7   | 84.8 ± 6.1  | 91.5 ± 8.3  |



La Localidad de El Arenal presentó de manera general una mayor inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa, con un  $76.01 \pm 5.67\%$  y una menor  $CI_{50}$  de  $27.54 \mu\text{g/mL}$ . Las localidades que produjeron un menor efecto de inhibición enzimática fueron Atempa y el Hue i, debido a que requirieron una mayor  $CI_{50} = 105.60$  y  $121.02 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Tabla 49, Figura 46).

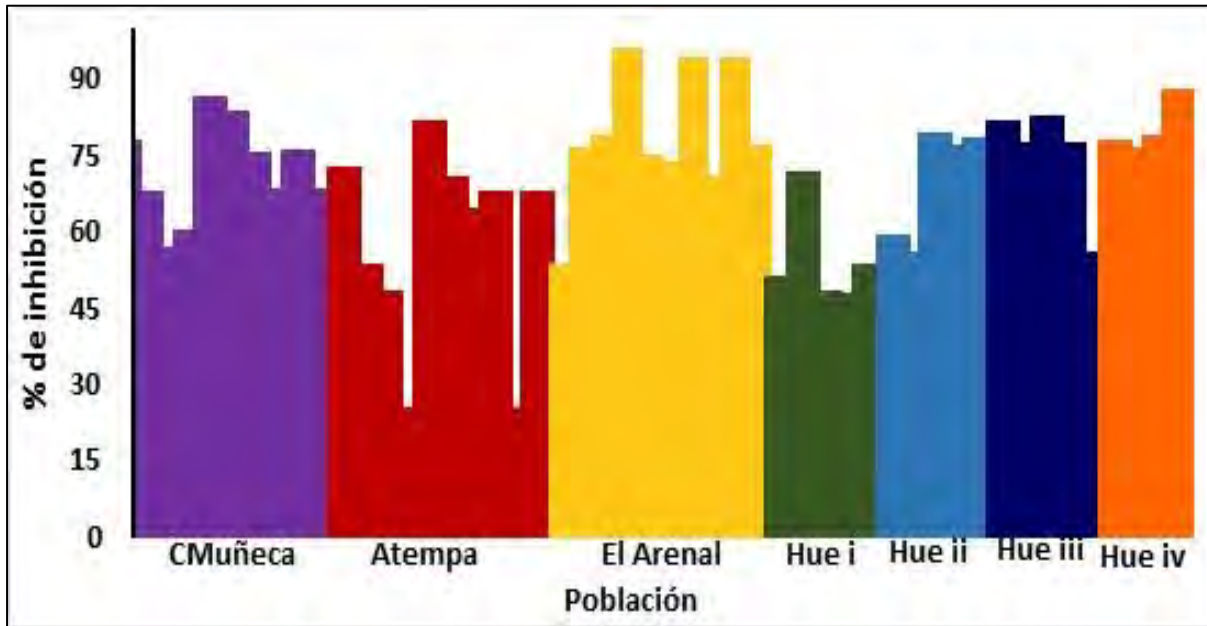
**Tabla 49.** Media, desviación estándar (Ds) por población del porcentaje de inhibición de alfa glucosidasa de los extractos etanólicos de *T. stans* y la concentración de inhibición del 50% de actividad enzimática ( $CI_{50}$ )

| Localidad | media $\pm$ Ds ( $\mu\text{g/mL}$ ) | $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|-----------|-------------------------------------|--------------------------------|
| CMuñeca   | $66.16 \pm 19.59$                   | 45.72                          |
| Atempa    | $54.48 \pm 20.36$                   | 105.60                         |
| El Arenal | $76.01 \pm 5.67$                    | 27.54                          |
| Hue i     | $51.69 \pm 25.16$                   | 121.02                         |
| Hue ii    | $66.64 \pm 16.70$                   | 56.27                          |
| Hue iii   | $71.55 \pm 5.27$                    | 32.02                          |
| Hue iv    | $78.12 \pm 7.74$                    | 30.73                          |
| Acarbosa  | $62.81 \pm 11.44$                   | 317.77                         |



**Figura 46.** Gráficas del porcentaje de inhibición de alfa glucosidasa para las siete poblaciones de *T. stans*.

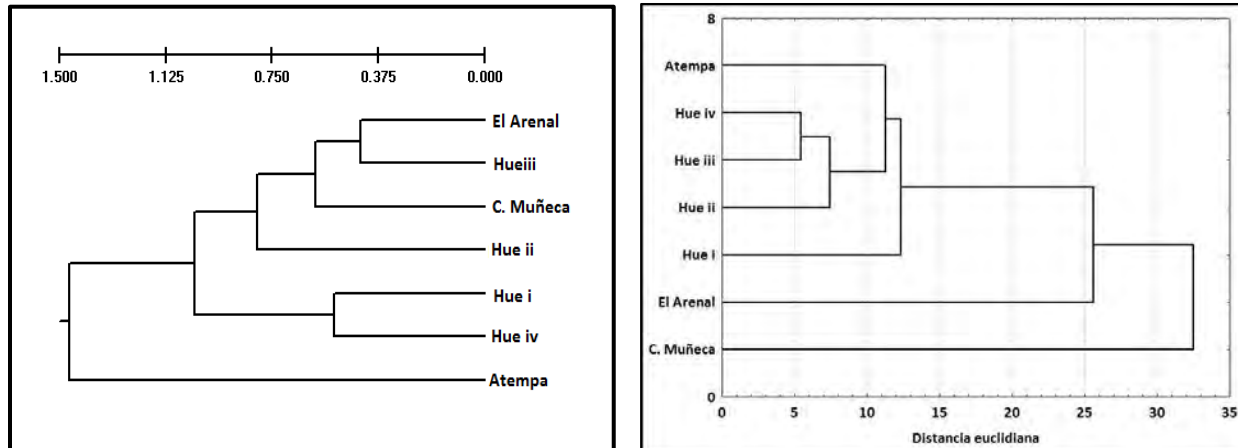
Con respecto al lugar de procedencia, se obtuvo que El Arenal presentó ocho individuos que inhiben la actividad de alfa glucosidasa en las concentraciones de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , en los tiempos desde 5 a los 15 minutos y la que menos ejemplares presentó fue Atempa con un individuo (Figura 47). Sin embargo, cabe destacar que el 70% de los individuos mostraron inhibición de alfa glucosidasa mayores al 50% en la concentración de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  desde los 5-30 minutos.



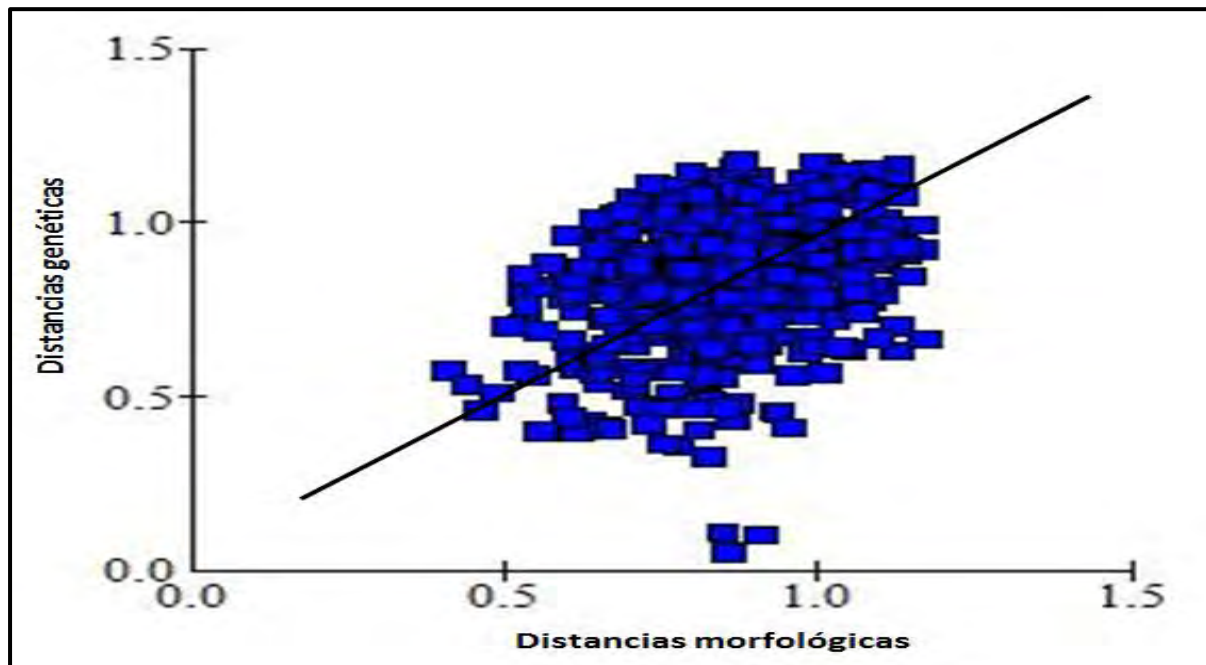
**Figura 47.** Porcentaje de inhibición de alfa glucosidasa por individuo de las siete poblaciones de *T. stans*.

#### **Correlación datos morfológicos, genéticos e inhibición de alfa glucosidasa**

De acuerdo con los análisis de distancias genéticas y las distancias euclidianas para los datos morfológicos no se observa una correspondencia entre los dendrogramas (Figura 48), sin embargo, con la prueba de mantel entre las distancias genéticas y las distancias morfológicas, se obtuvo una correlación positiva  $r= 0.324$ ,  $P=0.0008$  (Figura 49).



**Figura 48.** Dendrograma de distancias genéticas versus morfológicas en las siete poblaciones de *T. stans*.



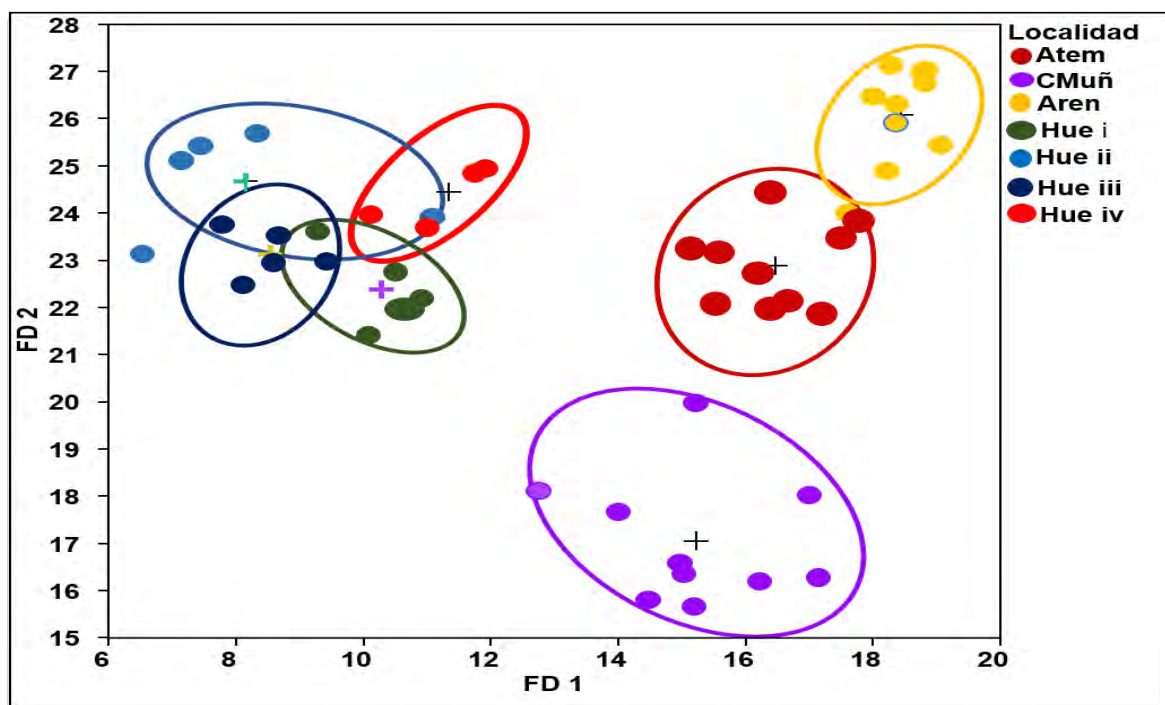
**Figura 49.** Correlación entre las variables morfológicas y genéticas de *T. stans* con la prueba de Mantel.

Utilizando el conjunto de datos, morfológicos, genéticos y de inhibición de alfa glucosidasa, el AFD, se obtuvo que las variables que permiten la agrupación de las localidades fueron principalmente las variables morfológicas DP, L1/3A y DVM para las tres funciones discriminantes, con lo que se explicó el 92.12% de la varianza acumulada (Tabla 50)

**Tabla 50.** AFD de *T. stans* con las variables morfológicas, genéticas y porcentaje de inhibición de alfa glucosidasa (%Inh $\alpha$ gluc.), donde R= correlación, %var= el porcentaje de varianza explicada y P= la significancia para cada función discriminante (FD).

| Variable             | FD 1    | FD 2    | FD3     |
|----------------------|---------|---------|---------|
| LocusJacc22          | -0.032  | -0.008  | -0.142  |
| LocusJacc2           | 0.026   | 0.027   | -0.072  |
| LocusIM7             | 0.220   | -0.009  | 0.080   |
| %Inh $\alpha$ -gluc. | 0.006   | 0.018   | 0.023   |
| LP                   | -0.083  | -0.084  | 0.126   |
| DP                   | -14.290 | 30.132  | -42.308 |
| DP2FOL               | -0.242  | 0.034   | 0.050   |
| LL                   | -0.011  | 0.004   | 0.001   |
| AnCh. Max.           | 0.241   | -0.111  | -0.053  |
| L1/3 B               | 0.932   | 0.204   | -0.013  |
| L1/3A                | -36.450 | 20.138  | 0.122   |
| DVM                  | 14.341  | 20.807  | 0.230   |
| NAT                  | -0.063  | 0.021   | -0.034  |
| NVXLOB               | 0.136   | 0.193   | -0.037  |
| V.Prop               | 16.262  | 10.91   | 4.35    |
| R                    | 0.970   | 0.957   | 0.902   |
| %Varianza            | 47.02   | 31.53   | 13.57   |
| P                    | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 |

En el AFD se obtuvieron cuatro grupos bien diferenciados. el primero donde se agrupan a todos los cultivos y las poblaciones silvestres conformaron un grupo cada una. Donde la población de el Arenal se encuentra en el extremo superior debido a que presenta una mayor diversidad genética y de inhibición de alfa glucosidasa, seguida por Atempa que fue la que morfológica y genéticamente fue más cercana, sin embargo, presenta bajos porcentajes de inhibición enzimática, mientras que la población de CMuñeca se encuentra más distante morfológicamente, pero con una actividad de inhibición intermedia (Figura 50).



