



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO

---

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE  
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PARA OBTENER EL GRADO DE  
LICENCIADO(A) EN BIOLOGÍA

**Estudio molecular de *Peperomia* sp., registro  
nuevo de una planta comestible en la zona de los  
volcanes, Estado de México**

QUE PRESENTA EL ALUMNO (A)

**Marisol Benitez Flores**

Matrícula: 2143063121

ASESORES:

Externo:

Dr. Sol Cristians Niizawa

Interno:

M. en C. Aída Marisa Osuna Fernández

No. Económico: 18057

Ciudad de México,

a 27 de febrero de 2020

## Resumen

Los quelites, o bien, aquellas especies vegetales cuyas hojas o tallos tiernos son comestibles, ocupan un lugar destacado en el listado de plantas útiles, sin embargo, se ha registrado una disminución dramática del conocimiento y uso de éstos, debido principalmente a la desinformación e introducción de hortalizas.

En vista de las altas tasas de pérdida de biodiversidad, y debido a que la identificación de especies presenta limitaciones puesto que se basa en estructuras reproductivas que suelen estar ausentes en la etapa fenológica de consumo de los quelites, para resolver esta situación surge el enfoque del código de barras de DNA como una herramienta práctica que permite la identificación de las especies a través de partes aisladas de la planta o distintos estadios ontogénicos.

El presente trabajo se basó en la generación del código de barras molecular de distintas poblaciones de un quelite conocido popularmente como berro, proveniente de la zona de los volcanes, Estado de México. Se utilizaron cuatro marcadores moleculares de cloroplasto (*matK*, *rbcL*, *trnH-psbA* y *rpl32-trnL*) y uno nuclear (*ITS2*). La capacidad discriminativa de los marcadores se calculó mediante el análisis de distancia (*barcoding gap*) y mediante un análisis filogenético (*máxima verosimilitud*). Finalmente, se generó una propuesta de un código de barras molecular concatenando las secuencias de los marcadores *rbcL*, *trnH-psbA* e *ITS2*, lo que permite la identificación inequívoca de *Peperomia hintonii*, siendo así el primer registro etnobotánico de esta especie e incrementando la escasa información molecular existente de las plantas útiles de México.

**Palabras clave:** *Peperomia hintonii*, Piperaceae, quelite, código de barras.

# Índice

I.	Introducción .....	3
II.	Revisión de Literatura .....	4
2.1	Quelites .....	4
2.2	Familia Piperaceae .....	4
2.2.1	Género <i>Peperomia</i> .....	5
2.2.1.1	<i>Peperomia hintonii</i> Yunk.....	5
2.2.1.1.1	Descripción botánica .....	5
2.2.1.1.2	Distribución y usos.....	5
2.3	Código de barras genéticos.....	6
III.	Objetivos.....	8
3.1	Objetivo general .....	8
3.2	Objetivos particulares .....	8
IV.	Materiales y métodos.....	8
4.1	Material vegetal .....	8
4.2	Análisis molecular.....	8
4.2.1	Extracción de DNA.....	8
4.2.2	Amplificación de marcadores de DNA .....	9
4.3	Análisis de datos .....	11
V.	Resultados .....	12
5.1	Evaluación molecular .....	12
5.1.1	Extracción de DNA.....	12
5.1.2	Amplificación de marcadores de DNA .....	14
5.2	Análisis de datos .....	18
5.2.1	Análisis filogenético y de distancia.....	18
5.3	Determinación de identidad botánica .....	25
VI.	Discusión .....	27
VII.	Conclusiones .....	29
	Agradecimientos.....	30
	Referencias .....	31
	Anexos.....	37

## I. Introducción

Los “quelites”, o bien, aquellas especies vegetales cuyas hojas o tallos tiernos son comestibles, han formado parte importante de la alimentación de la población desde la época prehispánica en México. Dentro del listado de plantas útiles en la categoría de comestibles, los quelites ocupan un lugar destacado, sin embargo, se ha registrado una disminución dramática del conocimiento y uso de estos vegetales que va desde un 55 hasta un 90%, con respecto a lo que había sido documentado durante los años posteriores a la Conquista; esto responde principalmente a la preferencia por hortalizas introducidas, a la falta de interés de las nuevas generaciones por integrar estas plantas en su dieta, al abuso y uso de productos químicos y a la pérdida del hábitat (Bye y Linares, 2000; Mera-Ovando *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2011).

Aunque en México no se cuenta con un inventario regional o nacional de quelites, existen diversos trabajos etnobotánicos, artículos, reportes y tesis dispersas en los que se aborda el tema, por ejemplo: la milpa, mercados, quelites, alimentación e inventarios de plantas utilizadas por grupos originarios en distintas comunidades del país. Todo este conocimiento los ha conducido a ser reconocidos como un potencial recurso fitogenético; dicho esto, en el 2008 se formó la Red Quelites perteneciente al Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la alimentación y la Agricultura (SINAREFI). Dicha Red se centra en la revalorización cultural, nutricional, culinaria y ecológica de este recurso, y en ella se realizan estudios con el objetivo de identificar las especies utilizadas generando información acerca del tipo de distribución y consumo de algunos quelites a nivel nacional dependiendo de los aspectos culturales de cada caso particular (Basurto, 2011; Castro *et al.*, 2011; Linares y Bye, 2015; Solís *et al.*, 2016; SNICS, 2018).

El uso clásico de rasgos morfológicos para la identificación de especies puede llevar a la identificación errónea de un taxón debido a la plasticidad fenotípica del rasgo estudiado o a la existencia de taxones crípticos. Por otra parte, las claves morfológicas vegetales suelen ser efectivas para la etapa de vida con estructuras reproductivas, las cuales no suelen estar presentes en la etapa fenológica en la que se consumen la mayoría de los quelites (Valentini *et al.*, 2009). El enfoque del código de barras de DNA podría representar una solución práctica que, sin la intención de demeritar el valioso trabajo del taxónomo clásico, busca complementar y agilizar el reconocimiento de especies a una tasa mayor que el de la pérdida de la biodiversidad. Por otro lado, es también una herramienta que permite identificar distintas partes aisladas de plantas (raíces, semillas, polen, etc.), o distintos estadios ontogenéticos (etapa sexual y asexual), así como distintos géneros (plantas dioicas o monoicas); de esta manera ayuda en muchas investigaciones básicas y en los esfuerzos aplicados en la taxonomía y la identificación de las especies, así como aclarando problemas de sinonimia (Ebach y Holdrege, 2005; Hebert y Gregory, 2005; Newmaster *et al.*, 2006; Hajibabaei *et al.* 2007; Erickson *et al.*, 2008; Nock *et al.*, 2011).

Por lo anterior, en el presente trabajo se generó el código de barras molecular de diversas poblaciones del quelite conocido localmente como berro, proveniente de la zona de los volcanes en el Estado de México, buscando de esta manera dar una identidad taxonómica inequívoca a este nuevo registro de planta comestible e incrementar la información molecular de los recursos vegetales de México.

## II. Revisión de Literatura

### 2.1 Quelites

La palabra quelite deriva del náhuatl “quilitl” que significa planta cuyo follaje tierno es comestible como verdura, (Bye, 1981; Basurto-Peña *et al.*, 1998). Los quelites comprenden un grupo de plantas comestibles los cuales en general, se definen como todas las hojas, tallos, bulbos o brotes tiernos e inflorescencias inmaduras, que son consumidas de diversas formas. Éstos han formado parte de la dieta nacional desde la época prehispánica, en asociación con otros alimentos, tanto en términos de su consumo en diversos platillos, como en su producción en los agroecosistemas (Linares y Aguirre, 1992; Basurto, 2011; Castro *et al.*, 2011).

De las 25,000 especies de plantas superiores que se estiman nativas para México, alrededor de 500 son consideradas quelites, de los cuales se utilizan alrededor de 358 taxa (Mera *et al.*, 2011; Linares y Bye, 2015), mientras que otros autores sugieren 244 especies (Basurto, 2011) incluyendo especies introducidas de otras regiones del mundo (p. ej., *Malva parviflora*, *Sonchus oleraceus*, *Eruca sativa*, *Brassica* spp., por mencionar algunas), así como partes comestibles de maíz, frijol, calabaza y las especies circundantes de agroecosistemas (magueyes, nopales, yucas, entre otros).

### 2.2 Familia Piperaceae

La familia Piperaceae es considerada una de las más complejas y diversas entre las angiospermas basales (Jaramillo y Manos, 2001), se conforma por especies herbáceas perennes y en pocos casos anuales, arbustos y árboles pequeños. Se divide en cinco géneros (*Manekia*, *Verhuellita*, *Zippelia*, *Piper* y *Peperomia*, éstos dos últimos, son los géneros con mayor número de especies (Samain, 2008). Las especies del género *Piper* tienen mayor importancia a nivel económico debido que son utilizadas principalmente como recurso medicinal o condimento (Novara, 1998; Anderson y Beaman, 2004; Vergara-Rodríguez, 2013).

### 2.2.1 Género *Peperomia*

Este género comprende un gran número de especies alrededor de las regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios, sin embargo, la mayor concentración de sus especies se encuentra en Centro y Sudamérica (Jones, 1988; McKendrick, 1992; Thorne, 1992; Figuerido y Sazima, 2006). Desde que se inició la descripción del género, se han documentado alrededor de 2420 especies y 668 variedades, sin embargo, se han descartado aproximadamente 1473 debido a que son sinónimos o bien, nombres ilegítimos (Mathieu, 2007).

En México se cuenta con alrededor de 131 especies, ocupando así el quinto lugar a nivel mundial en riqueza de *Peperomia*, a pesar de esto, se han realizado pocos estudios sobre este género en especial por la gran dificultad para determinar sus especies, lo cual explica el poco conocimiento de los estudios realizados para este género (Hill, 1907; Trelease, 1922; Yuncker, 1958; Burger, 1971; Cronquist, 1981; McKendrick, 1992; Wanke *et al.*, 2006).

Las plantas de este género son usadas con fines ornamentales, o bien, algunas son aprovechadas para su consumo, por ejemplo, *P. peltimba*, *P. maculosa*, *P. maculata*, *P. bernoullii*, *P. denticularis*, *P. donaguina*, *P. rotundifolia* y *P. lenticularis* (Basurto *et al.*, 1998; Castro *et al.*, 2011; Vergara-Rodríguez y Krömer, 2011; Linares y Bye, 2015).

#### 2.2.1.1 *Peperomia hintonii* Yunk.

##### 2.2.1.1.1 Descripción botánica

*P. hintonii* es una hierba laxa, terrestre, crece en las laderas de las montañas; alcanza hasta 30 cm de alto; su tallo es débil y delgado, glabro y de un milímetro, generalmente di- o tricotómicamente ramificada. Las hojas, una a tres por nudo, a veces parecen más numerosas debido a sus ramas cortas, con frecuencia se presenta un verticilo de tres o más en el nudo inferior, cortamente pecioladas, son elípticas–ovadas, de ápice agudo y base obtusa, con un tamaño que va hasta los 12 mm de ancho y 15 mm de largo. Su inflorescencia es apicada y axilar, corta de 5 mm o menos, subsésil, pocas flores (comúnmente cuatro o cinco), flores dísticas y con un solo carpelo y dos estambres (Yuncker, 1965; Rzedowski, 2010).

##### 2.2.1.1.2 Distribución y usos

El área donde se le ha registrado está restringida a lugares sombreados y húmedos de cañadas, en bosques de *Abies* y bosques mesófilos, se le conoce en los municipios de Epazoyucan y El Chico en la Sierra de Pachuca y Amecameca en el Valle de México, fuera de éste en el municipio de Temascaltepec del Estado de México, en Michoacán y Jalisco (Yuncker, 1965; Medina *et al.*, 2000; Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2010; Rojas-Zenteno *et al.*, 2016; Martínez-De La

Cruz *et al.*, 2018). Sin embargo, no se le ha documentado en algún listado de plantas útiles en ninguna de sus categorías.

### 2.3 Código de barras genéticos

Una herramienta práctica y poderosa que permite la identificación de especies biológicas es el uso de los marcadores moleculares o códigos de barras genéticos (en inglés, “DNA barcodes”; Kress y Erickson, 2012). Éstos son secuencias cortas ortólogas de una región estandarizada del genoma, DNA, que funcionan a manera de “etiquetas” que permiten caracterizar y distinguir especies entre sí (Newmaster *et al.*, 2006; Kress *et al.*, 2005).

La investigación en códigos de barras genéticos comenzó en el ámbito de la zoología (Hebert *et al.*, 2003). Sin embargo, en un trabajo colectivo, multinacional, coordinado por el Consorcio para el Código de Barras de la Vida (CBOL), se afirmó que las secuencias génicas candidatas a ser consideradas como códigos de barras genéticos en plantas deberían contar con las siguientes características (Hollingsworth *et al.*, 2009; Erickson *et al.*, 2008; Newmaster *et al.*, 2006):

- i. Universalidad. Debe contar con loci que puedan ser rutinariamente secuenciados a través de los distintos linajes de plantas terrestres.
- ii. Calidad y cobertura. Poseer secuencias con bi-direccionalidad con ninguna, o pocas, bases ambiguas; sitios frontera que permitan usar primers universales; tener un tamaño de secuencia corto apropiado para la extracción y amplificación del DNA; al usar una aproximación multi-loci debe poder complementarse la información.
- iii. Discriminación. Uso de loci que permitan que la mayor parte de las especies vegetales sean distinguidas, mostrando un nivel significativo de variabilidad y divergencia para la región amplificada.
- iv. Bioinformática. Contar con algoritmos sencillos de alineación de la secuencia que permitan trabajar con numerosas muestras, presentando niveles altos de confianza en la asignación de especies.

El resultado de la búsqueda de la combinación adecuada de códigos de barras genéticos con las anteriores características, para su uso específico en plantas, permitió la elección de cinco candidatos principales (Kress *et al.*, 2005; Newmaster *et al.*, 2006; Shaw *et al.*, 2007; Timme *et al.*, 2007; Hollingsworth *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010; Vijayan y Tsou, 2010; Whitlock *et al.*, 2010):

- *rbcL* (subunidad mayor de RuBisCO - cloroplasto). Es el locus mejor caracterizado debido a su fácil amplificación y alineación, secuenciado para gran cantidad de especies en GenBank: universalidad, usándose solo presenta una discriminación del 85%.
- *matK* (maturasa K - cloroplasto). Se trata de un locus que evoluciona rápidamente, lo que le confiere alta discriminación, usándose solo 66%; sin embargo, su amplificación y alineación requieren bastante trabajo manual.
- *trnH-psbA* (espaciador intergénico – cloroplasto). Presenta un nivel alto de discriminación, 69% cuando se le considera solo, tiene un alto porcentaje de amplificación (93%). Es muy difícil encontrar secuencias bidireccionales y presenta bases ambiguas, y por su tamaño requiere primers específicos, debe ser alineado apropiadamente para evitar que, debido a las inversiones asociadas a secuencias palindrómicas presentes en algunos linajes de angiospermas, separe especies cercanas en los análisis.
- *rpl32-trnL* (espaciador intergénico – cloroplasto). Este locus es relativamente nuevo y poco explorado; su tamaño va desde los 543 hasta 1417 pares de bases (pb), sin embargo, ofrece una fuerte variación informativa permitiendo la identificación de especies a bajo nivel taxonómico.
- *ITS2* (segundo espaciador transcrito interno del cistrón ribosomal nuclear – núcleo). Locus con alto porcentaje de amplificación (94%), presenta alta divergencia inter-específica y una óptima tasa de discriminación de 93% entre especies, usando el método BLAST1.

A pesar del carácter consensual de la propuesta del grupo de trabajo de plantas del CBOL (Hollingsworth *et al.*, 2009), otros autores han registrado que la combinación de regiones de cloroplasto y nucleares sólo alcanzan un promedio de nivel de discriminación del 70% (p. ej., Nicolalde-Morejón *et al.*, 2011). Dicha capacidad de identificación puede ser suficiente para aplicaciones como la investigación de interacciones planta-animal, identificación de especies vegetales protegidas, estudios de biodiversidad a larga escala, identificación de plántulas en programas de regeneración forestal. Sin embargo, para lograr un nivel de discriminación mayor es esencial en estudios taxonómicos y otras aplicaciones que requieran una identificación absoluta de las especies (Vijayan y Tsou, 2010). Es posible concluir, entonces, que la combinación *rbcL* + *matK* se debe considerar como un tamiz molecular rápido que brinde una primera idea de la identidad botánica de las especies, y debe ser afinado con la codificación de otros loci; de hecho, la combinación con el locus *trnH-psbA* aumenta la discriminación a nivel de especie (en algunos grupos) hasta un 87% (p. ej., Vijayan y Tsou, 2010; Erickson *et al.*, 2008).



