



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

TESIS
FILOGENIA DEL COMPLEJO *Stachys coccinea* Ortega (LAMIACEAE)
BASADA EN DATOS MOLECULARES Y MORFOLÓGICOS.

PRESENTA

Adriana María Berumen Cornejo

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTOR

Dra. María Elena Siqueiros Delgado

COMITÉ TUTORAL

Ph.D. Charlotte Lindqvist

Dr. Martín Eugenio Pérez Molphe Balch

Aguascalientes, Ags., 20 de noviembre del 2016.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

ADRIANA MARÍA BERUMEN CORNEJO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
PRESENTE.

Estimada alumna:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"Filogenia del complejo *Stachys coccinea* Ortega (LAMIACEAE) basada en datos moleculares y morfológicos"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 25 de noviembre de 2016

"Se lumen proferre"

EL DECANO

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'José de Jesús Ruiz Gallegos'.

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.



UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M EN C JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BASICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **ADRIANA MARÍA BERUMEN CORNEJO** con ID 18080 quien realizó la tesis titulada: **FILOGENÍA DEL COMPLEJO *Stachys coccinea* Ortega (LAMIACEAE) BASADA EN DATOS MOLECULARES Y MORFOLÓGICOS**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATE NTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 20 de *noviembre* de 2016.

Dra. María Elena Siqueiros Delgado
Tutor de tesis

(en caso de tener dos tutores, favor de incluir otro espacio para la firma)

c.c.p.- Adriana María Berumen Cornejo
c.c.p.- Dr. Juan Jáuregui Rincón - Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Consejero Académico Dra. María Elena Siqueiros Delgado – Área terminal Ecología
c.c.p.- Dr. María Consolación Martínez Saldaña - Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M EN C JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **ADRIANA MARÍA BERUMEN CORNEJO** con ID 18080 quien realizó la tesis titulada: **FILOGENÍA DEL COMPLEJO *Stachys coccinea* Ortega (LAMIACEAE) BASADA EN DATOS MOLECULARES Y MORFOLÓGICOS**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 20 de noviembre de 2016.

Dra. Charlotte Lindqvist
Asesor de tesis

(en caso de tener dos tutores, favor de incluir otro espacio para la firma)

c.c.p.- Adriana María Berumen Cornejo
c.c.p.- Dr. Juan Jáuregui Rincón - Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Consejero Académico Dra. María Elena Siqueiros Delgado - Área terminal Ecología
c.c.p.- Dr. María Consolación Martínez Saldaña - Secretario Técnico

M EN C JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **ADRIANA MARÍA BERUMEN CORNEJO** con ID 18080 quien realizó la tesis titulada: **FILOGENIA DEL COMPLEJO *Stachys coccinea* Ortega (LAMIACEAE) BASADA EN DATOS MOLECULARES Y MORFOLÓGICOS**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATE NTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 20 de *noviembre* de 2016.


Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch
Asesor de tesis

c.c.p.- Adriana María Berumen Cornejo
c.c.p.- Dr. Juan Jáuregui Rincón - Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Consejero Académico Dra. María Elena Siqueiros Delgado - Área terminal Ecología
c.c.p.- Dr. María Consolación Martínez Saldaña - Secretario Técnico

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT, por el apoyo financiero otorgado a través de la beca 351302, sin el cual no se hubiera podido realizar el presente trabajo.

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes, por el apoyo otorgado en el desarrollo de las actividades del doctorado, así como al Programa del Doctorado en Ciencias Biológicas.

A las Doctoras María Elena Siqueiros Delgado y Charlotte Lindqvist, y al Doctor Eugenio Pérez Molphe Balch, miembros de mi comité tutorial, por compartir su conocimiento, por la guía brindada y sus comentarios acertados, y sobre todo, por su paciencia.

A la Doctora Consolación Martínez Saldaña, por haber llegado en el momento justo y por todo su apoyo.

A Martha Evelia Pérez, gracias por todo su apoyo en el trabajo de laboratorio.

A Tilottama Roy, por sus asesorías a distancia en temas peliagudos de reconstrucción de filogenias: ¡gracias por ayudar a una extraña!