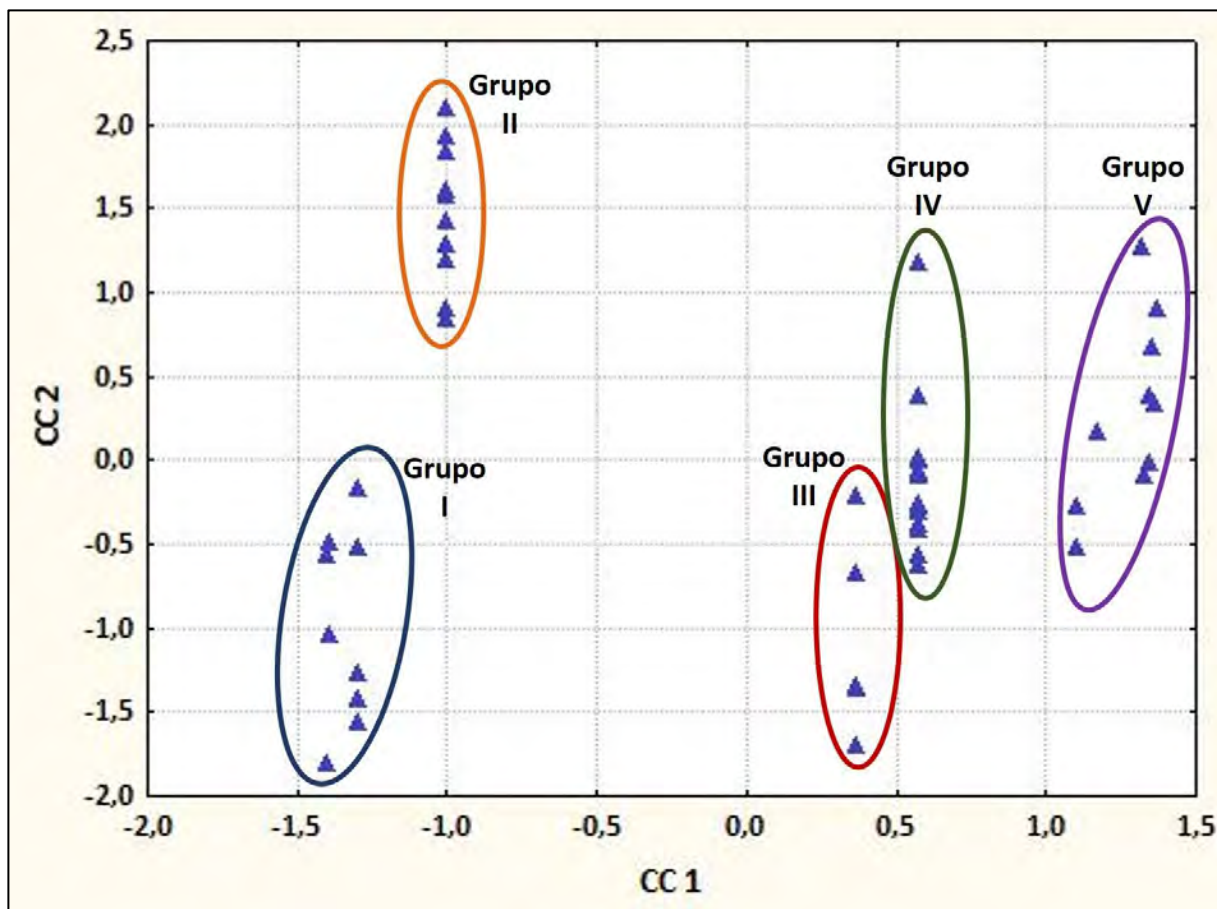
**Figura 50.** Análisis discriminante de *T. stans* con los datos morfológicos, genéticos y de inhibición de alfa glucosidasa.

En el ACC se encontró que existe una correlación negativa en nueve caracteres morfológicos de *T. stans* con la altitud, sin embargo, el DVM, los datos genéticos y el porcentaje de inhibición se correlacionaron de manera positiva con esta variable. La latitud se correlacionó de manera positiva con nueve caracteres morfológicos, con los datos genéticos y los de inhibición, solo el DP se correlacionó de manera negativa ( $r=-0.64$ ), mientras que Lfol ( $r=-0.001$ ), Anchmax ( $r=-0.053$ ) y DVM ( $r=-0.049$ ) se correlacionaron de manera negativa con la longitud (Tabla 51).

**Tabla 51.** Análisis de correlaciones canónicas (ACC) entre las variables geográficas con los datos genéticos, morfológicos e inhibición de alfa glucosidasa de *T. stans*.

| Correlaciones entre matrices |          |         |          |
|------------------------------|----------|---------|----------|
| Variable                     | Altitud  | Latitud | Longitud |
| Jacc22                       | 0.51     | 0.46    | 0.24     |
| Jacc2                        | 0.61     | 0.44    | 0.38     |
| IM7                          | 0.69     | 0.43    | 0.06     |
| %Inh                         | 0.09     | 0.39    | 0.22     |
| LP                           | -0.08    | 0.27    | 0.004    |
| DP                           | -0.57    | -0.06   | 0.095    |
| DP2fol                       | -0.19    | 0.20    | 0.067    |
| LL                           | -0.75    | 0.07    | -0.001   |
| Anchmax                      | -0.71    | 0.08    | -0.05    |
| L1/3 B                       | -0.69    | 0.08    | 0.09     |
| L1/3A                        | -0.67    | 0.10    | 0.03     |
| DVM                          | 0.05     | 0.17    | -0.05    |
| NAT                          | -0.19    | 0.36    | 0.16     |
| NVxlob                       | -0.58    | 0.04    | 0.11     |
| V.Prop                       | 0.92     | 0.65    | 0.43     |
| R                            | 0.96     | 0.81    | 0.65     |
| Var                          | 0.33     | 0.32    | 0.35     |
| P                            | <0.00001 | <0.0001 | 0.03     |

A partir de la correlación entre las variables geográficas con los datos morfológicos, genéticos e inhibición de alfa glucosidasa, en el ACC se obtuvieron cuatro grupos, los cuales se diferencian por los tamaños de hojas, la diversidad genética y por su actividad de inhibición de alfa glucosidasa. El primer grupo se presentaron hojas pequeñas con una baja diversidad genética y con niveles intermedios de inhibición de alfa glucosidasa, el segundo grupo con hojas grandes altos niveles de diversidad genética y mayores porcentajes de inhibición enzimática (Figura 51).



**Figura 51.** ACC de *T. stans* entre las variables geográficas con las variables morfológicas, genéticas y porcentaje de inhibición de alfa glucosidasa.

### Determinación de la especie con mayor inhibición de alfa glucosidasa

De acuerdo con la prueba de ANOVA anidada, se obtuvo que existen diferencias entre especies en el porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa, así como también de las interacciones de los factores localidad(especie)-concentración-tiempo (Tabla 52). La especie que obtuvo una mayor actividad de inhibición de alfa glucosidasa (66.41%) fue *T. stans*, el cual fue semejante al de *acarbosa* en la concentración de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (67.58%), por lo que no hubo diferencias significativas entre ellas. Sin embargo, si hubo diferencias significativas con *C. obtusifolia* (60.63%) y *C. scaber* (60.23%).

**Tabla 52.** ANOVA anidado de las tres especies de plantas antidiabéticas de acuerdo al porcentaje de inhibición de alfa glucosidasa

| <b>Factor</b>                        | <b>Nparm</b> | <b>DF</b> | <b>SCM</b> | <b>F</b> | <b>P</b> |
|--------------------------------------|--------------|-----------|------------|----------|----------|
| Especie (Esp.)                       | 4            | 1         | 429,4      | 5,3382   | 0,0209   |
| Especie*concentración                | 4            | 2         | 267,8      | 1,6646   | 0,1893   |
| Especie*Tiempo                       | 4            | 4         | 3810,7     | 11,8427  | <0,0001  |
| Población (Pob.) [Esp.]              | 10           | 0         | 0,0        | -        | -        |
| Población[Especie] *concentración    | 10           | 5         | 301621,2   | 749,8893 | 0,0000   |
| población[Especie]*Tiempo            | 10           | 10        | 9631,4     | 11,9727  | <,0001   |
| Individuo [Pob., Esp.]               | 87           | 76        | 3273455,1  | 535,4244 | 0,0000   |
| Individuo [Pob., Esp.]*concentración | 87           | 84        | 408304,9   | 60,4242  | 0,0000   |
| Individuo [Pob., Esp.]*Tiempo        | 87           | 87        | 8836,0     | 1,2625   | 0,0501   |
| Concentración                        | 1            | 0         | 0,0        | -        | -        |
| Tiempo                               | 1            | 1         | 1487,6     | 18,4925  | <0,0001  |



## DISCUSIÓN

### Morfología

En el AFD la variación morfológica cambia entre localidades y entre cultivos donde se observa una estrecha relación morfológica de los individuos cultivados con las poblaciones naturales, principalmente con las que se encuentran en las regiones más húmedas (Atempa y El Arenal), donde se observan hojas más grandes con respecto a los individuos de la población de El CMuñeca que exhibieron hojas más pequeñas y que se encuentran en un ambiente seco de tipo xerófilo, donde la precipitación pluvial anual se encuentra entre los 300-400 mm (Granados-Sánchez *et al.*, 2012)<sup>99</sup>.

Aunado a lo anterior, la planta debe crear ciertas modificaciones, de tal manera que le representen un menor costo energético para soportar altos niveles de estrés hídrico y una mayor incidencia de luz solar (Akinci y Lösel, 2012<sup>12</sup>; De Micco y Aronne, 2012<sup>59</sup>).

### Genética

#### Diversidad genética

Los resultados de diversidad genética de las poblaciones naturales de *T. stans* sugieren que esta planta presenta altos niveles de variación genética ( $Ra= 5.369$ ,  $Dg= 0.823$  y  $Ho= 0.760$ ,  $H\text{ Nei}= 0.706$ ), comparada con otras especies de angiospermas, por ejemplo, *Retama raetam* ( $H\text{ Nei}= 0.25-0.45$ , (Abdellaoui *et al.*, 2014<sup>4</sup>; Zhang *et al.*, 2015<sup>304</sup>), y en *Chondrus crispus* ( $H\text{ Nei}=0.250$ , (Provan *et al.*, 2012)<sup>212</sup>.

Una posible explicación para una alta diversidad genética y una baja diferenciación genética en las poblaciones de *T. stans* es un alto flujo genético entre poblaciones. En particular, la polinización por abejas, aves y los mecanismos de dispersión de la semilla por viento, pueden ser los factores que posiblemente homogenizan el efecto de la distribución de la variación genética (Ferrer *et al.*, 2004)<sup>76</sup>.

La heterocigosidad juega un papel importante en especies que se encuentran en ambientes extremadamente heterogéneos (Rainey *et al.*, 1987<sup>214</sup>; Mopper *et al.*, 1991<sup>173</sup>; Ferrer *et al.*, 2004<sup>76</sup>). De acuerdo con Ferrer y colaboradores (2004)<sup>76</sup>, y lo propuesto por Nevo y Beiles (1989)<sup>186</sup>, las plantas que crecen en zonas áridas presentan temporalmente una gran heterogeneidad ambiental, lo cual está relacionada con la variación en la precipitación. Por esta razón, una alta variabilidad genética puede ser favorecida (Nevo y Beiles, 1989)<sup>186</sup>. Sin

embargo, en este estudio, no se observa que la población de El CMuñeca presente una mayor diversidad genética comparada con las poblaciones de clima tropical (Atempa y El Arenal) que fueron las que presentaron los valores más altos de heterocigosidad y de Dg 0.82 y 0.89 respectivamente.

### **Estructura genética**

La estructura genética de las poblaciones de *T. stans* es altamente influenciada por el movimiento de genes. En el caso de la población de El CMuñeca presenta una mayor diferenciación genética con respecto a la de El Arenal y Atempa. Esto debido quizás a una baja diversidad genética, producto de una inestabilidad demográfica por la disminución en el tamaño efectivo de las poblaciones con repetidos cuellos de botella o eventos de efecto fundador. Lo que, a su vez, provoca una reducción en la variabilidad genética y un aumento en la estructuración genética de la población a través del efecto de la deriva genética (Moreira *et al.*, 2009)<sup>174</sup> o por disturbios históricos (Moreira y Fernandes, 2013)<sup>175</sup>.

Las poblaciones de *T. stans* presentaron moderados niveles de diferenciación ( $F_{st}=0.07$ ), lo cual se encuentra dentro de los rangos observados en especies leñosas con polinización por viento, como la familia Fagaceae y Pinaceae (Hamrick y Godt, 1996)<sup>105</sup> y similares a los de *Filipendula vulgaris* con valores de  $F_{st}=0.07$  (Weidema *et al.*, 2000)<sup>289</sup>.

### **Historia demográfica**

Los factores históricos y ecológicos, las características reproductivas y el flujo genético entre las poblaciones puede tener una mayor incidencia sobre la diversidad genética de *T. stans* donde las poblaciones del matorral xerófilo (CMuñeca) experimentaron repetidos eventos de contracción y expansión, como resultado de los periodos climáticos durante el plioceno y el cuaternario, donde hubo eventos volcánicos, lo cual induce la destrucción y regeneración de los bosques. Estos episodios ocurrieron recientemente (aproximadamente 1,000 AP). Además, cabe destacar que diversos autores mencionan que la vegetación del Valle del Mezquital, que es donde se encuentra la población del CMuñeca, se le considera trozos o vestigios del desierto chihuahuense y al mismo tiempo un refugio del pleistoceno (Rzedowski, 1973)<sup>230</sup>.

La zona árida chihuahuense alcanza sus límites de extensión en los estados de San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo, Puebla y Oaxaca formando tres “islotos” de aridez que se

encuentran ligados entre sí y con la zona chihuahuense formando un corredor continuo de clima semiseco. La composición florística de estas regiones (*Larrea tridentata* y *Fouquieria splendens*) refleja la situación recíproca del relativo aislamiento. Además de que las floras de las regiones áridas de México reflejan relaciones de parentesco entre sí (González-Quintero, 1968<sup>93</sup>; Rzedowski, 1973)<sup>230</sup>.

Lo que hace necesario realizar estudios en toda la zona de distribución utilizando otro tipo de marcador como el de cloroplasto, ya que es una región más conservadora y, por lo tanto, permite hacer una mejor aproximación sobre la historia demográfica de las poblaciones. ya que este estudio se realizó con microsatélites nucleares como una primera aproximación sobre la inferencia demográfica de las poblaciones, sin embargo, este tipo de información se encuentra en recombinación con una tasa de mutación más alta.

#### **Inhibición de alfa glucosidasa**

Se obtuvo que los extractos de *T. stans* inhiben por arriba del 50% la actividad de la enzima de alfa glucosidasa en las concentraciones de 40-200 µg/mL, mientras que en Acarbosa en la concentración de 400 µg/mL inhibe un 62.82 %. Los extractos de las cincuenta muestras difieren entre individuos, dentro y entre localidades, y del tiempo en el que se lleva a cabo la reacción.