### **III. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo general**

Generar el código de barras molecular del quelite, *Peperomia* sp., a partir de muestras selectas de distintas poblaciones provenientes de la zona de los volcanes, Estado de México.

#### **3.2 Objetivos particulares**

- Determinar si la calidad del DNA genómico extraído de las muestras de *Peperomia* sp. permitirá la amplificación de los marcadores moleculares de cloroplasto y nuclear.
- Analizar la capacidad discriminativa de los marcadores moleculares amplificados.
- Evaluar si un solo marcador o el concatenado de estos permitirá la determinación taxonómica inequívoca a nivel de especie del quelite berro (*Peperomia* sp.).

### **IV. Materiales y métodos**

#### **4.1 Material vegetal**

Se realizó una revisión del herbario para seleccionar muestras de las hojas de *Peperomia* sp., así como de otras poblaciones de la misma zona de los volcanes. Las cuales fueron registradas y rotuladas como se muestra en el Anexo 1.

Se extrajeron un total de 36 muestras de DNA, de las cuales cinco correspondieron a individuos de *Peperomia* sp. de Amecameca (*Peperomia* 1 – 5), siete de Berro (*Peperomia* 6 – 12), cinco que ya fueron determinadas hasta el taxón especie (*Peperomia* 13 – 17), cinco que han sido registradas como pertenecientes a la familia Piperaceae (*Peperomia* 18 – 22), tres que fueron tomadas del invernadero (*Peperomia* 23 – 25), cinco que fueron muestreadas en H1 Chico (*Peperomia* 26 – 30), cinco más que se tomaron en H2 Corral (*Peperomia* 31 – 35) y una registrada en PPA Hq.r 394 (*Peperomia* 36) (Anexo1).

#### **4.2 Análisis molecular**

##### **4.2.1 Extracción de DNA**

El DNA se extrajo de las hojas de las muestras seleccionadas utilizando el kit comercial Plant DNeasy Mini Kit (QIAGEN), haciendo algunas modificaciones del método propuesto por el fabricante:

1. De cada muestra se pesaron 20 mg de tejido foliar, el cual se congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$ , para poder ser pulverizado en TissueLyser (QIAGEN) a 50 oscilaciones por minuto durante 2 min.
2. Centrifugación por 13 seg a 8000 g, posteriormente, se agregaron 400  $\mu\text{L}$  de Buffer AP1 y 4  $\mu\text{L}$  de RNAsa, y se incubaron 15 min a  $65^{\circ}\text{C}$ , mezclando en vortex cada 3 min.
3. Se añadieron 130  $\mu\text{L}$  de Buffer P3, se homogenizó en vortex e incubó en hielo por 5 min y se centrifugó 5 min a 16873 g.
4. Se transfirieron 450  $\mu\text{L}$  de sobrenadante a la columna lila (para retener la mayoría de los precipitados y restos celulares) y se centrifugó por 2 min a 16873 g.
5. El filtrado se transfirió a un tubo eppendorf de 2 mL, al cual se le agregaron 1.5 volúmenes de Buffer AW1 (675  $\mu\text{L}$ ) y se homogenizó por pipeteo.
6. Se transfirieron 650  $\mu\text{L}$  a la columna transparente (la cual retendrá el DNA) y se centrifugó por 2 min a 16873 g. Este paso se repitió con el resto de la muestra, y la columna se colocó en un nuevo tubo de colecta.
7. Se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de Buffer AW2 y centrifugó 1 min a 8000 g, se descartó el filtrado y se añadieron otros 500  $\mu\text{L}$  de Buffer AW2 y centrifugó por 5 min a 16873 g.
8. La parte superior de la columna se transfirió a un nuevo tubo eppendorf, se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de Buffer AE e incubó por 15 min a temperatura ambiente, y se centrifugó 1 min a 8000 g.
9. Por último, se agregaron otros 75  $\mu\text{L}$  de Buffer AE e incubó otros 15 min a temperatura ambiente, y se centrifugó por 1 min a 8000 g. Las extracciones se almacenaron a  $-4^{\circ}\text{C}$ .

La calidad y concentración de DNA se cuantificó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) mediante la medición de la absorbancia a 260 y 280 nm; de manera adicional, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

#### **4.2.2 Amplificación de marcadores de DNA**

La amplificación de DNA se llevó a cabo usando los marcadores moleculares de cloroplasto sugeridos por el CBOL: *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*, *rpL32-trnL*, y el marcador nuclear: *ITS2* (Kress y Erickson, 2012) (Cuadro 1). Cada marcador molecular contó con sus propias condiciones de concentración de reactivos y de programación en el termociclador para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Cuadros 2 y 3).

**Cuadro 1.** Marcadores moleculares usados para la evaluación molecular.

Región	Descripción	Primer	
		Forward	Reverse
<i>matK</i>	Maturasa K – cloroplasto	<i>marK-KIM 1R</i> ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC	<i>matK-KIM 3F</i> CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG
<i>rbcL</i>	Subunidad mayor de RuBisCo – cloroplasto	<i>rbcLa-F</i> ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	<i>rbcLa-R</i> GTAAAATCAAGTCCACCRCG
<i>rpl32-trnL</i>	Espaciador intergénico – cloroplasto	<i>rpl32-F</i> CAGTTCCAAAAAACGTACTTC	<i>trnL<sup>(UAG)</sup></i> CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT
<i>trnH-psbA</i>	Espaciador intergénico – cloroplasto	<i>trnH2</i> CGCGCATGGTGGATTACAATCC	<i>psbAF</i> GTTATGCATGAACGTAATGCTC
<i>ITS2</i>	Segundo espaciador transcrito interno del cistrón ribosomal nuclear – núcleo	<i>ITS-S2F</i> ATGCGATACTTGGTGTGAAT	<i>ITS-S3R</i> GACGCTTCTCCAGACTACAAT

**Cuadro 2.** Concentraciones finales para la amplificación de los distintos marcadores moleculares.

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

La PCR se realizó usando un volumen final de 30  $\mu$ L, ajustando con agua grado molecular, para los cinco marcadores. Cada marcador contó con sus propias condiciones de temperatura y tiempo en el termociclador (Cuadro 3). La amplificación se efectuó en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Norwalk, CT, USA).

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

Etapas de la PCR	matK y rbcL			rpl32-trnL			trnH-psbA			ITS2		
		°C	Tiempo		°C	Tiempo		°C	Tiempo		°C	Tiempo
Etapa previa de desnaturalización		94	2 min		95	2 min		94	2 min		95	5 min
Desnaturalización		94	30 seg		94	45 seg		94	30 seg		94	30 seg
Alineamiento	29 ciclos	52	40 seg	35 ciclos	53	45 seg	40 ciclos	55	40 seg	40 ciclos	56	30 seg
Extensión		72	40 seg		72	1.30 min		72	40 seg		72	45 seg
Etapa posterior a la extensión		72	5 min		72	8 min		72	5 min		72	1 min
Preservado		5	$\infty$		5	$\infty$		5	$\infty$		5	$\infty$

Después de la amplificación, los productos del PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1% marcado con Midori Green Advance (NIPPON Genetics EUROPE).

Los productos de PCR se secuenciaron utilizando un analizador de DNA 3730xL con 96 en la detección capilar mediante iluminación dual.

### 4.3 Análisis de datos

Las secuencias de DNA se editaron usando el software de análisis de secuencia DNA Dynamo (Blue Tractor Software, NorthWales, UK). Las bases con calidad baja o discordancias entre las cadenas se editaron manualmente para generar las secuencias consenso, la identidad taxonómica de las secuencias consenso se verificó comparando la base de datos del GenBank (NCBI) mediante la herramienta de búsqueda Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Las secuencias editadas se enviaron al GenBank.

Los análisis filogenéticos se realizaron con las secuencias consenso para cada marcador, utilizando el método estadístico de máxima verosimilitud (ML) mediante el modelo de sustitución de nucleótidos idóneo, debido a su nivel de criterio de información bayesiano más bajo. Para la prueba de filogenia, se aplicó una prueba del método Bootstrap. Todos los análisis filogenéticos y de ensamblaje de árboles se realizaron en el software MEGA X (Tamura *et al.*, 2013), y los árboles se editaron utilizando la herramienta de dibujo de figuras de árboles FigTree v.1.4.2 (Institute of Evolutionary Biology, University of Edimburgh, UK).

El análisis de distancia del código de barras (barcoding gap) se realizó mediante el método de descubrimiento automático de la distancia del código de barras (ABGD) (Puillandre *et al.*, 2012) para detectar una distancia significativa en el código de barras entre la variación intra e interespecífica y predecir la mejor división del conjunto de datos en especies candidatas. La distancia se midió mediante la distribución de las diferencias por pares utilizando el modelo JC69 Jukes-Cantor. Se analizaron las capacidades de identificación de especies de cada marcador molecular y la secuencia concatenada.

## V. Resultados

### 5.1 Evaluación molecular

#### 5.1.1 Extracción de DNA

De las 36 muestras que se extrajeron, en general, se obtuvieron concentraciones de DNA con cocientes de pureza ( $A_{260}/A_{280}$ ) y contaminación ( $A_{260}/A_{230}$ ) dentro, o bien, ligeramente fuera de los rangos aceptados (pureza: 1.8 – 2 y contaminación: 2 – 2.2), a excepción de las muestras “Peperomia 15 y 16” (Cuadro 4 y Anexo 1).

**Cuadro 4.** Cuantificación de DNA total extraído de las muestras de *Peperomia* sp. a partir de muestras selectas de distintas poblaciones provenientes de la zona de los volcanes, Estado de México.

Muestras	Concentración de DNA (ng/ $\mu$ L)	Cociente de pureza $A_{260}/A_{280}$	Cociente de contaminación $A_{260}/A_{230}$
Peperomia 1	70.4	2.00	2.56
Peperomia 2	71.0	1.95	2.48
Peperomia 3	128.6	2.00	2.35
Peperomia 4	81.2	2.00	2.22

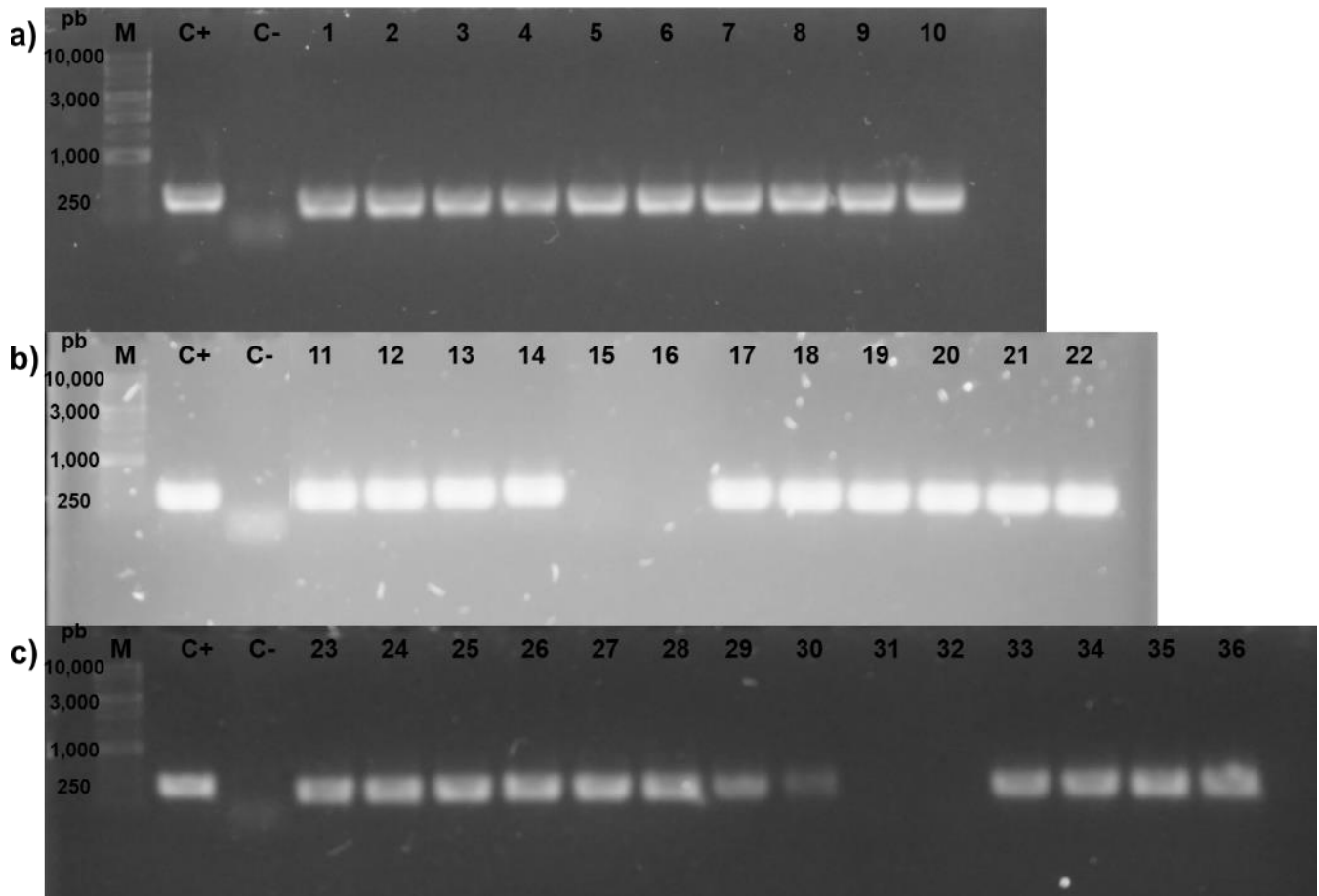
Peperomia 5	66.0	2.00	2.61
Peperomia 6	220.2	2.05	2.28
Peperomia 7	88.3	1.97	2.55
Peperomia 8	53.9	1.90	2.66
Peperomia 9	58.2	1.92	2.26
Peperomia 10	41.0	1.88	2.09
Peperomia 11	48.6	1.90	2.15
Peperomia 12	45.6	1.86	1.97
Peperomia 13	65.2	1.71	1.14
Peperomia 14	30.1	1.91	2.80
<b>Peperomia 15</b>	<b>265.0</b>	<b>1.21</b>	<b>0.32</b>
<b>Peperomia 16</b>	<b>175.5</b>	<b>1.21</b>	<b>0.36</b>
Peperomia 17	26.6	1.93	2.20
Peperomia 18	54.7	1.89	2.13
Peperomia 19	53.3	1.87	1.26
Peperomia 20	51.5	1.91	1.35
Peperomia 21	120.1	1.99	2.25
Peperomia 22	153.2	1.99	2.16
Peperomia 23	58.4	1.96	2.31
Peperomia 24	41.7	1.95	2.84
Peperomia 25	45.6	1.97	2.90
Peperomia 26	92.2	1.96	2.22
Peperomia 27	78.3	1.92	2.41
Peperomia 28	89.2	1.96	2.45

Peperomia 29	99.0	1.97	2.40
Peperomia 30	68.9	1.95	2.43
Peperomia 31	69.0	1.93	2.41
Peperomia 32	70.0	1.92	2.12
Peperomia 33	97.0	2.05	2.43
Peperomia 34	121.7	2.03	2.10
Peperomia 35	57.4	2.08	2.51
Peperomia 36	72.7	2.00	2.34

