



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Horticultura Ambiental.



**Protocolo de germinación de *Clinopodium mexicanum* (Benth.) Govaerts
(Poleo verde).**

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en Horticultura Ambiental

PRESENTA:

Silva Castellanos Ana Paola

DIRIGIDO POR:

Dra. Magallán Hernández Emma Fabiola

Dra. Magallán Hernández Emma Fabiola
Presidente

Dr. Vergara Pineda Santiago
Secretario

M. en C. Ramírez Segura Oliva del Carmen
Vocal

Dra. Queijeiro Bolaños Mónica Elisa
Vocal

M. en C. Alvarado Aurora Mariana
Suplente

Santiago de Querétaro, Querétaro, 2019.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Protocolo de germinación de *Clinopodium
mexicanum* (Benth.) Govaerts (Poleo verde).

por

Ana Paola Silva Castellanos

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: CNLIN-212827

RESUMEN

El poleo verde, *Clinopodium mexicanum*, es una especie nativa de México, perteneciente a la familia Lamiaceae, con demanda en los mercados locales por sus propiedades medicinales. No se encontró información sobre su cultivo, por lo que el presente estudio tiene como objetivo elaborar un protocolo de germinación que contribuya al conocimiento de esta especie para su manejo, cultivo, comercialización y conservación. Se colectaron muestras en dos poblaciones silvestres del estado de Querétaro. Se llevó a cabo la caracterización morfológica de sus frutos y semillas, se evaluó el porcentaje de viabilidad y se llevaron a cabo pruebas de germinación. Se estableció un diseño univariado con tres tratamientos, controlando la temperatura (28, 21 y 15 °C), humedad del sustrato (100%), humedad ambiental (30%) y fotoperiodo (12/12), durante 20 días por tratamiento. Como resultados se determinó que los frutos son núculas de forma cilíndrica, presentan cinco lóbulos con tricomas en el ápice y un anillo de tricomas en el interior. Su cubierta es estriada, con glándulas y se encuentran en tonalidades verdes y cafés. Miden en promedio 1.6 mm de ancho × 6.7 mm de largo y su peso es de 436.5 frutos/g. Las semillas son ovaladas de color café a negro, presentan un conjunto de gránulos blancos en la base y cubiertas reticuladas, miden 0.8 mm de ancho × 1.6 mm de largo y el peso es de 2,686.5 semillas/g. Las semillas de color negro presentaron 100% de viabilidad y las cafés 33%. Se observó que las semillas son quiescentes, fotoblásticas positivas y presentan mixocarpia durante la germinación. El tratamiento a 28 °C, fue el más óptimo para la germinación llegando al 10% en 4.2 días y al 50% en 6.2 días, con un máximo de 93% de germinación en 12 días.

Palabras clave: semillas, plantas medicinales, caracterización morfológica, viabilidad, condiciones ambientales.

ABSTRACT

The green poleo *Clinopodium mexicanum*, a specie from Mexico, belong to the Lamiaceae family, has a lot of demand in local markets due to its medicinal properties. No information about its cultivation was found, so the present study aims were the elaboration of a germination protocol that contributes to the knowledge of this specie for its management, cultivation, commercialization and conservation. Samples were collected in two wild populations of the state of Querétaro. The morphological characterization of fruits and seeds was carried out, viability percentage and germination tests were performed. A univariate design was established with three treatments, controlling the temperature (28, 21 and 15 °C), humidity of the substrate (100%), relative humidity (30%) and photoperiod (12/12), during 20 days per treatment. As a result, it was determined that the fruits are cylindrical, have five lobes with trichomes at the apex and a ring of trichomes inside, striated coat with glands and are found in green and brown tones. Range of measure felt on average 1.6 mm wide × 6.7 mm long and their weight was 436.5 fruits/g. The seeds are oval brown to black, have a set of white granules at the base and reticulated covers, measure 0.8 mm wide × 1.6 mm long and weighed 2,686.5 seeds/g. The black seeds showed 100% viability and brown ones 33%. It was observed that the seeds are quiescent, positive photoblastic and have myxocarpia during the germination. The treatment at 28 °C, was the most optimal for the germination reaching 10% germination in 4.2 days and 50% germination in 6.2 days with a maximum of 93% in 12 days.

Keywords: seeds, medicinal plants, morphological characterization, viability, environmental conditions.

DEDICATORIAS

A mi mamá, papá, hermanos y abuelitos con todo mi cariño.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro que a través de la Dirección de Investigación y Posgrado del Fondo de Investigación (FOFI 2018-2020), dio su apoyo para el desarrollo de la presente investigación.

Al M. en G. Hugo Luna Soria por ayudarme en la elaboración de los mapas utilizados en este estudio.

A mis maestros y compañeros de la Licenciatura que estuvieron al pendiente de la investigación y me aportaron conocimiento y apoyo para su culminación.

A Arantxa Nayeli Sánchez, Monserrat Serrano, Janett Medina y a Axel Moreno por su ayuda en la separación de muestras, su colaboración en el abstract y su cariño.

A mi mamá, hermanos y abuelitos, por darme todo lo necesario para concluir mis estudios, también por su paciencia, confianza y palabras de aliento.

A mi papá por estar al pendiente y su apoyo.

A mi directora de tesis Dra. Fabiola Magallán por ofrecerme esta investigación y permanecer a mi lado durante todo el proceso, a mis sinodales el Dr. Santiago Pineda, M. en C. Oliva Segura, Dra. Mónica Queijeiro y M. en C. Aurora Alvarado por su compromiso con el proyecto, por enriquecer esta investigación con su conocimiento, pero sobre todo gracias por todo su cariño, tiempo y enseñanzas.

ÍNDICE

RESUMEN	II
ABSTRACT	III
DEDICATORIAS	IV
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE CUADROS	X
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 La semilla y su germinación.....	2
2.1.1 Factores ambientales que afectan la germinación.....	3
2.1.2 Protocolo de germinación.....	5
2.2 Caracterización morfológica de frutos y semillas	5
3. ESPECIE DE ESTUDIO	6
3.1 Taxonomía y clasificación del género <i>Clinopodium</i>	6
3.2 Distribución	7
3.3 Descripción del hábitat y tipos de vegetación	8
3.4 Descripción botánica <i>Clinopodium mexicanum</i>	9
3.5 Fenología y ecología.....	10
3.6 Mecanismos de dispersión.....	10
3.6.1 Mixocarpia.....	11
3.6.2 Ornamentaciones.....	12
3.7 Etnobotánica	12
3.8 Fitoquímica	13
4. ANTECEDENTES	14

4.1	Estudios en semillas de <i>Clinopodium mexicanum</i>	14
4.2	Germinación de <i>Clinopodium mexicanum</i>	15
4.3	Propagación de <i>Clinopodium mexicanum</i>	15
5.	JUSTIFICACIÓN	16
6.	OBJETIVOS	16
6.1	Objetivo general.....	16
6.2	Objetivos particulares	16
7.	METODOLOGÍA.....	16
7.1	Área de estudio.....	17
7.2	Modo de colecta, selección y almacenamiento.....	19
7.3	Caracterización morfológica de frutos y semillas de <i>C. mexicanum</i>	19
7.4	Porcentaje de viabilidad de semillas en <i>C. mexicanum</i>	19
7.5	Condiciones ambientales óptimas para la germinación de semillas de <i>C. mexicanum</i>	20
7.5.1	Selección de condiciones ambientales para pruebas de germinación	20
7.5.2	Diseño experimental para pruebas de germinación.....	21
7.5.3	Pruebas de germinación	22
7.6	Análisis estadístico	22
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
8.1	Caracterización morfológica de frutos.....	23
8.1.1	Tamaño.....	23
8.1.2	Forma y color.....	24
8.1.3	Cubierta.....	25

8.1.4	Peso.....	27
8.2	Caracterización morfológica de semillas.....	27
8.1.1	Tamaño.....	27
8.1.2	Forma y color.....	29
8.1.3	Cubierta.....	30
8.1.4	Peso.....	32
8.3	Pruebas de viabilidad de las semillas de <i>C. mexicanum</i>	32
8.4	Pruebas de germinación	34
8.5	Protocolo de germinación	38
9.	CONCLUSIONES.....	43
10.	LITERATURA CITADA.....	44
11.	APÉNDICES	50
11.1	Apéndice 1. Tamaño de frutos de <i>C. mexicanum</i> en poblaciones Sombrerete y Maguey Verde.....	50
11.2	Apéndice 2. Clave de colores de Munsell en frutos de <i>C. mexicanum</i> de las poblaciones Sombrerete y Maguey Verde.	51
11.3	Apéndice 3. Tamaños de semillas de <i>C. mexicanum</i> en poblaciones Sombrerete y Maguey Verde.....	52
11.4	Apéndice 4. Clave de colores de Munsell en semillas de <i>C. mexicanum</i> de las poblaciones Sombrerete y Maguey Verde.	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de <i>C. mexicanum</i> en los estados de México. Tomado de Magallán <i>et al.</i> (2015).....	7
Figura 2. Distribución de <i>C. mexicanum</i> en los municipios de Querétaro. Tomado de Magallán <i>et al.</i> (2015).....	8
Figura 3. Morfología de <i>C. mexicanum</i> . A. Acomodo de hojas y botones de florales. B. Detalle de perianto de flores. C. Corola de flores. D. Frutos (núculas)..	9
Figura 4. Mapa conceptual de la metodología utilizada en la investigación.	17
Figura 5. Mapa de los puntos de colecta de <i>C. mexicanum</i>	18
Figura 6. Mapa de estaciones meteorológicas revisadas y puntos de colecta	20
Figura 7. Diferencia de tamaño en frutos de <i>C. mexicanum</i> entre poblaciones. A. Largo. B. Ancho.....	24
Figura 8. Frutos de <i>C. mexicanum</i>	25
Figura 9. Cubierta de los frutos (núculas) de <i>C. mexicanum</i> . A. Acomodo paralelo de tricomas en paredes internas de las cápsulas. B. Tricomas abundantes y homogéneos en las puntas de las cápsulas. C. Glándulas en cubierta de las núculas.	26
Figura 10. Diferencia de tamaño en semillas de <i>C. mexicanum</i> entre poblaciones. A. Largo. B. Ancho.	28
Figura 11. Semillas de <i>C. mexicanum</i>	30
Figura 12. Cubierta de las semillas de <i>C. mexicanum</i> . A. Cubierta reticulada. B. Gránulos encontrados en zona de emergencia radicular.	31
Figura 13. Prueba de viabilidad con tetrazolio en semilla de <i>C. mexicanum</i> . A. Semillas de color café y negro. B. Prueba en semillas de color negro. C. Prueba en semillas de color café.	33
Figura 14. Porcentajes de germinación obtenidos en los tratamientos.	34
Figura 15. Tiempo de germinación (t 10 y t 50) en semillas de <i>C. mexicanum</i>	35
Figura 16. <i>Clinopodium mexicanum</i> en medio silvestre. A. Fotografía del arbusto. B. Flores C. Fruto semi-seco de <i>C. mexicanum</i> sugerido para colecta con fines de propagación.....	40

Figura 17. Frutos y semillas de *C. mexicanum*. A. Frutos maduros color café en estado, semi seco. B. Semillas maduras color negro..... 41

Figura 18. Semillas germinadas de *C. mexicanum* en caja Petri con sustrato de algodón. 42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción de poblaciones de colecta de semillas de *C. mexicanum* (Alvarado *et al.*, 2018)..... 18

Cuadro 2. Comparación de datos obtenidos de las estaciones meteorológicas cercanas a los puntos de colecta. 21

Cuadro 3. Porcentaje de germinación y tiempo (días) en que las semillas de *C. mexicanum* alcanzaron t 10 y t 50 de germinación por tratamientos..... 35

1. INTRODUCCIÓN

Un protocolo de germinación, es un estudio que permite conocer las condiciones ambientales necesarias, para favorecer la germinación de las semillas de diferentes especies. El conocer cómo los factores ambientales influyen en la germinación de las especies, facilita la producción de plantas y permite identificar los periodos más favorables para el establecimiento de las mismas en la naturaleza (Herranz *et al.*, 2002). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, cuando no existen datos científicos publicados o documentados sobre el cultivo de una especie, deben aplicarse los métodos de cultivo tradicionales, o desarrollarse nuevos métodos mediante la investigación (OMS, 2003). Por lo cual, es necesario desarrollar protocolos de germinación, especialmente en plantas que presenten demanda comercial, como son las plantas aromáticas y medicinales (PAMs) (Fretes *et al.*, 2010). Las PAMs, son aquellas que contienen principios activos, es decir, que poseen sustancias con actividad terapéutica (Moré *et al.*, 2010). En los últimos años se ha incrementado el uso y comercialización de las PAMs, para la fabricación de diferentes productos a nivel mundial. Sin embargo, son especies de baja producción comercial, por el desconocimiento de la forma de propagación y la falta de capacitación para el manejo de los cultivos. (Fretes *et al.*, 2010).

Los principios activos de las PAMs, también son llamados metabolitos secundarios y son sustancias de gran importancia ecológica, porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente. Son sintetizadas en pequeñas cantidades por algunas plantas como estrategia de defensa contra las condiciones de estrés biótico y abiótico, por ejemplo, en la defensa del daño ocasionado por heridas, el ataque de insectos, microorganismos patógenos o depredadores vertebrados, en otras ocasiones, para la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas o los frutos y para competir por el espacio de suelo, luz y nutrientes con otras plantas, entre otros (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003; Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009).

Los metabolitos secundarios tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, porque también pueden ser utilizados como ingredientes de medicamentos en la industria farmacéutica y extraerse de la planta o emplearse directamente en la parte de la planta donde se contengan. Pueden variar dependiendo de las condiciones ambientales donde haya crecido la planta y cada planta puede tener una o más aplicaciones que varían de acuerdo a la cultura, cada una puede usarse sola o en conjunto con otras plantas (Moré *et al.*, 2010; Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009).

Las lamiáceas, son una familia con un gran número de especies de PAMs demandadas en los mercados porque son productoras de compuestos de fuerte impacto comercial. Éstas en todas sus partes, presentan glándulas secretoras, de algunos tipos de metabolitos secundarios de importancia medicinal, como son los aceites esenciales (Fernández-Alonso y Rivera-Díaz, 2006; Di Sapio *et al.*, 2012). *Clinopodium mexicanum* (Benth.) Govaerts (poleo verde), es una especie nativa de México, la cual pertenece a dicha familia y es demandada en los mercados locales por sus propiedades medicinales (Magallán *et al.*, 2015). La presente investigación pretende contribuir al conocimiento de la especie en aspectos de su germinación, que permitan llevarla al cultivo, manejo, comercialización y conservación para evitar que los ejemplares sigan siendo extraídos de sus poblaciones silvestres.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 La semilla y su germinación

La semilla representa la etapa inicial en el ciclo de vida de las plantas que las presentan. Son la estructura mediante la cual se resguarda el material genético contenido en el embrión, protegiéndolo de las condiciones ambientales adversas, para permitir la propagación y dispersión de las especies a través del tiempo (Márquez-Guzmán *et al.*, 2013). Para lograr lo anterior, la semilla experimenta cambios bioquímicos y metabólicos que conducen al crecimiento del embrión y a la protusión de la radícula a través de su cubierta, a este fenómeno se le conoce como germinación (Márquez-Guzmán *et al.*, 2013). La germinación es un proceso

que consta de tres fases: la primera es la imbibición, es decir, que la semilla incrementa su captación de agua; en la segunda, continúa la imbibición y comienza la actividad metabólica y en la tercera fase surge la emergencia de la radícula (Hartmann *et al.*, 2011). Dicho suceso sólo ocurre cuando las condiciones ambientales a las que se encuentra sometida una semilla, son favorables para el establecimiento de los nuevos individuos (Márquez-Guzmán *et al.*, 2013).