E donde el 70% de los extractos etanólicos inhiben la actividad de alfa glucosidasa, mientras que la  $CI_{50}$  de la Acarbosa fue de  $489.25 \pm 38.5$  µg/mL para inhibir la actividad de la enzima bajo las mismas condiciones de tratamiento (Liu *et al.*, 2013<sup>149</sup>). Los extractos que inhiben mejor la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa, fueron El Arenal, Hue iv, Hue iii, Hue ii y CMuñeca con  $CI_{50}$  que oscilan de 27.54-56.27 µg/mL., mientras que la Acarbosa fue de 317.77 µg/mL. Los valores de  $CI_{50}$  de las muestras difiere con respecto a los de Acarbosa porque sus constituyentes químicos, como flavonoides, no fueron fraccionados y pueden tener un efecto sinérgico en la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa (Elya *et al.*, 2012)<sup>68</sup>.

#### **Correlación entre variables morfológicas, genéticas y de inhibición de alfa glucosidasa**

Se encontró una correlación entre las variables morfológicas y genéticas ( $r= 0.324$ ,  $P=0.0008$ ), lo que indica una existencia de un condicionante genético en la determinación de la variación morfológica en la mayoría de las poblaciones de *T. stans*, donde algunos caracteres pueden ser o no heredables. Sin embargo, no se observó una relación entre los diferentes

dendrogramas obtenidos (Figura 48). En el caso del clúster morfológico se diferencian entre grupos cultivados y silvestres. En tanto que el clúster con los datos genéticos no se observa esta tendencia. Estos resultados pueden ser explicados desde el punto de vista geográfico o ecológico (Zhang et al., 2015)<sup>304</sup>, donde la plasticidad fenotípica se encuentra sometida a diferentes presiones de selección (González-Rodríguez y Oyama, 2005)<sup>94</sup>.

El conocer la dinámica poblacional de *T. stans* ayuda a poder desarrollar estrategias de conservación y manejo de los recursos genéticos.

## Discusión general

En este trabajo se encontró una gran variación en las características morfológicas foliares de *Bidens odorata*, *Cecropia obtusifolia*, *Costus scaber* y *Tecoma stans*, que, a su vez, presentaron una alta diversidad genética entre los diferentes sitios de muestreo.

En diversas especies, se ha encontrado patrones en la variación fenotípica dentro y entre poblaciones (Valencia y Delgado, 2003<sup>272</sup>; *Quercus crassifolia* x *Q. crassipes*, Tovar-Sánchez y Oyama, 2004<sup>267</sup>; *Quercus laurina-Quercus affinis*, González-Rodríguez y Oyama, 2005<sup>94</sup>); *Juniperus oxycedrus*, Brus *et al.*, 2011<sup>41</sup>), donde se observaron diferencias significativas entre localidades, entre poblaciones e individuos, y que a su vez todos los caracteres foliares cambiaron a lo largo de su área de distribución.

Un gradiente altitudinal se caracteriza por cambios abruptos en las condiciones físicas ambientales tales como, temperatura, presión atmosférica, humedad, horas de sombra, radiación de luz ultravioleta, viento, periodo estacional y geología, así como también con los factores bióticos como el número y tipo de polinizadores, competidores y herbivoría (Abbott y Brennan, 2014)<sup>2</sup>.

En este trabajo se encontró que, en *Cecropia obtusifolia*, *Costus scaber* y *Tecoma stans*, que todas las variables morfológicas se correlacionaron negativamente con la altitud, lo que indica que existe una reducción en la superficie foliar cuando incrementa esta variable geográfica, con lo cual disminuyen los daños por una mayor incidencia de luz y por bajas temperaturas, al mismo tiempo pueden almacenar una mayor cantidad de nutrientes, pierden menos agua, tienen una mayor resistencia mecánica al doblamiento y a fracturas que se pueden ocasionar por los vientos intensos (Kremer *et al.*, 2002<sup>142</sup>; Wang y Gao, 2004<sup>286</sup>).

Una alta diversidad genética observada en *C. obtusifolia*, *C. scaber* y *T. stans*, puede ser el resultado del comportamiento reproductivo y la presencia de alelos raros (frecuencia con  $p < 0.05$ ) y alelos con baja frecuencia ( $0.25 > P \geq 0.01$ ). Una alta variación genética encontrada dentro de las poblaciones puede ser atribuible a los diferentes niveles de flujo genético, out-crossing, bajos valores de  $F_{ST}$  y mutaciones de *novo* (Tyagi *et al.*, 2015)<sup>270</sup>. Por lo que también, la diversidad genética puede estar determinada por la adaptación a cambios ambientales o microclimáticos que existen en el área de distribución de estas especies.

En *C. obtusifolia*, *C. scaber* y *T. stans* existe un determinante genético sobre los constituyentes químicos con propiedades antidiabéticas, sí como en la morfología de las hojas, que a su vez se ven afectadas por las condiciones micro geográficas, lo que permite tener una estructuración de las poblaciones con la capacidad de sobrevivir a intensas presiones de selección y a cambios ambientales (Bakoumé, 2016)<sup>28</sup>.

En el caso de *C. obtusifolia* y *T. stans*, se colectaron en el mismo estado fenológico (todos los individuos presentaron flores) y estación del año, por lo que su actividad de inhibición no se debió a estas variables. Sin embargo, el presentar estructuras reproductivas, sus constituyentes químicos pueden encontrarse en mayor cantidad como sucede en *Pruneta vulgaris*, donde el contenido de los ácidos rosmarino, ursólico y linoleico, se encontraron en mayores cantidades durante la época de floración (Chen *et al.*, 2012b)<sup>50</sup>.

En los individuos masculinos de *C. obtusifolia*, las presiones de selección sobre las características morfológicas, y posiblemente en la composición química, suelen estar determinadas genéticamente, donde los individuos presentan una diferenciación en la composición genética (tres alelos en los *loci* Cec 45 y Cec 46), con la presencia de hojas más grandes y con una mayor actividad en alfa glucosidasa. De igual manera, esto debe de suceder en las características fenotípicas de los individuos femeninos. Estas diferencias marcadas, se pueden deber principalmente a que los sexos tienen diferentes requerimientos para su desarrollo y para la reproducción.

La especie con mayor actividad de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa fue *T. stans* (65%), sin embargo esto puede cambiar si se considera los factores localidad, individuo (genotipos), la concentración y el factor tiempo. Así como, la biología de las especies (sexo, eventos reproductivos, edad, etc.), ya que los mecanismos micro evolutivos pueden influir sobre la actividad y cantidad de metabolitos secundarios de las plantas medicinales (Guo *et al.*, 2010<sup>102</sup>; Chen *et al.*, 2012a<sup>49</sup>).

De esta manera el realizar estudios integrales (morfología, diversidad genética y actividad y fitoquímicos) en las plantas medicinales con potencial antidiabético, permiten establecer las condiciones para su estandarización, seguridad y eficacia antes de promover su cultivo, ya que la mayoría de las plantas medicinales son utilizadas y comercializadas sin que se pruebe su eficacia y seguridad clínica (Canuto *et al.*, 2012)<sup>43</sup>.

## CONCLUSIÓN

- *Cecropia obtusifolia*, *Costus scaber* y *T. stans* presentan una alta plasticidad fenotípica a escala local y que esta variabilidad se debe a las diferencias genotípicas en los diversos ambientes en los que se desarrollan, lo que refleja una alta adaptación a las condiciones ambientales. Además de que genotipos disímiles muestran distintos grados de inhibición de alfa glucosidasa, con lo cual puede ayudar a tener una mejor aplicación terapéutica en el tratamiento de la diabetes.
- La estructura genética de las tres especies de plantas antidiabéticas se encuentra dentro de las poblaciones, con niveles moderados de diferenciación genética y altos niveles de flujo genético.
- La historia demográfica de las poblaciones de *C. scaber* se encuentran actualmente en expansión y las poblaciones de *T. stans* han pasado por procesos de expansión y contracción en sus tamaños poblacionales por posibles cuellos de botella.
- Las variables geográficas (latitud, longitud y altitud) modifican diferencialmente la distribución de la variación morfológica, genética e inhibición de alfa glucosidasa.
- Aunado a la problemática de salud de DM, combinado con el conocimiento del uso tradicional a cerca de *C. obtusifolia*, *C. scaber* y *T. stans* para tratar diabetes y por tener una eficaz inhibición de alfa glucosidasa, pueden convertirse en especies susceptibles de extracción inmoderada, por lo que es necesario, la implementación de estrategias de conservación *ex situ* e *in situ*, así como programas de uso y manejo de las plantas medicinales.

## LITERATURA CITADA.

1. Aarts, E., Verhage, M. Veenvliet, J.V., Donald, C.V. y van der Sluis, S. (2014). A solution to dependency: Using multilevel analysis to accomodate nested data. *Nature neuroasciense* 17(4): 491-496.
2. Abbott, R.J. y Brennan, A.C. (2014). Altitudinal gradients plant hybridzones and evolutionary novelty. *Philosophical Transactions of the Royal Society of Biology* 369: 20130346.
3. Abdel-Hamid Taher, M., Hosni-Dawood, D., Ibrahim-Sanad, M. y Ahmed-Hassan, R. (2016). Searching for anti-hyperglycemic phytomolecules of *Tecoma stans*. *European Journal of Chemistry* 7 (4): 397-404.
4. Abdellaoui, R., Yahyaoui, F. y Neffati, M. (2014). Population structure and genetic diversity of a medicinal plant species *Retama raetam* in Southern Tunisia. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 17(2): 182-189.
5. Abdel-Monein, A. y Fayez, H. (2015). A review on medication of diabetes mellitus and antidiabetic medicinal plants. *International Journal of Bioassays* 4(6): 4002-4012.
6. Aggarwal, N. y Shishu. (2014). A review of recent investigation on medicinal herbs possessing antidiabetic properties. *Nutritional Disorders and Therapy* 1(1): 1-10.
7. Aguilar-Santamaría, L., Ramírez, G., Nicasio, P., Alegría-Reyes, C., Herrera-Arellano, A. (2009). Antidiabetic activities of *Tecoma stans*(L.) Juss. ex Kunth. *Journal of Ethnopharmacology* doi: 10.1016/j.jep.2009.04.
8. Ahmad, W., Khan, I., Han, M.A., Ahmad, M., Subhan, F. y Karim, N. (2014). Evaluation of antidiabetic activity of *Artemisia indica* linn (aerial parts) in streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 151: 618-623.
9. Ahmed, F. y Urooj, A. (2010). Effect of *ficus racemosa* stem bark on the activities of carbohydrate hydrolyzing enzymes: An in vitro study. *Pharmacology Biology* 48(5): 518-23.
10. Ahmed, N. (2009). Alloxan diabetes-induced oxidative stress and impairment of oxidative defense system in rat brain: neuroprotective effects of *Cichorium intybus*. *International Journal of Diabetes and Metabolism* 17: 105-109.
11. Ahmed, Z., Bhagat, A., Johri, R. K. y Chishti, M. Z. (2012). Treatig Diabetes mellitus with natural products. En: *Medicinal plants: Photochemistry, pharmacology and Therapeutics* Vol. 2. (Eds). Singh, G. D., Singh, S. y Kaul, A. Editorial Daya Publishing House. Delhi, India. Pp. 433.



12. Akinci, S. y Lösel, D.M. (2012). Plant water-stress response mechanisms. Pp. 15–42 in I. M. M. Rahman, H. Hasegawa, Eds. Water stress. InTech, Rijeka, Croatia. Disponible <http://www.intechopen.com/books/water-stress/plant-water-stress-response-mechanisms> (Acceso 15 mayo 2015).
13. Alagesan, K., Thennarasu, P., Kumar, V., Sankarnarayanan, S. y Balsamy, T. (2012). Identification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from *Psidium guajava* leaves and *Syzygium cumini* Linn. Seeds. *International of Pharma Sciences and Research* 3(2): 316-322.
14. Al-Azzawi, A.M. (2012). Genotoxic and cytotoxic study of *Tecoma stans* Bignoniaceae. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 15(2): 92-97.
15. Alexiou, P. y Demopoulos, V.J. (2010). Medicinal plants used for the treatment of diabetes and its long-term complications. En: Plants in traditional and modern medicine: Chemistry and activity. (Eds.). Kokkalou, E. Editorial. Transworld Research Network, Kerala, India. Pg. 69-175.
16. Alvarez-Buylla, E.R. y Garay, A.A. (1994). Population genetic structure of *Cecropia obtusifolia*, a tropical pioneer tree species. *Evolution* 48(2): 437-453.
17. Alvarez-Buylla, E.R. y Martínez-Ramos, M. (1992). Demography and allometry of *Cecropia obtusifolia*, a neotropical pioneer tree- an evaluation of the climax- pioneer paradigm for tropical rain forests. *Journal of Ecology* 80: 275-290.
18. Alvarez-Buylla, E.R., García-Barrios, R., Lara-Moreno, C. y Martínez-Ramos, M. (1996). Demographic and genetic models in conservation biology: applications and perspectives for tropical rain forest tree species. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27: 387–421.
19. Ami, N., Ramar, K. y Janardan, P. (2017). Comparative physicochemical and phytochemical evaluation for insulin plant-*Costus pictus* D. Don. *International Journal of Applied Ayurved Research* 3(2):
20. Andrade-Cetto, A. y Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 99(3): 325-348.
21. Andrade-Cetto, A. y Wiendenfeld, (2001). Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology* 78: 145-149.

22. Andrade-Cetto, A., Becerra-Jiménez, J. y Cárdenas-Vázquez, R. (2008). Alfa-glucosidase inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* **116**: 27-32.
23. Annadurai, R.S., Jayakumar, V., Mugasimangalami, R.C., Katta, M.A., Anand, S., Gopinathan, S., Sarma, S.P., Fernandes, S.J., Mullapudi, N., Murugesan, S. y Rao, S.N. (2012). Next generation sequencing an novo transcriptome analysis of *Costus pictus* D. Don. a non-model plant with potent anti-diabetic properties. *BioMedCentral Genomics* **13**:663. DOI: 10.1186/1471-2164-13-663.
24. Arora, R. (2010). Herbal medicine: A cancer chemopreventive and therapeutic perspective. Jaypee Brothers medical Publishers (P). Ltd, Delhi, India. Pp.634.
25. Arora, R., Mathur, A. y Mathur, A.K. (2010). Emerging trends in medicinal plant biotechnology. En: Arora, R. (Edt.). Medicinal planta Biotechnology. Editorial C.A.B International.
26. Ávila-Díaz, I. y Oyama, K. (2007). Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciose* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **94**(2): 184-193.
27. Bakker, E.G., Stahl, E.A., Tooman, C., Nordborg, M and Kreitman, M. (2006). Distribution of genetic variation within and among local populations of *Arabidopsis thaliana* over its species range. *Molecular Ecology* **15**: 1405-1418.
28. Bakoumé, (2016). Genetic diversity erosion and Conservation in Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). En: Ahuja, M.R. y Jain, S.M. (Eds.). Genetic diversity and erosion in plants, sustainable development and biodiversity **8**: 1-33.
29. Balloux, F. y Lugon-Moulin, N. (2002). The estimation of population with microsatellites markers. *Molecular Ecology* **11**: 155-165.
30. Banderas-Dorantes, T.R. (2006). Mecanismo de acción hipoglucemiante de extractos obtenidos de plantas antidiabéticas. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana de Iztapalapa, México, D.F. Pp.62.
31. Barbosa-Filho, J.M., Vasconcelos, T.H.C., Alencar, A.A., Batista, L.M., Oliveira, R.A.G., Guedens, D.N., Falcão, H.S., Moura M.D., Diniz, M.F.F.M. y Modesto-Filho, J. (2005). Plants and their active constituents from south-Central and north America with hypoglycemic activity. *Brazilian Journal Pharmacognosy* **15**: 392-413.