### 5.1.2 Amplificación de marcadores de DNA

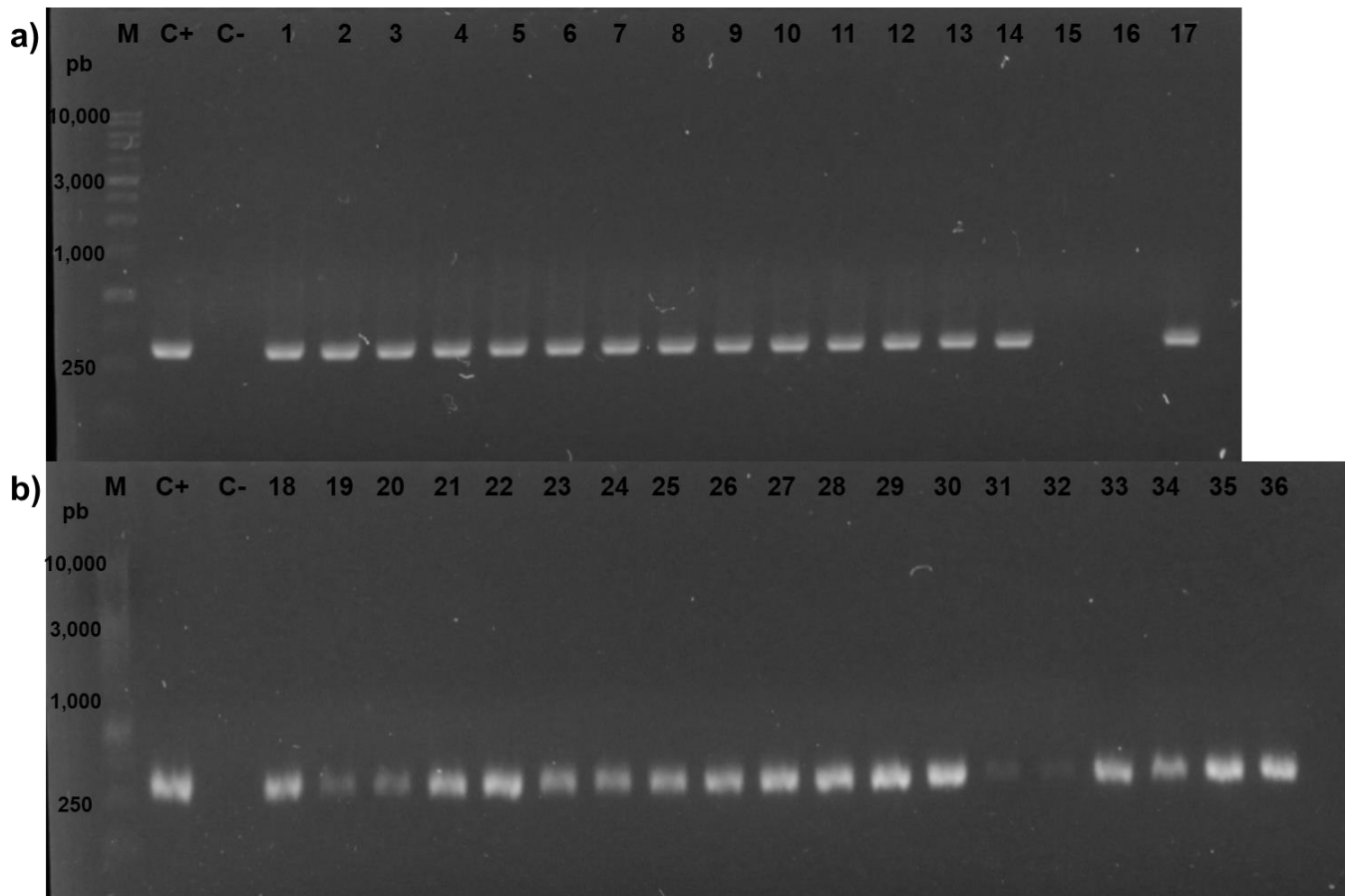
La amplificación de DNA por PCR sólo fue exitosa para los marcadores moleculares *trnH-psbA*, *rbcL*, *rpl32-trnL* e *ITS2*; sin embargo, no todas las muestras lograron amplificarse con éxito a pesar de algunas presentaban coeficientes de pureza ( $A_{260}/A_{280}$ ) y contaminación ( $A_{260}/A_{230}$ ) dentro de los adecuados (Cuadro 4). Por lo tanto, de los marcadores moleculares *trnH-psbA* y *rbcL* sólo se amplificaron 32 muestras (88.9%), para *rpl32-trnL* sólo ocho muestras (22.2%) y de *ITS2* resultaron exitosas 34 muestras (94.4%) (Figura 1 – 4). La amplificación de DNA del marcador molecular *matK* no fue visible para ninguna de las muestras en ningún gel de agarosa a pesar de que se repitió la PCR en variadas ocasiones.

Los productos del marcador molecular *trnH-psbA* que se obtuvieron fueron de aproximadamente 250 pb (Figura 1); para *rbcL* los productos amplificados que se obtuvieron fueron de aproximadamente 400 pb (Figura 2); mientras que para el marcador *ITS2* los productos amplificados fueron de aproximadamente 500 pb (Figura 3); por último, para *rpl32-trnL* los fragmentos de DNA amplificados obtenidos se encontraron entre los 300 y 600 pb (Figura 4).

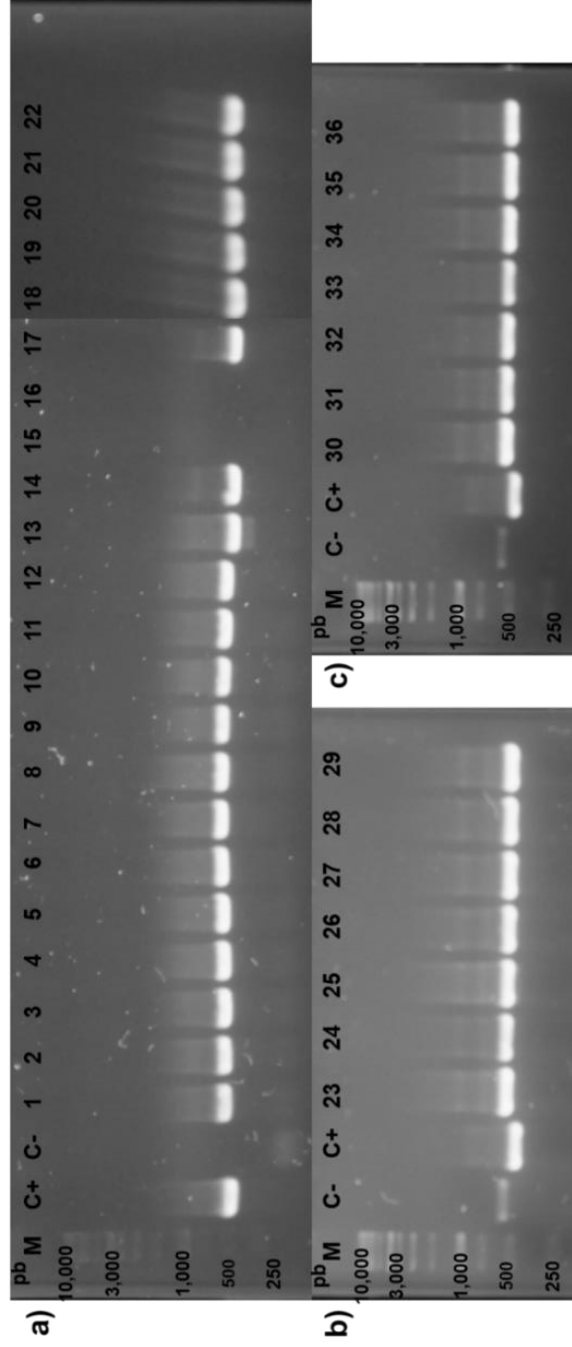


**Figura 1.** Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1% de la reacción de PCR del marcador molecular *trnH-psbA* de *Peperomia* sp. a partir de muestras selectas de distintas poblaciones provenientes de la zona de los volcanes, Estado de México. Nota: M = Marcador molecular de peso; C+ = Control positivo; C- = Control negativo; a) Muestras: 1 – 10 = *Peperomia* 1 a 10, respectivamente; b) Muestras: 11 – 22 = *Peperomia* 11 a 22, respectivamente; c) Muestras: 23 – 36 = *Peperomia* 23 a la 36, respectivamente.

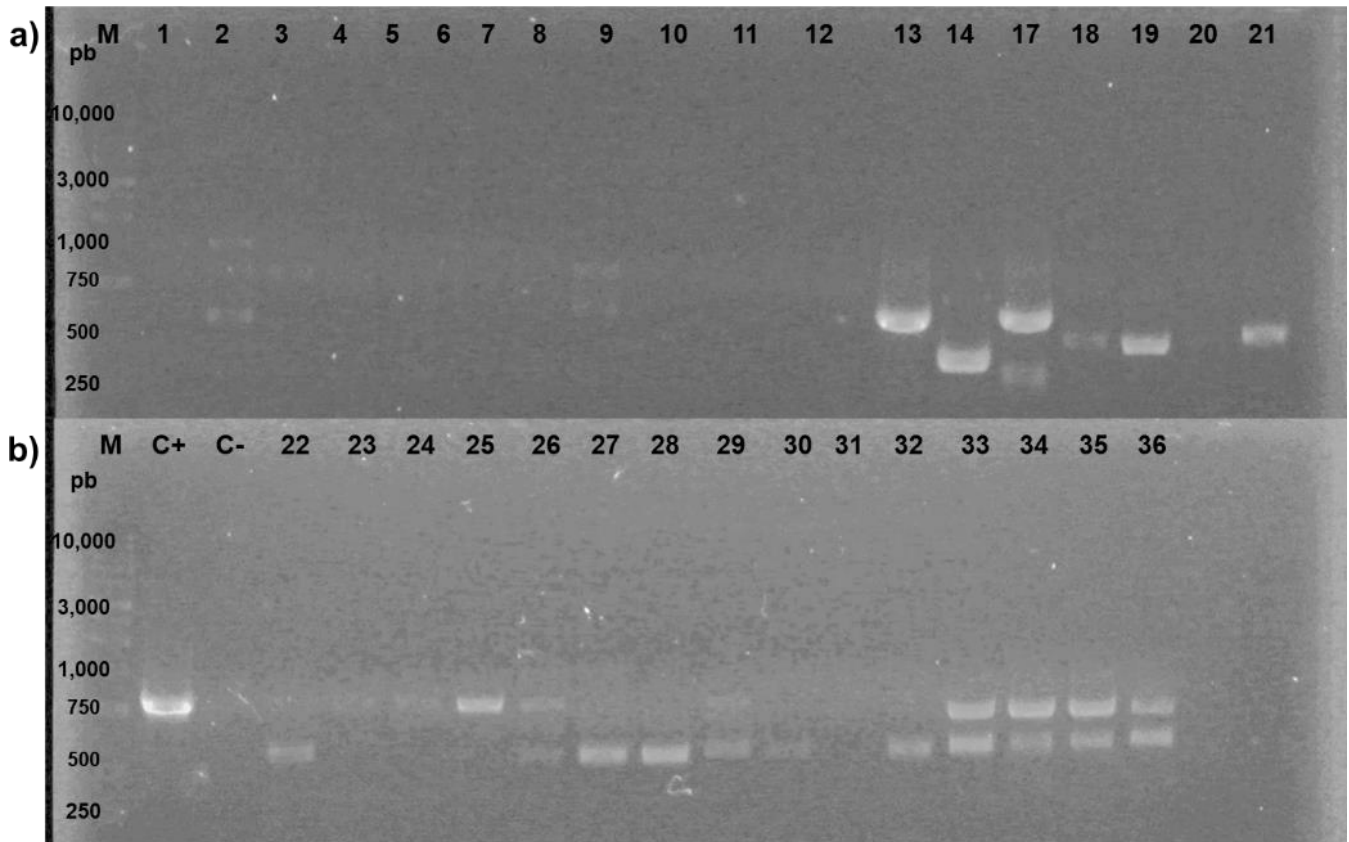




**Figura 2.** Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1% de la reacción de PCR del marcador molecular *rbcL* de *Peperomia* sp. a partir de muestras selectas de distintas poblaciones provenientes de la zona de los volcanes, Estado de México. Nota: M = Marcador molecular de peso; C+ = Control positivo; C- = Control negativo; a) Muestras: 1 – 17 = *Peperomia* 1 a 17, respectivamente; b) Muestras: 18 – 36 = *Peperomia* 18 a 36, respectivamente.



**Figura 3.** Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1% de la reacción de PCR del marcador molecular *ITS2* de *Peperomia* sp. a partir de muestras selectas de distintas poblaciones provenientes de la zona de los volcanes, Estado de México. Nota: M = Marcador molecular de peso; C+ = Control positivo; C- = Control negativo; a) Muestras: 1 – 22 = *Peperomia* 1 a 22, respectivamente; b) Muestras: 23 – 29 = *Peperomia* 23 a 29, respectivamente; c) Muestras: 30 – 36 = *Peperomia* 30 a la 36, respectivamente.



**Figura 4.** Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1% de la reacción de PCR del marcador molecular *rpl32-trnL* de *Peperomia* sp. a partir de muestras selectas de distintas poblaciones provenientes de la zona de los volcanes, Estado de México. Nota: M = Marcador molecular de peso; C+ = Control positivo; C- = Control negativo; a) Muestras: 1 – 21 = *Peperomia* 1 a 21, respectivamente; b) Muestras: 22 – 36 = *Peperomia* 22 a 36, respectivamente.

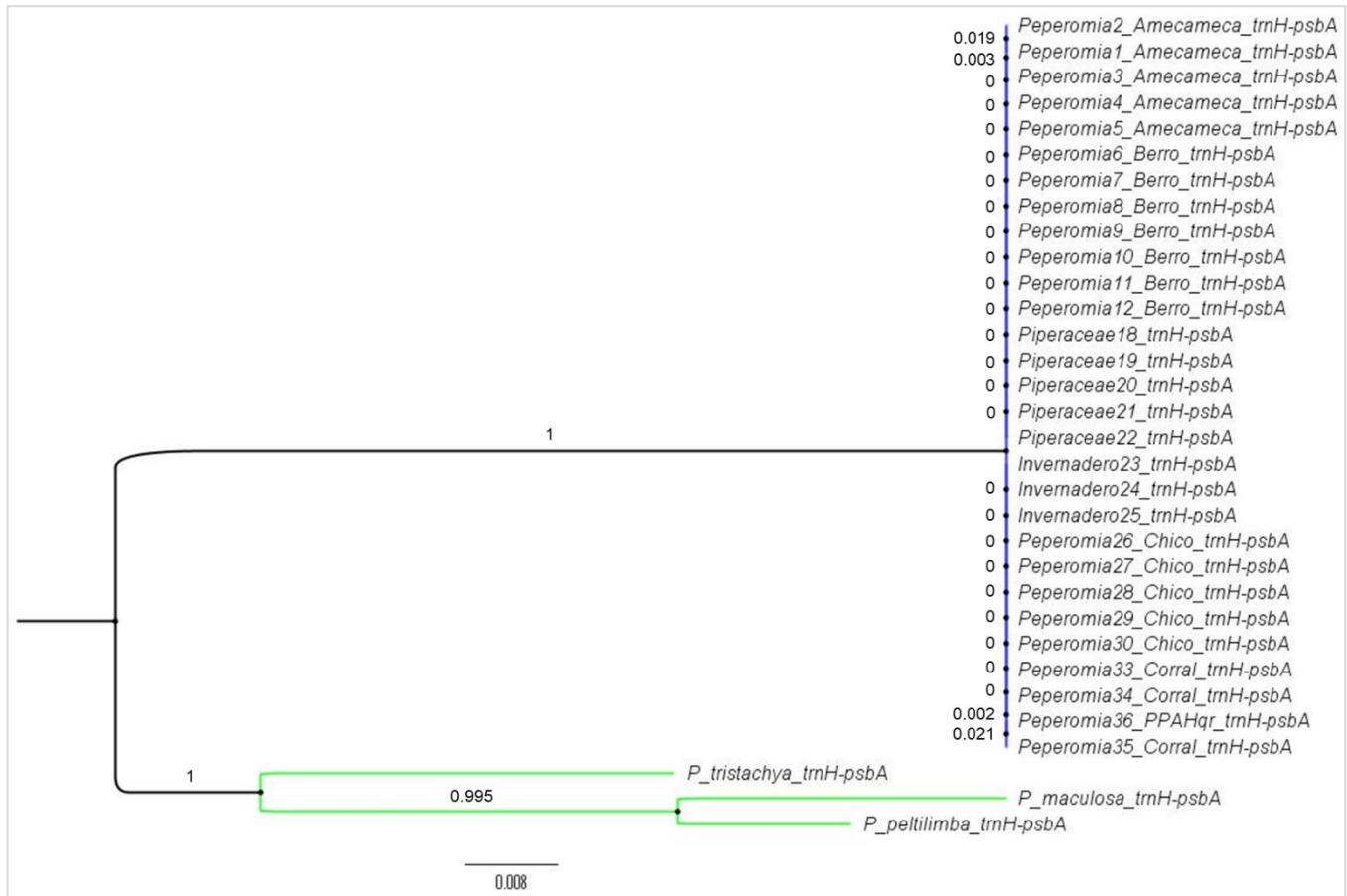
## 5.2 Análisis de datos

### 5.2.1 Análisis filogenético y de distancia

Se obtuvieron cuatro árboles filogenéticos pertenecientes a los marcadores moleculares de *trnh-psbA*, *rbcL*, *ITS2* y *rpl32-trnL*, a partir de las muestras que se secuenciaron y editaron manualmente (Anexo 2).