Para que se active el metabolismo de una semilla y surja una nueva planta, se requieren tres condiciones: 1) que la semilla sea viable (que el embrión esté vivo y sea capaz de germinar), 2) romper la dormancia (estado de la semilla, que le impide germinar en condiciones ambientales favorables) o la quiescencia (condición de la semilla para que germine en condiciones óptimas) y 3) que las condiciones ambientales sean apropiadas (Matilla, 2008; Hartmann *et al.*, 2011).

2.1.1 Factores ambientales que afectan la germinación

Hartmann *et al.* (2011), mencionan que existen factores ambientales, como: el agua, la temperatura y la luz, entre otros, que afectan el proceso de germinación en las semillas. En el caso del agua, para aquellas semillas que no presentan dormancia, sólo es un factor limitante para la germinación, ya que es necesaria para imbibir las semillas y dar paso al inicio de la germinación, estando en las temperaturas adecuadas. El estrés hídrico es un factor capaz de decrecer el porcentaje de germinación, por el contrario, controlar la hidratación de las semillas puede acelerar la emergencia radicular. Es importante contemplar la calidad del agua, ya que si presenta un alto contenido de sales, se puede decrecer o inhibir la germinación. De acuerdo a los parámetros de agua para uso agrícola establecidos por la FAO, si los sólidos disueltos (SD) son mayores de 2 g/L, o la conductividad eléctrica (CE) es mayor de 3 dS/m, los problemas de salinidad pueden ser muy graves a menos que se establezcan una serie de tratamientos (Carrazón-Alocén, 2007).

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes para la germinación; debido a que el calor permite que ocurran los procesos metabólicos dentro de la semilla para germinar. Además, es una señal precisa de

la época y sitio (condición idónea) para germinar y establecer la plántula. La temperatura de germinación de cada especie varía conforme al intervalo de temperaturas a las que está expuesta en su hábitat, a este intervalo de temperaturas se le llama ventana térmica. Dentro de dicho intervalo se encuentran las temperaturas máxima, mínima y óptima (mayor germinación, en menor tiempo), para la germinación, a éstas se les conoce como temperaturas cardinales (Márquez-Guzmán *et al.*, 2013). En condiciones extremas la temperatura puede desecar las semillas e inhibir la germinación, pero también puede controlar enfermedades y eliminar la dormancia. Usualmente el tiempo de germinación es más lento, y el porcentaje de germinación es menor a bajas temperaturas y se incrementan gradualmente conforme la temperatura lo hace, pero una vez que llegan a su nivel óptimo, decrecen nuevamente debido a que entran en estrés térmico (Hartmann *et al.*, 2011).

La luz es considerada un indicador de las condiciones ambientales para la germinación. Cada especie necesita alcanzar su umbral crítico (intensidad), y que éste permanezca el tiempo suficiente para lograr su germinación (fotoperiodo). Las semillas son clasificadas con base a sus requerimientos de luz para germinar en: fotoblásticas negativas (aquellas semillas que germinan en ausencia de luz), indiferentes (pueden germinar con y sin luz) y fotoblásticas positivas (aquellas que requieren luz para germinar) (Márquez-Guzmán *et al.*, 2013).

En las semillas fotoblásticas positivas la germinación es regulada por una familia de pigmentos fotosensibles llamados fitocromos, estos funcionan como receptores de las señales luminosas y las integran en una cadena de transducción que concluye en la activación o inhibición de la germinación. Dichas semillas se caracterizan por ser de tamaño pequeño y requerir poca profundidad de siembra. En ellas, los fitocromos son capaces de percibir la presencia de luz sobre la superficie del suelo y pueden indicar a la semilla, la existencia de una oportunidad para que la plántula alcance capas superiores del suelo, utilizando sus propias reservas. Esto es un factor de sobrevivencia para semillas pequeñas, cuyas

plántulas son pequeñas, frágiles y contienen mínimas reservas para crecer (Hartmann *et al.*, 2011 y Márquez-Guzmán *et al.*, 2013).

2.1.2 Protocolo de germinación

Los estudios de germinación permiten conocer los mecanismos e interacciones que se llevan a cabo entre las condiciones internas de la semilla (viabilidad, quiescencia o dormancia) y los factores ambientales (como la luz, temperatura y humedad) que determinan el éxito del proceso. Un protocolo de germinación es un estudio que por medio de la experimentación, permite establecer las condiciones ambientales que favorecen la germinación de una especie determinada; de modo que ésta pueda ser propagada indefinidamente en laboratorio y como resultado genera una ficha explicativa. La información mínima con la que este tipo de estudios debe contar es: taxonomía, nombres comunes, origen, descripción, método de colecta -incluyendo características del material de propagación a elegir- descripción de frutos, descripción de semillas, condiciones de almacenamiento, tratamientos pre-germinativos, viabilidad de las semillas y método de germinación mencionando: el tipo de sustrato, humedad ambiental, condiciones de iluminación, características del riego, tiempo de germinación y porcentaje obtenido. Este tipo de estudios son importantes para obtener material de propagación sin afectar a las poblaciones silvestres; especialmente en especies endémicas, raras o amenazadas. Y para generarlos también es necesario llevar a cabo la caracterización morfológica de la especie a estudiar. (ONUAA, 2007; Rodríguez-Servín, *et al.*, 2010; Martínez-Peña *et al.*, 2012).

2.2 Caracterización morfológica de frutos y semillas

La caracterización morfológica de las semillas, es la determinación de un conjunto de características usando descriptores definidos. Forma parte de las características que permiten diferenciar e identificar taxonómicamente a las plantas y también conservar las especies. La caracterización de semillas es el primer paso para el mejoramiento de cultivos y los programas de conservación (Hernández-Villarreal, 2013).

De acuerdo a Franco e Hidalgo (2003), entre los miembros que conforman la población de una especie, existen características que pueden o no ser visibles. La gran mayoría de las características visibles son referentes a la descripción morfológica de la planta o a su arquitectura y son denominados descriptores morfológicos. Uno de los tipos de descriptores morfológicos que existen, son los morfoagronómicos, estos son relevantes en el uso de especies cultivadas, pueden ser cualitativos o cuantitativos e incluyen algunos de los caracteres botánicos-taxonómicos, como el tipo y la forma de la hoja, la forma del fruto y la descripción de la flor, más otros que son importantes desde el punto de vista agronómico, de mejoramiento genético, comercialización y consumo. En su gran mayoría, estos descriptores tienen aceptable heredabilidad local, aunque en algunas especies aprovechadas por el hombre se pueden encontrar diferentes grados de variabilidad y además, pueden ser afectados por cambios ambientales. Algunos ejemplos de dichos caracteres para semillas son: color, forma, brillo, cubierta y excreción de mucílago; mientras que para frutos son: tamaño, forma, color, contorno u ornamentación y presencia o ausencia de glándulas, entre otros (Martín-Mosquero *et al.*, (2004).

3. ESPECIE DE ESTUDIO

3.1 Taxonomía y clasificación del género *Clinopodium*

El nombre *Clinopodium* proviene del griego *cline*, inclinación y *podos*, pie; por la apariencia inclinada de sus flores. *Clinopodium* pertenece a la subfamilia Nepetoideae de la familia Lamiaceae. Específicamente el género *Clinopodium sensu stricto* consta de alrededor de 100 especies en el mundo (Martínez-Gordillo, *et al.*, 2013). De acuerdo a Martínez-Gordillo *et al.* (2013), se sugiere que las especies de América pertenecen al género *Clinopodium* y no a *Satureja*, en el que eran incluidas anteriormente. Actualmente el género *Satureja* se encuentra confinado únicamente al viejo mundo. En México sólo se encuentran 14 especies de *Clinopodium*, de las cuales 10 son endémicas.

3.2 Distribución

La especie *Clinopodium mexicanum* es nativa y endémica de la región central de México. Se distribuye dentro del país en los estados de Chiapas, Guanajuato, Hidalgo, Guerrero, Jalisco, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Veracruz, Tamaulipas y Querétaro (Figura 1) (Magallán *et al.*, 2015; Villaseñor, 2016). Dentro del estado de Querétaro se encuentra en los municipios de Cadereyta, Ezequiel Montes, Pinal de Amoles, Querétaro, San Joaquín y Tolimán (Magallán *et al.*, 2015). Además se han encontrado poblaciones de la especie en el municipio de Peñamiller (Obs. Pers., 2018) (Figura 2).

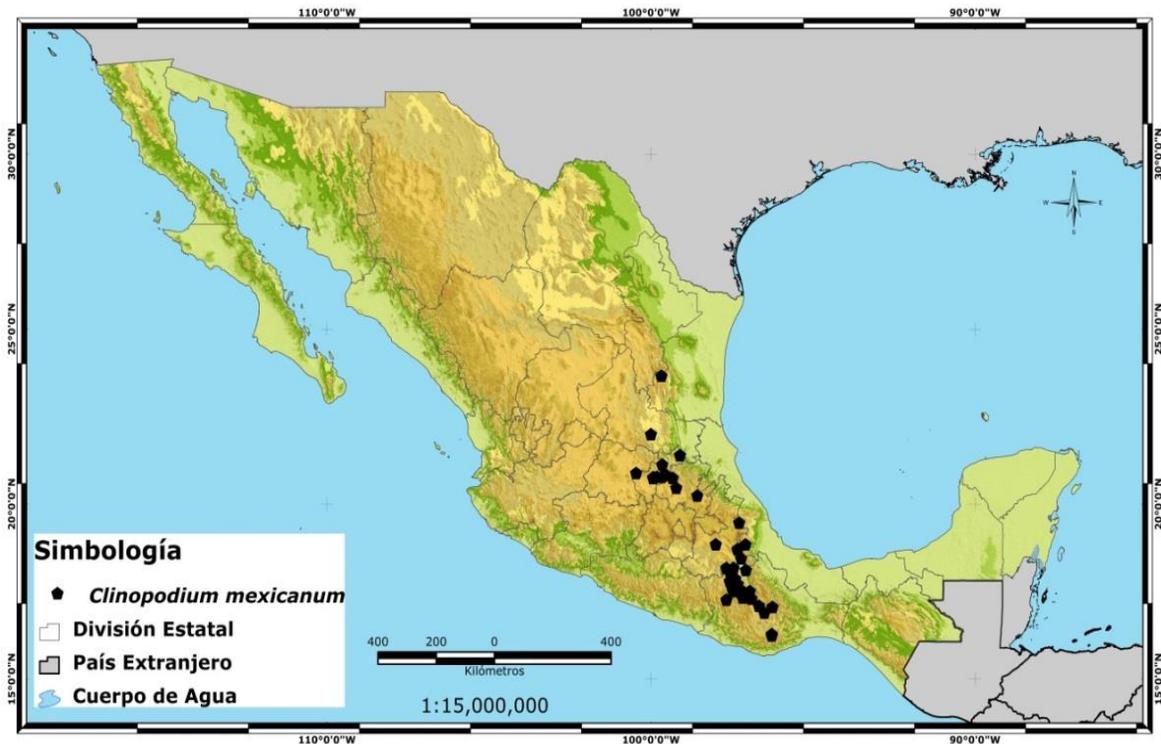


Figura 1. Distribución de *C. mexicanum* en los estados de México. Tomado de Magallán *et al.* (2015).

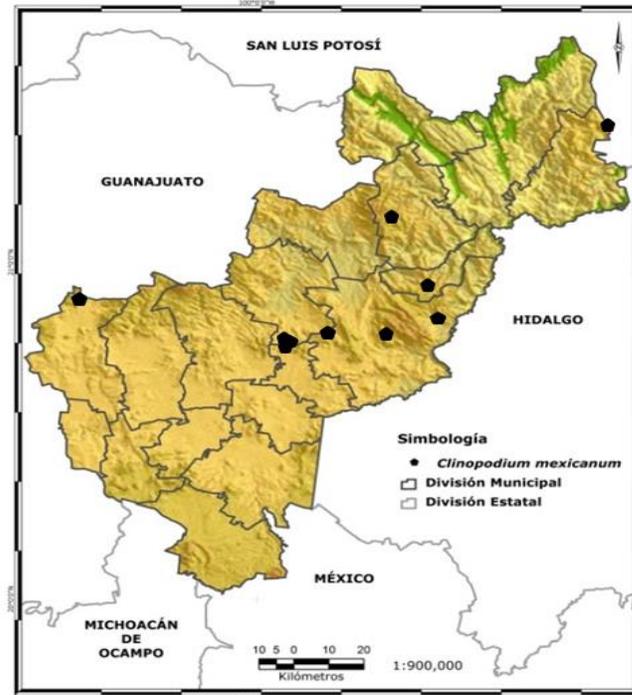


Figura 2. Distribución de *C. mexicanum* en los municipios de Querétaro. Tomado de Magallán *et al.* (2015).

3.3 Descripción del hábitat y tipos de vegetación

Las poblaciones silvestres de *C. mexicanum* se encuentran frecuentemente en sierras de roca caliza en altitudes de 1700 a 2600 msnm. Principalmente en regiones de clima templado húmedo (Cs) y en menor proporción en climas semiáridos (BSk) según la clasificación de Köppen (Magallán *et al.*, 2015). Se distribuye en regiones cuyo intervalo de precipitación es de 400 a 1500 mm, en oscilaciones de temperatura media anual (TMA) entre los 14 y 20 °C. Se encuentra en un amplio intervalo de tipos de vegetación como lo son matorral xerófilo, matorral micrófilo, matorral rosetófilo, pastizal, vegetación secundaria de bosques de *Quercus*, bosque de *Juniperus* y bosque de *Pinus*, principalmente en suelos de tipo leptosol y cambisol calcárico, con alta pedregosidad (Magallán *et al.*, 2015).

3.4 Descripción botánica *Clinopodium mexicanum*

Es una especie de hábito arbustivo, con tallos pubescentes. Tiene hojas opuestas, pecioladas, ovadas, con el margen aserrado, hasta de 1 cm de largo, glabras. Sus flores son solitarias y se encuentran en las axilas de las hojas superiores. La forma del cáliz es tubular y mide hasta de 6 mm de largo, tiene 13 venas evidentes y un anillo de pelos en su interior, el cual se divide hacia el ápice en 5 pequeños lóbulos. La corola es roja (raramente amarillenta) de 2.2 a 3.4 cm de largo, también tubular y se amplía hacia el ápice, dividida en 2 labios. El labio superior es erecto, mientras que el labio inferior se encuentra dividido en 3 lóbulos. Tiene 4 estambres, 2 de ellos más largos que los otros. El estilo está dividido hacia el ápice en 2 ramas desiguales. Produce frutos secos indehiscentes llamados núculas, los cuales al madurar, se dividen en su interior en 4 segmentos (tetranúcula), donde contienen 4 semillas. Dichas semillas no contienen endospermo (Figura 3) (Fernández-Alonso y Rivera-Díaz, 2006; Hanan-Alipi, 2009; Melgarejo-Hernández, 2010).