32. Barret, S.C.H. y Hough, J. (2013). Sexual dimorphism in flowering plants. *Journal of Experimental Botany*. 64(1): 67-82.
33. Ben-Israel, I., Yu, G., Austin, M.B., Bhuiyan, N., Auldridge, M., Nguyen, T., Schauuidold, I., Noel, J.P., Pichersky, E. y Fridman, E. (2009). Multiple biochemical and morphological factors underlap the production of methylketones in tomato trichomes[w][OA]. *Plant Physiology* **151**: 1952-1964.
34. Berjano, R., Arista, M., Talavera, M., Ariza, M.J. y Ortíz, P.L. (2014). Plasticity and within plant sex-ratio variation in monoecious *Eimex spinosa*. *Turkish Journal of Botany* **38**: 258-267.
35. Bhushan, M.S., Rao, C.H.V., Ojha, S.K., Vijayakumar, M. y Verma, A. (2010). An analytical review of plants for anti-diabetic activity with their phytoconstituents and mechanism of action. *International Journal of Pharmacy and Sciences Research* 1(1): 29-46.
36. Bilous, R. y Donnelly, R. (2010). Handbook of diabetes. 4a Edición. Editorial Wiley-Blackwell. Oxfor, United Kingdom. PP.238..
37. Bisht, S., Kant, R., y Kumar, V. (2013).  $\alpha$ -D-Glucosidase inhibitory activity of polysaccharide isolated from *Acacia tortilis* gum exudate. *International Journal of Biological Macromolecules* **59**: 214–220. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.04.057.
38. Black, C., Donnelly, P., McIntyre, L., Royle, P.L., Shepherd, J.P. et al. (2007). Meglitinide analogues for type II diabetes mellitus. *Cochrane Database Systematic Review* 2: CD004654.
39. Bond, W.J. y Midgley, J. (1988). Allometry and sexual differences in leaf size. *American Naturalist* **131**: 901-910.
40. Boyer, R. (1999). Conceptos de bioquímica. 1ª Edición. Editorial International Thomson. México, D.F. Pp.694.
41. Brus, R., Ballian, D., Zheleve, P., Pandža M., Bobinac, M., Aceuski, J., Raftoyannis, Y. y Jarni, K. (2011). Absence of geographical structure of morphological variation in *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *Oxycedrus* in the Balkan Peninsula. *European Journal of Forest Research* 130(4): 657-670.
42. Calixto, J.B. (2000). Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **33**: 179-189

43. Canuto, K.M., Silveira, R., Bezerra, M.A.E., Leal, L.K. y Viana, G.S.B. (2012). Phytochemistry, pharmacology and agronomy of medicinal plants: *Amburana cearensis*, an interdisciplinary study. En: Rao, V. (Edt). *Phytochemicals-A global perspective of their role in nutrition and health*. Editorial INTECH. Pp.538.
44. Carretero-Rodrigo, N. (2000). En: *Nutrí guía: Manual de nutrición clínica en atención primaria*. (Eds.): Requejo, A.M. y Ortega, M. Editorial. Complutense, España.
45. Cavallero, L., Galetti, L., Lòpez, D., McCargo, J. y Barberis, I.M. (2011). Morphological variation of the leaves of *Aechmea distichantha* Lem. Plants from contrasting habits of a Chaco forest: a trade-off between leaf area and mechanical support. *Revista Brasileira de Biociências* 9(4): 455-464.
46. Cea-D'Ancona, M. A. (2016). Análisis discriminante. Cuadernos metodológicos. Centro de investigaciones sociológicas. Madrid, España. Pp. 185.
47. Cengiz, S., Cavas, L. y Yurdakoc, K. (2010). Alpha-amylase inhibition kinetics by culepenyne Mediterranean. *Marine Science* 11(1):93-103. Doi:
48. Chen, C., Li, P., Wang, R.H., Schaal, B.A., Fu, C.X. (2014). The Population Genetics of Cultivation: Domestication of a Traditional Chinese Medicine, *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. (Scrophulariaceae). *Plos One* 9(8): e105064.
49. Chen, W., Xie, T., Shao, Y. y Chen, F. (2012a). Phylogenomic relationships between amylolytic enzymes from 85 strains of fungi. *Plos One* 7: e49679.
50. Chen, Y., Zhu, Z., Guo, Q., Zhang, L. y Zhang, X. (2012b). Variation in concentrations of major bioactive compounds in *Prunella vulgaris* L. related to plant parts and phenological stages. *Biol Research* 45: 171-175.
51. Chung, M.Y., Nason, J., Gi-Chung, M., Joong, K.K., Chong-Wook, P., Byung-Yun, S. y Jae-Hong, P. (2002). Landscape-level spatial genetic structure in *Quercus acutissima* (Fagaceae). *American Journal of Botany* 39(8): 1229-1236.
52. Cipollini, M.L. (2013). Seed size, sexual dimorphism, and sex ratio in *Lindera benzoin* L. (Lauraceae). *Journal of the Torrey Botanical Society* 140(3): 300-312.
53. Consitt, L.A., Boyle, K.E. y Houmard, J.A. (2008). Exerse as an effective treatment for type 2 diabetes. En: Feinglos, M.N. y Bethel, M.A. *Type 2 diabetes mellitus: An evidence based approach to practical management*. Editorial Humana Press-Springer. Totowa, NJ, USA. Pp.474.

54. Constantino, L., Raimondi, L., Pirisino, R., Brunetti, T., Pessotto, P., Giannessi, F., Lins, A.P., Barlocco, D. y El-Abady, S.A. (2003). Isolation and pharmacological activities of the *Tecoma stans* alkaloids. *Il Farmaco* **58**: 781-785.
55. Cooley, A. M., Reich, A. y Rundel, P. (2004). Leaf support biomechanics of Neotropical understory herbs. *American Journal of Botany* **91**(4): 573-581.
56. Corneslissen, T. y Stirling, P. (2005). Sex-biased herbivory: a meta-analysis of the effects of gender on plant-herbivore interactions. *Oikos* **111**: 488-500.
57. Cowan, M.M. (1999). Plant product as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology* **12** (4): 564-582.
58. Damsud, T., Adisakwattana, S. y Phuwapraisirisan, P. (2013). Three new phenylpropanoyl amides from the leaves of *Piper sarmentosum* and their  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities. *Phytochemistry Letters* **6**: 350-354.
59. De Micco, V. y Aronne, G. (2012). Occurrence of morphological and anatomical adaptative trait in young and adult plants of the rare Mediterranean Cliff species *Primula palinuri* Petagna. *The Scientific World Journal* **2012**: 471814. Doi: 10.1100/2012/471814.
60. Dhaked, U., Gupta, V., Singh, D.P. y Nama, G. (2011). Antidiabetic activity of *Tecoma stans* flower. *Pharmacologyonline* **1**: 553-558.
61. Dhanasekaran, M., Holcomb, L.A., Hitt, A.R., Tharakan, B., Porter, J.W., Young, K.A. y Manyam, B.V. (2009). Centella asiatica extract selectively decreases amyloid  $\beta$  levels in hippocampus of Alzheimer's disease animal model. *Phytotherapy Research* **23**: 14-19. Doi: 10.1002/ptr.2405.
62. Din, N., Dibong, S.D., Mpondo, M.V., Priso, R.J., Kwin, N.F. y Ngoye, A. (2011). Inventory and identification of plants used in the treatment of diabetes in Douala Town (Cameroon). *European Journal of Medicinal Plants* **1**(3): 60-73.
63. Doyle, M.E. y Egan, J.M. (2003). Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. *Pharmacology Review* **55**: 105-131.
64. Ebadi, M. (2008). Desk reference of clinical pharmacology. 2a Edición. Editorial, CRC Press, Taylor & Francis Group. Pp.732.
65. Eddouks, M., Maghrani, M., Lemhadri, A., Ouahidi, M.L. y Jouad, H. (2002). Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of Diabetes mellitus,

hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). *Journal of Ethnopharmacology* **82**: 97-103.

66. Ellison, A.M., Buckley, H.L., Miller, T.E. y Gotlli, J. (2004). Morphological variation in *Sarracenia purpurea* (Sarraceniaceae): Geographic, environmental and taxonomic correlates. *American Journal of Botany* 91(11): 1930-1935.

67. Elosh, G., Palanivel, V., y Senthil-Kumar, K.L. (2013). Evaluation of Anti-diabetic Activity of *Tecoma stans* Stem Extract in Induced Diabetic Albino Rats. *International Journal of Innovative Pharmaceutical Research*. 4(3): 337-341.

68. Elya, B., Basah, K., Mun'Im, A., Yuliasuti, W., Bangun, A., y Septiana, E.K. (2012). Screening of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity from some plants of Apocynaceae, Clusiaceae, Euphorbiaceae, and Rubiaceae. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2012**. Doi: 10.1155/2012/281078

69. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANU). (2012). Resultados por entidad federativa Hidalgo. Instituto Nacional de Salud Pública. México. Pp.112.

70. Excoffier, L. y Lischer, H.E (2015). Arlequin suite version 3.5.2: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10**: 564-567.

71. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. (2003a). Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **26**: 3160-3167.

72. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. (2003b). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **26**: S5-S20.

73. Falush, D., Stephens, M. y Pritchard, J.K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**: 1567-1587.

74. Fazil-Ahmed, M., Mohammed, K.S., Safiullah, G.S., Sughra, M.S., Rasheed, A.S., Mehboob, A.S. y Ibrahim, M. (2010). Antidiabetic activity of *Vinca rosea* extracts in alloxan-induced diabetic rats. *International Journal of Endocrinology* **2010**:1-6.

75. Federación Mexicana de Diabetes (FMD). (2010).

- 76.** Ferrer, M.M., Eguiarte, L.E. y Montaña, C. (2004). Genetic structure and outcrossing rate in *Flourensi cernua* (Asteraceae) growing at different densities in the South-western Chihuahuan desert. *Annals of Botany* **94**: 419-426.
- 77.** Finkeldy y Hattemer, H. (2007). Tropical forest genetics. Editorial, Springer.
- 78.** Forrest, J.R.K. (2014). Plant Size, Sexual Selection, and the Evolution of Protandry in Dioecious Plants. *The American Naturalist* **184(3)**: 338-351.
- 79.** Frandsen, T.P., Palcic, M.M. y Svensson, B. (2002). Substrate recognition by three family 13 yeast  $\alpha$ -glucosidases. *European Journal of Biochemistry* **269**: 728-734.
- 80.** Freeman, S. y Herron, J.C. (2001). Análisis evolutivo. 2a Edición. Editorial Prentice Hall. Madrid, España. Pp. 703.
- 81.** Fu, Y.X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* **147**: 915-925.
- 82.** Gao, J., Queenborough, S.A. Y Chai, J.P. (2012). Flowering sex ratios and spatial distribution of dioecious trees in a south-east Asian seasonal tropical forest. *Journal of Tropical Forest Science* **24(4)**: 517-527.
- 83.** Garber, A.J., Duncan, T.G., Goodman, A.M., Mills, D.J. y Rohlf, J.L. (1997). Efficacy of metformin in type II diabetes: Results of a double-blind, placebo-controlled, dose-response trial. *American Journal of Medicine* **103(6)**: 491-497.
- 84.** Garlapati, R., Pottabathini, N., Gurram, V., Swamy-Kasani, K., Gundla, R., Thulluri, C., Kumar-Machiraju, P., Avinash B. Chaudhary, A.B., Addepally, U., Dayam, R., Rao-Chunduri. V. y Patro, B. (2013). Development of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors by room temperature c-c-cross couplings of quinazolinones. *Organic and Biomolecular Chemistry* **11**: 4778-4791.
- 85.** Gaur, U., Chaudhury, A., Singh, D.K., Kumar, S., Tantia, M.S. y Vijn, R.K. (2010). Genetic bottleneck studies in five duck (*Anas platyrhynchos*) populations of India. *Indian Journal of Animal Sciences* **80(11)**:1103-1108.
- 86.** Geber, M.A. (1999). Theories of the evolution of sexual dimorphism. En: Gender and sexual dimorphism in flowering plants. Editores. Geber, M. A., Dawson, T. E. y Delph, L. F. pp. 97-122.
- 87.** Gentry, A.H. (1982). Bigononiaceae. *Flora de Veracruz* **24**: 1-222.

88. Giovannini, P., Howes, M.J. R. y Edwards, S.E. (2016). Medicinal plants used in the traditional management of diabetes and its sequelae in Central America: A review. *Journal of Ethnopharmacology* **184**: 58–71.
89. Givnish, T.J. (1987). Comparative studies of leaf form: assessing the roles of selective pressures and phylogenetic constraints. *New Phytologist* **106**: 131-160.
90. Givnish, T.J. (1988). Adaptation to sun and shade: A whole-plant perspective. *Australian Journal Plant and Physiology* **15**: 63-92.
91. Gobbo-Beto, L. y Lopes, N.P. (2007). Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. *Quimica Nova* **30**: 374-381.
92. González-Estrada, E. (2008). Pruebas de bondad de ajuste para distribuciones estables. Tesis de doctorado. Colegio de postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo, de México. Pp. 97.
93. González-Quintero, L. (1968). Tipos de Vegetación del Valle del Mezquital, Hidalgo. Departamento de Prehistoria, Instituto Nacional de Antropología e Historia. México, D.F.
94. González-Rodríguez, A. y Oyama, K. (2005). Leaf morphometric variation in *Quercus affinis* and *Quercus laurina* (Fagaceae), two hybridizing Mexican red oaks. *Botanical Journal of the Linnean Society* **147**: 427-435.
95. Goudet, J. (2001). FSTAT, a Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices Version 2.9.3. <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html> Updated from Goudet (1995).
96. Govindappa, M. (2015). A Review on Role of Plant(s) Extracts and its Phytochemicals for the Management of Diabetes. *Journal of Diabetes and Metabolism* **6(7)**: 1-38.
97. Govindappa, M., Sadananda, T.S., Channabsavar, R. y Raghavendra, V.B. (2011). In vitro anti-inflammatory, lipoxygenase, xanthine oxidase and acetylcholinesterase inhibitory activity of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* **2(2)**: 275-285.
98. Gram, W.K. y Sork, V. (1999). Population density as a predictor of genetic variation for Woody plant species. *Conservation Biology* **13(5)**: 1079-1087.
99. Granados-Sánchez, D., Hernández-García, M. Á., y López-Ríos, G. F. (2012). Ecología de los desiertos del mundo (Primera). México: Universidad Autónoma Chapingo.