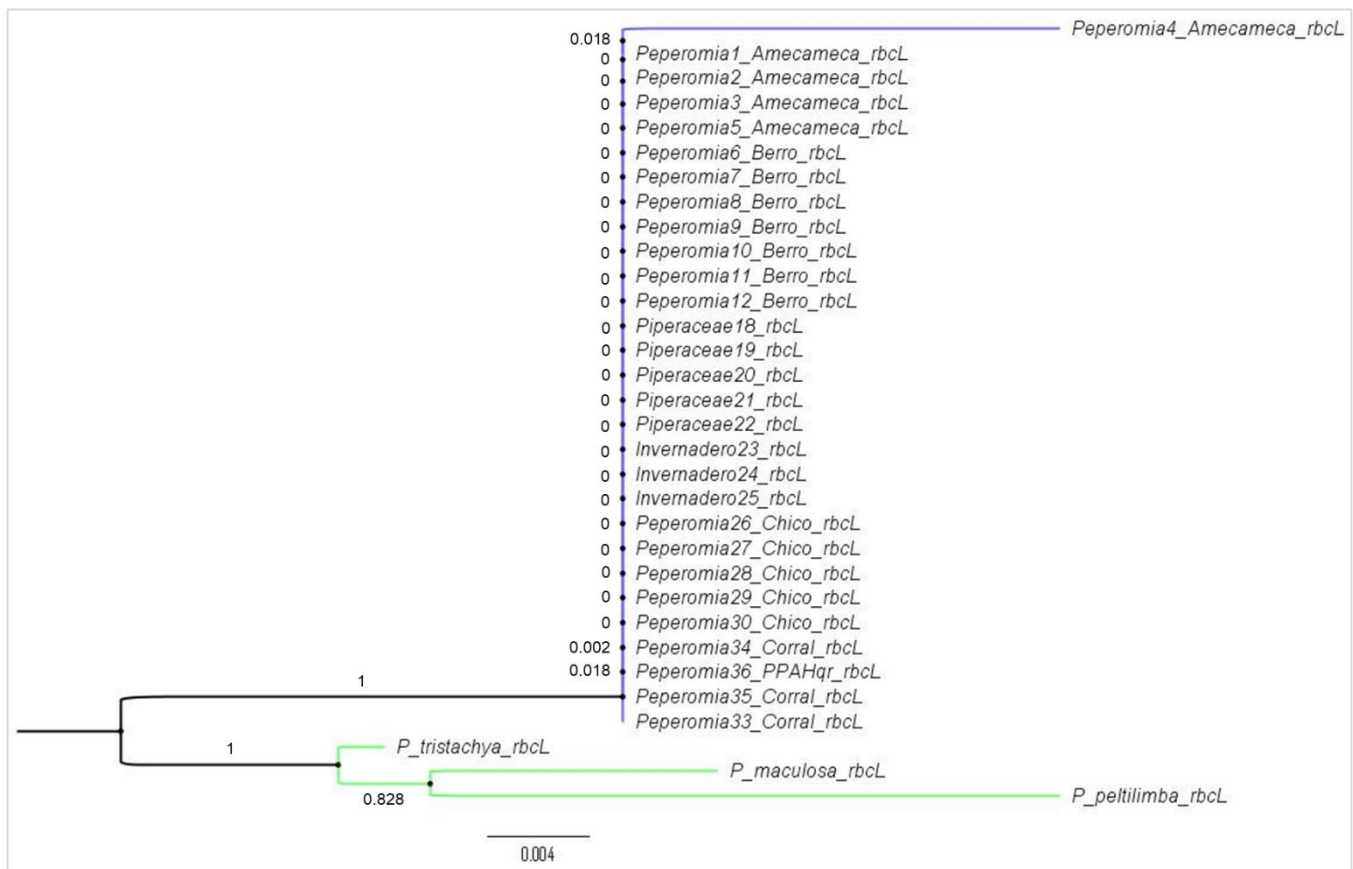
Para el caso del marcador *trnh-psbA* se logró discriminar a nivel de especie, agrupando en dos clados distintos, las secuencias de *Peperomia* sp. de aquellas que ya habían sido determinadas con anterioridad (*P. tristachya*, *P. peltolimba* y *P. maculosa*); así mismo, se detectó que las secuencias restantes de las otras poblaciones pertenecen a la misma especie que las muestras

de *Peperomia* sp. (Figura 5). Por otra parte, de acuerdo con el análisis de distancia de código de barras (Barcoding gap) para este marcador, siempre se forman tres grupos aun tomando en cuenta diferentes valores del límite de divergencia "P" intra e interespecífica. El grupo 1 está conformado por *Peperomia* sp. (*Peperomia*1 – 5\_Amecameca) y otras poblaciones (*Peperomia*6 – 12\_Berro, Piperaceae18 – 22, Invernadero23 – 25, *Peperomia*26 – 30\_Chico, *Peperomia*33 – 35\_Corral y *Peperomia*36), el grupo 2 está conformado por *P. peltiimba* y *P. maculosa*, mientras que en el grupo 3 sólo se encuentra *P. tristachya*. (Cuadro 5 y Anexo 3a).



**Figura 5.** Cladograma para el marcador molecular *trnH-psbA* de *Peperomia* sp. a partir de muestras selectas de distintas poblaciones provenientes de la zona de los volcanes, Estado de México. Alineación de secuencias a partir del algoritmo MUSCLE; el árbol consenso se generó a partir del método de máxima verosimilitud y modelo Tamura 3-parámetros; el análisis evolutivo se realizó en MEGA X. Nota: El clado en azul es representado por las muestras de *Peperomia* sp. (*Peperomia*1 – 5\_Amecameca) y las diversas poblaciones de las cuales no se conoce su identidad taxonómica de especie (*Peperomia*6 – 12\_Berro, Piperaceae18 – 22, Invernadero23 – 25, *Peperomia*26 – 30\_Chico, *Peperomia*33 – 35\_Corral y *Peperomia*36), el clado en verde representa las especies *P. tristachya*, *P. peltiimba* y *P. maculosa*. Los números en los nodos son valores expresados como porcentajes de 1,000 iteraciones por el método bootstrap.

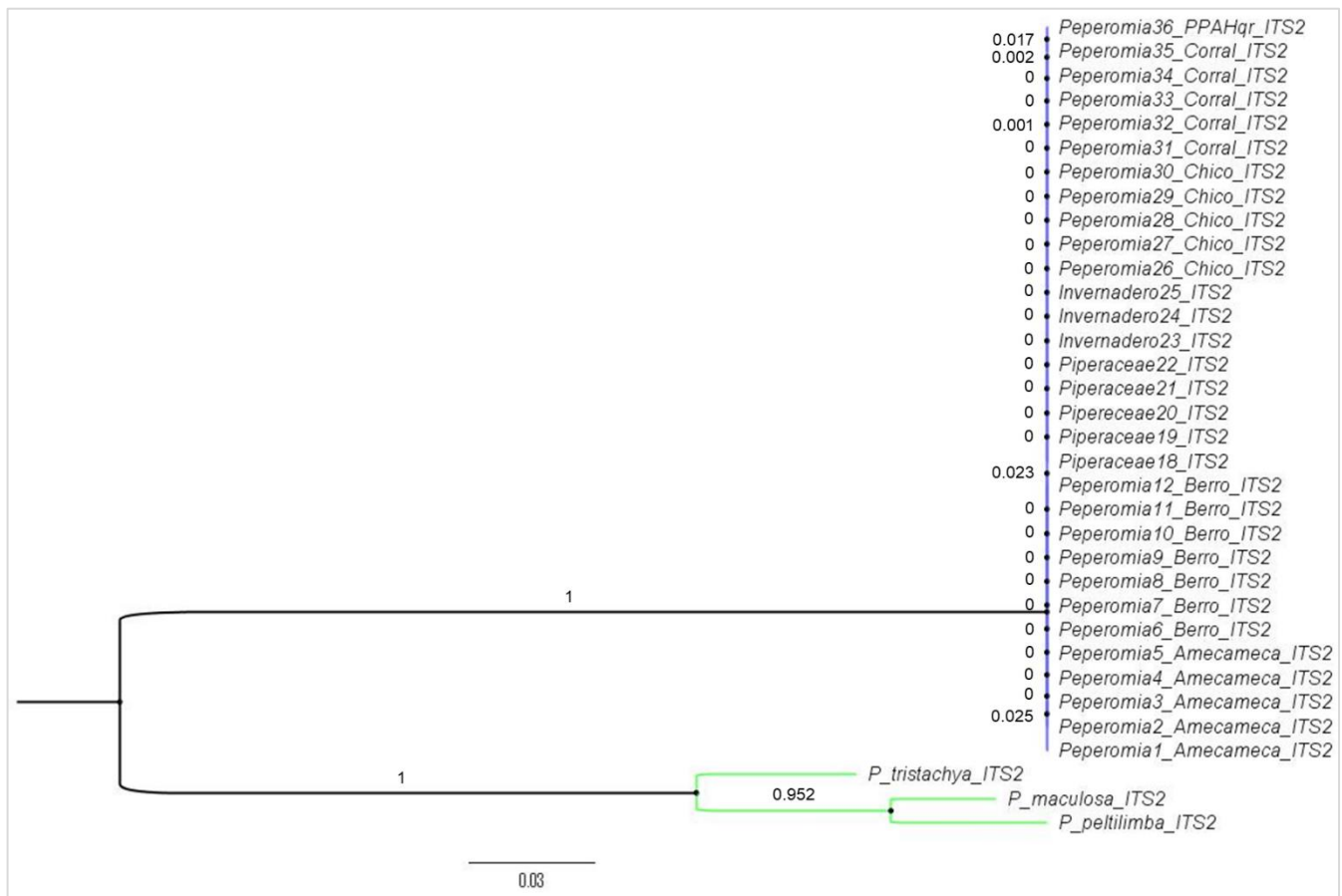
En el caso del marcador molecular *rbcl*, éste también logró discriminar a nivel de especie, separando, nuevamente en dos clados, las secuencias de *Peperomia* sp. y las muestras de otras poblaciones, de las especies que ya se conoce su identidad taxonómica (Figura 6). A su vez, el análisis de distancia de código de barras de este marcador demostró que se forman cuatro grupos a cualquier límite de divergencia “P”. El grupo 1, nuevamente está conformado por *Peperomia* sp. (Peperomia1 – 5\_Amecameca) y otras poblaciones (Peperomia6 – 12\_Berro, Piperaceae18 – 22, Invernadero23 – 25, Peperomia26 – 30\_Chico, Peperomia33 – 35\_Corral y Peperomia36), mientras que las especies *P. maculosa*, *P. tristachya*, y *P. peltilimba*, representan cada una a un grupo, (grupo 2, 3 y 4, respectivamente) (Cuadro 5 y Anexo 3b).



**Figura 6.** Cladograma para el marcador molecular *rbcl* de *Peperomia* sp. a partir de muestras selectas de distintas poblaciones provenientes de la zona de los volcanes, Estado de México. Alineación de secuencias a partir del algoritmo MUSCLE; el árbol consenso se generó a partir del método de máxima verosimilitud y modelo Tamura 3-parámetros; el análisis evolutivo se realizó en MEGA X. Nota: El clado en azul es representado por las muestras de *Peperomia* sp. (Peperomia1 – 5\_Amecameca) y las diversas poblaciones de las cuales no se conoce su identidad taxonómica de especie (Peperomia6 – 12\_Berro, Piperaceae18 – 22, Invernadero23 – 25, Peperomia26 – 30\_Chico, Peperomia33 – 35\_Corral y Peperomia36), el clado en verde representa las especies *P. tristachya*, *P. peltilimba* y *P. maculosa*.

Los números en los nodos son valores expresados como porcentajes de 1,000 iteraciones por el método bootstrap.

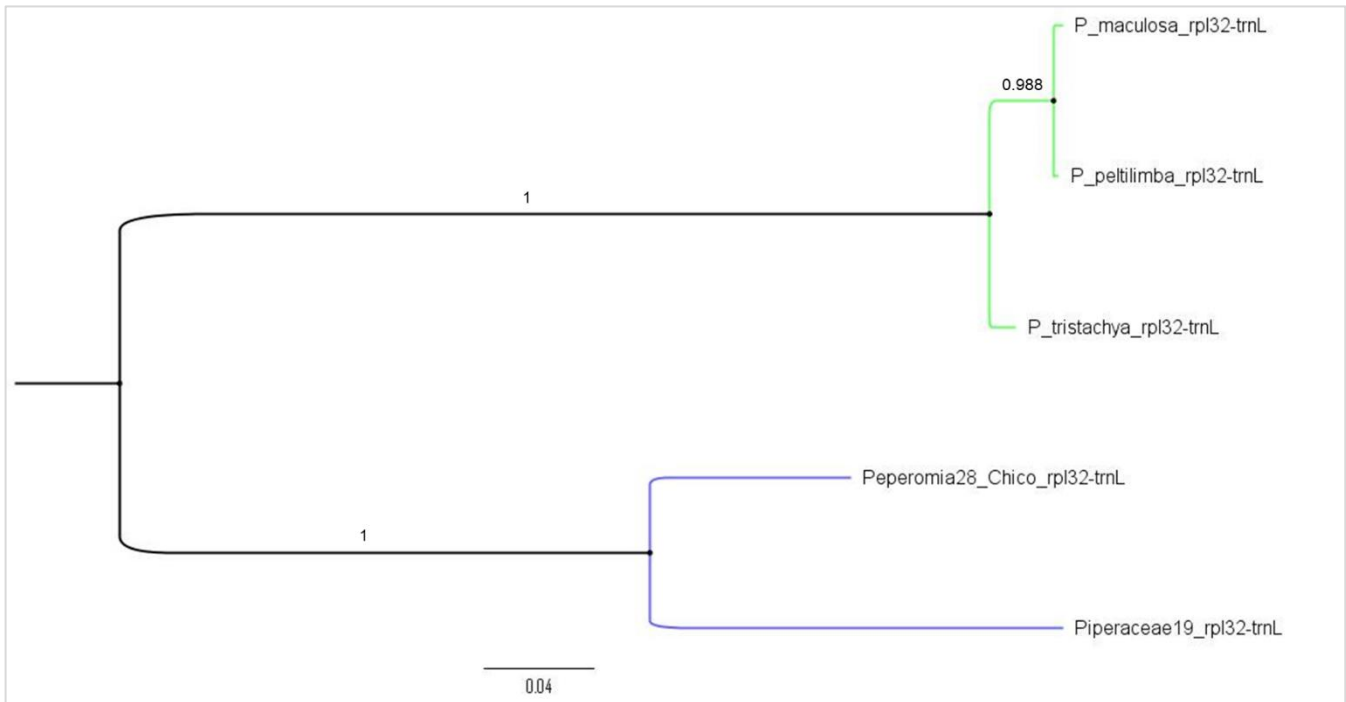
En cuanto al marcador *ITS2* también se logró discriminar todas las secuencias hasta nivel de especie, separando en dos clados las secuencias de *Peperomia* sp. y las otras poblaciones de las especies de *P. tristachya*, *P. peltilimba* y *P. maculosa* (Figura 7). El análisis de distancia de código de barras de este marcador, a cualquier límite de divergencia “P” únicamente forma dos grupos. El grupo 1, nuevamente está conformado por *Peperomia* sp. (Peperomia1 – 5\_Amecameca) y otras poblaciones (Peperomia6 – 12\_Berro, Piperaceae18 – 22, Invernadero23 – 25, Peperomia26 – 30\_Chico, Peperomia31 – 35\_Corral y Peperomia36), mientras que las especies *P. maculosa*, *P. tristachya*, y *P. peltilimba*, integran el grupo 2 (Cuadro 5 y Anexo 3c).