Figura 3. Morfología de *C. mexicanum*. A. Acomodo de hojas y botones de florales. B. Detalle de perianto de flores. C. Corola de flores. D. Frutos (núculas).

3.5 Fenología y ecología

Clinopodium mexicanum es un arbusto perenne, el cual florece durante todo el año. En una misma planta, pueden encontrarse al mismo tiempo botones florales, flores en antesis y frutos maduros e inmaduros (Magallán *et al.*, 2015). No se han encontrado registros específicos de las interacciones ecológicas de la especie de estudio. Sin embargo, Magallán *et al.* (2015), observaron como visitantes florales a mariposas y colibríes. En especies filogenéticamente cercanas a *C. mexicanum*, como *Satureja arvensis*, se tiene registro de sus interacciones de polinización, la cual es muy atractiva para abejas y mariposas (Escrivá, 2010). Estudios sobre la polinización de *Clinopodium multiflorum*, indican que es llevada a cabo por aves e insectos, los cuales transportan el polen de una planta a otra, siendo posibles polinizadores el moscardón (abejorro, nativo de Chile), la abeja y el picaflor (colibrí). Se menciona que los estambres sobresalientes de las flores de *C. multiflorum* también podrían permitir la polinización por el viento (FSC *et al.*, 2016), dicho proceso puede ser sugerido en *C. mexicanum*, de acuerdo a la descripción de Hanan-Alipi (2009), donde indica que los estambres presentes en esta especie, también son sobresalientes, del mismo modo se pueden proponer como polinizadores las mariposas y colibríes observados por Magallán *et al.* (2015).

3.6 Mecanismos de dispersión

No hay información específica sobre los mecanismos de dispersión de las semillas de *C. mexicanum*. Sin embargo, existen diferentes estudios del tema, para la familia Lamiaceae, Hernández-Gómez y Miranda-Colín (2008), mencionan que para *Salvia hispánica* (chía, cuyas semillas tienen apariencia semejante), las semillas maduras son extraídas al sacudir las inflorescencias y por medio de vibración, cuando inflorescencias se encuentran secas y con los cálices están abiertos. Dicho proceso de acuerdo a De Wet y Harlan (1975; citado en Hernández-Gómez y Miranda-Colín, 2008), es una imitación del mecanismo natural de dispersión por gravedad, de las semillas de las plantas silvestres (Hernández-Gómez y Miranda-Colín, 2008). Se encontró que *Clinopodium multiflorum*, que también habita en el sotobosque, se dispersa a través de la caída

de sus semillas al suelo por gravedad (FSC *et al.*, 2016), se puede inferir que el mismo proceso de dispersión por gravedad ocurre en *C. mexicanum*.

Estudios sobre la dispersión de especies de la familia Lamiaceae, mencionan que algunos géneros de la misma subfamilia de *C. mexicanum* como lo son *Prunella*, *Cleonia*, *Scutellaria* y *Ocimum*, pertenecen al grupo de los balistas; es decir, que son favorecidos por la lluvia al incidir sobre el cáliz y dar propulsión a la núcula. Al mismo tiempo, dichos géneros, presentan mixocarpia (secreción de mucílago), lo cual favorece tanto la atelecoria (fijación de la núcula al suelo), como a la epizooecia (dispersión a larga distancia, por medio de la adhesión en animales). (Pijl, 1982 en Martín-Mosquero *et al.*, 2004).

3.6.1 Mixocarpia

El mucílago es una sustancia que se presenta como cobertura en la superficie de algunas semillas y es producto casi siempre de las células de la epidermis externa de las mismas (Márquez-Guzmán *et al.*, 2013). En el caso de las lamiáceas se ha registrado la presencia de mixocarpia para varios géneros, la cual consiste en la liberación de mucílago a través de las células del epicarpo de las núculas maduras, al tener contacto con el agua (Bonzani *et al.*, 2011).

La mixocarpia es una condición que distingue a la subfamilia Nepetoideae, de otras especies de la familia Lamiaceae, presentándose en el 70 - 75% de sus géneros y especies (Bonzani *et al.*, 2011). En el trabajo de Martín-Mosquero *et al.* (2004), mencionan que la formación del halo mucilaginoso crea un microclima alrededor de la núcula, el cual podría favorecer la germinación. Otras funciones de la mixocarpia sugeridas en el trabajo de Alfayate *et al.* (2008), son: 1) mecanismo para impedir la desecación, 2) una estrategia para fijarse al suelo, 3) una manera de impedir el hundimiento en la tierra y lograr la germinación, 4) una forma de evitar la germinación prematura de las semillas, o 5) un procedimiento para cubrirse con las partículas del suelo como camuflaje contra animales granívoros.

En la investigación de Martín-Mosquero *et al.* (2004), se hace mención a que en algunas especies de la subfamilia Nepetoideae, la producción de mucílago, ya que está relacionada con la capacidad de germinación en las distintas especies, al incrementar la producción de mucílago, se favorece la germinación de las semillas. En los resultados de dicho estudio las especies con mayor producción de mucílago (*Prunella vulgaris* y *Prunella laciniata*) presentaron porcentajes de germinación cercanos al 100 y 90%, respectivamente, mientras que especies con menor cantidad de mucílago como *Prunella hssopifolia* no superaron el 30% de germinación.

3.6.2 Ornamentaciones

Existen algunos estudios que documentan la relación existente entre la ornamentación de la testa y los mecanismos de dispersión. Tal es el caso de algunas especies de *Mentha*, en las que las ornamentaciones reticulada y estriada les confieren a las superficies depresiones en las que acumulan aire, permitiéndoles la flotación en agua corriente; esta morfología ubicaría a los órganos de dispersión dentro del mecanismo de nautocoria (Bonzani *et al.*, 2011).

3.7 Etnobotánica

Clinopodium mexicanum comúnmente es conocida como: toronjil de monte (Estrada-Reyes *et al.*, 2010), chipito (Hernández-García, 2014) poleo, poleo verde, toronjil de menta (Magallán *et al.*, 2015) y como hierba del borracho, pero también en Santiago Huaucilla, Oaxaca, conserva su nombre mixteco *itanduku* o probablemente *ita'nduku* (Nambo-Camacho, 2015).

Estrada-Reyes *et al.* (2010), menciona que la infusión de las hojas de *C. mexicanum* es utilizada como sedante y como remedio analgésico dentro de la medicina tradicional mexicana para inducir el sueño. Hernández-García (2014) documentó que en San Miguel Tulancingo, Oaxaca las plantas de *C. mexicanum* son utilizadas para hacer té de chipito, por medio de la cocción de sus tallos, lo beben como agua de uso diario y también lo utilizan como medicinal para problemas estomacales o cruda.

Nambo-Camacho (2015), menciona que el poleo verde es una de las plantas con mayor importancia en la medicina tradicional de Santiago Huaucilla, Oaxaca. En esta localidad, esta especie es utilizada principalmente para los padecimientos gastrointestinales (dolor y malestar estomacal). Es ingerida de forma oral a través de la decocción de sus partes aéreas. Menciona que es una planta con alta relevancia cultural y alto valor de uso ya que no solo se consume como medicinal, sino que debido a que tiene un sabor muy agradable es ingerida como aperitivo, y digestivo después de la comida y para aliviar los síntomas después de haber estado ebrio, siendo así una planta de uso cotidiano para la población mencionada.

3.8 Fitoquímica

A través de un análisis químico del extracto acuoso de *C. mexicanum*, Estrada-Reyes *et al.* (2010), mencionan que los principales compuestos activos del extracto de poleo verde, son algunos metabolitos secundarios de tipo flavonoide, como la poncirina, isonaringina y la neoponcirina (NEO), siendo este último su compuesto mayoritario (Cassani *et al.*, 2013). No hay pruebas químicas que comprueben el uso del poleo verde contra problemas digestivos, gastrointestinales ni como remedio para la cruda. Sin embargo, sus efectos depresores en el sistema nervioso central, sí han sido estudiados por medio de modelos biológicos utilizando ratones como animales de experimentación. El extracto acuoso de *C. mexicanum* demostró tener efectos sedantes y disminuir el tiempo de latencia de la hipnosis inducida con pentobarbital sódico, aumentando la duración del sueño (Estrada-Reyes *et al.*, 2010; Estrada-Reyes *et al.*, 2015).

Los efectos ansiolíticos del poleo verde fueron probados por medio del comportamiento de ratones en tableros con perforaciones y a campo abierto. Además, se comparó el compuesto NEO con Diazepam (que es un fármaco derivado de la benzodiazepina, utilizado como ansiolítico) y ambos compuestos presentaron respuestas positivas al disminuir la actividad de los ratones (Estrada-Reyes *et al.*, 2010; Cassani *et al.*, 2013).

Por medio de pruebas en placas térmicas, con ratones a los que se les administró el extracto de *C. mexicanum* El compuesto NEO se comparó con ibuprofeno, mostrando mejores efectos (significativamente, $p < 0.001$) para contrarrestar la nocicepción e incrementó el tiempo de respuesta al estímulo térmico, en medida que aumentó la dosis del extracto. El efecto de la NEO fue similar al producido por el ketorolaco (que es un potente analgésico). La NEO no fue asociada a ningún efecto adverso, ya que no produjo ninguna perturbación motora visible en los animales evaluados. (Estrada-Reyes *et al.*, 2010; Cassani *et al.*, 2013; Estrada-Reyes, 2015).

El extracto de poleo verde prolongó el tiempo de aparición de las convulsiones inducidas por pentilentetrazol y picrotoxina, siendo capaz de prevenir completamente la muerte producida por picrotoxina en los sujetos experimentales. (Estrada-Reyes, 2010; Estrada-Reyes, 2015). La toxicidad aguda producida por el extracto, se evaluó por medio de su dosis letal media ($DL_{50} = 2850$ mg/kg) y se determinó que la toxicidad del extracto es 10 veces mayor que la dosis más alta a la que demostró su efecto sedante, por lo que *C. mexicanum* ofrece una amplia ventana terapéutica, cuando se administra de forma aguda (Estrada-Reyes, 2015).

4. ANTECEDENTES

4.1 Estudios en semillas de *Clinopodium mexicanum* y especies relacionadas

Magallán *et al.* (2015), indican que los cuatro segmentos del fruto contienen semillas elípticas de color negro, tienen una cuña en uno de sus extremos y miden de 1.5 a 2.0 mm de largo y 0.6 a 1.0 mm de ancho. En el trabajo de Bonzani *et al.* (2011), sobre *Mentha*, se encontró que algunas lamiáceas presentan ceras epicuticulares en su cubierta, las cuales pueden clasificarse en gránulos esféricos, filamentosos y cúbicos. Además menciona, que se podría inferir desde un punto de vista ecológico, que debido a su ubicación, éstos depósitos ceríceos, cumplen con la función de proteger la zona de emergencia radicular.

4.2 Germinación de *Clinopodium mexicanum* y especies relacionadas

El único estudio encontrado sobre la germinación de la especie, fue el llevado a cabo por Magallán *et al.* (2015), en el cual observaron a *Clinopodium mexicanum* dentro del medio silvestre reproduciéndose de manera sexual. Además, fue llevado a cabo en una unidad productiva, dentro de un sombreadero, donde las semillas de poleo verde, fueron expuestas sólo al 70% de luz solar, sin control, ni monitoreo del fotoperiodo, humedad o temperatura. Compararon tres tratamientos con diferentes sustratos: 1) peat moss, 2) arena + lombricomposta y 3) suelo de la región + lombricomposta (1:1:1), en charolas de germinación, utilizando 30 semillas por tratamiento (10 semillas por repetición). Basados en sus resultados sugieren el uso de 50% lombricomposta y 50% arena como sustrato de germinación, ya que en ese sustrato obtuvieron 60% de semillas germinadas, las cuales iniciaron el proceso a partir del día 15 y hasta el día 18 después de la siembra. Además, recomiendan riegos diarios, superficiales, con atomizador para que la superficie del sustrato permanezca húmeda, (en días calurosos deben ser dos veces por día).

Otro estudio bajo condiciones de sombreadero en una especie de la familia Lamiaceae, es el de Bello-González *et al.* (2013), para la germinación de *Satureja macrostema* en el cual recomiendan utilizar un sombreadero al 50% de luz y como sustrato tierra de monte. En dicho sustrato ellos obtuvieron 35% de germinación, lo describen como un material ligero que evita el apelmazamiento, presenta microporos y materia orgánica lo cual brinda buena aireación, drenaje y capacidad de intercambio iónico al suelo. Además de contar con niveles de sales propios de los suelos donde se distribuye la especie favoreciendo su germinación y crecimiento. Por otro lado, sugieren que el aumento de la temperatura en primavera favorece la germinación y les permite a las plántulas establecerse antes de la llegada del invierno.

4.3 Propagación de *Clinopodium mexicanum*

Hernández-García (2014), documenta que el poleo verde ha sido una especie propagada en huertos familiares de San Miguel Tulancingo, Oaxaca. Sin embargo, menciona que dichas plantas han sido obtenidas por medio de

propagación asexual, ya que son resultado de trasplantes o de esquejes de poblaciones silvestres. Respecto a la propagación sexual de la especie no se encontró más información.

5. JUSTIFICACIÓN

Debido a la falta de información para establecer cultivos de *Clinopodium mexicanum*, así como de un protocolo de germinación más específico, las poblaciones silvestres son vulnerables a la extracción de sus ejemplares. La falta de información sobre la germinación de la especie y su demanda en los mercados locales, generan la necesidad de elaborar un protocolo de germinación para esta especie. Llevar a cabo una investigación sobre las condiciones ambientales que favorecen la germinación de *C. mexicanum* y caracterizar los frutos y semillas de la especie aportará información para su eventual cultivo y programas de conservación.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

- Generar un protocolo de germinación de *Clinopodium mexicanum*

6.2 Objetivos particulares

- Caracterizar morfológicamente los frutos y semillas de *C. mexicanum* (tamaño, color, forma, cubierta y peso).
- Determinar el porcentaje de viabilidad de las semillas en una población de *C. mexicanum*.
- Definir las condiciones ambientales óptimas para la germinación de semillas de *C. mexicanum*.

7. METODOLOGÍA

A manera de esquematizar la metodología de la presente investigación, se llevó a cabo la elaboración del siguiente mapa conceptual (Figura 4). En el cual se sintetizan los procedimientos que se utilizaron para el cumplimiento de cada uno de los objetivos planteados.