- 100.** Gratani, L. (2014). Plant phenotypic plasticity in response to environmental factors. *Advances in Botany* **2**:
- 101.** Green, R.H. (1980). Multivariate approaches in ecology. *Annual review of Ecology and systematics* **11**: 1-14.
- 102.** Guo, Q.S., Zhou, L.J., Gong, W.H. y Wu, X.S. (2010). Effect of different water treatments on quality and yield of spadix in *Prunella vulgaris*. *China Journal Chinese Materia Medica* **35**: 1795-1798.
- 103.** Gurudeeban, S., Satyavani, S. y Ramanathan, T. (2012). Alpha glucosidase inhibitory effect and enzyme kinetics of coastal medicinal plants. *Bangladesh Journal of pharmacological Society* **7**: 186-191.
- 104.** Guzmán, A.J. (2015). Ecological advantage of leaf heteroblasty in *Costus pulverulentus* (Costaceae). *Botany*: 151-158.
- 105.** Hamrick, J.L. y Godt, M.J. (1996). Effects of life history traits on genetic diversity in plant species *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, series b, biological Sciences* **351**: 1291-1298.
- 106.** Harborne, J.B. (1993). Introduction to ecological biochemistry. 3ª edición. Editorial Academic Press Inc. San Diego, California. USA. Pp. 316.
- 107.** Hernández-Ávila, M., Gutiérrez, J.P. y Reynoso, Noverón, N. (2013). Diabetes mellitus en México: El estado de la epidemia. *Salud Pública de México*. 55(2): s128-s136.
- 108.** Hernandez-Galicia, E., Aguilar-Contreras, A., Aguilar-Santamaria, L., Roman-Ramos, R., Chavez-Miranda, A.A., Garcia-Vega, L.M. y Alarcon-Aguilar, F.J. (2002). Studies on hypoglycemic activity of Mexican medicinal plants. *Proceedings of the West Pharmacology Society* **45**:118–124.
- 109.** Herrera-Arellano, A., Aguilar-Santamaría, L., Garcia-Hernández, B., Nicasio-Torres, P. y Tortoriello, J. (2004). Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. *Phytomedicine* **11**:561e6.
- 110.** Herrmann, F., Romero, M.R., Blazquez, A.G., Kaufmann, D., Ashour, M.L, Kahl, S., Marín, J.J.G., Efferth, T. y Wink, M. (2011). Diversity of pharmacological properties in Chinese and European medicinal plants: Cytotoxicity, antiviral and antitrypanosomal screening of 82 herbal drugs. *Diversity* **3**(1): 547-580.

- 111.** Heubl, G. (2013). DNA-based authentication of TCM-plants: Current progress and future perspectives. En: Evidence and Rational Based Research on Chinese Drugs. Wagner, H. y Ulrich-Merzenich, U. (Eds). Capítulo II. Pp. 27-84.
- 112.** Hong-Lian, A., Wang, H., De-Zhu, L. y Jun-Bo, Y. (2009). Isolation and characterization of 13 microsatellite loci from *Incarvillea mairei* (Bignoniaceae), an endemic species to the Himalaya-Handgun mountains region. *Conservation Genetic* **10**: 1613-1615.
- 113.** Hopkins, R., Schmitt, J. y Stinchcombe, J.R. (2008). A latitudinal cline and response to vernalization in leaf angle and morphology in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *New Phytologist* **179**: 155-164.
- 114.** Hsu, C.C., Wahlquist, M.L., Lee, M.S. y Tsai, H.N. (2011). Incidence of dementia is increases in type II diabetes and reduced using sulfonylureas and metformin. *Journal Alzheimer's Diseases* **11**: 2057-2062.
- 115.** Hu, Y., Zhang, Q., Xin, H., Quin, L.P., Lu, B.R. y Rahman, K. (2007). Association between chemical and genetic variation of *Vitex rotundifolia* populations from different locations in China: its implication for quality control of medicinal plants. *Biomedical chromatography* **9**: 967-975.
- 116.** Hufford, K.M. y Mazer, S.J. (2003). Plant ecotypes: genetic differentiation in the age of ecological restoration. *Trends in Ecology and Evolution* **18**(3): 147-155.
- 117.** Hulin, B. (1994). New hypoglycemic agents. *Progres Medicine Chemistry* **31**: 1-58.
- 118.** Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). (2010).
- 119.** Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). (2010).
- 120.** International Diabetes Federation. (2012). Rationale for new IDF worldwide definition of the metabolic syndrome. [http://www.idf.org/webcast/pdf/IDF\\_Background\\_2.pdf](http://www.idf.org/webcast/pdf/IDF_Background_2.pdf)
- 121.** Janzen, D.H. (1973). Dissolution of mutualism between *Cecropia* and its Azteca ants. *Biotropica* **5**(1): 15-28.
- 122.** Jones, F.A. y Hubbell, S.P. (2003). Isolation and characterization of microsatellite loci in the tropical tree *Jacaranda copaia* (Bignoniaceae). *Molecular Ecology Notes* **3**: 403-405.
- 123.** Kabir, M.D., Moritz, K.K. y Stenberg, J.A. (2014). Plant-sex-biased tritrophic interactions on dioecious willow. *Ecosphere* **5**(12): 1-9.

- 124.** Kalailingam, P., Balasubramanian, K., Kannaian, B., Mohammed, A.K., Meenakshi Osundram, K., Tamilmani, E. y Kaliaperumal, R. (2013). Isolation and quantification of flavonoids from ethanol extract of *Costus igneus* rhizome (CIREE) and impact of CIREE on hypoglycaemic, electron microscopic studies of pancreas in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. *Biomedicine and Preventive Nutrition* **3**:285-297.
- 125.** Kameshwaran, S., Suresh, V., Arunachalam, G., Kanthlal, S.K. y Mohanraj, M. (2012). In vitro and in vivo anticancer activity of methanolic extract of *Tecoma stans* flowers. *International Research Journal of Pharmacy* **3**(3): 246-251.
- 126.** Kavanagh, P.H., Lehnebach, C.A., Shea, M.J. y Burns, K.C. (2011). Allometry of sexual size dimorphism in dioecious plants: Do plants obey Rance's rule? *The American Naturalist* **178**(5): 596-601.
- 127.** Kawano, N., Ichinose, K. y Ebizuka, Y. (2002). Molecular cloning and functional expression of cDNAs encoding oxidosqualene cyclases from *Costus speciosus*. *Biol. Pharm Bull.* **25**: 477-482.
- 128.** Kay, K.M y Schemske, D.W. (2008). Natural selection reinforces speciation in a radiation of neotropical rainforest plants. *Evolution* **62**(10): 2628–2642.
- 129.** Kay, K.M., Apkenas, V.E., y Yost, J.M. (2012). Permanent Genetic Resources: Expressed sequence tag library development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the Neotropical spiral gingers, *Costus* (Costaceae). *Molecular Ecology Resources* **2**:374-376.
- 130.** Kay, K.M., Reeves, P.A., Olmstead, R.G. y Schemske, D.W. (2005). Rapid speciation and evolution of hummingbird pollination in Neotropical *Costus* subgenus *Costus* (Costaceae): evidence from nrDNA ITS and ETS sequences. *American Journal of Botany* **92**(11): 1899-1910.
- 131.** Khan, A. y Anderson, R.A. (2003). Insulin potentiating factor (IPF) present in foods, species and natural products. *Pakistan Journal Nutritional* **2**: 254-257.
- 132.** Kim, J.S., Hyun, T.K. y Kim, M.J. (2011). The inhibitory effects of ethanol extracts from sorghum, foxtail millet and proso millet on  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase activities. *Food Chemistry* **124**: 1647-1651.
- 133.** Kim, Y.M., Okuyama, M., Mori, H., Nakai, H., Saburi, W., Chiba, S. y Kimura, A. (2005). Enzymatic synthesis of alkyl  $\alpha$ -2-deoxyglucosides by alkyl alcohol resistant  $\alpha$ -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Tetrahedron Asymmetry* **16**: 403-409.

- 134.** Kimura, M. y Crow, J.F. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* **4**: 725–38.
- 135.** King, D. y Mandonald, J. (1999). Tree architecture in relation to leaf dimensions and tree stature in relation tropical rain forests. *Journal of Ecology* **87**: 1012-1024.
- 136.** Kinsella, B.T., Stephane, H., Larkin, A. y Cantwell, B.A. (1991). Primary structure and processing of the *Candida tsukubaensis* alpha glucosidase: Homology with the rabbit intestinal sucrase-isomaltase complex and human lysosomal alpha glucosidase. *European Journal of Biochemistry* **202**: 657-664.
- 137.** Kirchoff, B.K. y Rutishauser, R. (1990). The phyllotaxy of *Costus* (Costaceae). *Botanical Gazette* **151**(1): 88-105.
- 138.** Kivelä, M., Arnaud-Haond, S. y Sramäki, J. (2014). EDENetwork: Ecological and evolutionary networks. University of Oxford, United Kingdom.
- 139.** Klich, M.G. (2000). Leaf variation in *Elaeagnus angustifolia* related to environmental heterogeneity. *Environmental and Experimental Botany* **44**: 171-183.
- 140.** Klug, W.S y Cummings, M.R. (1999). Conceptos de genética. 9ª Edición. Editorial Prentice Hall. España.
- 141.** Konovalov, D.A., Manning, C. y Henshaw, M.T. (2004). Kingroup: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. *Molecular Ecology Notes* **4**: 779-782.
- 142.** Kremer, A., Dupouey, J.L., Deans, J.D., Cottrell, J., Csaikl, U., Finkeldey, R., Espinel, S., Jensen, J., Kleinschmit, J., Van Dam, B., Cucousso, A., Forrest, I., De Heredia, U.L., Lowe, A. J., Tutkova, M., Munro, R.C., Steinhoff, C. y Badeau, V. (2002). Leaf morphological differentiation between *Quercus robur* and *Quercus petraea* is stable across western European mixed oak stands. *Annals of Forest Science* **59**: 777–787.
- 143.** Kuhlmann, J. y Puls, W. (1996). Oral antidiabetics. Editorial Springer. New York, USA. Pp. 732. Doi: 10.1007/978-3-662-09127-2
- 144.** Kumar, S., Narwal, S., Kumar, Smita. V. y Prakash, O. (2011).  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacognosy Review* **5**: 19-29.
- 145.** Lehninger, A.L. (1995). Bioquímica. Editorial Omega. Barcelona, España. Pp.117.

- 146.** Leiss, K.A., Matese, F., Cho, Y.H., Verpoorte, R. y Klinkhamer, P.G.L. (2009). Identification of chlorogenic acid as resistance factor for thrips in *Chrysanthemum*. *Plant Physiology* **150**: 1567-1575.
- 147.** Li, C., Xu, G., Zang, R., Korpelainen, H. y Berninger, F. (2007). Sex-related differences in leaf morphological and physiological responses in *Hippophae rhamnoides* along an altitudinal gradient. *Tree physiology* **27**: 399-406.
- 148.** Liu, Y., Li, D., Yan, L. y Huang, H. (2015). The microgeographical patterns of morphological and molecular variation of mixed ploidy population in the species complex *Actinidia chinensis*. *Plos One* **10(2)**: e0117596(1-15). Doi: 10.1371/journal.pone.0117596.
- 149.** Liu, Z., Liu, Y., Liu, C., Song, Z., Li, Q., Zha, Q., ... Lu, A. (2013). The chemotaxonomic classification of *Rhodiola* plants and its correlation with morphological characteristics and genetic taxonomy. *Chemistry Central Journal* **7(1)**: 1. Doi: 10.1186/1752-153X-7-118.
- 150.** Lobova, T.A., Mori, S.A., Blanchar, F., Peckham y Dominique, C.P. (2003). *Cecropia* as a food resource for bats in French Guiana and the significance of fruit structure in seed dispersal and longevity. *American Journal Botany* **90(3)**: 388-403.
- 151.** Longino, J.T. (1989). Geographic variation and community structure in an ant-plant mutualism: *Azteca* and *Cecropia* in Costa Rica. *Biotropica* **21(2)**: 126-132.
- 152.** Lordan, S., Smyth, T.J., Soler-Vila, A., Stanton, C. y Ross, R.P. (2013). The  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. *Food Chemistry* **141**: 2170-2176.
- 153.** Lot, A. y Chiang, F. (Compiladores, 1986). Manual de herbario. Administración y manejo de colecciones, técnicas de recolección y preparación de ejemplares botánicos. Consejo Nacional de la Flora de México, A. C. 142 p.
- 154.** Lowe, A., Harris, S. y Ashton, P. (2004). Ecological genetics. Editorial. Blackwell. Publishing. United Kingdom. Pp.344.
- 155.** Mahmood, S. y Abbas, A. (2003). Local population differentiation in *Trifolium alexandrinum* L. in response to various disturbance regimes. *Journal of Biological Sciences* **3(9)**: 773-781.
- 156.** Mallarino, A.P., Haq, M.U., Wittry, D. y Bermudez, M. (2001). Variation in soybean response to early season foliar fertilization among and within fields. *Agronomy Journal* **93**:1220-1226.