**Figura 7.** Cladograma para el marcador molecular *ITS2* de *Peperomia* sp. a partir de muestras selectas de distintas poblaciones provenientes de la zona de los volcanes, Estado de México. Alineación de secuencias a partir del algoritmo MUSCLE; el árbol consenso se generó a partir del método de máxima verosimilitud y modelo Kimura 2-parámetros; se utilizó una distribución Gamma discreta para modelar las diferencias de velocidad evolutiva entre los sitios; el análisis evolutivo se realizó en MEGA X. Nota: El clado en color azul es representado por las muestras de *Peperomia* sp. (Peperomia1 –

5\_Amecameca) y las diversas poblaciones de las cuales no se conoce su identidad taxonómica de especie (Peperomia6 – 12\_Berro, Piperaceae18 – 22, Invernadero23 – 25, Peperomia26 – 30\_Chico, Peperomia31 – 35\_Corral y Peperomia36), el clado sombreado en verde representa las especies *P. tristachya*, *P. peltilimba* y *P. maculosa*. Los números en los nodos son valores expresados como porcentajes de 1,000 iteraciones por el método bootstrap.

Para el marcador *rpl32-trnL* sólo se utilizaron cinco secuencias consenso, debido a que las secuencias restantes presentaban muchas discordancias entre ambas cadenas del DNA. El uso de este marcador logró discriminar con éxito, las especies *P. maculosa*, *P. tristachya*, y *P. peltilimba* de las muestras de Piperaceae19 y Peperomia28\_Chico, a pesar de ser sólo cinco muestras (Figura 8). De acuerdo con el análisis de distancia de código de barras de este marcador, se forman dos grupos, el grupo 1 conformado por las muestras de piperáceas sin identificación taxonómica de especie, mientras que el grupo 2 es representado por *P. maculosa*, *P. tristachya*, y *P. peltilimba* (Cuadro 5 y Anexo 3d).



**Figura 8.** Cladograma para el marcador molecular *rpl32-trnL* de *Peperomia* sp. a partir de muestras selectas de distintas poblaciones provenientes de la zona de los volcanes, Estado de México. Alineación de secuencias a partir del algoritmo MUSCLE; el árbol consenso se generó a partir del método de máxima verosimilitud y modelo Tamura 3-parámetros; el análisis evolutivo se realizó en MEGA X. Nota: El clado en azul es representado por las muestras de Piperaceae18 y Peperomia28\_Chico, mientras que el clado en verde representa las especies *P. tristachya*, *P. peltilimba* y *P. maculosa*. Los números en los nodos son valores expresados como porcentajes de 1,000 iteraciones por el método bootstrap.

**Cuadro 5.** Grupos formados a partir del análisis de distancia (barcoding gap) por ABGD de las muestras de *Peperomia* sp. a partir de muestras selectas de distintas poblaciones provenientes de la zona de los volcanes, Estado de México.

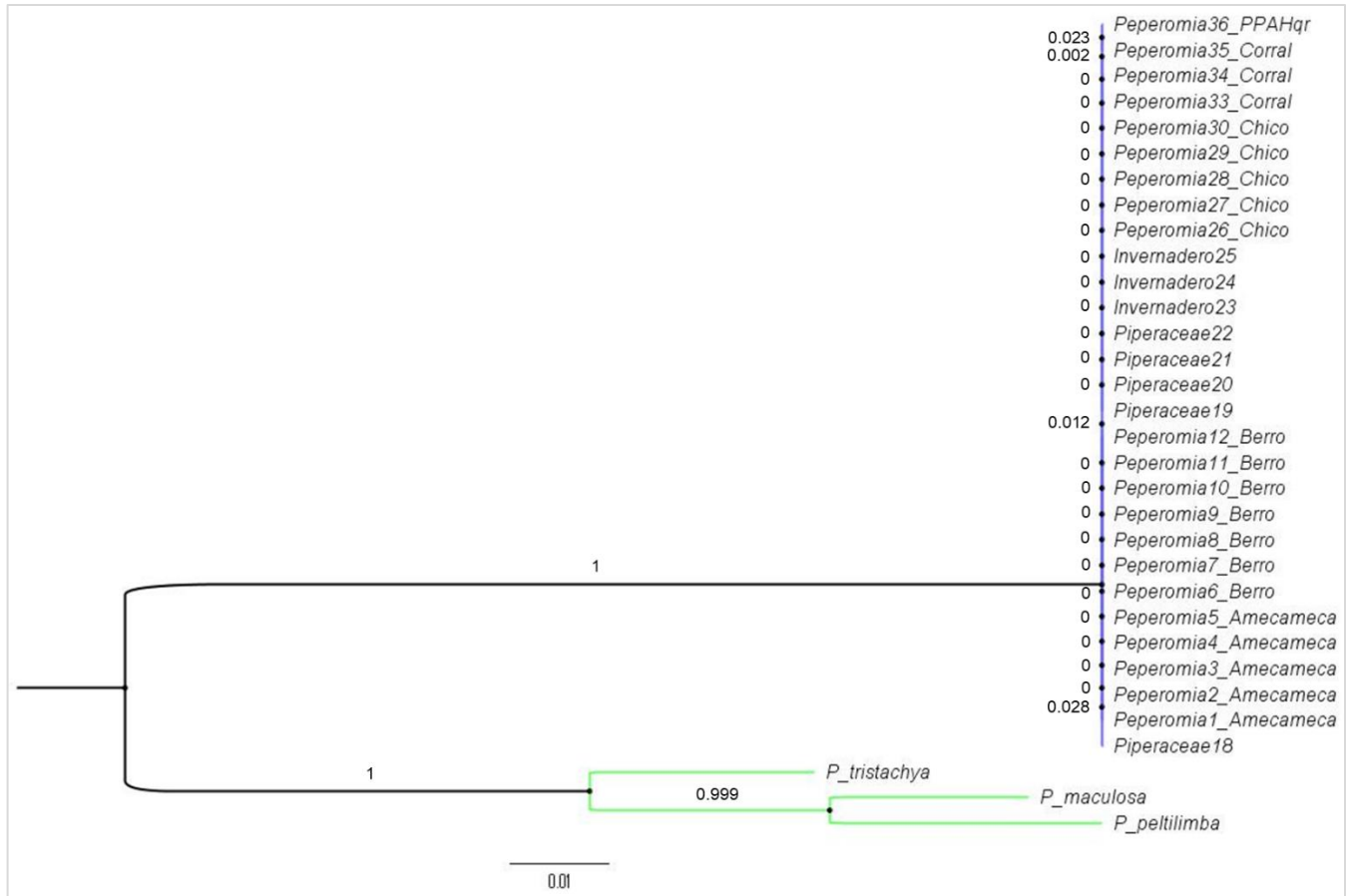
Marcador molecular	Grupo	Muestra
<i>trnH-psbA</i>	1	Peperomia1_Amecameca_trnH-psbA; Peperomia2_Amecameca_trnH-psbA; Peperomia3_Amecameca_trnH-psbA; Peperomia4_Amecameca_trnH-psbA; Peperomia5_Amecameca_trnH-psbA; Peperomia6_Berro_trnH-psbA; Peperomia7_Berro_trnH-psbA; Peperomia8_Berro_trnH-psbA; Peperomia9_Berro_trnH-psbA; Peperomia10_Berro_trnH-psbA; Peperomia11_Berro_trnH-psbA; Peperomia12_Berro_trnH-psbA; Piperaceae18_trnH-psbA; Piperaceae19_trnH-psbA; Piperaceae20_trnH-psbA; Piperaceae21_trnH-psbA; Piperaceae22_trnH-psbA; Invernadero23_trnH-psbA; Invernadero24_trnH-psbA; Invernadero25_trnH-psbA; Peperomia26_Chico_trnH-psbA; Peperomia27_Chico_trnH-psbA; Peperomia28_Chico_trnH-psbA; Peperomia29_Chico_trnH-psbA; Peperomia30_Chico_trnH-psbA; Peperomia33_Corral_trnH-psbA; Peperomia34_Corral_trnH-psbA; Peperomia35_Corral_trnH-psbA y Peperomia36_PPAHqr_trnH-psbA
	2	<i>P_maculosa_trnH-psbA</i> y <i>P_peltilimba_trnH-psbA</i>
	3	<i>P_tristachya_trnH-psbA</i>
<i>rbcL</i>	1	Peperomia1_Amecameca_rbcL; Peperomia2_Amecameca_rbcL; Peperomia3_Amecameca_rbcL; Peperomia4_Amecameca_rbcL; Peperomia5_Amecameca_rbcL; Peperomia6_Berro_rbcL; Peperomia7_Berro_rbcL; Peperomia8_Berro_rbcL; Peperomia9_Berro_rbcL; Peperomia10_Berro_rbcL; Peperomia11_Berro_rbcL; Peperomia12_Berro_rbcL; Piperaceae18_rbcL; Piperaceae19_rbcL; Piperaceae20_rbcL; Piperaceae21_rbcL; Piperaceae22_rbcL; Invernadero23_rbcL; Invernadero24_rbcL; Invernadero25_rbcL; Peperomia26_Chico_rbcL; Peperomia27_Chico_rbcL; Peperomia28_Chico_rbcL; Peperomia29_Chico_rbcL; Peperomia30_Chico_rbcL; Peperomia33_Corral_rbcL; Peperomia34_Corral_rbcL; Peperomia35_Corral_rbcL y Peperomia36_PPAHqr_rbcL
	2	<i>P_maculosa_rbcL</i>
	3	<i>P_tristachya_rbcL</i>
	4	<i>P_peltilimba_rbcL</i>
<i>ITS2</i>	1	Peperomia1_Amecameca_ITS2; Peperomia2_Amecameca_ITS2; Peperomia3_Amecameca_ITS2; Peperomia4_Amecameca_ITS2; Peperomia5_Amecameca_ITS2; Peperomia6_Berro_ITS2; Peperomia7_Berro_ITS2; Peperomia8_Berro_ITS2; Peperomia9_Berro_ITS2; Peperomia10_Berro_ITS2; Peperomia11_Berro_ITS2; Peperomia12_Berro_ITS2; Piperaceae18_ITS2; Piperaceae19_ITS2; Piperaceae20_ITS2; Piperaceae21_ITS2; Piperaceae22_ITS2;



		Invernadero23_ITS2; Invernadero24_ITS2; Invernadero25_ITS2; Peperomia26_Chico_ITS2; Peperomia27_Chico_ITS2; Peperomia28_Chico_ITS2; Peperomia29_Chico_ITS2; Peperomia30_Chico_ITS2; Peperomia31_Corral_ITS2; Peperomia32_Corral_ITS2; Peperomia33_Corral_ITS2; Peperomia34_Corral_ITS2; Peperomia35_Corral_ITS2 y Peperomia36_PPAHqr_ITS2
	2	<i>P_maculosa</i> _ITS2; <i>P_peltilimba</i> _ITS2 y <i>P_tristachya</i> _ITS2
<i>rpl32-trnL</i>	1	Piperaceae19_rpl32-trnL y Peperomia28_Chico_rpl32-trnL
	2	<i>P_maculosa</i> _rpl32-trnL; <i>P_peltilimba</i> _rpl32-trnL y <i>P_tristachya</i> _rpl32-trnL
Secuencia concatenada: <i>trnH-psbA</i> , <i>rbcL</i> e <i>ITS2</i>	1	Peperomia1_Amecameca; Peperomia2_Amecameca; Peperomia3_Amecameca; Peperomia4_Amecameca; Peperomia5_Amecameca; Peperomia6_Berro; Peperomia7_Berro; Peperomia8_Berro; Peperomia9_Berro; Peperomia10_Berro; Peperomia11_Berro; Peperomia12_Berro; Piperaceae18; Piperaceae19; Piperaceae20; Piperaceae21; Piperaceae22; Invernadero23; Invernadero24; Invernadero25; Peperomia26_Chico; Peperomia27_Chico; Peperomia28_Chico; Peperomia29_Chico; Peperomia30_Chico; Peperomia33_Corral; Peperomia34_Corra; Peperomia35_Corral y Peperomia36_PPAHqr
	2	<i>P_maculosa</i> ; <i>P_peltilimba</i> y <i>P_tristachya</i>

En vista de que todos los marcadores moleculares lograron discriminar las muestras hasta nivel de especie, para la elaboración del código de barras, se seleccionaron los marcadores moleculares *trnH-psbA*, *rbcL* e *ITS2*. A pesar de que el marcador *rpl32-trnL*, también logró separar todas las muestras de *Peperomia* sp. de *P. tristachya*, *P. peltilimba* y *P. maculosa*, se optó por no utilizarlo debido a que sólo se contaba con dos secuencias de *Peperomia* sp.

El cladograma construido a partir de la secuencia concatenada de estos marcadores, logró discriminar el total de secuencias hasta nivel de especie, separando las muestras en dos clados, por una parte, todas las secuencias de *Peperomia* sp. y en un segundo clado las secuencias de las especies de *P. tristachya*, *P. peltilimba* y *P. maculosa* (Figura 9). Aunado a esto, el análisis de distancia de código de barras de la secuencia concatenada muestra que, a cualquier límite de divergencia “P” siempre se forman dos grupos. El grupo 1, conformado por *Peperomia* sp. (Peperomia1 – 5\_Amecameca) y otras poblaciones (Peperomia6 – 12\_Berro, Piperaceae18 – 22, Invernadero23 – 25, Peperomia26 – 30\_Chico, Peperomia31 – 35\_Corral y Peperomia36), mientras que el grupo dos se conforma por las especies *P. maculosa*, *P. tristachya*, y *P. peltilimba* (Cuadro 5 y Anexo 3e).



**Figura 9.** Cladograma para la secuencia concatenada con los marcadores moleculares *trnH-psbA*, *rbcL* e *ITS2* de *Peperomia* sp. a partir de muestras selectas de distintas poblaciones provenientes de la zona de los volcanes, Estado de México. Alineación de secuencias a partir del algoritmo MUSCLE; el árbol consenso se generó a partir del método de máxima verosimilitud y modelo Tamura 3-parámetros; se utilizó una distribución Gamma discreta para modelar las diferencias de velocidad evolutiva entre los sitios; el análisis evolutivo se realizó en MEGA X. Nota: El clado en color azul es representado por las muestras de *Peperomia* sp. (*Peperomia*1 – 5\_Amecameca) y las diversas poblaciones de las cuales no se conoce su identidad taxonómica de especie (*Peperomia*6 – 12\_Berro, Piperaceae18 – 22, Invernadero23 – 25, *Peperomia*26 – 30\_Chico, *Peperomia*33 – 35\_Corral y *Peperomia*36), el clado en verde representa las especies *P. tristachya*, *P. peltilimba* y *P. maculosa*. Los números en los nodos son valores expresados como porcentajes de 1,000 iteraciones por el método bootstrap.

### 5.3 Determinación de identidad botánica

La identificación taxonómica de la especie en cuestión la llevó a cabo el Dr. Robert Bye y colaboradores, primero, mediante un análisis molecular previo a los que se realizaron en el presente trabajo para comparar la muestra contra la base de datos del GenBank (NCBI) mediante la herramienta de búsqueda Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) y así conocer la familia a la que pertenece, y posteriormente, a través de la consulta de muestras de

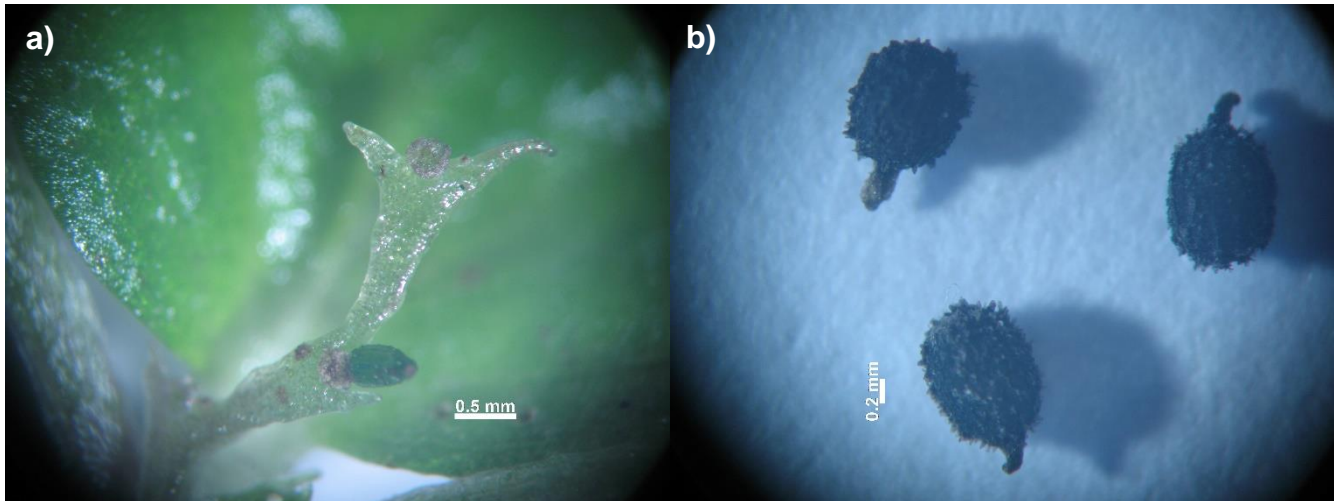
herbario y fotografías de las estructuras del ejemplar colectado se concluyó que la especie conocida comúnmente como berro en la zona de los volcanes en el Estado de México es *Peperomia hintonii* Yunck (Figuras 10, 11 y 12).