Metodología

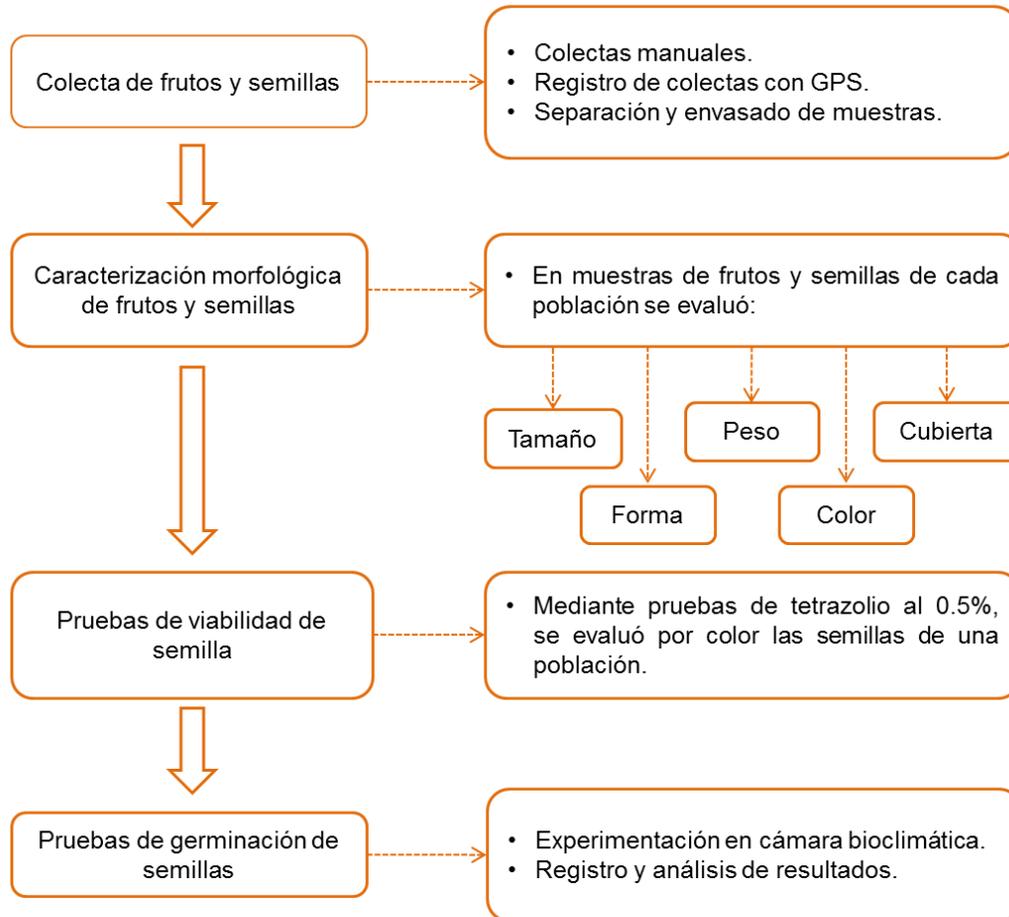


Figura 4. Mapa conceptual de la metodología utilizada en la investigación.

7.1 Área de estudio

Teniendo como criterio la accesibilidad y la disponibilidad de las plantas, se seleccionaron dos poblaciones de poleo verde en el estado de Querétaro para la colecta de frutos y semillas. Las poblaciones muestreadas fueron: Sombrerete, Cadereyta de Montes en las coordenadas 20°47'84" N, 99°39'97" O a 2512 msnm y Maguey Verde, Peñamiller, Querétaro, en las coordenadas 21°05'85" N, 99°41'77" O a 2296 msnm (Figura 5). En ambas poblaciones se registraron las

coordenadas utilizando GPS Oregon 650[®] y se investigaron sus características de suelo, tipo de vegetación y clima (Cuadro 1).

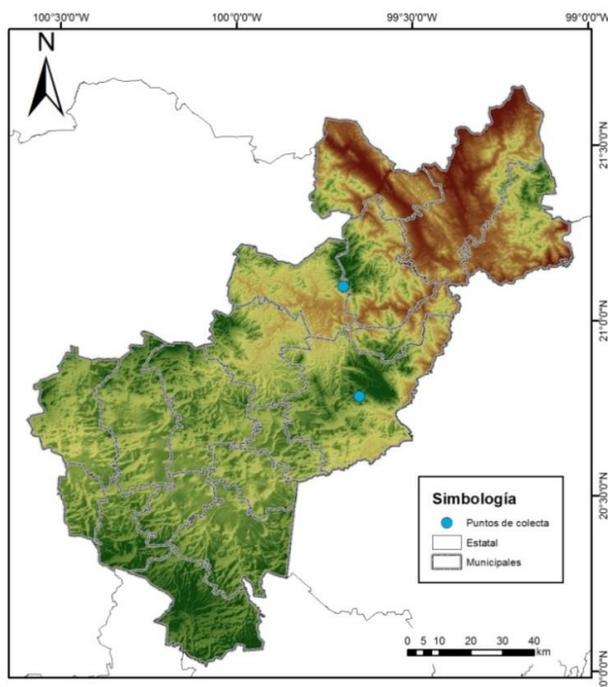


Figura 5. Mapa de los puntos de colecta de *C. mexicanum*

	Sombrerete	Maguey Verde
Municipio	Cadereyta de Montes	Peñamiller
Coordenadas	20°47'30" N, 99°39'97" O	21°09'48" N, 99°69'51" O
Tipo de vegetación	Matorral xerófilo, micrófilo. Posteriormente plantación de <i>Pinus cembroides</i> .	Transición entre bosque de matorral xerófilo y bosque de <i>Juniperus</i> .
Altitud	2512 msnm	2296 msnm
Humedad relativa	74.20%	63.89%
Características del suelo	Textura: franco arenoso	Textura: franco arenoso
	Alcalinidad: moderada (pH= 8.22)	Alcalinidad: media (pH= 7.87)
	Salinidad: baja, imperceptible (CE= 0.126 dS/m)	Salinidad: baja, imperceptible (CE= 0.307 dS/m)
	Buen drenaje	Buen drenaje
	Materia orgánica: alta (4.2%)	Materia orgánica: alta (11.11%)

Cuadro 1. Descripción de poblaciones de colecta de semillas de *C. mexicanum* (Alvarado *et al.*, 2018).

7.2 Modo de colecta, selección y almacenamiento

Se llevaron a cabo dos colectas (una por población). Utilizando tijeras de poda, se cortaron únicamente ramas de las plantas que presentaron frutos (sin distinción de colores), y se anotaron sus respectivos datos de colecta. El material se colocó en bolsas de papel estraza y se transportó a temperatura ambiente.

En el laboratorio, las muestras fueron extendidas sobre una charola plástica lisa, para separar únicamente los frutos. Éstos fueron envasados y el resto del material se regresó a las bolsas. Posteriormente con ayuda de una lupa, pinzas planas de punta delgada y una lámpara, se separaron las semillas de los frutos manualmente. Las semillas que llegaron a encontrarse sueltas en la muestra fueron separadas utilizando un tamiz metálico del número 10 con abertura entre celdas a 2 mm. Al finalizar, las semillas se almacenaron en frascos de vidrio con sílica gel, en condiciones de temperatura ambiental y a la sombra.

7.3 Caracterización morfológica de frutos y semillas de *C. mexicanum*

Para llevar a cabo, la descripción morfológica de frutos y semillas, se tomó una muestra de 30 frutos y 30 semillas por población, utilizando vernier, pinzas de disección planas, aguja de disección y microscopio de disección. El color se determinó utilizando tablas de Munsell (2011). Para observar y describir las cubiertas de los frutos y las semillas se utilizó en microscopio de barrido en modo de presión variable (sin recubrimiento) y dichas observaciones fueron fotografiadas. Para determinar el peso promedio de los frutos y las semillas se utilizó una báscula analítica, tomando muestras de 100 semillas y 100 frutos por población, obteniendo a su vez el peso promedio individual por fruto y semilla.

7.4 Porcentaje de viabilidad de semillas en *C. mexicanum*

Para las pruebas de viabilidad se usaron sólo semillas de la población Maguey Verde, debido a la disponibilidad. En estas pruebas se separaron las semillas por color en dos muestras: semillas de color negro y semillas de color café, cada muestra conformada por 30 semillas. Modificando la técnica de Victoria *et al.* (2006), cada muestra se dejó remojar por 48 h en agua destilada. Se hizo un corte transversal con navaja delgada en cada una de las semillas y se colocaron

en una solución de tetrazolio al 0.5% por 24 h. Posteriormente, se observó en el estereoscopio cada semilla con aguja y pinzas planas de disección, registrando los resultados de tinción por semilla.

7.5 Condiciones ambientales óptimas para la germinación de semillas de *C. mexicanum*

7.5.1 Selección de condiciones ambientales para pruebas de germinación

Se revisaron los datos en Weather Underground (TWC, 2018) a partir de enero del año 2000 hasta diciembre del 2017, de tres estaciones meteorológicas del estado de Querétaro, localizadas en los municipios de: Cadereyta de Montes, Peñamiller y Pinal de Amoles (Figura 6). Estos municipios fueron seleccionados por ser lugares donde se han encontrado poblaciones de la especie de estudio y por su cercanía a los puntos de colecta.

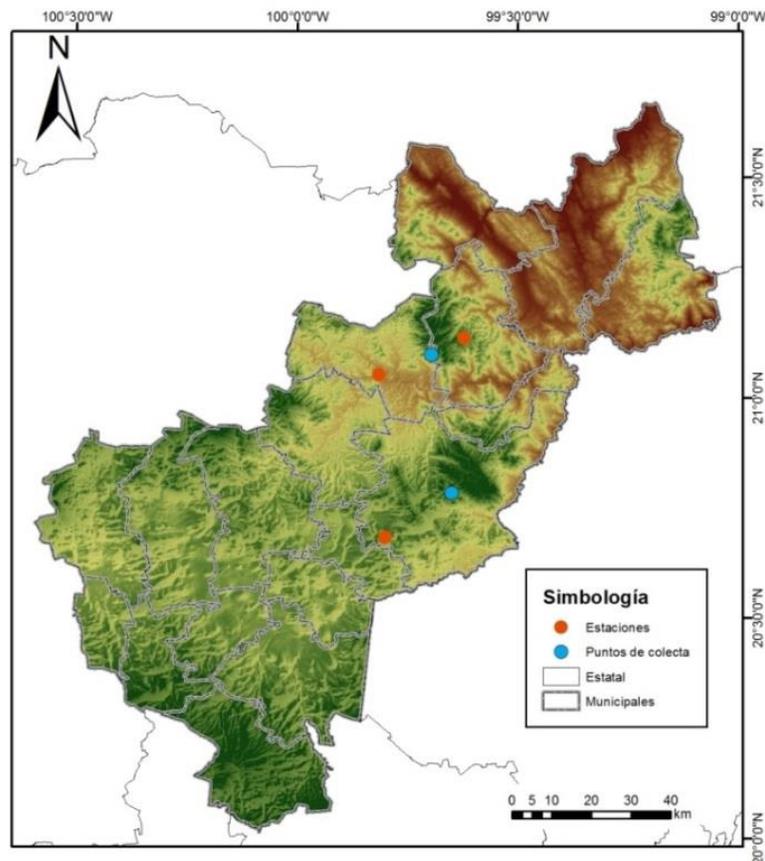


Figura 6. Mapa de estaciones meteorológicas revisadas y puntos de colecta

Una vez recopilada la información, se generó una tabla comparativa de las condiciones ambientales de cada estación (Cuadro 2), y se consideró la información obtenida de los municipios en los que se encontró la especie, para fijar el diseño experimental.

Estación meteorológica	Temperatura (°C)			Humedad (%)			Precipitación (mm)
	Max	Min	Prom	Max	Min	Prom	Max
Cadereyta de Montes	34.6	-5.2	15.7	100	4	63.5	4336
Peñamiller	40.8	-6.7	20.5	100	3	56.8	1971
Pinal de Amoles	28.1	-2.7	14	100	2	76.2	1733

Cuadro 2. Comparación de datos obtenidos de las estaciones meteorológicas cercanas a los puntos de colecta.

7.5.2 Diseño experimental para pruebas de germinación

Se determinó el diseño experimental, basados en las temperaturas máximas, mínimas y promedio de las estaciones meteorológicas de cada población (Cuadro 2), utilizando las siguientes temperaturas: 28, 21 y 15 °C, las cuales se encuentran dentro del intervalo de la temperatura en la zona. Aunque se registran porcentajes de humedad promedio de 56.8 a 77.2%, se decidió establecer un 30% de humedad ambiental constante para evitar problemas contaminación por hongos en las muestras de los experimentos. Los cuales se llevaron a cabo dentro de la cámara bioclimática, refrigerada, con fotoperiodo (CBRF-20). Por último, el fotoperiodo fue dividido de manera equitativa a las horas del día seleccionando 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Se estableció un diseño univariado con tres tratamientos, siendo constantes la humedad del sustrato (HS), humedad ambiental (HA) y fotoperiodo (F). Y variando solamente la temperatura (T), a tres niveles: 28, 21 y 15 °C. El tiempo a evaluar fueron 20 días por tratamiento. Se establecieron cinco repeticiones de 30 semillas cada una; obteniendo en total 150 semillas por tratamiento. Los tratamientos fueron los siguientes:

- Tratamiento 1: F 12/12, HS 100%, HA 30% y T 28 °C.
- Tratamiento 2: F 12/12, HS 100%, HA 30% y T 21 °C.
- Tratamiento 3: F 12/12, HS 100%, HA 30% y T 15 °C.

7.5.3 Pruebas de germinación

Modificando la técnica propuesta por Bueno *et al.* (2007), se desinfectaron cajas Petri de vidrio en una solución de cloro comercial al 2% por 30 min. Posteriormente se asperjaron con un atomizador de alcohol al 96% y se dejaron secar a temperatura ambiental y a la sombra. Dentro de las cajas se colocó una base de algodón como sustrato, en la cual fueron acomodadas y enumeradas las semillas, para monitorear su germinación individual. Las semillas se desinfectaron también en una solución de cloro comercial al 2%, añadiendo 0.5 ml de Tween 20 (para romper la tensión superficial, debido a que las semillas son de tamaño pequeño), en un vaso de precipitado de 100 ml. Permanecieron en ésta solución por 2 min y después fueron enjuagadas con agua destilada. Las cajas fueron ingresadas sin tapa en la cámara bioclimática, bajo las condiciones establecidas del diseño experimental. Se regó a saturación, diariamente con agua destilada y se registraron los resultados de la germinación en una bitácora.

7.6 Análisis estadístico

Para saber si hay diferencias en el tamaño de frutos y semillas de las dos poblaciones, se llevó a cabo una prueba de t de student, con el programa estadístico Past 3.21 (Hammer *et al.*, 2001). Para conocer las diferencias en el porcentaje de germinación entre los tres tratamientos, se utilizó un modelo lineal generalizado (distribución de error binomial y función de enlace logit) en el programa JMP 7.0 (SAS Institute Inc., 2007). Las curvas de germinación se compararon en el programa Germinator (Joosen *et al.*, 2010), y con el mismo programa se analizaron las medias de germinación (t 50) y el 10% de germinación (t 10) de los tratamientos.

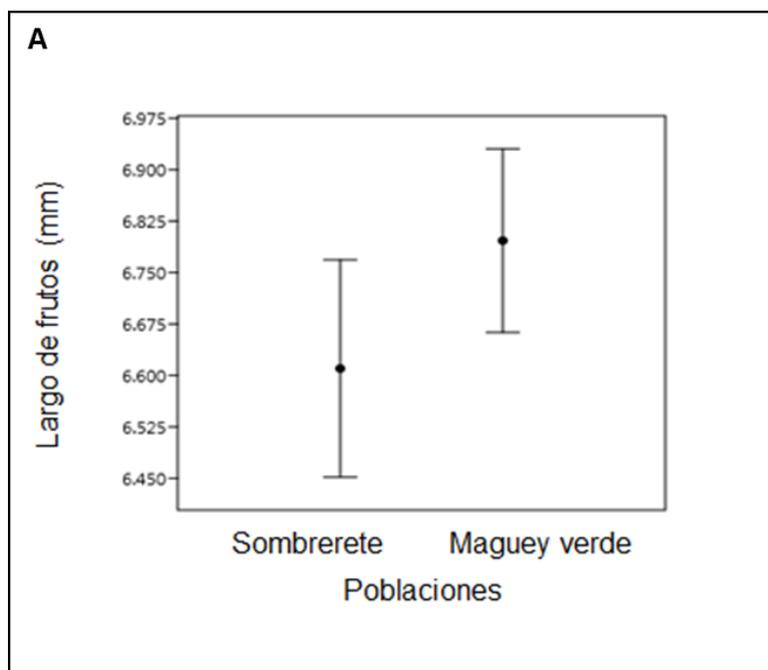
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Caracterización morfológica de frutos

8.1.1 *Tamaño*

En la población Sombreroete los frutos presentaron un intervalo de 1.3 - 2 mm de ancho y 5.3 - 8.4 mm de largo, con un tamaño promedio de 1.64 mm de ancho × 6.57 mm de largo. En la población Maguey Verde los frutos presentaron medidas de 1.3 - 2.7 mm de ancho y 5.3 - 8.5 mm de largo, con promedio de 1.64 mm de ancho × 6.57 mm de largo (Apéndice 1).