- 157.** Manaharan, T., Devi, P. U. y Hwee, M.C. (2012). Tropical plant extracts as potential antihyperglycemic agents. *Molecules* **17**: 5915-5923.
- 158.** Marroquín-Segura, R., Flores, P.M., García, B.M.M., Mora, G.J.L., Sánchez, R.J.F. y Aguilar-Castro, A. (2005). Efecto anti hiperglucémico de un extracto acuoso de *Colubrina elliptica*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* **36(2)**: 27-32.
- 159.** Martínez-Alfaro, M.A., Evangelista, O.V., Mendoza, C.M., Morales, G.G., Toledo, O.G. y Wong, L. A. (2001). Catálogo de plantas útiles de la Sierra Norte de Puebla, México. 2ª Edición. Editorial UNAM, México, D. F. Pp.
- 160.** Maryniuk, M.D. y Christian, M.J. (2008). Medical nutrition therapy for type 2 diabetes. En: Feinglos, M.N. y Bethel, M.A. Type 2 diabetes mellitus: An evidence based approach to practical management. Editorial Humana Press-Springer. Totowa, NJ, USA. Pp.474.
- 161.** Marzouk, M., Gamal-Eldeen, A., Mohamed, M. y El-Sayed, M. (2006). Anti-proliferative and antioxidant constituents from *Tecoma stans*. *Z. Naturforsch* **61c**: 783-791.
- 162.** Mayer, B.D. (1991). Diabetes mellitus diagnosis and treatment. 3ª edición. Editorial Churchill Livingstone, Reino Unido. Pp. 250.
- 163.** McCune, L.M. y Johns, T. (2002). Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the indigenous peoples of the North American boreal forest. *Journal of Ethnopharmacology* **82(2-3)**: 197-205.
- 164.** McDonald, P.G., Fonseca, C.R., Overton, J.M. y Westoby, M. (2003). Leaf-size divergence along rainfall and soil-nutrient gradients: Is the method size reduction common among clades. *Functional Ecology* **17**:50-57.
- 165.** Meléndez, C.M.E., Berdeja, B. y Miranda, G. (2004). Diuretic effect of the aqueous extract of *Bidens odorata* in the rat. *Journal of Ethnopharmacology* **95**: 363-366.
- 166.** Meng, S., Cao, J., Feng, Q., Peng, J. y Hu, Y. (2013). Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: A review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2013**: 1-11.
- 167.** Midgley, J.J. (2010). Causes of secondary sexual differences in plants: Evidence from extreme leaf dimorphism in *Leucadendron* (Proteaceae) South African. *Journal of Botany* **76**: 588-592.

- 168.** Migdal, A.L., Herzlinger, S., y Abragamson, J.M. (2017). Treating type 2 Diabetes mellitus. En: Poretzky, L.(Edt). Principles of Diabetes mellitus. Springer international. DOI: 10.1007/978-3-319-20797-1\_44-2.
- 169.** Miller, M.P. (1997). Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: a windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by the author, Northern Arizona University, Flagstaff, Arizona, USA.
- 170.** Minatoguchi, S., Arai, M., Uno, Y., Kariya, T., Nishida, Y., Hashimoto, K., Kawasaki, M., Takemura, G., Fujiwara, T. y Fujiwara, H. (1999). A novel anti myocardial infarct size in rabbits. *British Journal of Pharmacology* **128**: 1667-1672.
- 171.** Mitchell, K.A., Bolstad, P.V. y Vose, J.M.C. (1999). Interspecific and environmentally induced variation in foliar dark respiration among eighteen southeastern deciduous tree species. *Tree physiology* **19**:861-870.
- 172.** Molina, P.M.E. y Zamudio, R.S. (2010). Estudio florístico del pedregal de Paricutín en la Cuenca del lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. *Fascículo XXV*.
- 173.** Mopper, S., Mitton, J.B., Whitham, T.G., Cobb, N.S. y Christensen, K.M. (1991). Genetic differentiation and heterozygosity in pinyon pine associated with resistance to herbivory and environmental stress. *Evolution* **45**: 989-999.
- 174.** Moreira, P.A. y Fernandes, G.W. (2013). Is the São Francisco River a geographic barrier to gene flow in trees of *Handroanthus ochraceus*? *Journal Tropical Ecology* **29**:243–250.
- 175.** Moreira, P.A., Fernandes, G.W. y Collevatti, R.G. (2009). Fragmentation and spatial genetic structure in *Tabebuia ochracea* (Bignoniaceae) a seasonally dry neotropical tree. *Forest Ecology and Management* **258(12)**: 2690-2695.
- 176.** Moreira, P.A., Malverira-Brandão, M., Hayashida, A.N., Alves-Oliveira, D. y Fernandes, G.W. (2015). Genetic diversity and structure of the tree *Enterolobium contortisiliquum* (Fabaceae) associated with remnants of a sessionally dry tropical forest. *Flora* **210**: 40-46.
- 177.** Mun'Im, A., Katrin, Azizahwatti, Andriani, A., Fitriana, K., Mahmudah. y Mashita, M. (2013). Screening of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of some Indonesian medicinal plants. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants* **3(2)**:144-150.

- 178.** Naik, A., Prajapat, P., Krishnamurthy, R. y Pathak, J.M. (2017). Assessment of genetic diversity in *Costus pictus* accessions based on RAPD and ISSR markers. *3 Biotech* **7(70)**: 1-12.
- 179.** Nakagawa, M., Isogini, T., Inanaga, M., Abe, K., Okada, T., Yoichi, W., Kobayakawa, K., Toyama, C., Ito, K., Kawashima, N., Otani, K., Hori, M., Tani, S., Higuchi, K., Asano, I., Kawahara, K., Yamauchi, A., Kato, D. y Matsushita, M. (2015). Inter-specific and sexual differences in architectural traits of two dioecious *Lindera* species (Lauraceae). *Plant Ecology* **216**: 99-109.
- 180.** Nakai, H., Ito, T., Hayashi, M., Kamiya, K., Yamamoto, T., Matsubara, K., Kim, Y.M., Jintanart, W., Okuyama, M., Mori, H., Chiba, S., Yoshio Sano y Kimura, A. (2007). Multiple forms of  $\alpha$ -glucosidase in rice seeds (*Oryza sativa* L., var nipponbare). *Biochimie* **89**: 49-62.
- 181.** Nardini, A., Salleo, S. y Andri, S. (2005). Circadian regulation of leaf hydraulic conductance in sun flower (*Helianthus annuus* cv Margot). *Plant Cell and Environment* **28**:750-759.
- 182.** Nasri, H. y Rafieian-Kopaei, M. (2014). Metformin: Current knowledge. *Journal of Research in Medical Sciences* **19(7)**: 658–664.
- 183.** Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *The American Naturalist* **106(949)**: 283-292.
- 184.** Nei, M. (1978a). The theory of genetic distance and evolution of human races. *Japanese Journal of Human Genetics* **23**: 341-369.
- 185.** Nei, M. (1978b). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89(3)**: 583-590.
- 186.** Nevo, E. y Beiles, A. (1989). Genetic diversity in the desert: patterns and testable hypotheses. *Journal of Arid Environments* **17**: 241-244.
- 187.** Nicotra, A.B., Leigh, A., Boyce, K., Jones, C.S., Niklas, K.J., Royer, D.L. y Tsukaya, H. (2011). The evolution and functional significance of leaf shape in the angiosperms. *Functional Plant Biology* **38**: 535-552.
- 188.** Obeso, J.R. (2002). The costs of reproduction in plants. *New Phytologist* **155**: 321-348.
- 189.** Oleas, N.H., Meerow, A.W. and Francisco-Ortega, J. (2012). Population dynamics of the endangered plant, *Phaedranassa tungaraguae*, from the tropical Andean hotspot. *Journal of Heredity* **10(3)**:557-569.



- 190.** Omar, R., Li, L., Yuan, T., Seeram, N.P. (2012).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory hydrolyzable tannins from *Eugenia jambolana* seeds. *Journal Natural of Products* **75**:1505–1509.
- 191.** OMS. (2012). OMS: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>
- 192.** Ortíz-Medrano, A., Moreno-Letelier, A. y Piñero, D. (2008). Fragmentación y expansion demográfica en las poblaciones mexicanas de *Pinus ayacahuite* var. ayacahuite. *Boletín de la.Sociedad. Botánica de. México* **83**: 25-36.
- 193.** Ota, M., Okamoto, T., Hoshiro, W. y Wakabayashi, H. (2009). Action of  $\alpha$ -d-glucosidase from *Aspergillus niger* towards dextrin and stich. *Carbohydrate Polymers* **78**: 287-291.
- 194.** Ouarguidi, A., Powell, B., Martí, G.J., De Boer, H. y Abrad, A. (2012). Species substitution in medicinal roots and possible implications of toxic of herbal remedies in Morocco. *Economic Botany* **66(4)**: 370-382.
- 195.** Pagano, G., Morena, S., Corgiat-Mansin, L., Cravero, F., Giorda, C., Bozza, M. y Rossi, C.M. (1995). Comparison of miglitol and glibenclamide in diet treated type 2 diabetic patients. *Prog. Medicine Chemistry* **31**: 1-58.
- 196.** Parildar, H., Serter, R. y Yesilada, E. (2011). Diabetes mellitus and pytotherapy in Turkey. *Journal of the Pakistan Medical Association* **61(11)**: 1116-1120
- 197.** Patel, D.K., Kumar, R., Laloo, D. y Hemalatha, S. (2011). Evaluation of phytochemical and antioxidant activities of the different fractions of *Hybanthus enneaspermus* (Linn.) F. Muell. (Violaceae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **4(5)**: 391-396.
- 198.** Patel, D.K., Kumar, R., Laloo, D. y Hemalatha, S. (2012a). Diabetes mellitus: An overview on its pharmacological aspects and reported medicinal plants having antidiabetic activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **2(5)**: 411-420).
- 199.** Patel, D.K., Kumar, R., Laloo, D. y Hemalatha, S. (2012b). Natural medicines form plant source used for therapy of diabetes melitus: An overview of its pharmacological of aspects. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* **2012**:239-250.
- 200.** Patel, D.K., Prasad, D.K., Kumar, R. y Hemalata, S. (2012c). An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **2012**: 320-330.
- 201.** Peakall, R. y Smouse, P.E. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. **6**: 288-295.

- 202.** Pearson, J.G., Antal, E.J., Raehl, C.L., Gursch, H.K., Craig, W.A. y Alberts, K.S. (1986). Pharmacokinetic disposition of <sup>14</sup>C-glyburide in patients with varying renal function. *Clinical Pharmacology Ther.* **39**: 318-324.
- 203.** Perera, H.K.I., Kalpani-Premadasa, W.K.V. y Poongunran, J. (2016).  $\alpha$ -glucosidase and glycation inhibitory effects of *Costus speciosus* leaves. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **16**(2): 1-9. DOI 10.1186/s12906-015-0982-z.
- 204.** Pérez-Escandón, B.E., Villavicencio Nieto, M.A. y Ramírez-Aguirre, A. (2003). Lista de las plantas útiles del estado de Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca. Pp. 133.
- 205.** Pérez-Gutiérrez, C., Dolores, H.M., Ortiz, R., Álvarez, S.M. y Angeles, F.M. (2001). A pharmacological study of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology* **76**: 279-284.
- 206.** Pico, F.X. y Quintana, A.P. (2005). Análisis de factores demográficos y genéticos para la conservación de poblaciones de plantas en un hábitat fragmentado. *Ecosistemas* **14**(2): 109-115.
- 207.** Plazas, M., Andújar, I., Vilanova, S., Hurtado, M., Gramazio, P., Herraiz, F. y Rohens, J. (2013). Breeding for chlorogenic acid content in eggplant interest and prospects. *Natulae Botanicae Horti Agrobotanici* **41**(1): 26-35.
- 208.** Pluempanupat, W., Adisakwattana, S., Yibchok-Anun, S. y Chavasiri, W. (2007). Synthesis of N-phenylphthalimide derivatives as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Archives Pharmacal Research* **30**(12): 1501-1506.
- 209.** Pongwecharak, J., Tengmeersi, N., Malanusorn, N., Panthong, M. y Pawangkapin, N. (2009). Prescribing metformin in type II diabetes with a contraindication: prevalence and outcome. *Pharmacology World Science* **4**: 481-486.
- 210.** Porrás-Cerrón, J.C. 2016. Comparación de pruebas de normalidad multivariada. *Anales científicos* **77**(2): 141-146.
- 211.** Prabhakar, P. K. y Double, M. (2008). Mechanism of action of medicinal plants towards Diabetes mellitus: A Review. *RPMP Phytopharmacology and Therapeutic Values IV* **22**: 187-210.

- 212.** Provan, J., Glendinning, K., Kell, R. y Maggs, C. (2013). Levels and patterns of population genetic diversity in the red seaweed *Chondrus crispus* (Florideophyceae): a direct comparison of single nucleotide polymorphisms and microsatellites. *Biological Journal of the Linnean Society* **108**: 251-262.
- 213.** Puglielli, G., Crescente, M.F., Frattaroli, A.R. y Gratani, L. (2015). Morphological, anatomical and physiological leaf traits plasticity of *Sestertia nitida* (Poaceae) in open vs shared conditions. *Polony Journal Ecology* **63**: 10-22.
- 214.** Rainey, D.Y. Mitton, J.B. y Monson, R.K. (1987). Associations between enzyme genotype and dark respiration in perennial ryegrass, *Lolium perenne* L. *Oecologia* **74**: 335-338.
- 215.** Rajanaidu, N., Kushairi, A., Rafii, M. et al. (2000). Oil palm breeding and genetic resources. En: Board Malaysian Palm Oil (Edts). Advances in oil palm research, 2a Edición. Malaysian Palm Oil Board, Bangi, Pp. 171–237.
- 216.** Ramanathan, T. (2000). Studies on medicinal plants Parangipettai Coast (Southeast coast of India). Tesis de doctorado. Universidad de Annamalai, India.
- 217.** Ramírez, G., Zavala, M., Pérez, J. y Zamilpa, A. (2012). In vitro screening of medicinal plants used in Mexico as antidiabetics with glucosidase and lipase inhibitory activities. *Evid Based Complement Alternative Medicine* **1**:0-6.
- 218.** Ramsay, J.O. y Silverman, B.W. (2005). Functional data analysis. 2a Edición. Editorial Springer series en estadística. New York, USA. Pp. 645.
- 219.** Rao, R.R., Tiwari, A.K., Reddy, P.P., Babu, K.S., Ali, A.Z., Madhusudana, K. y Rao, M. (2009). New furanoflavanoids, intestinal  $\alpha$ -glucosidase inhibitory and free-radical (DPPH) scavenging, activity from antihyperglycemic root extract of *Derris indica* (Lam.). *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **17**: 5170-5175. doi:10.1016/j.bmc.2009.05.051
- 220.** Requejo, A.M. y Ortega, M. (2000). Nutrí guía: Manual de nutrición clínica en atención primaria. Editorial Complutense, España.
- 221.** Revilla-Monsalve, M.C., Andrade, C.A., Palomino, G.M.A., Wiedenfeld, H., Islas, A.S. (2007). Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extracts on type 2 diabetic patients. *Journal of Ethnopharmacology* **111**: 636-640.
- 222.** Rico-Gray, V. y Palacios-Ríos, M. (1996). Leaf area variation in *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae) along a latitudinal gradient in Mexico. *Global Ecology Biogeography* **5**:30-35.