**Figura 10.** Quelites (*Peperomia hintonii*) cosechados de un huerto en la zona de los volcanes, Estado de México. Nota: Foto tomada por el Dr. Robert Bye.



**Figura 11.** Quelite *Peperomia hintonii*, de la zona de los volcanes en el Estado de México. Nota: a) Detalle del quelite completo; b) Detalle de las hojas. Fotos tomadas por el Dr. Robert Bye.



**Figura 12.** Fotos microscópicas del quelite *Peperomia hintonii*, de la zona de los volcanes en el Estado de México. Nota: a) Detalle de la inflorescencia; b) Detalle de las semillas. Fotos tomadas por el Dr. Robert Bye y la Biól. Susana Guzmán en el Laboratorio de Microscopía y Fotografía de la Biodiversidad (II).

## VI. Discusión

El 95% de las extracciones de DNA se encontraron dentro de los rangos apropiados para el cociente de pureza ( $A_{260}/A_{280}$ ) y contaminación ( $A_{260}/A_{230}$ ) de acuerdo con la evaluación del espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) (Matlock, 2015) a excepción de las muestras pertenecientes a la especie *P. obtusifolia* (*Peperomia* 15 y 16) (Cuadro 4), por ello, en un principio se infirió que la amplificación de los marcadores moleculares no resultaría exitosa, lo cual se confirmó al momento de llevar a cabo los PCR. Uno de los posibles motivos por el cual se obtuvo este resultado negativo, es el estado del material vegetal ya que se trató de hojas contaminadas, probablemente con hongos y tejido foliar oxidado, lo que generó una degradación prematura del DNA interfiriendo con la eficiencia de la extracción.

A pesar de la alta calidad del DNA extraído, no todos los marcadores moleculares lograron ser amplificados en la totalidad de las muestras. En el caso del marcador molecular *matK* no se logró amplificar, por lo que no fue posible evaluar su capacidad discriminativa. Entre los factores que pudieran explicar este resultado están la afinidad que presentan los primers, que en el caso de este marcador es muy variable (Kress y Erickson, 2012) o bien, la presencia de metabolitos secundarios que pueden inhibir el proceso de la PCR (Chase *et al.* 2007; Raclariu *et al.*, 2018); ya que se conoce que la familia Piperaceae contiene compuestos como los fenilpropanoides, lignanos y neolignanos, amidas alifáticas y aromáticas, alcaloides, policétidos y cromenes (Orjala *et al.*, 1993; Benevides *et al.*, 1999; Dodson *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2003; Lago *et al.*, 2004). Cabe destacar que *matK* es reconocido y recomendado como un

excelente marcador para plantas, debido a su alta discriminación de especies; sin embargo, se corrobora la idea de que en plantas no existen marcadores universales, y en cada grupo pueden variar los resultados (Pennisi, 2007).

Respecto al marcador *rpl32-trnL* solamente amplificaron el 22.2% de las muestras, en la electroforesis en gel de agarosa se observaron bandas dobles en la mayoría de las muestras (Figura 4b). Este patrón está asociado al gran tamaño de este amplicón (1018 pb en promedio; Shaw *et al.*, 2007) dificultando su obtención y generando fragmentos más pequeños (múltiples bandas); además, algunas muestras fueron imposibles de editar, por lo que sólo se analizaron cinco muestras, no obstante, fueron suficientes para alcanzar a discriminar como distintos taxa en los análisis realizados (Figura 8 y Cuadro 5). Aunque es un marcador poco explorado y relativamente nuevo ofrece una gran variación informativa (Shaw *et al.*, 2007), sin embargo, debido a su bajo porcentaje de amplificación, se descarta el uso de este marcador para identificar a *P. hintonii*.

Los marcadores *rbcL* y *trnH-psbA* amplificaron en un 94% de las muestras analizadas, las accesiones de *Peperomia31\_Corral* y *Peperomia32\_Corral* no generaron ningún amplicón lo cual no corresponde ni a la concentración ni calidad del DNA obtenidos. Si bien ambos marcadores presentan una capacidad discriminativa óptima en ambos análisis (Figuras 5 y 6 y Cuadro 5) como ha sido reportado en diversos trabajos (Kress *et al.*, 2005; Braukmann *et al.*, 2017), *rbcL* fue el único marcador capaz de separar las cuatro especies del género *Peperomia* analizadas, tal vez relacionado a una mayor variabilidad; sin embargo, estos resultados deberían corroborarse utilizando más individuos de las especies en cuestión.

Por último, *ITS2*, por su gran potencial como código de barras universal, ya que posee un alto grado de éxito en la identificación de distintos taxones de plantas (Chen *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2012), fue el único marcador que amplificó la totalidad de las muestras evaluadas, permitiendo la separación inequívoca de *P. hintonii* del resto de las especies analizadas. Por estos motivos, se concatenó a este marcador junto con *rbcL* y *trnH-psbA* para evaluar si se generaba un marcador molecular de identidad más robusto.

El concatenado de los marcadores *rbcL*, *trnH-psbA* e *ITS2*, separó de manera contundente a *Peperomia hintonii* del resto de las especies analizadas (Figura 9); sin embargo, no fue capaz de discernir entre sí en el análisis de distancia a *P. tristachya*, *P. peltilimba* y *P. maculosa*, tal como se logró con el marcador *rbcL*, por si solo (Cuadro 5). Lo que cuestiona si es recomendable utilizar el concatenado de los tres marcadores o usarlos por separado, aunque es claro que la suma de los sitios informativos genera un código de barras más robusto, con lo que se cumple el objetivo general de este trabajo. Además, cabe destacar que solamente se contó con un individuo de cada una de las otras especies del género *Peperomia*, y debido a que en un análisis de distancia se requiere de un gran número de muestras para arrojar predicciones

confiables (Wiemers y Fiedler, 2007), no se debe descartar que, tras el análisis de más muestras, la separación de todos los taxa a través de dicho análisis pueda conseguirse.

Debido a la eficacia de los códigos de barras moleculares es cada vez más común su uso para controlar la calidad del material vegetal que se comercializa nacional e internacionalmente (Sucher y Carles, 2008; Palhares *et al.*, 2015; Tehen *et al.*, 2014; De Boer *et al.*, 2015; Mishra *et al.*, 2016; Heinrich y Anagnostou, 2017). En México son escasos los grupos de investigación que han aplicado esta nueva herramienta, además, de estos pocos ejemplos, la generación de códigos de barras moleculares sólo se ha utilizado para el control de calidad del material vegetal empleado con fines medicinales (Cristians *et al.*, 2018; Gesto-Borroto *et al.*, 2019). Por lo tanto, debido al incremento en la pérdida de biodiversidad, conocimiento y uso de diversas plantas comestibles, en específico de los quelites (Bye y Linares, 2000; Mera-Ovando *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2011); los cuales recientemente han sido reconocidos como un excelente recurso fitogenético (SNICS, 2018), es necesario aplicar esta herramienta al control de calidad del material vegetal comercializado como alimento, generando una mayor cantidad de información molecular de las plantas útiles del país.

## VII. Conclusiones

- El DNA genómico extraído de las muestras de *Peperomia* sp. permitió la amplificación de los marcadores moleculares de cloroplasto y nuclear.
- El código de barras concatenando los marcadores *rbcL*, *trnH-psbA* e *ITS2*, permite la identificación inequívoca del quelite conocido como berro, *P. hintonii*, de la zona de los volcanes en el Estado de México.
- Los marcadores *matK* y *rpl32-trnL* no fueron útiles para identificar a la especie de estudio.
- Este trabajo constituye el primer ejemplo de la aplicación de esta herramienta molecular para la identificación de una especie comestible poco estudiada, incrementando la escasa información molecular existente y complementando el conocimiento etnobotánico de las plantas útiles de México.

## **Agradecimientos**

Agradezco a toda mi familia, porque su apoyo, paciencia y confianza han sido de gran importancia para mí durante toda mi travesía académica.

Agradezco a mi amiga del alma Ma. del Pilar Escamilla, por ofrecerme su amistad y amor incondicional y siempre alentarme a seguir adelante dentro de la universidad y la vida misma.

Agradezco al amor más intenso y verdadero que he vivido, Guillermo Cario, nunca has dejado de creer en mí.

Agradezco con todo el corazón al Dr. Sol Cristians Niisawa por responder a mi solicitud y brindarme la oportunidad de ser parte del equipo de trabajo en el laboratorio de etnobotánica del Jardín Botánico de la UNAM e instruirme dentro del enfoque de la biología molecular.

Agradezco también a la M. en C. Aída Marisa Osuna Fernández por aceptar ser mi asesora dentro de la UAM – Xochimilco y hacer las correcciones pertinentes a este proyecto.

Agradezco además a los compañeros con los que conviví dentro del laboratorio de etnobotánica, en especial a Viridiana Escalante con quien, a la par, aprendí el “detrás de cámaras” del análisis molecular con todo y “bloopers”.

Finalmente, agradezco a la Dra. Lidia Irene Cabrera Martínez por su asistencia técnica dentro de los laboratorios de Sistemática Molecular Botánica I y II, así como a la M. en C. Laura Márquez y a la M. en C. Nelly López por su asistencia técnica en el laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud, todos pertenecientes al Instituto de Biología – UNAM.

## Referencias

- Anderson C. y Beaman J. H. (2004). *The plants of Mount Kinabalu*. Natural History Publications (Borneo) y Royal Botanic Gardens, Kew. Vol. 5 (Magnoliaceae-Winteraceae). 609 pp.
- Basurto B.F. (2011). *Los quelites de México: especies de uso actual*. En: Mera, O.L.M., Castro D., y Bye R. (compiladores). *Especies vegetales poco valoradas: una alternativa para la seguridad alimentaria*. UNAM- SNICS- SINAREFI, México. 215 pp.
- Basurto-Peña F, Villalobos G. y Martínez MA. (1998). *Los quelites de la Sierra Norte de Puebla, México: Inventario y formas de preparación*. Bol. Soc. Bot. México 62: 49-62.
- Benevides P.J.C., Sartorelli P. y Kato M.J. (1999). *Phenylpropanoids and neolignans from Piper regnellii*. Phytochemistry. 52: 339-343.
- Braukmann T.W.A., Kuzmina M.L., Sills J., Zakharov E.V. y Hebert P.D.N. (2017). *Testing the Efficacy of DNA Barcodes for Identifying the Vascular Plants of Canada*. PLOS ONE 12(1): 1-19.
- Burger W.C. (1971). *Flora Costaricensis. Piperaceae*. Fieldiana Botany 35:5-217.
- Bye R. (1981). *Quelites-ethnoecology of edible greens-past, present and future*. Journal of Ethnobiology 1(1): 109-123.
- Bye R. y Linares E. (2000). *Los quelites, plantas comestibles de México: una reflexión sobre intercambio cultural*. CONABIO. Biodiversitas 31: 11-14
- Castro L.D., Basurto P.F., Mera O.L.M. y Bye R. (2011). *Los quelites, tradición milenaria en México*. SAGARPA- SNICS- SINAREFI- UACH, México. 8 pp.
- Chase M.W, et al. (2007). *A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants*. Taxon, 56(2): 295-299.
- Chen S., et al. (2010). *Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species*. PLoS ONE. 5 (1): 1-8.
- Cheng M.J., Lee S.J., Chang Y.Y., Wu S.H., Tsai I.L., Jayaprakasam B. y Chen Y.Y. (2003). *Chemical and cytotoxic constituents from Peperomia sui*. Phytochemistry. 63: 603-608.
- Cristians, S., Bye, R., y Nieto-Sotelo, J. (2018). *Molecular markers associated with chemical analysis: A powerful tool for quality control assessment of copalchi medicinal plant complex*. Front. Pharmacol. 9: 1–12.



- Cronquist A. (1981). *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. Columbia University Press, Nueva York.
- De Boer, H. J., Ichim, M. C., y Newmaster, S. G. (2015). *DNA Barcoding and Pharmacovigilance of Herbal Medicines*. *Drug Saf.* 38: 611–620.
- Dodson C.D., Dyer L.A., Searcy J., Wright Z. y Letourneau D.K. (2000). *Cenocladamine a dihydroxyridone alkaloid from Piper cenocladum*. *Phytochemistry*. 53: 51-54.
- Ebach M.C. y Holdrege C. (2005). *DNA barcoding is no substitute for taxonomy*. *Nature*. 434: 697.
- Erickson D.L., Spuge J., Resch A., Weigt L.A. y Kress W.J. (2008). *DNA barcoding in land plants: developing standards to quantify and maximize success*. *TAXON*. 57 (5): 1304-1316.
- Figueiredo R. A. y Sazima M. (2006). *Phenology and pollination biology of eight Peperomia species (Piperaceae) in semideciduous forests in Southeastern Brazil*. *Plant Biology* 9(1): 136-141.
- Gesto-Borroto, R., Cardoso-Taketa, A., Yactayo-Chang, J. P., Medina-Jiménez, K., Hornung-Leoni, C., Lorence, A., y Villarreal, M. L. (2019). *DNA barcoding and TLC as tools to properly identify natural populations of the Mexican medicinal species Galphimia glauca Cav.* *PLoS One*. 14: 1–18.
- Hajibabaei M., Singer G.A.C., Hebert P.D.N. y Hickey D.A. (2007). *DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics*. *TRENDS in Genetics* 23 (4): 167-172.
- Han J., Shin L., Chen X. y Lin Y. (2012). *Comparison of four DNA barcodes in identifying certain medicinal plants of Lamiaceae*. *Journal of Systematics and Evolution*, 50: 227-234.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball S.L. y DeWaard, J.R. (2003). *Biological identifications through DNA barcodes*. *Proceedings of the Royal Society B*. 270: 313-321.
- Hebert P. y Gregory T.R. (2005). *The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy*. *Systematic Biology*. 54 (5): 852-859.
- Heinrich, M. y Anagnostou, S. (2017). *From Pharmacognosia to DNA-Based Medicinal Plant Authentication - Pharmacognosy through the Centuries*. *Planta Med.* 83: 1110–1116.
- Hill A. W. (1907). *A revision of the geophilous species of Peperomia with some additional notes on their morphology and seedling structure*. *Annals of Botany* 21:139-160.
- Hollingsworth P.M., et al. (2009). *A DNA barcode for land plants*. *PNAS*. 106 (31): 12794-12797.