La medida promedio de los frutos de ambas poblaciones es 1.6 mm de ancho × 6.7 mm de largo. De acuerdo con la prueba de t, la diferencia de largo entre las poblaciones ($t= 0.8992$, g.l.= 58, $p= 0.3723$), y ancho entre ambas poblaciones ($t= 0.2826$, g.l.= 58, $p= 0.7785$), no fue significativa (Figura 7).



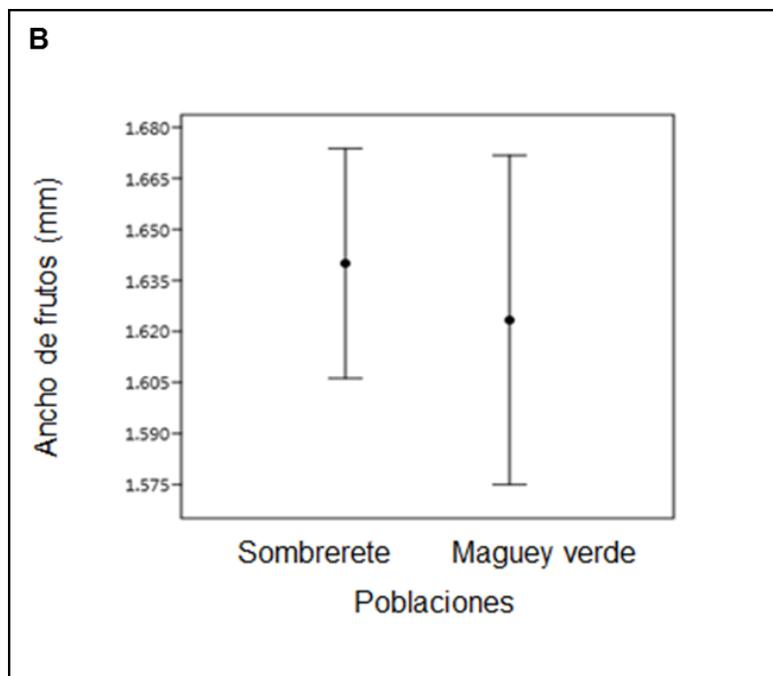


Figura 7. Diferencia de tamaño en frutos de *C. mexicanum* entre poblaciones. A. Largo. B. Ancho.

El tamaño de los frutos de *C. mexicanum*, no se había registrado en investigaciones anteriores. Sin embargo, las medidas presentadas coinciden con el tamaño del cáliz mencionado en la descripción de Hanan-Alipi (2009), donde indica que el cáliz mide 6 mm de largo, esto sucede porque posteriormente a la polinización la flor se seca y cae, permitiendo que el cáliz se convierta en la cápsula o fruto (Obs. Pers., 2018). Nuestros resultados coinciden con lo mencionado por Franco e Hidalgo (2003), ya que no se encontraron diferencias significativas, entre los tamaños de los frutos de ambas poblaciones, debido a caracteres morfológicos tienen alta heredabilidad y por tanto los tamaños se asemejan.

8.1.2 Forma y color

Los frutos en ambas poblaciones fueron de forma cilíndrica y presentan cinco puntas (lóbulos) en el ápice, con forma estrellada (Figura 8). Estos se observaron en diferentes tonalidades de verdes y cafés (2.5Y5/2, 2.5Y5/4, 2.5Y5/6, 2.5Y6/4, 2.5Y6/6, 2.5Y6/8, 5Y7/4, 5Y7/6, 5Y7/8, 5Y8/4, 5Y8/6, 5Y8/8, 5Y8/12, 2.5GY7/10 y 2.5GY8/10; Munsell, 2011) (Apéndice 2).



Figura 8. Frutos de *C. mexicanum*

Los resultados obtenidos respecto a la forma de los frutos, confirman lo observado por Hanan-Alipi (2009), quien menciona en su descripción de la especie, que la forma del cáliz (posteriormente fruto) es cilíndrica y presenta el ápice dividido en 5 lóbulos. Por otro lado, la presente investigación aporta información morfoagronómica de los colores, al indicar las diferentes tonalidades de café y verde encontradas en los frutos. Dicha información es relevante para la propagación de la especie, considerando la investigación de Hernández-Gómez y Miranda-Colín (2008), donde mencionan que en *Salvia hispanica* (chía), cuando los cálices están secos y abiertos, las semillas se encuentran maduras y pueden ser extraídas. Analizando los resultados de la presente investigación, el color del fruto en *C. mexicanum* es un indicador de madurez y se sugiere la colecta del fruto cuando éste sea de color café, en estado semi-seco, para la obtención de semillas maduras.

8.1.3 Cubierta

A través del microscopio de barrido, se obtuvieron imágenes donde se observa que la cubierta del fruto es estriada, pubescente y presenta glándulas en las paredes externas. Los tricomas en la pared interna del fruto presentan un acomodo paralelo en vertical hacia el ápice de la núcula. Los tricomas encontrados en los lóbulos (puntas) del ápice del fruto son abundantes y están distribuidos de forma homogénea (Figuras 9).

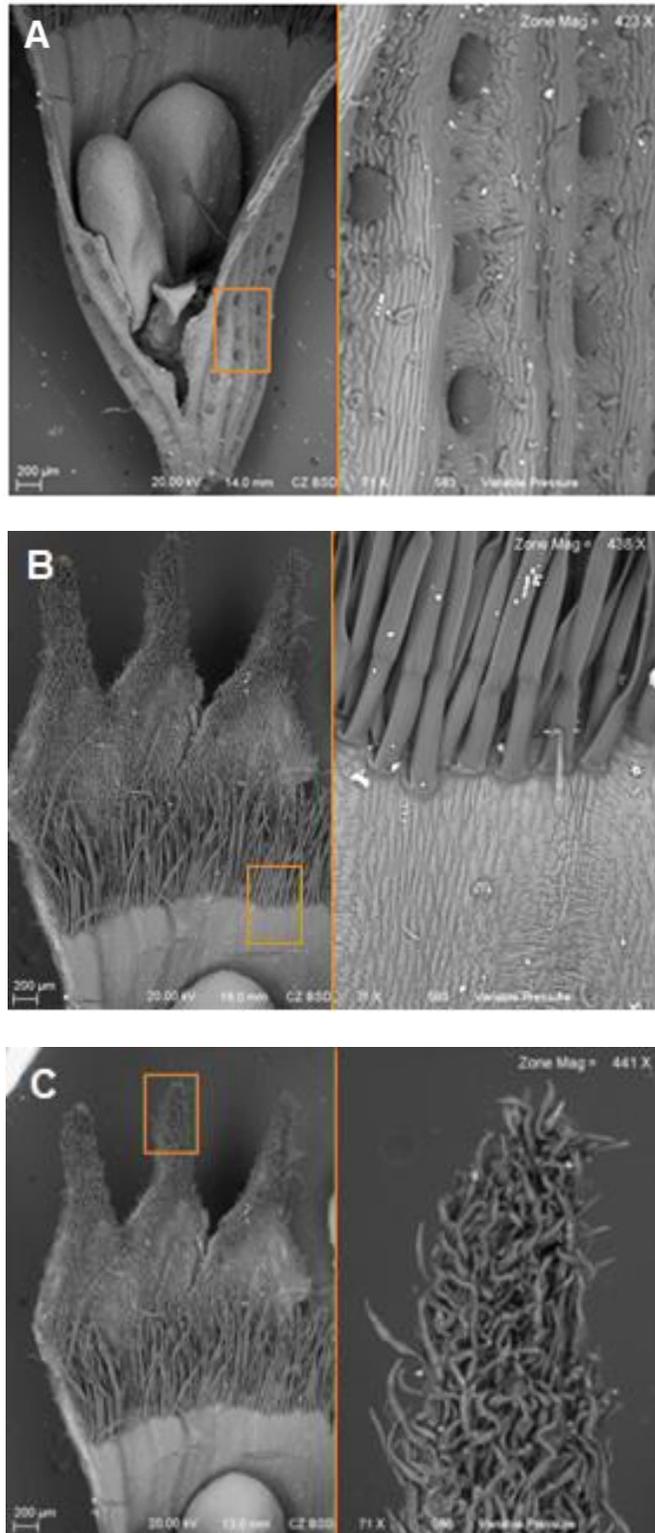


Figura 9. Cubierta de los frutos (núculas) de *C. mexicanum*. A. Acomodo paralelo de tricomas en paredes internas de las cápsulas. B. Tricomas abundantes y homogéneos en las puntas de las cápsulas. C. Glándulas en cubierta de las núculas.

En la descripción de Hanan-Alipi (2009), se menciona que en el interior del cáliz de la flor de *C. mexicanum* está presente un anillo de pelos. La presente investigación aporta información al respecto, al mencionar el acomodo de dichos tricomas y registrar la presencia de otro conjunto de tricomas encontrado en las puntas del ápice. Por otro lado, la presencia de glándulas es un carácter descriptor para integrantes de la familia Lamiaceae, de acuerdo al trabajo de Martín-Mosquero *et al.* (2004). Con los resultados encontrados en este estudio, hemos retomado lo mencionado por Fernández-Alonso y Rivera-Díaz (2006), quienes hablan de la presencia de glándulas secretoras de aceites volátiles en todas las partes de las especies de la familia Lamiaceae. En ese sentido, se han considerado que las glándulas encontradas en las cubiertas de las núculas de *C. mexicanum* contienen aceites esenciales y que estos de acuerdo a Sepúlveda-Jiménez *et al.* (2003), pueden tener una función de atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos. Esta información es importante como aportación al conocimiento de la ecología de la especie, pero también para el aprovechamiento de los mismos.

8.1.4 Peso

En la población Sombrerete, de 100 núculas se obtuvo un peso de 0.245 g, lo cual equivale a 408 frutos/g. En la población Maguey Verde el peso fue de 0.215 g, lo cual equivale a 465 frutos/g. Conocer el peso del fruto y las características anteriores, es de utilidad para el diseño de herramientas, maquinaria y técnicas, que faciliten el procesamiento de los mismos y la obtención de semillas. Además, aporta información de interés al establecer estándares de calidad para la comercialización de núculas.

8.2 Caracterización morfológica de semillas

8.2.1 Tamaño

Las semillas de la población Sombrerete presentan un intervalo de 0.5 mm - 1mm de ancho y 1 mm - 1.9 mm de largo, teniendo un promedio de 0.86 mm de ancho x 1.57 mm de largo las semillas de esta población. Las semillas de la

población Maguey Verde presentaron un intervalo de 0.5 mm - 1 mm de ancho y 1.3 mm - 2 mm de largo, en promedio midieron 1.10 mm de ancho x 1.72 mm de largo (Apéndice 3).

De acuerdo a la prueba de t, la diferencia entre el largo de las semillas en ambas poblaciones sí fue significativa ($t= 2.8324$, g.l.= 58, $p= 0.0063$). En el caso del ancho de las semillas entre las poblaciones de acuerdo a la prueba de t, la diferencia no fue significativa ($t= 0.6145$, g.l.= 58, $p= 0.5413$) (Figura 10).

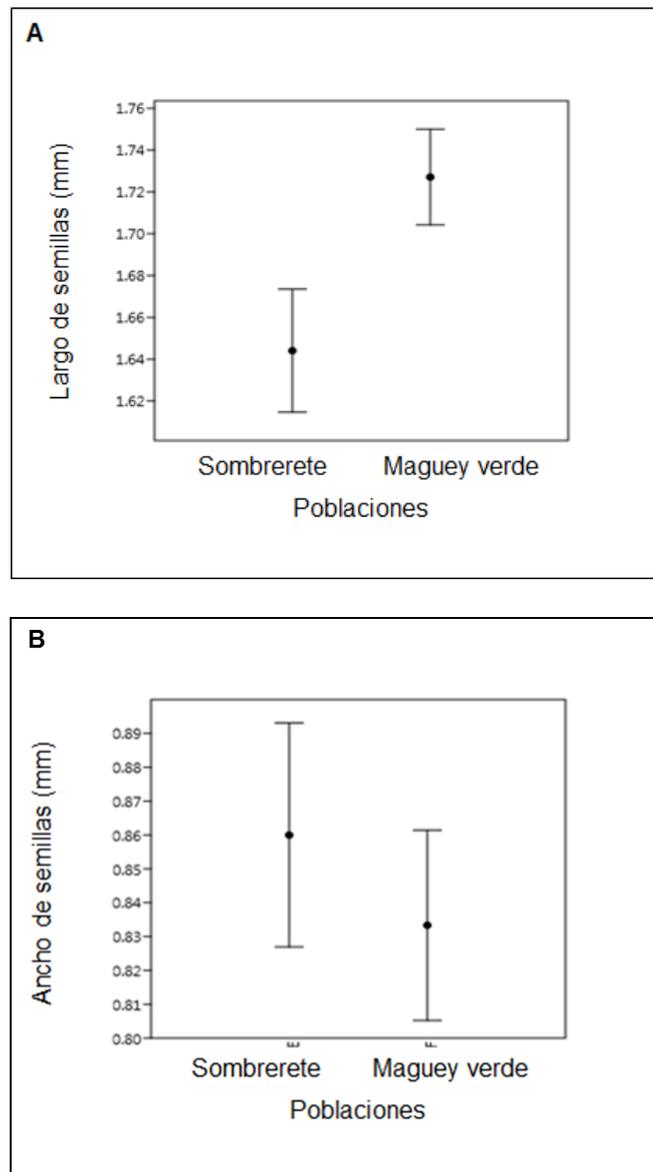


Figura 10. Diferencia de tamaño en semillas de *C. mexicanum* entre poblaciones. A. Largo. B. Ancho.

De acuerdo a la investigación de Magallán *et al.* (2015), las semillas de *C. mexicanum* en promedio miden 0.8 mm de ancho x 1.75 mm de largo, lo anterior es semejante a las medidas encontradas en la presente investigación, donde únicamente difiere el largo de las semillas obtenido (1.6 mm). Sin embargo, al no tener las medidas por individuo, de ambas investigaciones no se pudo determinar la significancia de esta diferencia. Respecto a la diferencia significativa presentada en la comparación del largo entre las semillas de las poblaciones de esta investigación, se confirma lo mencionado por Franco e Hidalgo (2003), donde a pesar de que los caracteres morfológicos tienen alta heredabilidad y por eso puede explicarse que el ancho de las semillas se mantenga indiferente entre las poblaciones. También mencionan que en especies aprovechadas por el hombre (como lo es *C. mexicanum*), pueden presentarse diferentes grados de variabilidad, y que además, estos caracteres también pueden ser afectados por cambios en los factores ambientales de las poblaciones, los cuales de acuerdo a los datos de Alvarado *et al.* (2018), en dicho experimento fueron diferentes.