- 223.** Riddle, M.C. (2008). The transition from oral agents to combination insulin/oral therapy. En: Feinglos, M.N. y Bethel, M.A. Type 2 diabetes mellitus: An evidence based approach to practical management. Editorial Humana Press-Springer. Totowa, NJ, USA. Pp.474.
- 224.** Rogers, A. R. y Harpending, H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9(3): 552-569.
- 225.** Roig, J.T. (1988). Plantas medicinales aromáticas y venenosas de Cuba. La Habana. Editorial Científico-Técnica. 846-8.
- 226.** Román-Ramos, R., Flores-Sáenz, J.L., Partida-Hernández, G., Lara-Lemus, A. y Alarcón-Aguilar, F. (1991). Experimental study of the hypoglycemic effect of some antidiabetic plants. *Archivos de Investigación Médica*. 22(1): 87-93.
- 227.** Rosellini, D., Ferradini, N., Allegrucci, S., Capomaccio, S., Rego, D.E., Carputo, D., Reale, L. y Veronesi, F. (2013). Sexual polyploidization in *Medicago sativa* L.: Impact on the phenotype, gene transcription and genome methylation. *Genetics*
- 228.** Rozenfeld, A.F., Arnaud-Haond, S., Hernández-García, E., Eguíluz, V.M., Matías, M.A., Serrão, E.A. y Duarte, C.M. (2007). Spectrum of genetic diversity and networks of clonal populations. *Journal of the Royal Society Interface* 4: 1093-1102.
- 229.** Rubilar, M.N., Jara, C., Poo, Y., Acevedo, F., Gutierrez, C., Sineiro, J. y Shene, C. (2011). Extracts of maqui (*Aristotelia chilensis*) and murta (*Ugni molinae turcz.*): Sources of antioxidant compounds and  $\alpha$ -Glucosidase/ $\alpha$ -amylase inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 1630-1637.
- 230.** Rzedowski, J. (1973). Geographical relationships of the flora of Mexican dry regions. En: Graham A. Ed. Vegetation and Vegetational History of Northern Latin America, pp. 61-72, Elsevier Science Publication Company, Amsterdam.
- 231.** Rzedowski, J. y Calderón, G. (1993). Datos sobre la dinámica de la flora fanerógama del Valle de México, con énfasis en especies nativas, raras, en peligro de extinción y aparentemente extintas. *Acta Botánica Mexicana* 25: 81-108.
- 232.** Sahoo, N., Manchikanti, P. y Dey, S. (2010). Herbal drugs: Standards and regulation *Fitoterapia* 82: 462-471.
- 233.** Sancheti, S., Sancheti, S. y Seo, S.Y. (2009). Chaenomeles sinensis: A potent  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucosidase inhibitor. *American Journal of Pharmacology and Toxicology* 4(1):8-11.

- 234.** Sánchez-Hernández, C. y Gaytán-Oyarzún, J.C. (2006). Two mini-preparation protocols to DNA extraction from plants with high polysaccharide and secondary metabolites. *American Journal of Biotechnology* 5(20): 18864-1867.
- 235.** SAS (2007). JMP statistics and graphics guide, SAS Institute, Cary, North Carolina, USA.
- 236.** Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugowara, M. y Iseki, K. (2011). In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmacology* 403: 136-138.
- 237.** Scapin, G. (2008). Structural biology and molecular modeling in the design of novel DPP-4 inhibitors. En: From molecules to medicine: Structure of biological macromolecules and its relevance in combating new diseases and bioterrorism. Sussman, J.L. y Spadon, P. (Edts.). Editorial Springer. Pp. 251.
- 238.** Scarano, F.R. Duarte, H.M., Rôças, G., Barreto, S.M.B., Amado, E.F., Reinert, F., Wendt, T., Mantovani, A., Lima, H.R.P. y Barros, C.F. (2002). Acclimation or stress symptom? An integrated study of intraspecific variation in the clonal plant *Aechmea bromeliifolia*, a widespread CAM tank-bromeliad. *Botanical Journal of the Linnean Society* 140: 391-401.
- 239.** Scully, T. (2012). Diabetes in numbers. *Nature* 485: S2-S3.
- 240.** Secretaría de Salud y Servicios de Salud de Hidalgo. (2011-2016). Actualización del Programa Sectorial de Salud. Gobierno del Estado de Hidalgo. 120 pp.
- 241.** Shai, L.J., Masoko, P., Mokgotho, M.P., Magano, S.R., Mogale, A.M., Boaduo, N. y Eloff, J.N. (2010). Yeast alpha glucosidase inhibitory and antioxidant activities of six medicinal plants collected in Phalaborwa, South Africa. *South African Journal of Botany* 76: 465-470.
- 242.** Shanmukha, I., Abubaker, S., Prabhu, K. y Ramachandra-Setty, S. (2012). Effect of *Tecoma stans* leaves extract on experimentally induced renal injury in various animal models. *American Journal of PharmTech Research* 2(6): 779-809.
- 243.** Sharma, R.K. y Arora, R.(Edts.) (2006). Herbal drugs: A twenty first century perspective. Jaypee Brothers Medical Publishers (P). New Delhi, India. Pp.688.
- 244.** Shori, A.B. (2015). Screening of antidiabetic and antioxidant activities of medicinal plants. *Journal Integral Medicine* 13(5): 297–305. Doi: 10.1016/S2095-4964(15)60193-5.
- 245.** Singab, A.N., Youssef, F.S. y Ashour, M.L. (2014). Medicinal Plants with Potential Antidiabetic Activity and their Assessment. *Medicinal and Aromatic Plants* 3(1): 151-163.

- 246.** Sivasothy, Y., Yong, L.K., Hoong, L.K., Litaudon, M. y Awang, K. (2015). A potent alpha-glucosidase inhibitor from *Myristica cinnamomea* King. *Phytochemistry* xx: xxxx-xxx.
- 247.** Smith, R.W. (1941). The phyllotaxis of *Costus* from standpoint of development. *P. Leed. Phil. Lit. Soc.* **4**: 42-43.
- 248.** Specht, C.D., Kress, W.J., Stevenson, D.W. y Desalle, R. (2001). A molecular phylogeny of Costaceae (Zingiberales). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **21**: 333-345.
- 249.** Statsoft. (2007). STATISTICA for Windows. Manual version 7.0 Statsoft, Tulsa, Oklahoma, USA.
- 250.** Steven, J.C., Delph, L.F. y Brodie, E.D. (2007). Sexual dimorphism in thee quantitative genetic architecture of floral, leaf and allocation traits in *Silene latifolia*. *Evolution* 61(1): 42-57.
- 251.** Suárez, F. (1996). Reconciliación con la naturaleza. *Avances en Medicina* 3(7):56
- 252.** Subramoniam, A. (2003). Pharmacological evaluation in herbal drug development. In: GMP for Botanicals. Verpoorte, R. and Mukherjee, P.K. (Eds). Business Horizons, New Delhi, pp 321–330.
- 253.** Subramoniam, A. (2014). An overview of present scenario, challenges and future perspectives in plant based medicine development. *Annales of Phytomedicine* **3**: 31–36.
- 254.** Subramoniam, A. (2016). Plants with Anti-Diabetes Mellitus Properties. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor and Francis. Pp.390.
- 255.** Sujatha, S. y Shalin, J. (2012). Complementary therapeutic potential: A focus on polyherbal products for hyperglycemia. *Asian Journal of Scientific Research* 5 (1): 1-13.
- 256.** Sullivan, J., Markert, J.A., y Kilpatrick, C.W. (1997). Phylogeography and molecular systematics of the *Peromyscus aztecus* species group (Rodentia: Muridae) inferred using parsimony and likelihood. *Systematic. Biology* **46**: 426–440.
- 257.** Sultan, S.E. y Spenser, H.G. (2002). Metapopulation structure favors plasticity over local adaptation. *The American Naturalist* 160(2): 1-13.
- 258.** Surget-Groba, Y. y Kay, K. (2013). Restricted gene flow within and between rapidly diverging Neotropical plant species. *Molecular Ecology* doi: 10.1111/mec.12442.

- 259.** Tag, H., Kalita, P., Dwivedi, P. y Das, A.K. (2012). Herbal medicines used in the treatment of diabetes mellitus in Arunachal Himalaya, northeast, India. *Journal of Ethnopharmacology* **141**: 786-795.
- 260.** Tagami, T., Okuyama, M., Nakai, H., Kim, Y.M., Mori, H., Taguchi, K., Svensson, B. y Kimura, A. (2013). Key aromatic residues at subsites +2 and +3 of glycoside hydrolase family 31  $\alpha$ -glucosidase contribute to recognition of long-chain substrates. *Biochimica et Biophysica Acta: Proteins and Proteomics* **1834**: 329-335.
- 261.** Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**: 585-595.
- 262.** Tchamgoue, A.D., Tchokouaha, L.D.Y., Tarkang, P.A., Kulate, J.R. y Agbor, G.A. (2015). Costus afer possesses carbohydrate hydrolyzing enzymes inhibitory activity and antioxidant capacity in vitro. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine* **2015**: 987984.Pp.10.
- 263.** Teer-Braak, C.J.F. (1986). Canonical correspondence analysis: A new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology* **67(5)**: 1167-1179.
- 264.** Thompson, J.D. (1991). Phenotypic plasticity as a component of evolutionary change. *Trends in Ecology and Evolution* **6(8)**: 246-249.
- 265.** Tolman, K.G. y Chandramouli, J. (2003). Hepatotoxicity of the thiazolidinediones clinical. *Liver Diseases* **7**: 369-379.
- 266.** Torres, G. F., Paz, M.G. y Zapata, L.M. (2013). Las plantas pueden ser fuente de compuestos antidiabéticos que aún no han sido científicamente válidos. *Ciencia y Salud* **1(3)**: 11-18.
- 267.** Tovar-Sánchez, E. y Oyama, K. (2004). Natural hybridization and hybrid zones between *Quercus crassifolia* and *Quercus crassipes* (Fagaceae) in Mexico: Morphological and molecular evidence. *American Journal of Botany* **91(9)**: 1352-1363.
- 268.** Trinh, B.T.H., Staerk, D. y Jäger, A.K. (2016). Screening for potential  $\alpha$ -amylase inhibitory constituents from selected Vietnamese plant used to treat type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* **186**: 189-195.

- 269.** Trojan-Rodrigues, M., Alvesa, T.L.S., Soaresa, G.L.G. y Ritter, M.R. (2012). Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* **139**:155-163.
- 270.** Tyagi, A., Singh, S., Mishra, P., Singh, A., Tripathi, A.M., Jena, S.N. y Roy, S. (2016). Genetic diversity and population structure of *Arabidopsis thaliana* along an altitudinal gradient. *AoB PLANTS* **8**: plv145. Doi:10.1093/aobpla/plv145.
- 271.** Uribe-Salas, D., Sáenz-Romero, C., González-Rodríguez, A., Téllez-Valdéz, O. y Oyama, K. (2008). Foliar morphological variation in the White oak *Quercus rugosa* Née (Fagaceae) along latitudinal gradient in Mexico: Potential implications for management and conservation. *Forest Ecology and Management* **256(12)**: 2121-2126.
- 272.** Valencia, S. y Delgado, A. (2003). Los tricomas foliares en la caracterización de un grupo de especies del género *Quercus*, sección Lobatae (Fagaceae). *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica* **74**: 5-15.
- 273.** Valladares, F. (2003). Light Heterogeneity and plants: from ecophysiology to species coexistence and biodiversity. *Progress in Botany* **64**: 439-471.
- 274.** Valladares, F., Chico, J.M., Aranda, I., Balaguer, L., Dizengremel, P. y Manrique, E., (2002). The greater sapling high-light tolerance of *Quercus robur* over *Fagus sylvatica* is linked to a greater physiological plasticity. *Trees* **16**: 395–403.
- 275.** Valladares, F., Skillman, J.B. y Pearcy, R.W. (2000). Convergence in light capture efficiencies among tropical forest understory plants with contrasting Crown architectures: a case of morphological compensation. *American Journal of Botany* **89(8)**:1275-1284.
- 276.** van Dam, R.M. (2006). Coffee and type 2 diabetes: from beans to beta-cells. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **16(1)**: 69–77. Doi:10.1016/j.numecd.2005.10.003
- 277.** Van de Laar, F.A., Lucassen, P.L. y Akkermans, R.P. (2005). A-glucosidase inhibitors for patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **28**:166-175.
- 278.** Van, D.W.E. y Dorken, M.E. (2012). Trade-offs between clonal and sexual reproduction in *Sagittaria latifolia* (Alismataceae) scale up to affect the fitness of entire clones. *New Phytologist* **196**: 606-616.



- 279.** Vega-Vela, N., Delgado, A, W.A., Chacón, S, M.I. (2013). Genetic structure and essential of the aromatic shrub *Lippia origanoides* (Verbenaceae) in two populations from northern Colombia. *Agronomía Colombiana* 31(1): 7-17.
- 280.** Villaseñor, J.L. y Espinosa G., F.J. (1998) Catálogo de Malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México y Fondo de Cultura Económica. México, D.F. 449 pp. ISBN 968-16-5878-7
- 281.** Villavicencio-Nieto, M.A. y Pérez-Escandón, B.E. (2013). Plantas medicinales del estado de Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México. Pp.254.
- 282.** Villavicencio-Nieto, M.A., Pérez-Escandón, B.E. y Mendoza, D.E. (2008). Citotoxicidad en células Hela de extractos de tres especies de plantas medicinales de Hidalgo, México. *Polibotánica* 26: 137-147.
- 283.** Volpato, G.T., Damasceno, DC., Calderon, IMP., Rudge, M.V.C. (2002). Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do diabetes mellitus. *Revista Brasileira of Planta Medica* 4: 35-45.
- 284.** Vovides, A.P. (1994). Familia Costaceae. *Flora de Veracruz* 78:1-13.
- 285.** Wagner, H. (2011). Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia* 82: 34–37.
- 286.** Wang, G. y Gao, F. (2004): Effects of soil water content on nutrient uptake and allocation of baldcypress. *Forest Research* 17 (2): 213–219
- 287.** Wang, M., Lamers, R.J.A., Korthout, H.A.A.J., van Nesselrooi, J.H.J., Witkam, R.F., van der Heijden, R., Voshol, P.J., Havekes, L.M., Verpoorte, R. y van der Greef, J. (2005). Metabolomics in the context of systems biology: Bridging traditional Chinese medicine and molecular pharmacology. *Phytotherapy Research* 19: 173-182.
- 288.** Wei, N. y Dick, C.W. (2014). Characterization of twenty-six microsatellite markers for the tropical Pioneer tree species *Cecropia insignis* Liebm (Urticaceae). *Conservation Genetics Resources* 6: 987-989.
- 289.** Weidema, I.R., Magnussen L.S. y Philipp, M. (2000). Gene flow and mode of pollination in a dry grassland species, *Filipendula vulgaris* (Rosaceae). *Heredity* 84 (3), 311–320.