- Jaramillo M.A. y Manos P.S. (2001). *Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus Piper (Piperaceae)*. American Journal of Botany. 88: 706-716.
- Jones S.B. (1988). *Sistemática Vegetal*. McGraw-Hill, México, D.F.
- Kress W.J. y Erickson D.L. (2012). *DNA Barcodes: Methods and Protocols*. Humana Press. 470 pp.
- Kress W.J., Wurdack K.J., Zimmer E.A., Weigt L.A., Janzen D.H. (2005). *Use of DNA barcodes to identify flowering plants*. PNAS. 102 (23): 8369-8374.
- Lago J.H.G., et al. (2004). *Benzoic acid derivatives from Piper species and their fungitoxic activity against Cladosporium cladosporioides and C. sphaerospermum*. Journal of Natural Products. 67: 1783-1788.
- Linares E. y Aguirre J. (eds.). (1992). *Los quelites, un tesoro culinario*. Universidad Nacional Autónoma de México e Instituto Nacional de la Nutrición, México. 143 pp.
- Linares E. y Bye R. (2015). *Las especies subutilizadas de la milpa*. Revista Digital Universitaria. 16 (5): 1-22.
- Martínez-De La Cruz I., Villaseñor J. L., Aguilera G. L. I. y Rubí A. M. (2018). *Angiospermas nativas documentadas en la literatura para el Estado de México, México*. Acta Botánica Mexicana 124: 135-217.
- Mathieu G. (2007). *Compendium of herbarium names in the genus Peperomia (Piperaceae)*. Nautilus Academic Books. Zelzate, Belgium 616 pp.
- Matlock B. (2015). *Assessment of Nucleic Acid Purity*. Thermo Fisher Scientific, Eilmington, MA, USA.
- Medina G. C., Guevara-Féfer F., Martínez R. M. A., Silva-Sáenz P. y Chávez-Carbajal Ma. A. (2000). *Estudio florístico en el área de la comunidad indígena de Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México*. Acta Botánica Mexicana 52: 5-41.
- Mera-Ovando L. M., Alvarado-Flores R., Basurto-Peña F., Bye-Boettler R., Castro-Lara D., Evangelista V., Mapes-Sánchez C., Martínez-Alfaro M.A., Molina N. y Saldivar J. (2003). *“De quelites me como un taco”. Experiencia en educación nutricional*. Revista del Jardín Botánico Nacional 24 (1-2): 45-49.
- Mera O.L.M., Castro D. y Bye R. (compiladores). (2011). *Especies vegetales poco valoradas: una alternativa para la seguridad alimentaria*. UNAM- SNICS- SINAREFI, México. 215 pp.
- McKendrick M. (1992). *Peperomias*. Garden 117: 352-356.

- Mishra, P., Kumar, A., Nagireddy, A., Mani, D. N., Shukla, A. K., Tiwari, R., y Sundaresan, V. (2016). *DNA barcoding: An efficient tool to overcome authentication challenges in the herbal market*. *Plant Biotechnol. J.* 14, 8–21.
- Newmaster, S.G., Fazekas, A.J. y Ragupathy S. (2006). *DNA barcoding in land plants: evaluation of rbcL in a multigene tiered approach*. *Canadian Journal of Botany*. 84: 335-341.
- Nicolalde-Morejón F., Vergara-Silva F., González-Astorga J., Stevenson D.W., Vovides A.P. y Sosa V. (2011). *A character-based approach in the Mexican cycads supports diverse multigene combinations for DNA barcoding*. *Cladistics*. 27: 150-164.
- Nock C.J., Waters D.L.E., Edwards M.A., Bowen S.G., Rice N., Cordeiro G.M. y Henry R.J. (2011). *Chloroplast genome sequences from total DNA for plant identification*. *Plant Biotechnology Journal*. 9: 328-333.
- Novara L. J. (1998). *Piperaceae en: "Flora del Valle de Lerma"*. *Aportes Botánicos de Salta*. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta 5(1): 1-24.
- Orjala J., Erdelmeier C.A.J., Wright A.D., Rali T. y Sticher O. (1993). *Five new prenylated p-hydroxybenzoic acid derivatives with antimicrobial and molluscicidal activity from Piper aduncum leaves*. *Planta Medica*. 59: 813-818.
- Palhares, R. M., Drummond, M. G., Dos Santos Alves Figueiredo Brasil, B., Cosenza, G. P., Lins Brandao, M. D. G., y Oliveira, G. (2015). *Medicinal plants recommended by the world health organization: DNA barcode identification associated with chemical analyses guarantees their quality*. *PLoS One*. 10: 1–29.
- Pennisi E. (2007). *Wanted: A Barcode for Plants*. *Science*, 318: 190-191.
- Puillandre N., Lambert A., Brouillet S. y Achaz G. (2012). *ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation*. *Mol. Ecol.* 21, 1864–1877.
- Rojas-Zenteno, E. C., Orozco-Villa M., Romero-Rangel S., y Montoya-Ayala R. (2016). *Vegetación y flora del municipio de Temascaltepec, Estado de México, México*. *Polibotánica*, (42): 43-89.
- Raclariu A. C., Heinrich M., Ichim M. C., y De Boer, H. (2018). *Benefits and limitations of DNA barcoding and metabarcoding in herbal product authentication*. *Phytochem. Anal.* 29, 123–128.
- Rzedowski J. y Calderón de Rzedowski, G. (2010). *Flora fanerogámica del Valle de México*. Edición digital, Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México D.F.

Samain M. S. (2008). *Tackling Pandora's Box. Order out of chaos in the giant genus Peperomia (Pieraceae)*. Tesis de Doctorado, Ghent University, Gante, Bélgica.

Shaw J., Lickey E., Schilling E. y Small R. (2007). *Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III*. *American Journal of Botany*, 94(3): 275-288.

Silva R.V., Navickiene H.M.D., Kato M.J., Bolzani V., Méda C.I., Young M.C.M. y Furlan M. (2002). *Antifungal amides from Piper arboreum and Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*. 59: 521-527.

SNICS (Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas). (2018). *Línea 14. Promoción y fortalecimiento de redes sobre los recursos Fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. Quelites*. [En línea]. Disponible en: <https://www.gob.mx/snics/acciones-y-programas/linea-14-promocion-y-fortalecimiento-de-redes-sobre-los-recursos-fitogeneticos-para-la-alimentacion-y-la-agricultura-quelites> [Recuperado el 30 de mayo de 2019].

Solís G., Mera L.M., Castro D., Pinzón L.L., Noguez R., Casanova E. y Méndez A.R. (2016). *Conservación y aprovechamiento sostenible de especies vegetales tradicionales de México*. CONACYT- UACH- SAGARPA- SNICS. México. 98 pp.

Sucher, N. J. y Carles, M. C. (2008). *Genome-based approaches to the authentication of medicinal plants*. *Planta Med.* 74: 603–623.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., y Kumar S. (2013). *MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0*. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725–2729.

Techen, N., Parveen, I., Pan, Z., and Khan, I. A. (2014). *DNA barcoding of medicinal plant material for identification*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 25: 103–110.

Thorne R.F. (1992). *Classification and geography of the flowering plants*. *Botanical Review* 58:225-348.

Timme R., Kuehl E.J., Boore J.L. y Jansen R.K. (2007). *A comparative analysis of the Lactuca and Helianthus (Asteraceae) plastid genomes: identification of divergent regions and categorization of shared repeats*. *American Journal of Botany*, 94: 302–313.

Trelease W. (1922). *The peltate peperomias of North America*. *Botanical Gazette* 73:133-147.

Valentini A., Pompanon F. y Taberlet P. (2009). *DNA barcoding for ecologists*. *Trends in Ecology and Evolution* 24 (2): 110-117.

Vijayan K. y Tsou C.H. (2010). *DNA barcoding in plants: taxonomy in a new perspective*. Current Science. 99 (11): 1530-1541.

Vergara-Rodríguez D. (2013). *Diversidad y distribución de las especies de Peperomia (Piperaceae) en el Estado de Veracruz*. Tesis de Maestría. Universidad Veracruzana, Xalapa, México.

Vergara-Rodríguez D. y Krömer T. (2011). *¿Conoce usted el cilantro de monte?* Gaceta Universidad Veracruzana. 118: 24–26.

Wanke S., Samain M.S., Vanderschaeve L., Mathieu G., Goetghebeur P. y Neinhuis C. (2006). *Phylogeny of the genus Peperomia (Piperaceae) inferred from the trnK/matK region (cpDNA)*. Plant Biology 8: 93-102.

Whitlock B.A., Hale A.M. y Groff, P.A. (2010). *Intraspecific Inversions pose a challenge for the trnH-psbA plant DNA barcode*. PLoS ONE. 5 (7): 1-7.

Wiemers M., y Fiedler K. (2007). *Does the DNA barcoding gap exist? - a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae)*. Frontiers in zoology, 4-8.

Yuncker T.G. (1958). *The Piperaceae - A family profile*. Brittonia 10:1-7.

Yuncker T. (1965). *Contributions to the Flora of Tropical America: LXXIII: A New Peperomia from Mexico*. Kew Bulletin, 19(3): 415-415.

## Anexos

**Anexo 1.** Listado de muestras de *Peperomia* sp. a partir de muestras selectas de distintas poblaciones provenientes de la zona de los volcanes, Estado de México.

Registro / rotulado	Muestra	Peso (g)
Peperomia 1	Peperomia 1, 13-IX-18, Amecameca	0.0146
Peperomia 2	Peperomia 2, 13-IX-18, Amecameca	0.0084
Peperomia 3	Peperomia 3, 13-IX-18, Amecameca	0.0162
Peperomia 4	Peperomia 4, 13-IX-18, Amecameca	0.0183
Peperomia 5	Peperomia 5, 13-IX-18, Amecameca	0.0082
Peperomia 6	Berro, 22-VIII-18, 1	0.0177
Peperomia 7	Berro, 22-VIII-18, 2	0.0118
Peperomia 8	Berro, 22-VIII-18, 3	0.0144
Peperomia 9	Berro, 22-VIII-18, 4	0.0155
Peperomia 10	Berro, 22-VIII-18, 5	0.0126
Peperomia 11	Berro, 22-VIII-18, 6	0.0153
Peperomia 12	Berro, 22-VIII-18, 7	0.0121
Peperomia 13	PIP <i>Peperomia peltilimba</i> C.DC. ex Trel., MCH/ PBL-QD, 2018 <u>08</u> 23 Bye	0.0207
Peperomia 14	PIP <i>Peperomia tristachya</i> Kunth, DF cult, 2018 <u>08</u> 26 Bye	0.0218
Peperomia 15	PIP <i>Peperomia obtusifolia</i> (L.) A. Dietr., DF cult, 2018 <u>08</u> 26 Bye	0.0211
Peperomia 16	PIP <i>Peperomia obtusifolia</i> (L.) A. Dietr., DF cult, 2018 <u>08</u> 26 Bye	0.0226

Peperomia 17	PIP <i>Peperomia maculosa</i> (L.) Hook, MCH/DF 2018 <u>08</u> 24 Robert Bye	0.0201
Peperomia 18	Piperaceae Bye, 29 VIII 18, 1	0.0207
Peperomia 19	Piperaceae Bye, 29 VIII 18, 2	0.0210
Peperomia 20	Piperaceae Bye, 29 VIII 18, 3	0.0206
Peperomia 21	Piperaceae Bye, 29 VIII 18, 4	0.0218
Peperomia 22	Piperaceae Bye, 29 VIII 18, 5	0.0214
Peperomia 23	Invernadero Berro <u>2</u> 22 VIII 18, Ángel	0.0078
Peperomia 24	Invernadero Berro <u>3</u> 22 VIII 18, Ángel	0.0063
Peperomia 25	Invernadero Berro <u>10</u> 22 VIII 18, Ángel	0.0065
Peperomia 26	H1 Chico, 1	0.0201
Peperomia 27	H1 Chico, 2	0.0203
Peperomia 28	H1 Chico, 3	0.0203
Peperomia 29	H1 Chico, 4	0.0204
Peperomia 30	H1 Chico, 5	0.0202
Peperomia 31	H2 Corral PPA H2, 1	0.0204
Peperomia 32	H2 Corral PPA H2, 2	0.0207
Peperomia 33	H2 Corral PPA H2, 3	0.0206
Peperomia 34	H2 Corral PPA H2, 4	0.0203
Peperomia 35	H2 Corral PPA H2, 5	0.0202
Peperomia 36	PPA Hq.r 394	0.0204

