Conocer el tamaño de las semillas es importante para el reconocimiento y aprovechamiento por parte los productores, ya que al ser de tamaño pequeño, pueden ser confundidas fácilmente con otros materiales. Desde el punto de vista agronómico, el tamaño de las semillas es una característica de la cual depende el manejo de siembra, porque permite estimar la profundidad de siembra ideal para la especie.

8.2.2 Forma y color

La forma de las semillas fue ovalada en ambas poblaciones. Respecto al color, los individuos se mostraron en ambos casos de café a negro (Figura 11). En la población de Sombreroete, el 33.33% de la muestra (diez individuos) fueron de color negro y el otro 66.66% de la muestra (veinte individuos) fueron de color café (tono 5YR3/2). En la población Maguey Verde, el 26.65% de las semillas fueron cafés, del cual 3.33% (equivalente a un individuo) fue del tono 2.5Y5/4, 3.33% (un individuo) fue del tono 5YR3/4, 6.66% (dos individuos) fueron del tono 7.5YR4/2 y

13.33% (cuatro individuos) pertenecieron al tono 2.5YR3/4. El otro 73.33% de las muestra presentó color negro (Munsell, 2011) (Apéndice 4).



Figura 11. Semillas de *C. mexicanum*

Magallán *et al.* (2015), coinciden en la forma de las semillas y mencionan que las semillas son de color negro. Esta investigación aporta información sobre las diferentes tonalidades en que se encontraron las semillas. Estos caracteres son relevantes desde el punto de vista morfoagronómico porque permiten el reconocimiento del material (las semillas) que necesitan obtener los productores para la germinación. Además, al analizar los resultados de esta investigación se generó información para el cultivo, ya que se observó que el color de la semilla, es un descriptor importante para conseguir un mayor porcentaje de germinación.

8.2.3 Cubierta

Las observaciones hechas a través del microscopio de barrido muestran que la cubierta de las semillas es reticulada. En la base de la semilla, donde se sujeta al funículo de la núcula, se observó la presencia de un conjunto de gránulos esféricos color blanco (Figura 12). De acuerdo al trabajo de Bonzani *et al.* (2011), quienes mencionan que la presencia de ornamentaciones reticuladas en las cubiertas de las semillas pueden estar asociadas a su dispersión, se propone que las semillas de *C. mexicanum*, pueden ser dispersadas por nautocoria (flotando en agua corriente), ya que presentan dicha característica. También basados en la

misma investigación (Bonzani *et al.*, 2011) se propone desde el punto de vista ecológico, el conjunto de gránulos encontrados en la base de las semillas de *C. mexicanum* son las ceras epicuticulares, cuya función es proteger la zona de emergencia radicular.

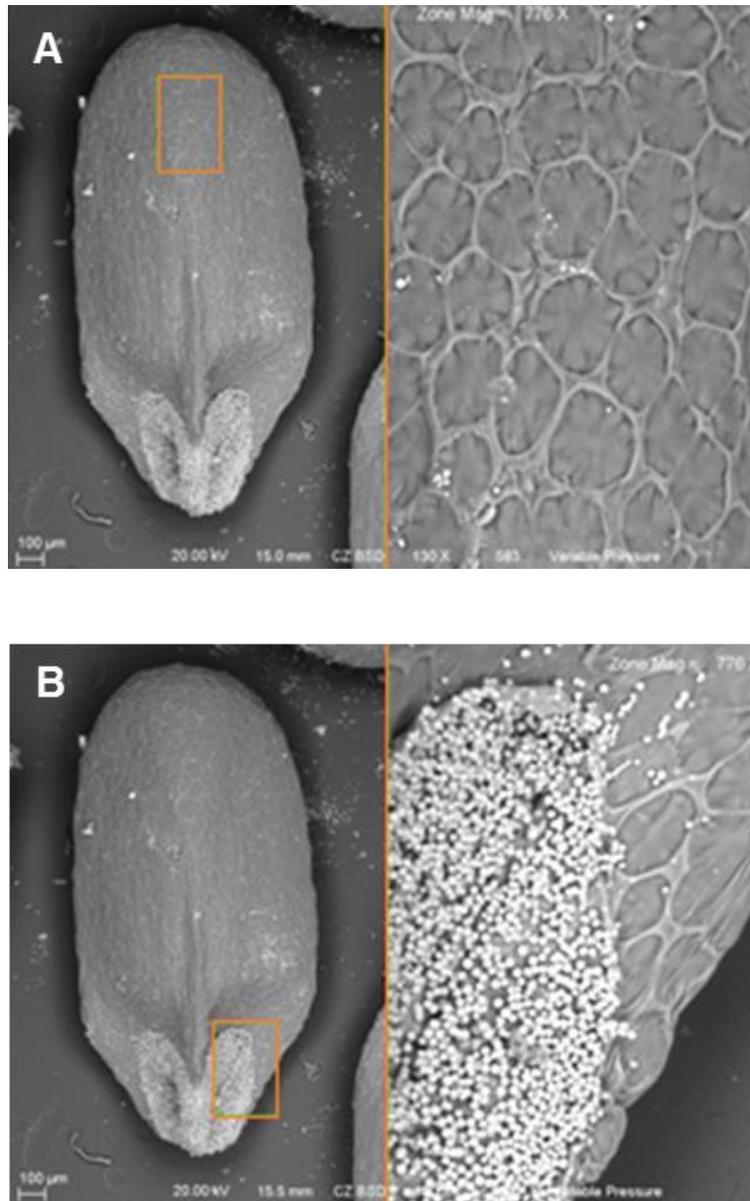


Figura 12. Cubierta de las semillas de *C. mexicanum*. A. Cubierta reticulada. B. Gránulos encontrados en zona de emergencia radicular.

8.2.4 Peso

Las semillas de la población Sombrerete pesaron 0.039 g, lo cual equivale a 2,507 semillas/g. En la medición de la población Maguey Verde, la muestra pesó 0.033 g, lo cual equivale a 2,866 semillas/g. El peso de las semillas y la cantidad de semillas por gramo, es información importante para su comercialización, ya que existe una diferencia de 300 semillas entre las poblaciones para obtener un gramo, por lo que se preferiría semillas de mayor peso, con la intención de que éstas, contarán con mayor cantidad de sustancias de reserva para favorecer la germinación. Lo anterior, también afecta su comercialización, ya que el peso junto con la forma y el color, pueden ser indicadores para conocer la calidad y/o vigor de la semilla, permitiendo generar un estándar de pureza para su venta. A su vez, el peso en conjunto con el tamaño y la forma, en un futuro permitiría desarrollar un sembrado automático (por medio de una sembradora de inducción por aire).

8.3 Pruebas de viabilidad de las semillas de *C. mexicanum*

En la prueba de tetrazolio se obtuvo 100% de tinción en las semillas de color negro y 33% en las semillas de color café (Figura 13). De acuerdo a la investigación de Magallán *et al.* (2015), en *C. mexicanum* pueden encontrarse frutos maduros e inmaduros en una misma planta, al mismo tiempo; los resultados de ésta investigación confirman lo anterior, al encontrar en las pruebas de viabilidad ambos tipos de semillas, en una misma época de colecta.

Las pruebas de tetrazolio que se llevaron a cabo, permiten mostrar que el cambio de coloración de café a negro en las semillas de *C. mexicanum* es un indicador de madurez, ya que sólo las semillas de color negro mostraron el 100% de viabilidad, indicando de este modo, que la mayor parte de las semillas cafés, no se encuentran listas para germinar. Durante ésta investigación, también se observó que la mayor parte de las semillas negras fueron obtenidas de núculas color café, lo cual indica que existe una relación entre el color del fruto y la madurez de la semilla, como lo mencionan Hernández-Gómez y Miranda-Colín (2008), para *Salvia hispanica* (chía). Esta información resulta relevante para la germinación de semillas, ya que facilita a los productores la distinción de semillas

viables y así optimizar los recursos al momento de la producción. Además, conocer el porcentaje de viabilidad de las semillas, permite determinar estándares de calidad para su comercio.

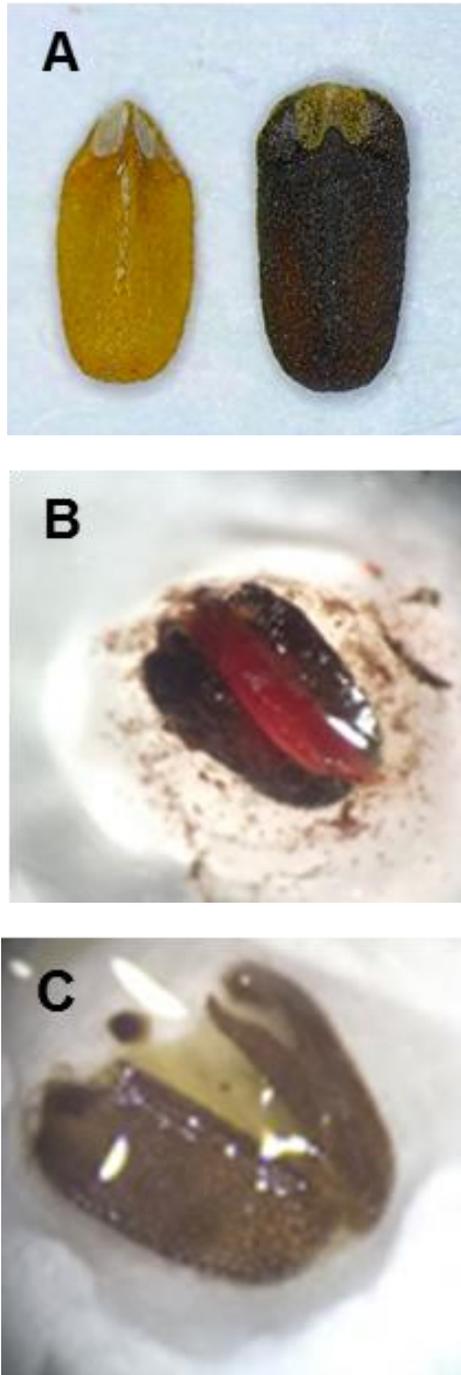


Figura 13. Prueba de viabilidad con tetrazolio en semilla de *C. mexicanum*. A. Semillas de color café y negro. B. Prueba en semillas de color negro. C. Prueba en semillas de color café.

8.4 Pruebas de germinación

En el tratamiento 1 (a 28 °C) se obtuvo el 93% de germinación, en el tratamiento 2 (a 21 °C) el 89% de germinación y para en el tercer tratamiento (a 15 °C) sólo se alcanzó 83% de germinación (Cuadro 3). De acuerdo al modelo lineal generalizado, no se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento 1 y 2, ni tampoco entre el 2 y el 3. Sin embargo en la prueba entre el tratamiento 1 y 3 sí se mostró diferencia significativa en los porcentajes de germinación (Figura 14).

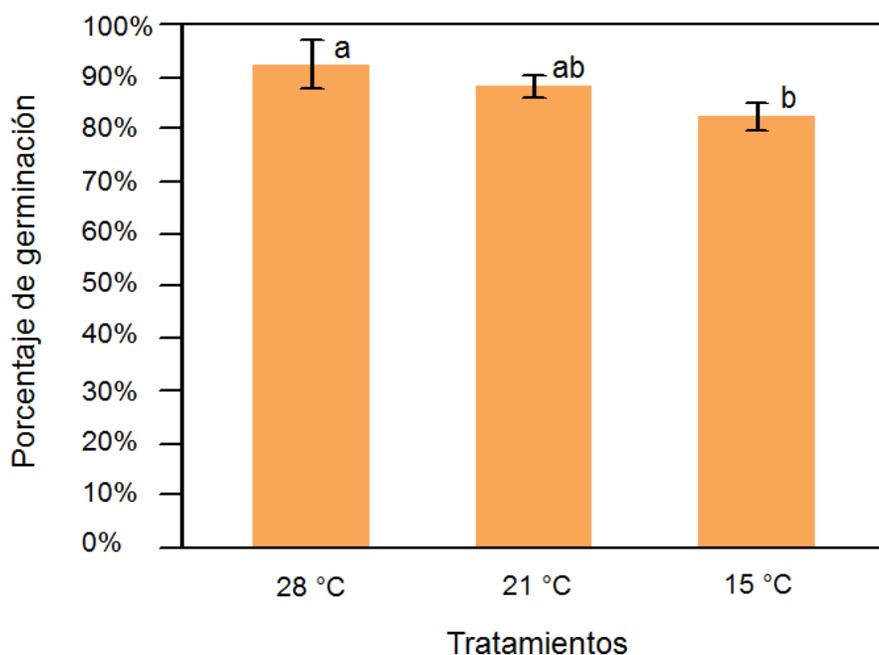


Figura 14. Porcentajes de germinación obtenidos en los tratamientos.

Respecto al tiempo de germinación, se observó en los tres tratamientos que el proceso de germinación duró en promedio 12 días, iniciando el día 4 y terminando el día 16 después de la siembra. De acuerdo a las pruebas de t, para llegar al 10% de germinación solo existió diferencia significativa entre los tratamientos 1 y 2, respecto al 3. En la comparación de medias de germinación (t 50), las pruebas de t muestran, diferencia significativa entre los tres tratamientos (Cuadro 3; Figura 15).

Tratamiento	Porcentaje de germinación	Tiempo de germinación (días)	
		t (10)	t (50)
1. 28 °C	93%	4.2 (a)	6.2 (a)
2. 21 °C	89%	4.0 (a)	5.1 (b)
3. 15 °C	83%	5.3 (b)	7.4 (c)

Cuadro 3. Porcentaje de germinación y tiempo (días) en que las semillas de *C. mexicanum* alcanzaron t 10 y t 50 de germinación por tratamientos.

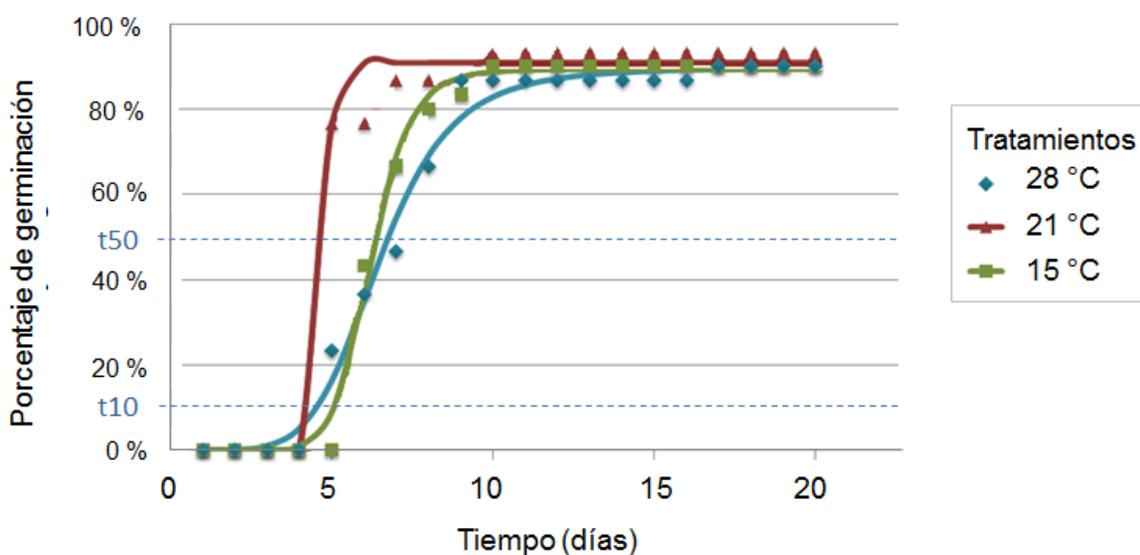


Figura 15. Tiempo de germinación (t 10 y t 50) en semillas de *C. mexicanum*.