- 290.** Wheelwright, N.T., Sinclair, J.P., Hochwender, C. y Janzen, F.J. (2012). Leaf size in three generations of a dioecious tropical tree, *Ocotea tenera* (Lauraceae): sexual dimorphism and changes with age. *American Journal of Botany* **99**(8): 1350-1355.
- 291.** Whiting, D.R., Guariguato, L., Weil, C. y Shaw, J.L. (2011). IDF Diabetes atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice* **94**: 311-321.
- 292.** Winkelman, M. (1986). Frequently used medicinal plants in Baja California Norte. *Journal of Ethnopharmacology* **18**: 109-131.
- 293.** Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics* **16**: 97-159.
- 294.** Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Ann.Eugen.* **15**: 323-354.
- 295.** Wright, S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* **19**: 395-420.
- 296.** Wright, S. (1978). Evolution and the genetics of populations: Variability within and among Natural Populations Vol. 4. University of Chicago Press: Chicago, IL.
- 297.** Wu, Y.Z., Zhu, L.H., Xiao, M., Hu, X.P., Zeng, X.Y., Chen, X.H. y Hu, S.L. (2000). The comparison of the chemical components in different habitat. *Zhong Yao Cai* **23**: 616-618.
- 298.** Xu, F., Guo, W., Xu, W. y Wang, R. (2008). Habitat effects on leaf morphological plasticity in *Quercus acutissima*. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* **50**(2): 19-26.
- 299.** Yamamoto, T., Unno, T., Watanabe, Y., Yamamoto, M., Okuyama, M., Mori, H., Chiba, S. y Kimura, A. (2004). Purification and characterization of *Acremonium implicatum*  $\alpha$ -glucosidase having regioselectivity for  $\alpha$ -1,3-glucosidic linkage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Proteins and Proteomics* **1700**: 189-198.
- 300.** Yang, J. (2012). Systematical analysis of the application of Chinese traditional medicine informatics to diabetes proved recipes. *Diabetes Research and Clinical Metabolism* **2050**:1-10.
- 301.** Yeh, F., Yang, R.C. y Boyle, T. (1999). POPGENE. The user-Friendly shareware for population genetic analysis. Molecular and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton.
- 302.** Zar, J.H. (1999). Biostatistical analysis. 4a edición. Editorial. Prentice Hall. Englewood Cliff, New Jersey, USA.

- 303.** Zavala-Mendoza, D., Alarcón, A.J., Pérez, G.S., Escobar, V.MC. y Zavala, S. MA. (2013). Composition and antidiarrheal activity of *Bidens odorata* Cav. *Evidence-Based complementary and Alternative Medicine* **2013**: 1-7.
- 304.** Zhang, Q.D., Jia, R.Z., Meng, C., Ti, C. W. y Wang, Y.L. (2015) Diversity and population structure of a dominant deciduous tree based on morphological and genetic data. *AoB PLANTS* **7**: plv103; Doi:10.1093/aobpla/plv103.
- 305.** Zhang, R., Yao, Y., Wang, Y., y Ren, G. (2011). Antidiabetic activity of isoquercetin in diabetic KK-Ay mice. *Nutrition y Metabolism* **85(8)**: 1-6.

## **ANEXOS**

### **Anexo 1. Protocolo de extracción de DNA genómico a partir de muestras vegetales.**

Las muestras fueron pretratadas con 2 ml de NaCl<sub>2</sub> 500mM por una hora y se dejó secar a temperatura ambiente. La extracción de DNA se realizó de la siguiente manera:

1. En un mortero colocar 200 mg de tejido vegetal y macerar con nitrógeno líquido, adicionar 900 µl de buffer de Carlson (precalentado a 65°C), agregar 50 µl de β-mercaptoetanol, adicionar 10 µl de RNAasa y homogeneizar la muestra durante dos o tres minutos, pasar la muestra a un tubo de 2.0 ml y dejar las muestras en hielo hasta finalizar la extracción.

2. Mezclar la muestra antes de incubar.

3. incubar las muestras a 65°C durante 20 minutos (agitando constantemente) y dejar enfriar a temperatura ambiente por ocho minutos.

4. Extraer la muestra con 900 µl de solución cloroformo-octanol proporción (24:1) y centrifugar a 9,000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante (fase de arriba que contiene el DNA) se transfiere a un tubo nuevo de 2 ml y se repite este paso.

5. La fase acuosa (arriba) se transfiere a un tubo estéril de 2 ml y se adicionan 500 µl de agua estéril y se ajusta el pH a 7 con HCl al 20% (con tiras de papel tornasol).

6. Transferir la muestra a una columna de DNasy (columna blanca) pipeteando 650 µl cada vez y centrifugar por un minuto a 9,000 rpm y desechar la fase líquida cuidando que la columna esté libre de líquido. Repetir este procedimiento hasta que sea transferida toda la muestra por la columna.

7. Cambiar la columna DNasy a un tubo de colección y adicionar 500 µl del buffer AW y centrifugar por dos minutos a 9,000 rpm, verificando que la muestra esté libre de alcohol (se recomienda tirar la fase líquida cada vez que se lave la muestra). Repetir el lavado con 500 µl de buffer AW y centrifugar durante dos minutos a 14,000 rpm.

8. Transferir la columna DNasy a un tubo estéril de 1.5 ml y adicionar 50 µl de buffer AE precalentado a 65°C directamente en la membrana de DNasy. Encubar durante cinco minutos a temperatura ambiente, posteriormente centrifugar un minuto a 8,000 rpm. Repetir la elución con 50 µl de buffer AE.

9. Adicionar 200 µl de agua estéril.

- 10.** Extraer la muestra con 300  $\mu$ l de solución cloroformo-octanol proporción (24:1) y centrifugar a 9,000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante (fase de arriba que contiene el DNA) se transfiere a un tubo estéril de 2 ml y se repite este paso.
- 11.** Transferir la fase acuosa a un tubo estéril de 1.5 ml, se adiciona 65  $\mu$ l de acetato de sodio 3M y 600  $\mu$ l de isopropanol, mezclar gentilmente e incubar a -20°C por toda la noche.
- 12.** Centrifugar a 14,000 rpm por 15 minutos, se tira toda la fase líquida y se adiciona 1.2 ml de etanol absoluto, centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos.
- 13.** Lavar el botón de DNA con 1.2 ml de etanol al 70% y centrifugar por un minuto a 5,000 rpm.
- 14.** Dejar secar el botón en la campana por 15 minutos, adicionar 85  $\mu$ l de agua destilada estéril para PCR, y mezclar gentilmente, congelar la muestra para su posterior uso a -20°C.

**Anexo 2.** Frecuencias alélicas por locus en las tres poblaciones de *Costus scaber*.

| Locus                  | Alelo | El Río | La Calavera | Cantarranas |
|------------------------|-------|--------|-------------|-------------|
| <b><i>cdi4g6</i></b>   | 1     | 0.500  | ***         | 0.063       |
|                        | 2     | ***    | 0.375       | 0.188       |
|                        | 3     | ***    | ***         | 0.25        |
|                        | 4     | 0.150  | ***         | 0.125       |
|                        | 5     | 0.150  | 0.125       | ***         |
|                        | 6     | ***    | 0.063       | 0.063       |
|                        | 7     | ***    | 0.438       | 0.125       |
|                        | 8     | 0.200  | ***         | 0.188       |
| <b><i>ncdi8a</i></b>   | 1     | 0.050  | ***         | ***         |
|                        | 2     | 0.150  | 0.250       | 0.125       |
|                        | 3     | 0.050  | 0.375       | 0.125       |
|                        | 4     | ***    | ***         | 0.125       |
|                        | 5     | 0.100  | 0.125       | ***         |
|                        | 6     | 0.100  | 0.250       | 0.125       |
|                        | 7     | 0.050  | ***         | 0.25        |
|                        | 8     | 0.250  | ***         | ***         |
|                        | 9     | ***    | ***         | 0.125       |
|                        | 10    | 0.200  | ***         | 0.125       |
|                        | 11    | 0.050  | ***         | ***         |
| <b><i>ceTri2d9</i></b> | 1     | 0.050  | 0.429       | 0.063       |
|                        | 2     | 0.050  | ***         | ***         |
|                        | 3     | 0.250  | 0.071       | 0.125       |
|                        | 4     | ***    | 0.214       | 0.313       |
|                        | 5     | 0.250  | ***         | 0.250       |
|                        | 6     | 0.200  | 0.071       | 0.125       |
|                        | 7     | 0.150  | 0.214       | ***         |
|                        | 8     | 0.050  | ***         | 0.125       |

**Anexo 3.** ACC factor de estructura entre variables morfológicas y genéticas (A), entre variables geográficas y morfológicas (B) de *C. scaber*.

**A**

| Factor de estructura matriz izquierda |       |        |        |
|---------------------------------------|-------|--------|--------|
| Locus                                 | CC 1  | CC 2   | CC 3   |
| cdi4g6                                | 0,928 | -0,308 | 0,208  |
| ncdi8a10                              | 0,775 | 0,537  | -0,334 |
| cetri2d9                              | 0,643 | 0,446  | 0,622  |
| Varianza                              | 0,625 | 0,194  | 0,181  |
| Redundancia                           | 0,280 | 0,029  | 0,009  |
| Factor de estructura matriz derecha   |       |        |        |
| Variable                              | CC 1  | CC 2   | CC 3   |
| LP                                    | 0,478 | 0,222  | -0,173 |
| DP                                    | 0,726 | -0,323 | -0,201 |
| LL                                    | 0,626 | -0,295 | -0,007 |
| AnCh. Max                             | 0,664 | -0,531 | -0,018 |
| L1/3 B                                | 0,682 | -0,561 | -0,074 |
| L1/3 A                                | 0,807 | -0,402 | -0,226 |
| DVM                                   | 0,317 | -0,514 | -0,176 |
| NVxlob                                | 0,868 | -0,164 | 0,315  |
| %inhibición                           | 0,027 | -0,153 | -0,074 |
| Varianza extr                         | 0,446 | 0,161  | 0,032  |
| Redundancia                           | 0,200 | 0,024  | 0,002  |

**B**

| Factor de estructura matriz izquierda |        |        |        |
|---------------------------------------|--------|--------|--------|
| Variable                              | CC 1   | CC 2   | CC 3   |
| Latitud                               | 0,347  | -0,515 | -0,784 |
| Longitud                              | -0,809 | 0,266  | -0,524 |
| Altitud                               | -0,324 | 0,548  | -0,771 |
| Varianza                              | 0,293  | 0,212  | 0,494  |
| Redundancia                           | 0,189  | 0,036  | 0,014  |
| Factor de estructura matriz derecha   |        |        |        |
| Variable                              | CC 1   | CC 2   | CC 3   |
| LP                                    | -0,510 | 0,429  | 0,057  |
| DP                                    | -0,973 | 0,120  | 0,098  |
| LL                                    | -0,644 | 0,051  | -0,376 |
| AnCh. Max                             | -0,818 | 0,037  | -0,137 |
| L1/3 B                                | -0,856 | 0,041  | -0,205 |
| L1/3 A                                | -0,782 | 0,078  | -0,250 |
| DVM                                   | -0,694 | -0,263 | 0,077  |
| NVxlob                                | -0,832 | -0,173 | -0,373 |
| %inhibición                           | -0,107 | 0,549  | -0,424 |
| Varianza                              | 0,536  | 0,068  | 0,067  |
| Redundancia                           | 0,346  | 0,012  | 0,002  |

**Anexo 4.** Frecuencias alélicas por locus en las poblaciones silvestres (CMañeca, Atempa y El Arenal) y cultivadas o huertos (Hue) (Hue i, Hue ii, Hue iii y Hue iv) de *T. stans*.

| Locus         | Alelo | C. Mañeca | Atempa | El Arenal | Hue i | Hue ii | Hue iii | Hue iv |
|---------------|-------|-----------|--------|-----------|-------|--------|---------|--------|
| <b>Jacc22</b> | 1     | 0.150     | 0.050  | 0.150     | ***   | ***    | ***     | ***    |
|               | 2     | 0.050     | 0.100  | ***       | ***   | 0.100  | ***     | ***    |
|               | 3     | 0.150     | 0.300  | ***       | ***   | ***    | ***     | ***    |
|               | 4     | ***       | ****   | 0.150     | ***   | ***    | ***     | ***    |
|               | 5     | 0.050     | 0.050  | 0.200     | ***   | ***    | ***     | ***    |
|               | 6     | ***       | ***    | 0.050     | 0.200 | 0.200  | 0.300   | ***    |
|               | 7     | ***       | ***    | 0.150     | ***   | ***    | 0.100   | 0.400  |
|               | 8     | 0.150     | 0.050  | 0.050     | 0.600 | 0.100  | ***     | 0.600  |
|               | 9     | ***       | ***    | ***       | 0.200 | ***    | ***     | ***    |
|               | 10    | 0.100     | 0.100  | 0.050     | ***   | 0.600  | 0.200   | ***    |
|               | 11    | 0.100     | 0.150  | 0.150     | ***   | ***    | 0.200   | ***    |
|               | 12    | 0.100     | 0.150  | 0.050     | ***   | ***    | 0.200   | ***    |
|               | 13    | 0.150     | 0.050  | ***       | ***   | ***    | ***     | ***    |
| <b>Jacc2</b>  | 1     | ***       | ***    | ***       | ***   | ***    | ***     | 0.600  |
|               | 2     | ***       | ***    | ***       | 0.200 | ***    | ***     | 0.400  |
|               | 3     | ***       | ***    | ***       | ***   | ***    | 0.200   | ***    |
|               | 4     | 0.050     | ***    | 0.313     | 0.500 | 0.100  | 0.400   | ***    |
|               | 5     | ***       | ***    | 0.063     | 0.100 | 0.400  | 0.100   | ***    |
|               | 6     | 0.700     | 0.250  | 0.188     | 0.100 | ***    | 0.200   | ***    |
|               | 7     | 0.100     | 0.350  | 0.063     | ***   | ***    | ***     | ***    |
|               | 8     | 0.100     | ***    | 0.125     | ***   | ***    | ***     | ***    |
|               | 9     | ***       | ***    | 0.125     | ***   | ***    | 0.100   | ***    |
|               | 10    | ***       | ***    | 0.125     | 0.100 | 0.100  | ***     | ***    |
|               | 11    | 0.050     | 0.050  | ***       | ***   | 0.200  | ***     | ***    |
|               | 12    | ***       | 0.100  | ***       | ***   | 0.200  | ***     | ***    |
|               | 13    | ***       | 0.250  | ***       | ***   | ***    | ***     | ***    |
| <b>Im7</b>    | 1     | 0.300     | ***    | 0.200     | 0.300 | 0.500  | 0.600   | 0.200  |
|               | 2     | 0.250     | ***    | 0.050     | 0.300 | 0.200  | 0.100   | 0.300  |
|               | 3     | 0.150     | 0.200  | 0.100     | 0.100 | 0.100  | ***     | 0.100  |
|               | 4     | 0.150     | 0.150  | 0.100     | 0.100 | 0.100  | 0.200   | 0.200  |
|               | 5     | 0.150     | 0.100  | 0.250     | 0.200 | 0.100  | 0.100   | 0.200  |
|               | 6     | ***       | 0.300  | 0.150     | ***   | ***    | ***     | ***    |
|               | 7     | ***       | 0.250  | 0.150     | ***   | ***    | ***     | ***    |



**Anexo 5.** Porcentaje de inhibición de alfa glucosidasa en las siete poblaciones de *T. stans*.