A Julieta Domínguez, Carolina Muñoz, Karina Vacío, Sandra Martínez y Lucila Perales, ¡gracias por hacer más llevadero el proceso!

A Leopoldo, Claudia, Bernardo y Francisco, mis hermanos, por el apoyo brindado cuando fue necesario, en particular a mi hermana: ¡gracias Claudia por todo!

DEDICATORIAS

*En perseguirme, Mundo, ¿qué interesas?
¿En qué te ofendo, cuando sólo intento
poner bellezas en mi entendimiento
y no mi entendimiento en las bellezas?*

*Yo no estimo tesoros ni riquezas;
y así, siempre me causa más contento
poner riquezas en mi pensamiento
que no mi pensamiento en las riquezas.*

*Y no estimo hermosura que, vencida,
es despojo vil de las edades,
ni riqueza me agrada fementida,
teniendo por mejor, en mis verdades,
consumir vanidades de la vida
que consumir la vida en vanidades.*

Sor Juana Inés de la Cruz

A Francisco, mi esposo, y a mis hijos, Ramsés Darío y Héctor Aníbal, que compartieron conmigo el proceso de dar luz a esta obra.

A mis padres, Héctor y Guadalupe, por el inapreciable don de la vida además de su consejo y su consuelo amoroso.

A doña Mercedes, mi madre adoptiva, por su apoyo incondicional.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	1
ÍNDICE DE TABLAS	2
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ACRÓNIMOS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCION	7
ANTECEDENTES	8
HIPÓTESIS	20
OBJETIVOS	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
RESULTADOS	33
DISCUSIONES	66
CONCLUSIÓN	71
GLOSARIO	73
BIBLIOGRAFÍA	75
ANEXO A. Datos de colecta de ejemplares utilizados en el presente estudio.	81
ANEXO B. Cuadro comparativo de especies pertenecientes al complejo <i>Stachys coccinea</i> Ortega (Lamiaceae).	84
ANEXO C. Matriz de datos morfológicos.	89
ANEXO D. Protocolo CTAB de Extracción de DNA (Alto Rendimiento).	94
ANEXO E. Protocolos de los Análisis Numéricos de los Datos Morfológicos.	96
ANEXO F. Carta de aceptación de artículo derivado.	105

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Listado de especies pertenecientes al complejo <i>Stachys coccinea</i>	19
Tabla 2. Listado de taxa, códigos de ID, información de voucher y números de adquisición de GenBank de los especímenes utilizados.	22
Tabla 3. Listado de caracteres morfológicos y estados de carácter.	26
Tabla 4. Listado de cebadores utilizados en el análisis molecular.	29