De acuerdo a las definiciones de Mantilla (2008), las semillas son quiescentes ya que germinaron sin necesidad de algún tratamiento pregerminativo, sólo con las condiciones ambientales adecuadas. En el trabajo de Magallán *et al.* (2015), se obtuvo 60% de germinación en semillas de *C. mexicanum*, pero no mencionan la temperatura en la cual llevaron a cabo el experimento. En esta investigación las tres temperaturas experimentadas mostraron estar dentro de la ventana térmica para *C. mexicanum* de acuerdo a Márquez-Guzmán *et al.*, (2013) ya que en las tres, fue posible la germinación de la especie. Sin embargo, no pueden ser consideradas como temperaturas

cardinales, porque no se conoció la temperatura mínima en que puede germinarse el poleo verde. En la presente investigación, se confirma lo mencionado por Hartmann *et al.*, (2011), quienes mencionan, que el incremento de la temperatura puede favorecer el porcentaje de germinación en algunas especies. Los resultados en las pruebas presentadas, mostraron mayor porcentaje de germinación en el tratamiento 1 (a 28 °C), el cual fue la temperatura más alta y mostró diferencias significativas, respecto a los resultados del tratamiento 3 (a 15 °C), que fue la temperatura experimental más baja. Estos resultados muestran información importante a considerar, al elaborar un protocolo de germinación (en laboratorio), porque permiten sugerir las condiciones en que se obtendrá el mayor porcentaje de germinación, favoreciendo el aprovechamiento de las semillas y a su vez incrementando la producción de plántulas.

Respecto al tiempo de germinación, en el trabajo de Magallán *et al.* (2015), mencionan que las semillas comenzaron a germinar a partir del día 15 y hasta el día 18 después de la siembra. Sin embargo, no indican las condiciones ambientales del experimento. Lo cual, difiere con las pruebas en ésta investigación, donde se mantuvieron las condiciones ambientales controladas, para disminuir el estrés en las semillas durante la germinación. Como resultado de lo anterior, las semillas comenzaron a germinar a partir del día 4 y terminaron el día 16 después de la siembra. Esto muestra que el manejo de las condiciones ambientales, permite acelerar el proceso de germinación de las semillas de *C. mexicanum*. Las condiciones ambientales utilizadas en esta investigación pueden ser consideradas para agilizar la germinación y así organizar y optimizar el tiempo en una cadena productiva. Sin embargo, estos resultados no son del todo extrapolables a sistemas de producción tradicionales, donde no se puedan controlar las condiciones ambientales, ni aseguran la sobrevivencia de las plántulas al trasplante.

Sobre el tiempo en que los tratamientos alcanzaron el 10% de germinación (t 10), el tratamiento 3 (a 15 °C) fue el único que mostró diferencias significativas respecto a los demás, al ser el que necesitó más días para llegar a

dicho porcentaje, coincidiendo con lo propuesto por Hartmann *et al.* (2011), quienes mencionan que conforme se incrementa la temperatura, se puede acelerar el proceso de germinación en algunas especies. Por otro lado, los resultados de los tratamientos, respecto al tiempo en que llegaron a su media de germinación (t_{50}), difieren a lo mencionado, puesto que sí presentaron diferencias significativas, siendo el tratamiento 2 (a 21 °C), el que tardó menos tiempo (5 días) en alcanzarla. A pesar de que el tratamiento 2, mostró llegar en menos tiempo a la media de germinación, los tres tratamientos duraron 12 días en promedio en dicho proceso. De tal forma, que el tratamiento a sugerir para la germinación de la especie de estudio, es el tratamiento 1 (a 28 °C) al presentar el mayor porcentaje de germinación (93%), en el mismo periodo de tiempo.

Por otro lado, las semillas de *C. mexicanum* presentaron características que pueden permitirles de acuerdo a Hartmann *et al.* (2011) y Márquez-Guzmán *et al.* (2013), ser consideradas dentro del grupo de semillas fotoblásticas positivas. Dichas características son: 1) la baja cantidad de sustancias de reserva (endospermo ausente) (Melgarejo-Hernández, 2010), 2) ser de tamaño pequeño y 3) germinar en presencia de luz. Ésta información es importante para el conocimiento de la especie, pero además, las semillas mostraron resultados favorables en presencia de fotoperiodo 12/12 h, lo cual puede ser de utilidad para próximas investigaciones y para adaptar técnicas en campo a pequeña escala, como cubrir los semilleros o charolas de germinación con cubiertas de color oscuro, para simular el fotoperiodo en campo y conservar el alto porcentaje de germinación obtenido.

Los porcentajes de germinación obtenidos en las pruebas, pudieron ser influenciados también, por la presencia de mucílago en las semillas de *C. mexicanum*. Durante la investigación se observó que al poner en contacto las semillas de poleo verde con el agua, éstas presentaron mixocarpia, al igual que otras especies de la subfamilia Nepetoideae. Martín-Mosquero *et al.* (2004), mencionan que al aumentar la producción de mucílago, en este caso, con los riegos a saturación, las semillas aumentan su capacidad de germinación. Ya que a

través del mucílago se protegen de la desecación y forman un microclima que puede incrementar el índice de semillas germinadas. En base a eso, se sugiere que se mantengan las mismas condiciones de riego para la germinación óptima de *C. mexicanum*. Como información respecto a la ecología de la especie, por la mixocarpia presentada en las semillas de poleo verde, de acuerdo a Martín-Mosquero *et al.* (2004) y a Alfayate *et al.* (2008), es posible que *C. mexicanum*, también pertenezca al grupo de las balistas, la lluvia favorezca la expulsión de sus semillas al darles propulsión con su caída sobre las núculas y éstas al estar en contacto con el agua, generen mucílago, el cual permita que por medio de atelecoria, la semilla se fije al suelo e impida su hundimiento y desecación en la tierra y así lograr la germinación en el medio silvestre.

8.5 Protocolo de germinación

De acuerdo a la OMS (2003), cuando no existen datos científicos publicados o documentados sobre el cultivo de una especie (PAMs), en este caso, *C. mexicanum*, se deben aplicar los métodos de cultivo tradicionales, o desarrollar un método mediante la investigación. Retomando lo mencionado por Rodríguez-Servín, *et al.* (2010), un protocolo de germinación sólo permite que una especie pueda ser propagada indefinidamente en laboratorio, sin embargo, la información generada a través de las pruebas presentadas, puede servir como base para el desarrollo del método de producción de la especie. Ya que permite conocer las condiciones ambientales que favorecen la germinación de sus semillas y dicho proceso es el primer paso para su reproducción sexual.

Como resultado del presente estudio se generó una ficha explicativa, en la que considerando los datos obtenidos de las pruebas anteriores, bajo un sistema de condiciones ambientales controladas (F 12/12, HS 100%, HA 30% y T 28, 21 y 15 °C), se seleccionaron las condiciones óptimas para la germinación de las semillas de poleo verde. El protocolo fue complementado con información de la consulta bibliográfica que se llevó a cabo previamente como: la información etnobotánica, las sugerencias de almacenamiento y fotos de los frutos y las semillas maduras; permitiendo a los productores, conocer los usos de la planta,

reconocer la especie en campo para su colecta en estado maduro y resguardar las semillas en buenas condiciones. Con la intención de que el protocolo sea utilizado con fines agronómicos y teniendo en cuenta que aún se requieren pruebas en condiciones de campo (unidades de producción) fuera del laboratorio, se hacen recomendaciones para sustituir algunos de los materiales empleados, como el algodón, que puede ser reemplazado con el sustrato de germinación sugerido en el sistema de Magallán *et al.* (2015), de 50% arena + 50% lombricomposta o peat moss que como lo sugiere Bello-González *et al.* (2013), es un sustrato con buen drenaje. El agua destilada puede sustituirse por agua corriente, siempre y cuando se respeten los índices permitidos por la FAO para agua de uso agrícola (donde SD no debe ser >2 g/L, o CE no debe ser >3 dS/m, Carrazón-Alocén 2007), y las cajas Petri por charolas de germinación o semilleros. Además, se recomiendan técnicas como el recubrimiento de los semilleros en campo para incrementar la temperatura, ya que las semillas mostraron mayor porcentaje de germinación a 28 °C ó sembrar en los meses más cálidos como lo sugiere Bello-González *et al.* (2013) aprovechando que la temperatura en la estación de la primavera favorece la germinación y les permite a las plántulas establecerse antes de la llegada del invierno, lo cual de acuerdo al INEGI (2017), en el estado de Querétaro sería a partir de los meses de abril y mayo, esto varía de acuerdo a la región. También se recomienda mantener el riego diario a saturación, de acuerdo al estudio de Magallán *et al.* (2015), de ser necesario regar dos veces al día en temporada de calor y utilizar algún medio de aspersion y no riegos directos para evitar la pérdida de semillas

Protocolo de germinación de Clinopodium mexicanum

<i>Información de la especie</i>	
Nombre científico	<i>Clinopodium mexicanum</i> (Benth.) Govaerts.
Nombre común	Poleo, Poleo verde, toronjil de monte, toronjil de menta, chipito, hierba del borracho e <i>ita`nduku</i> .
Familia	Lamiaceae.
Origen	México.

Uso	Aperitivo, digestivo y medicinal. Utilizada como sedante, analgésico, ansiolítico, antinociceptivo, contra problemas gastrointestinales y remedio para la cruda.
Colecta	
Caracteres diagnósticos	Arbusto con tallos pubescentes, hojas opuestas, ovaladas, glabras, con margen aserrado. Flores solitarias, de cáliz tubular y corola anaranjada, dividida en dos labios con 4 estambres sobresalientes.
Método	Con tijeras de poda, recolectar en frascos con tapa ó bolsas de papel estroza.
Época de colecta	Todo el año.
Material de propagación	Cortar sólo frutos café (semi-secos), para obtener semillas negras (maduras, Figura 16).



Figura 16. *Clinopodium mexicanum* en medio silvestre. A. Fotografía del arbusto. B. Flores C. Fruto semi-seco de *C. mexicanum* sugerido para colecta con fines de propagación.

Descripción de frutos y semillas

Frutos	Son cápsulas alargadas, con 5 lóbulos (puntas) en el ápice. Presentan tonalidades de verdes en fresco y café en seco (Figura 17). Miden en promedio 1.6 mm ancho x 6.7 mm de largo. Peso: 436.5 frutos/g.
---------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Semillas

Son ovaladas de color café (inmaduras) a negro (maduras). Presentan una cuña de coloración blanca en la base (Figura 17). Miden 0.8 mm de ancho x 1.6 mm de largo. Peso: 2686.5 semillas/g.

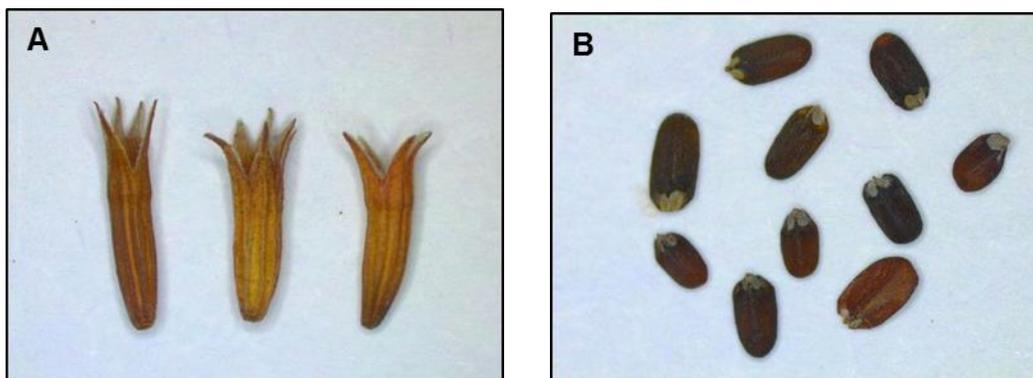


Figura 17. Frutos y semillas de *C. mexicanum*. A. Frutos maduros color café en estado, semi seco. B. Semillas maduras color negro.

Almacenamiento

Colocar los frutos y semillas en frascos pequeños (100 ml) con tapa. Se recomienda agregar un sobre de sílica gel al interior para reducir la humedad y conservar en buen estado las muestras. También se recomienda mantener los frascos en condiciones de sombra a temperatura y humedad ambiental.

Tratamientos pre-germinativos

Ninguno.

Viabilidad de las semillas

Color café 33%.

Color negro 100%.

Método y condiciones de germinación

Método En cajas Petri de vidrio sin tapa en laboratorio (Figura 18), y charolas de germinación o semilleros en campo o unidades productivas.

Sustrato 50% arena + 50% lombricomposta o peat moss en

	campo o unidades productivas y algodón en laboratorio.
Humedad Ambiental	30%.
Fotoperiodo	12 h luz/12 h oscuridad.
Riego	Diario a saturación. Con agua destilada o agua corriente (respetando los parámetros de agua para uso agrícola establecidos por la FAO). Se sugiere usar algún medio de aspersión y no riegos directos para evitar la pérdida de semillas. De ser necesario, regar dos veces al día para evitar la deshidratación en temporada de calor.
Temperatura	28 °C. En campo y unidades productivas se recomienda sembrar a partir de los meses de abril y mayo, (dependiendo la región) para el aprovechamiento de las altas temperaturas, o el uso de recubrimientos o domos, para la incrementar la temperatura del semillero, mantener la humedad y llevar a cabo monitoreos constantes para prevenir la deshidratación.



Figura 18. Semillas germinadas de *C. mexicanum* en caja Petri con sustrato de algodón.

Germinación

Inicio *	Día 4 después de la siembra.
Media *	Día 6 después de la siembra.
Término*	Día 16 después de la siembra.
Porcentaje obtenido*	93%.

* Tiempo y porcentaje de germinación, sujetos al manejo de las condiciones ambientales y a la viabilidad de las semillas colectadas.

9. CONCLUSIONES

- Los frutos de *C. mexicanum* presentan la cubierta estriada y se propone que el contenido de las glándulas que presentan son aceites.
- Los frutos pueden ser encontrados en diferentes tonalidades de verdes en estado fresco y café en seco (maduros).
- Las núculas de poleo verde miden en promedio: 1.6 mm ancho × 6.7 mm de largo y pesan: 436.5 frutos/g.
- Las semillas son ovaladas de color café a color negro (semillas maduras) y presentan una cuña de coloración blanca en la base, compuesta por un conjunto de gránulos, los cuales se propone que son ceras epicuticulares, que protegen la zona de emergencia radicular.
- Las semillas presentan cubiertas reticuladas, dichas ornamentaciones pueden estar asociadas a su dispersión (nautocoria).
- Las semillas miden: 0.8 mm de ancho × 1.6 mm de largo y pesan: 2686.5 semillas/g.
- Las semillas de color negro tienen mayor porcentaje de viabilidad (100 %).
- Las semillas de poleo verde son quiescentes, fotoblásticas positivas y presentan mixocarpia durante el proceso de germinación.
- El tratamiento a 28 °C, fue el más óptimo para la germinación de *C. mexicanum*, al presentar 93% de semillas germinadas en 12 días, bajo condiciones controlas, sin embargo, la presente investigación no puede asegurar el porcentaje de sobrevivencia al trasplante ni el desempeño de las plántulas.