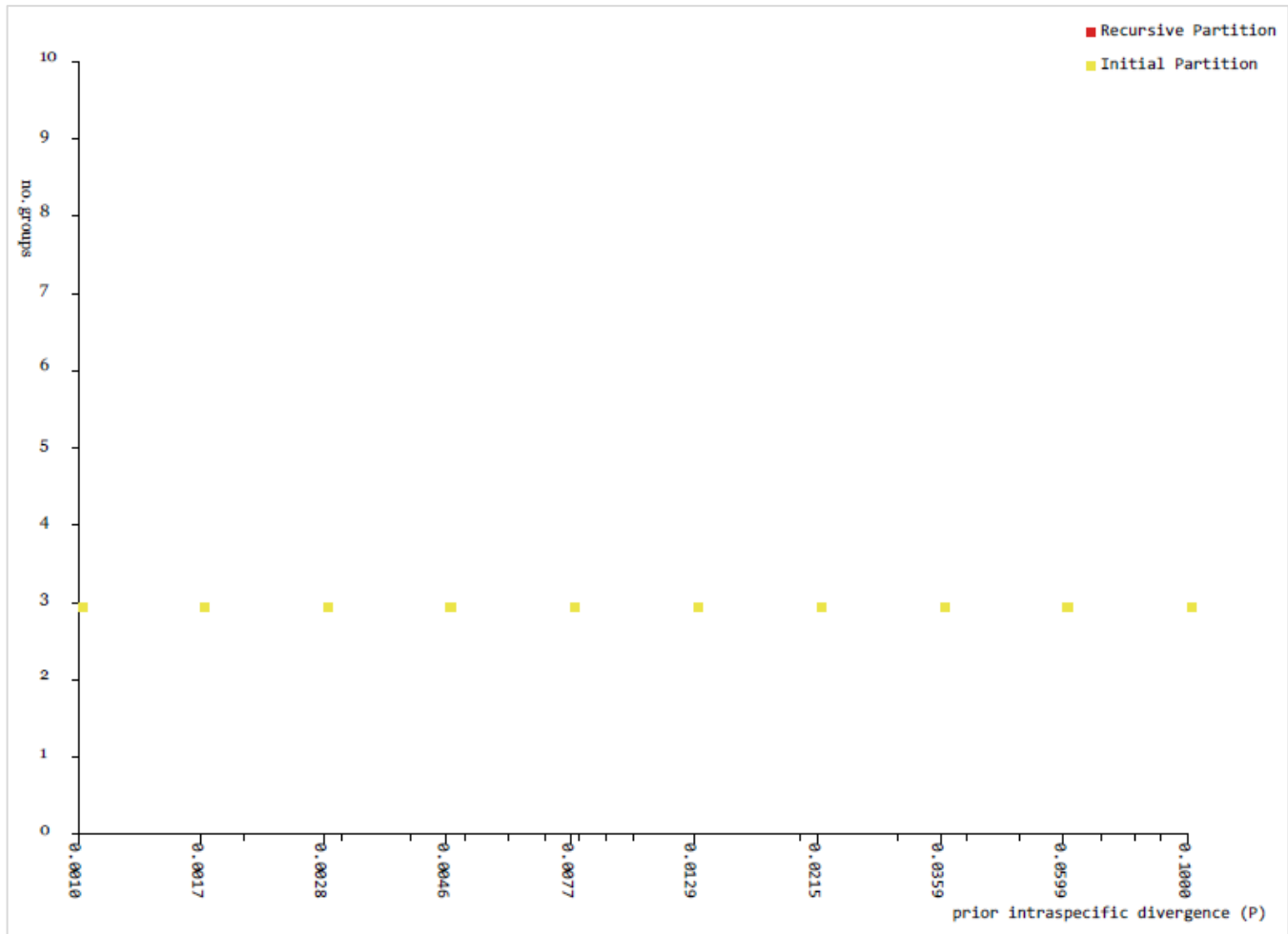




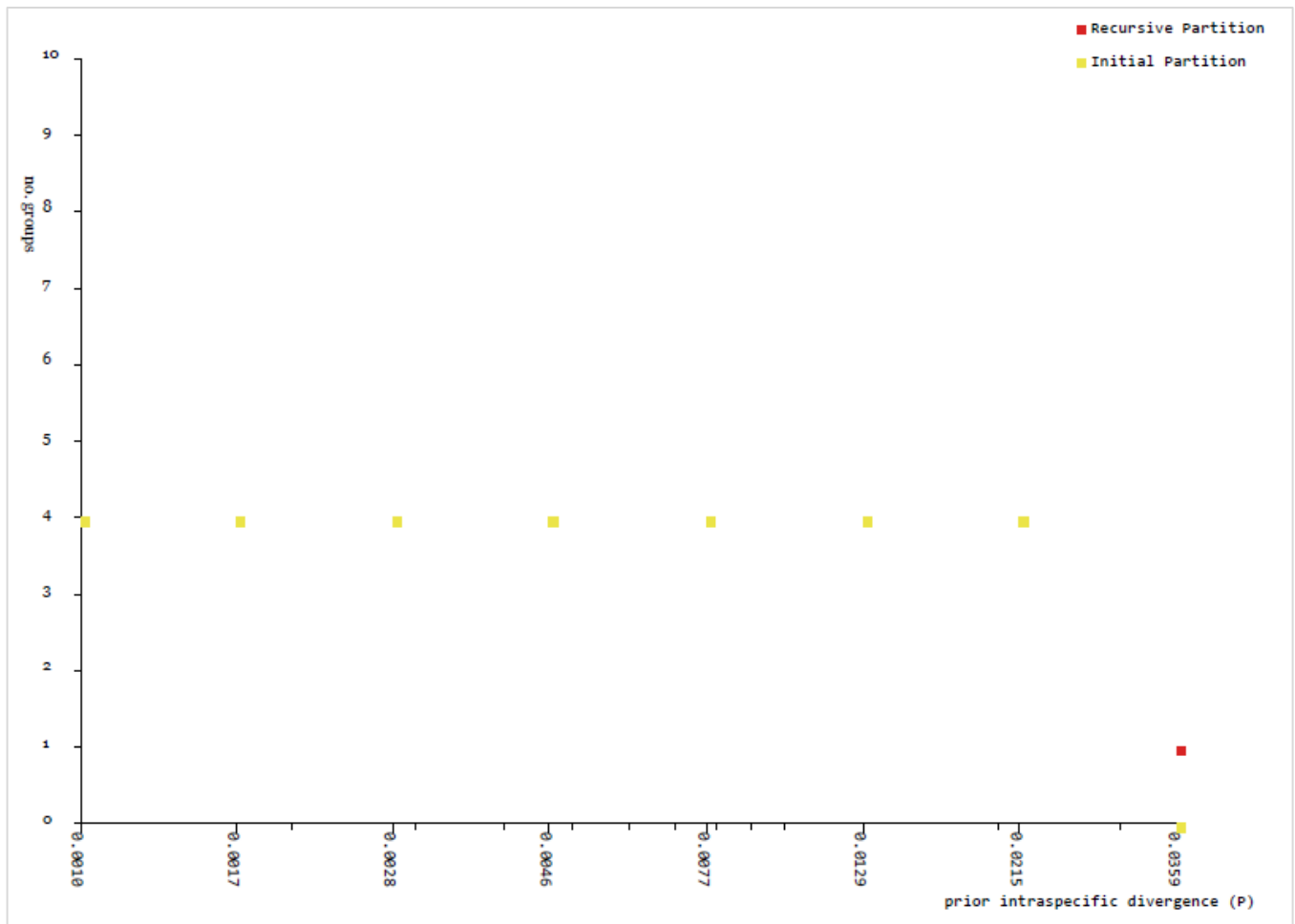




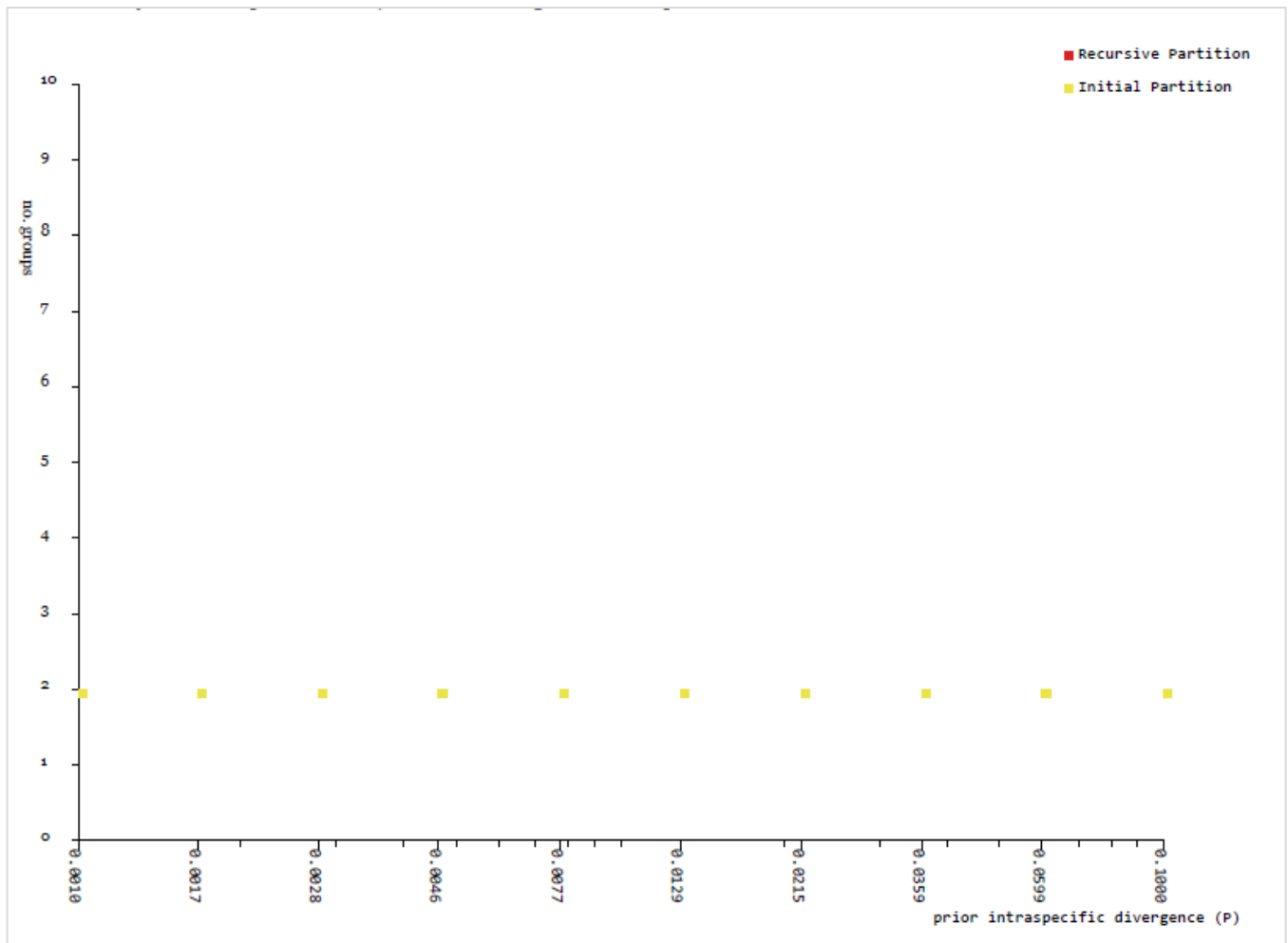
**Anexo 3.** Análisis de distancia por Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) de los marcadores moleculares *trnH-psbA*, *rbcL*, ITS2 y *rpl32-trnL* de las muestras de *Peperomia* sp. a partir de muestras selectas de distintas poblaciones provenientes de la zona de los volcanes, Estado de México.



**Anexo 3a.** Partición para el marcador molecular *trnH-psbA* de *Peperomia* sp. a partir de muestras selectas de distintas poblaciones provenientes de la zona de los volcanes, Estado de México. Generada a partir del método de descubrimiento automático de la distancia del código de barras (ABGD), la distancia se midió mediante la distribución de las diferencias por pares utilizando el modelo JC69 Jukes-Cantor.

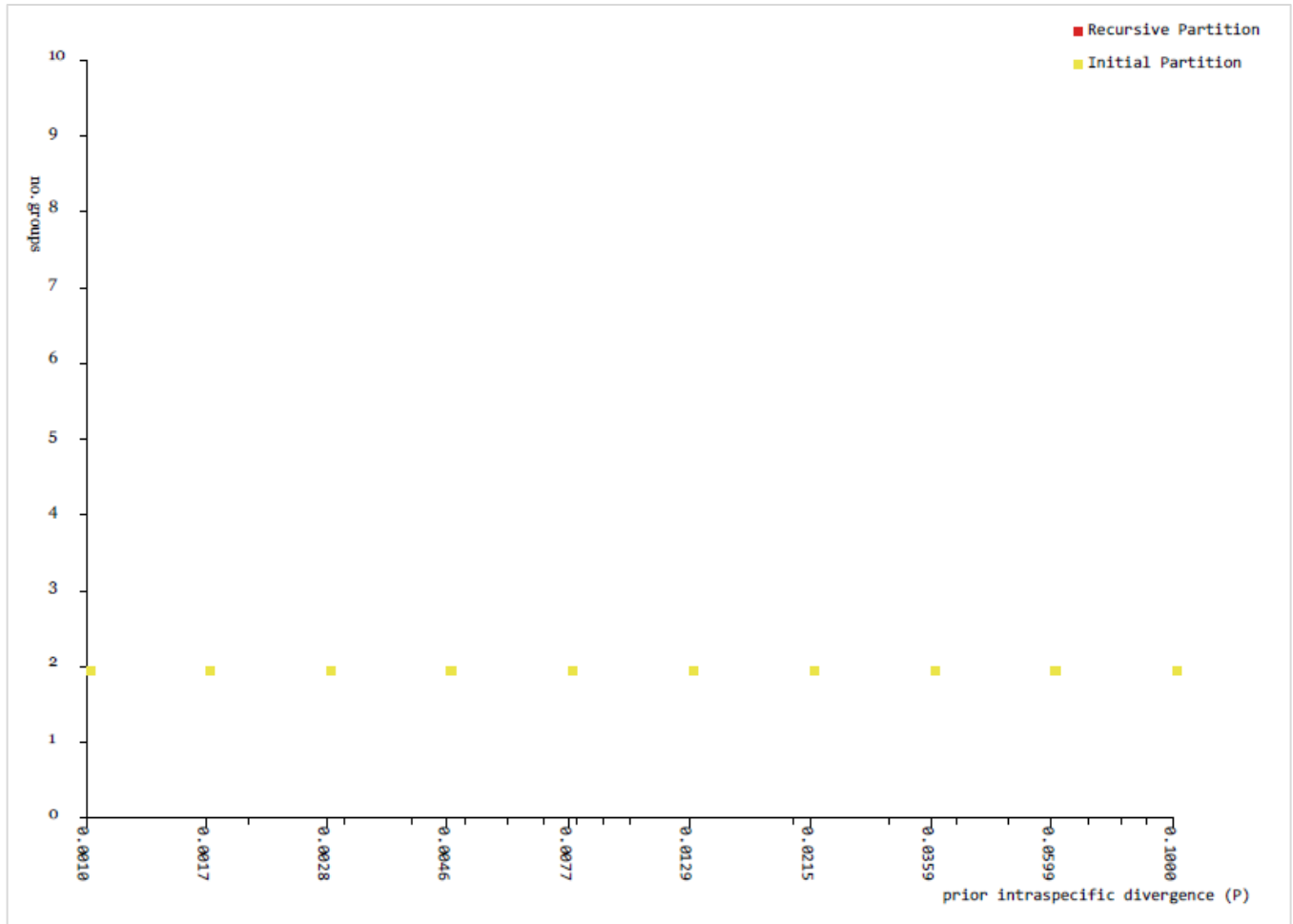


**Anexo 3b.** Partición para el marcador molecular *rbcl* de *Peperomia* sp. a partir de muestras selectas de distintas poblaciones provenientes de la zona de los volcanes, Estado de México. Generada a partir del método de descubrimiento automático de la distancia del código de barras (ABGD), la distancia se midió mediante la distribución de las diferencias por pares utilizando el modelo JC69 Jukes-Cantor.

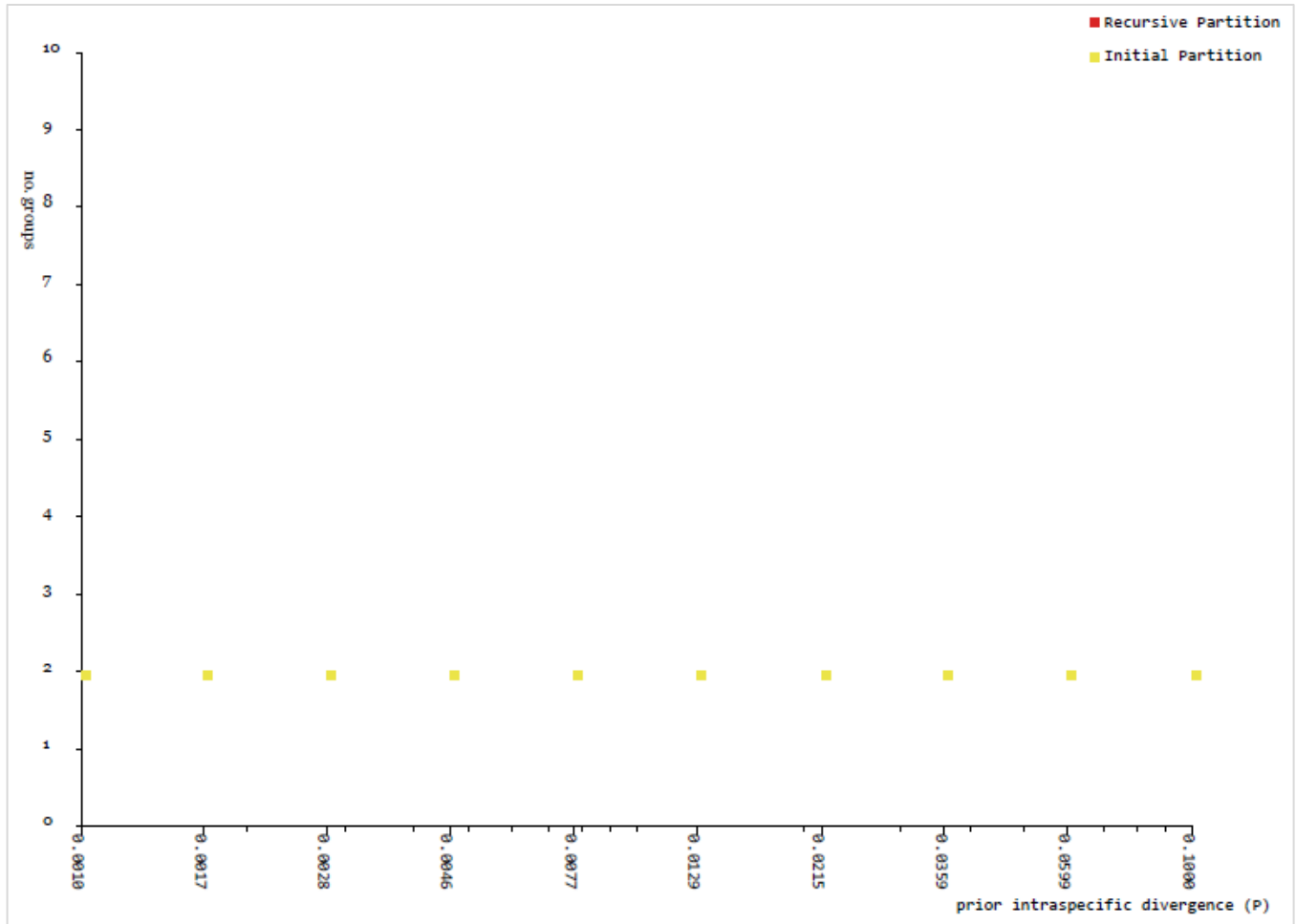


**Anexo 3c.** Partición para el marcador molecular *ITS2* de *Peperomia* sp. a partir de muestras selectas de distintas poblaciones provenientes de la zona de los volcanes, Estado de México. Generada a partir del método de descubrimiento automático de la distancia del código de barras (ABGD), la distancia se midió mediante la distribución de las diferencias por pares utilizando el modelo JC69 Jukes-Cantor.





**Anexo 3d.** Partición para el marcador molecular *rpl32-trnL* de *Peperomia* sp. a partir de muestras selectas de distintas poblaciones provenientes de la zona de los volcanes, Estado de México. Generada a partir del método de descubrimiento automático de la distancia del código de barras (ABGD), la distancia se midió mediante la distribución de las diferencias por pares utilizando el modelo JC69 Jukes-Cantor.



**Anexo 3e.** Partición para la secuencia concatenada con los marcadores moleculares *trnH-psbA*, *rbcl* e *ITS2* de *Peperomia* sp. a partir de muestras selectas de distintas poblaciones provenientes de la zona de los volcanes, Estado de México. Generada a partir del método de descubrimiento automático de la distancia del código de barras (ABGD), la distancia se midió mediante la distribución de las diferencias por pares utilizando el modelo JC69 Jukes-Cantor.