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de la República Mexicana. 9

Figura 2. Análisis de Conglomerados. 34

Figura 3. Análisis de Componentes Principales. 37

Figura 4. Análisis de Coordenadas Principales. 41

Figura 5. Análisis de Máxima Parsimonia sobre Datos Morfológicos. 43

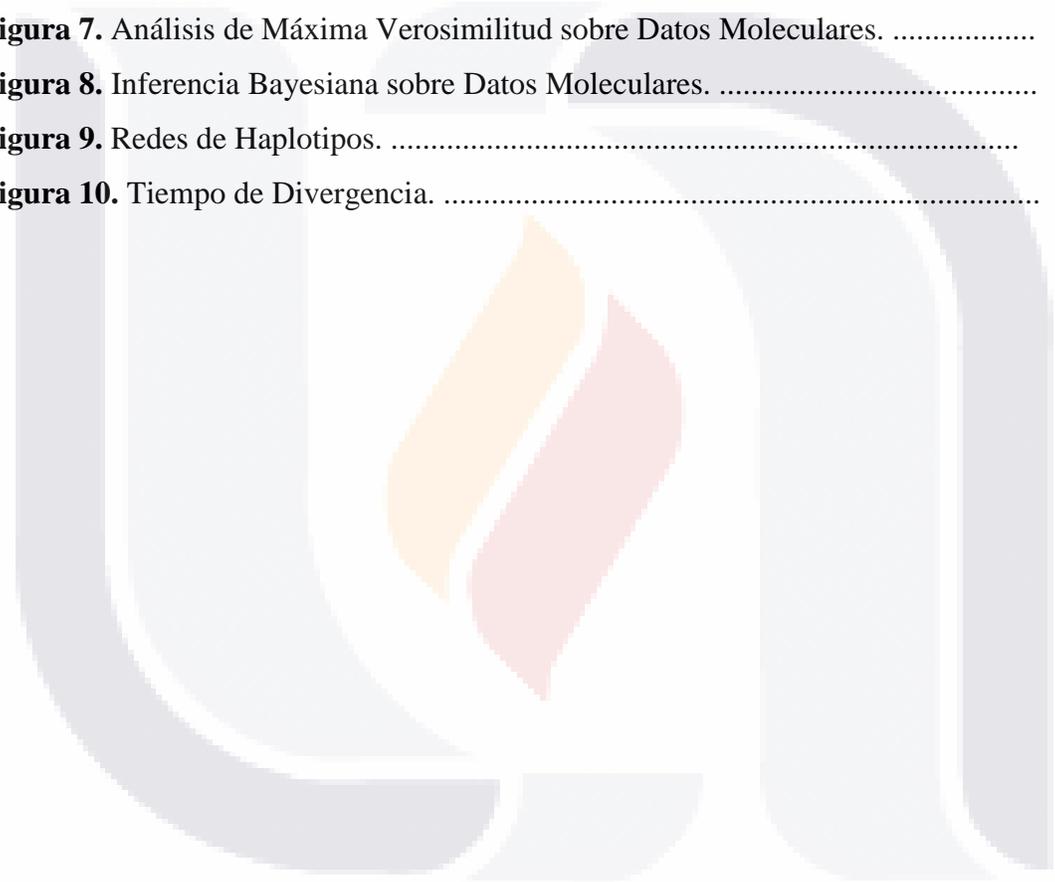
Figura 6. Análisis de Máxima Parsimonia sobre Datos Moleculares. 46

Figura 7. Análisis de Máxima Verosimilitud sobre Datos Moleculares. 51

Figura 8. Inferencia Bayesiana sobre Datos Moleculares. 56

Figura 9. Redes de Haplotipos. 61

Figura 10. Tiempo de Divergencia. 65



ACRÓNIMOS

HUAA : Herbario de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

MEXU : Herbario Nacional del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.



RESUMEN

Dentro de la familia Lamiaceae Martinov, uno de sus géneros más grandes, *Stachys* L., está en extrema necesidad de ser revisado taxonómicamente debido a su polifilia comprobada. Un grupo de especies de *Stachys* ampliamente distribuidas en México, donde cuatro de las siete especies del complejo son consideradas endémicas, pertenecen al complejo *Stachys coccinea* y están caracterizadas por su corolas grandes rojas, anaranjadas o moradas. Sin embargo, la variación morfológica observada entre las especies del complejo parece ser insuficiente para circunscribir este número de especies. La circunscripción y relaciones entre las especies del complejo *Stachys coccinea* fueron evaluadas usando análisis numéricos aplicados a datos morfológicos y análisis filogenéticos aplicados a datos de secuencias de cpDNA. Se encontró que la variación morfológica en este complejo delimita insuficientemente a los miembros del complejo, debido probablemente a la plasticidad. Además, las regiones de cpDNA utilizadas, comúnmente usadas en la reconstrucción de filogenias de plantas (las secuencias del intrón *trnL*, del espaciador *trnL-F* y del intrón *rps16*), no pueden resolver las relaciones entre la mayoría de las especies en el complejo. Se propone que el complejo *Stachys coccinea* sea re-delimitado, reduciendo el número de especies a tres especies: *Stachys coccinea*, *S. lindenii* y *S. albotomentosa*, manteniendo las delimitaciones originales de las especies e incluyendo a *S. jaimehintonii*, *S. manantlanensis*, *S. pacifica*, y *S. torresii* como variedades de *S. coccinea*.