10. LITERATURA CITADA

- Alfayate, M. C., Barrera, I., Ron, E., García-Jiménez, R., Pajarón, S. y Pérez-Alonso, M. J. 2008. La mixocarpia de *Salvia aegyptiaca* L. y su aplicación etnobotánica. *Botanica Complutensis*. 32: 213 - 216.
- Alvarado A. M., Cardador-Martínez, M. A., García-Trejo, F., Magallán-Hernández, F. 2018. Determination of edaphoclimatic conditions and total flavonoids in populations of “Poleo” (*Clinopodium mexicanum*), from the semi-desert of Queretaro, Mexico. XIV Congreso Nacional de Ingeniería (CONIIN).
- Ávalos-García, A. y Pérez-Urria, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2: 119 – 145.
- Bello-González, M. A., Salgado-Garciglia, F. y Carmona-Fernández, J. 2013. Propagación y crecimiento de *Satureja macrostema* Briq. (Lamiaceae) bajo condiciones controladas en Uruapan, Michoacán. *Ciencia Nicolaita*. 58: 105 – 115.
- Bonzani, N. E., Bravi, V. S. y Barboza, G. E. 2011. Estudios morfo-anatómicos de gineceo y fruto en especies de *Mentha* (Lamiaceae) de Argentina. *Caldasia*. 33: 349 - 366.
- Bueno, M. S., Feldman, S. R. y Ortiz, J. P. 2007. Desinfección de cariopses y regeneración de plantas de *Spartina argentinensis*. *Ciencia Investigación e Agraria*. 34: 231 - 236.
- Carrazón-Alocén, J. 2007. Manual práctico para el diseño de sistemas de minirriego. Programa Especial para la Seguridad Alimentaria (PESA). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 39 p.
- Cassani, J., Escalona-Araujo, A. G., Martínez-Vazquez, M., Manjarrez, N., Moreno, J. y Estrada-Reyes, R. 2013. Anxiolytic-Like and Antinociceptive Effects of 2(S)-Neoponcirin in Mice. *Molecules*. 18: 7584 – 7599.

- Di Sapia, O., Bueno, M., Busilacchi, H., Quiroga, M. y Severin, C. 2012. Caracterización morfoanatómica de hoja, tallo, fruto y semilla de *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 11: 249 - 268.
- Escrivá, M. G. 2010. Huerto orgánico en macetas. Albatros. 102 pp.
- Estrada-Reyes, R., Martínez-Vázquez, M., Gallegos-Solís, A., Heinze, G., Moreno, J. 2010. Depressant effects of *Clinopodium mexicanum* Benth. Govaerts (Lamiaceae) on the central nervous system. Journal of Ethnopharmacology. 130: 1 – 8.
- Estrada-Reyes, R. 2015. Estudio Fitoquímico y evaluación Neurofarmacológica de los “toronjiles”, *Clinopodium mexicanum*, *Dracocephalum moldavica* y *Agastache mexicana subesp. mexicana* y *subesp. xolocotziana*, utilizados en la medicina tradicional Mexicana como tranquilizantes. Tesis. Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Fernández-Alonso, J. L. y Rivera-Díaz, O. 2006. Las labiadas (familia Labiatae) Libro Rojo de Plantas de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Colombia. 3: 385 - 582.
- Forest Stewardship Council (FSC), Global Environment Facility (GEF) y United Nations Environment Programme (UNEP). 2016. Guía para la recolección de plantas medicinales. (2 Ed.). Fomento de la Investigación en Centros de Secundaria (ForCES). 70 p.
- Franco, T. L. e Hidalgo, R. (eds.). 2003. Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Boletín técnico no. 8, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). 89 p.
- Fretes, F., Mendoza, C., Penner, R. y Martínez, M. 2010. Plantas medicinales y aromáticas una alternativa de producción comercial. Programa Paraguay Vende. 5p.

- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., Ryan, P. D. 2001. Past: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontología Electrónica*. 4: 9.
- Hanan-Alipi, A. M. 2009. Ficha- *Clinopodium mexicanum* (Benth.) Govaerts. Malezas de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). Webside <http://www.conabio.gob.mx/malezasde/mexico/lamiaceae/clinopodium-mexicanum/fichas/ficha.htm> [Fecha de acceso Mayo 2018].
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies-Jr, F. T. y Geneve, R. L. 2011. Plant propagation: principles and practices. (8 Ed.). Prentice Hall. 915 pp.
- Hernández-García, Y. K. 2014. Sistema médico tradicional rru ngigua (chocho) y el complejo uso de plantas medicinales en San Miguel Tulancingo, Oaxaca. Tesis. Colegio de Postgraduados: Institución de Enseñanza e Investigación en ciencias agrícolas.
- Hernández-Gómez, J. A. y Miranda-Colín, S. 2008. Caracterización morfológica de chía (*Salvia hispánica*). *Revista Fitotecnia Mexicana*. 31: 105 – 113.
- Hernández-Villarreal, A. E. 2013. Caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. *Revista Bio Ciencias*. 2: 113 - 118.
- Herranz, J. M., Ferrandis, P., Copete, M. A. y Martínez-Sánchez, J. J. 2002. Influencia de la temperatura de incubación sobre la germinación de 23 endemismos vegetales ibéricos o iberoafricanos. *Investigación agraria. Producción y protección vegetal*. 17: 229 - 246.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2017. Anuario estadístico y geográfico de Querétaro. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México.
- Joosen, R. V., Kodde, J., Willems, L. A., Ligterink, W., van der Plas, L. H. y Hilhorst, H. W. 2010, Germinator: a software package for high-throughput

- scoring and curve fitting of Arabidopsis seed germination. *The Plant Journal*, 62: 148 - 159.
- Magallán, F., Alvarado, A., Ocampo, R. y Guerrero, L. 2015. Informe técnico: Protocolos de propagación de plantas nativas aromáticas y medicinales con uso potencial en la industria farmacéutica y cosmética. Fondo de vinculación tecnológica. Universidad Autónoma de Querétaro. 52 pp.
- Matilla, A. (2008). Desarrollo y germinación de las semillas. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. (2 Ed.). McGraw Hill. 558 pp.
- Márquez-Guzmán, J., Collazo-Ortega, M., Martínez-Gordillo, M., Orozco-Segovia, A. y Vázquez-Santana, S. 2013. *Biología de las angiospermas*. (1 Ed.). México. Editores Asociados. 602 pp.
- Martínez-Gordillo, M., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M. R. y Montiel, O. 2013. Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84: 30 - 86.
- Martínez-Peña, M. L., Díaz-Espinosa, A. y Vargas, O. 2012. Protocolo de propagación de plantas hidrófilas y manejo de viveros para la rehabilitación ecológica de los parques ecológicos distritales de humedal. Grupo de Restauración Ecológica de la Universidad Nacional de Colombia y Secretaría Distrital de Ambiente. 184 p.
- Martín-Mosquero, M. A., Rodríguez, J. R. y Pastor-Díaz, J. E. 2004. Observaciones micro-morfológicas y anatómicas en núculas de *Prunella* L. y *Cleonia* L. (Lamiaceae) del suroeste de España. *Acta Botánica Malacitana*. 29, 203 - 214.
- Melgarejo-Hernández, L. M. 2010. Experimentos en fisiología vegetal. (1 Ed.). Universidad Nacional de Colombia. 13 – 24 p.

- Moré, E., Fanlo, M., Melero R. y Cristóbal R. 2010. Guía para la producción sostenible de plantas aromáticas y medicinales. Centro Tecnológico Forestal De Cataluña (CTFC). 10 p.
- Munsell. 2011. Color Chart for Plant Tissues. Xrite.
- Nambo-Camacho, A. A. 2015. Etnobotánica de Santiago Huaucuililla, Oaxaca y evaluación farmacológica de *Zinnia peruviana*. Tesis. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (ONUAA). 2007. Material de propagación de calidad declarada. Protocolos y normas para cultivos propagados vegetativamente. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2003. Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales. Organización Mundial de la Salud (OMS). 10p.
- Rodríguez-Servín, J., Castro-Lara, D. y Bye-Boettler, R. 2010. Protocolo de germinación de dos especies de quelites: *Crotalaria pumila* "Chepil" y *Porophyllum ruderale var. macrocephalum* "Pápalo". Universidad Nacional Autónoma de México
- SAS Institute Inc., 2007. JMP 7.0. Cary, NC, 1989-2007.
- Sepúlveda-Jiménez, G., Ducoing, P., Rocha, H. y Sosa, M. 2003. La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. Revista Mexicana de Fitopatología. 21: 355 – 363.
- The Wather Company (TWC.). 2018. Weather Underground. Product and Tecnology LLC, 2014, 2018. Webside <https://www.wunderground.com/> [Fecha de acceso Junio 2018].

Victoria T., Jorge A., Bonilla C., Carmen R., Sánchez O. y Manuel S. 2006. Viabilidad en tetrazolio de semillas de caléndula y eneldo. *Acta Agronómica*. 55: 1.

Villaseñor, J. L. 2016. Catálogo de las plantas vasculares nativas de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 87: 559–902.

11. APÉNDICES

11.1 Apéndice 1. Tamaño de frutos de *C. mexicanum* en poblaciones Sombreroete y Maguey Verde.

Individuo	Sombreroete		Maguey Verde	
	Largo (mm)	Ancho (mm)	Largo (mm)	Ancho (mm)
1	7.0	1.8	8.4	1.6
2	8.0	1.7	6.9	2.7
3	6.7	1.8	6.9	1.6
4	6.8	1.6	5.3	1.6
5	6.7	1.6	7.9	1.7
6	6.7	1.8	6.5	1.8
7	8.0	1.7	7.6	1.7
8	6.2	1.5	8.5	1.7
9	6.6	1.3	7.5	1.6
10	5.9	1.4	6.6	1.4
11	6.1	1.4	6.4	1.9
12	6.5	1.5	7.9	1.5
13	5.4	1.5	6.9	1.8
14	8.4	1.8	6.0	1.8
15	8.3	1.6	6.4	1.6
16	7.0	1.4	7.1	1.4
17	5.9	2.0	6.3	1.5
18	5.3	1.6	6.9	1.4
19	6.0	1.5	6.4	1.6
20	6.4	1.6	6.7	1.5
21	5.6	1.6	7.1	1.3
22	6.0	1.6	6.4	1.5
23	5.6	1.7	7.0	1.4
24	7.7	1.8	5.6	1.6

25	6.0	1.4	6.1	1.9
26	6.6	1.6	6.4	1.4
27	7.3	2.0	6.6	1.7
28	7.7	1.8	6.7	1.3
29	6.1	1.6	6.6	1.4
30	5.8	2.0	6.3	1.8

11.2 Apéndice 2. Clave de colores de Munsell en frutos de *C. mexicanum* de las poblaciones Sombreroete y Maguey Verde.

Clave de color (Munsell, 2011)		
Individuo	Sombreroete	Maguey Verde
1	5Y8/8	2.5Y5/4
2	5Y8/4	5Y7/6
3	2.5Y5/2	5Y8/6
4	2.5Y6/8	5Y7/6
5	5Y8/6	2.5Y6/6
6	5Y8/8	2.5Y5/4
7	5Y8/6	2.5Y6/6
8	5Y7/8	5Y7/8
9	5Y8/8	5Y8/8
10	5Y7/6	2.5Y6/8
11	2.5Y6/4	5Y7/4
12	5Y8/8	5Y7/4
13	5Y8/4	5Y8/8
14	5Y8/4	5Y7/8
15	5Y8/6	5Y8/8
16	5Y8/8	2.5Y6/6
17	5Y8/6	5Y7/6
18	5Y8/6	5Y7/8
19	5Y8/8	5Y8/6
20	5Y7/6	2.5Y6/8

21	5Y8/8	2.5Y5/6
22	2.5GY8/10	2.5Y5/4
23	5Y8/12	2.5Y6/6
24	5Y7/8	5Y7/8
25	2.5GY7/10	5Y7/6
26	2.5Y5/6	5Y7/4
27	5Y7/6	2.5Y6/6
28	5Y8/4	5Y7/6
29	5Y7/6	5Y7/4
30	2.5GY7/10	2.5Y6/6

11.3 Apéndice 3. Tamaños de semillas de *C. mexicanum* en poblaciones Sombreroete y Maguey Verde.

Individuo	Sombreroete		Maguey Verde	
	Largo (mm)	Ancho (mm)	Largo (mm)	Ancho (mm)
1	1.9	0.8	1.7	0.9
2	1.5	0.7	1.7	0.7
3	1.0	0.9	1.3	0.9
4	1.8	1.0	1.8	0.9
5	1.7	1.0	1.8	0.7
6	1.6	1.0	1.7	0.8
7	1.8	1.0	1.8	1.0
8	1.6	1.0	1.8	1.0
9	1.4	0.5	1.8	0.9
10	1.0	0.5	1.9	1.0
11	1.6	1.0	1.8	0.9
12	1.8	0.9	1.5	1.0
13	1.4	1.0	1.7	0.9
14	1.5	0.7	1.5	0.6
15	1.6	1.1	1.6	0.7
16	1.5	0.7	1.9	0.5

17	1.9	1.1	1.9	0.7
18	1.5	0.9	1.8	1.0
19	1.4	1.0	1.7	0.8
20	1.5	1.0	1.9	0.8
21	1.5	0.9	1.8	0.9
22	1.6	0.9	1.9	1.0
23	1.8	0.7	1.9	1.0
24	1.5	0.8	1.5	0.9
25	1.0	0.5	1.8	0.7
26	1.8	0.7	1.7	0.8
27	1.6	0.6	2.0	1.1
28	1.9	1.1	1.8	0.6
29	1.8	0.9	1.3	0.6
30	1.6	0.9	1.5	0.7

11.4 Apéndice 4. Clave de colores de Munsell en semillas de *C. mexicanum* de las poblaciones Sombreroete y Maguey Verde.

Clave de color (Munsell, 2011)		
Individuo	Sombreroete	Maguey Verde
1	Negro	5YR3/2
2	Negro	Negro
3	7.5YR4/2	5YR3/2
4	5YR3/4	5YR3/2
5	2.5YR3/4	5YR3/2
6	2.5YR3/4	Negro
7	Negro	5YR3/2
8	Negro	5YR3/2
9	Negro	5YR3/2
10	Negro	5YR3/2
11	2.5Y5/4	Negro
12	Negro	5YR3/2

13	Negro	Negro
14	Negro	5YR3/2
15	Negro	5YR3/2
16	Negro	5YR3/2
17	Negro	5YR3/2
18	2.5YR3/4	5YR3/2
19	Negro	5YR3/2
20	Negro	Negro
21	Negro	5YR3/2
22	Negro	5YR3/2
23	2.5YR3/4	5YR3/2
24	7.5YR4/2	Negro
25	Negro	Negro
26	Negro	Negro
27	Negro	Negro
28	Negro	5YR3/2
29	Negro	5YR3/2
30	Negro	Negro