Palabras clave: *análisis numéricos, complejo Stachys coccinea, filogenia, Lamiaceae, morfología, rps16, trnL, trnL-F.*

ABSTRACT

Within the Lamiaceae Martinov, one of its largest genera, *Stachys* L., is in extreme need of taxonomic revision due to its demonstrated phylogenetic polyphyly. A group of *Stachys* species widely distributed in Mexico, where four of the seven species of this complex are considered endemic, belong to the *Stachys coccinea* complex are characterized by their large red, orange or purple corollas, is. Nonetheless, the observed morphological variation among the species of the complex appears insufficient to circumscribe this number of species. The circumscription and relationships among the *Stachys coccinea* complex were evaluated using numerical analysis applied to morphological data and phylogenetic analyses of cpDNA sequence data. We found that morphological variation in this complex insufficiently circumscribe members of the complex, possibly caused by their plasticity. In addition, the utilized cpDNA markers, which are commonly used in plant phylogenetic reconstruction (*trnL* intron, *trnL-F* spacer, and *rps16* intron sequences), can not resolve relationships among most of the species in the complex. We propose that the *Stachys coccinea* complex is recircumscribed, reducing the number of species to three species: *Stachys coccinea*, *S. lindenbergii*, and *S. albotomentosa*, keeping the original circumscription of these species and including *S. jaimehintonii*, *S. manantlanensis*, *S. pacifica* and *S. torresii* as varieties of *S. coccinea*.

Key words: *Lamiaceae*, *morphology*, *numerical analysis*, *phylogeny*, *rps16*, *Stachys coccinea* complex, *trnL*, *trnL-F*.

INTRODUCCIÓN

Como bien menciona Rzedowski en su obra “Vegetación de México” (1978), México presenta una de las cubiertas vegetales más variadas de la Tierra, y que esta diversidad no sólo se debe a las condiciones fisiográficas, geológicas y climáticas, sino también al hecho de que México participa tanto de elementos meridionales Sudamericanos como de elementos boreales propios de Norteamérica y de Eurasia. Y es precisamente ésta diversidad vegetal la que se ha utilizado como primer criterio para clasificar el medio natural de México (CONABIO, 1998).

Desde tiempos remotos, el estudio de la diversidad vegetal de México se enfocó básicamente en aquellas especies con propiedades particulares y usos antropocéntricos, es decir, aquellas con usos comerciales, medicinales, comestibles u ornamentales, sin dar mucha importancia a las cuestiones ecológicas, y mucho menos, a las cuestiones taxonómicas. Es hasta inicios del siglo XVIII cuando se empiezan a dar estudios que buscan conocer la diversidad vegetal de México, aunque en pequeña escala, y es hasta el siglo XX que empiezan los trabajos más formales enfocados en describir esta diversidad que caracteriza a México aunque a niveles muy locales y generales. Sin embargo la flora mexicana no está bien estudiada aún y hay varias deficiencias tanto en el conocimiento de muchos grupos que la componen (Rzedowski, 1978). Y es en éste contexto donde la enorme importancia de la taxonomía queda claramente revelada (Toledo, 1988).

La taxonomía tradicional, con el uso de métodos de identificación y clasificación tradicionales basados en morfología, sigue siendo utilizada para la circunscripción de especies (Wiens, 2004). Sin embargo, gracias a los avances en filogenia molecular y en reconstrucción filogenética, se ha hecho posible la resolución de una amplia gama de problemas taxonómicos y evolutivos para un gran número de taxa, dando como resultado cambios en las clasificaciones tradicionales (Wiens, 2004; Scheen *et al.*, 2010). Esta situación es observada en varias familias de plantas.

Una de las familias de plantas más diversas del país es la familia Lamiaceae Martinov, representada por 32 géneros y 591 especies, de las cuales 389 especies son endémicas. Uno de los géneros que reviste más importancia dentro de la familia es el

género *Stachys* L., el cual, junto con *Salvia* L. y *Scutellaria* L. son los más diversos en el país (Martínez-Gordillo *et al.*, 2013).

El género *Stachys* está ampliamente distribuido en el país, tiene preferencia por las regiones templadas y subtropicales; muestra una gran diversidad morfológica y citológica, por lo que representa un grupo de taxonomía difícil, en extrema necesidad de ser revisado (Mulligan & Munro, 1989; García Zuñiga, 2001; Lindqvist & Albert, 2002; Scheen *et al.*, 2010; Salmaki *et al.*, 2012).

Dentro de las especies del género *Stachys* presentes en México, se identifican aquellas especies que presentan corolas grandes de colores anaranjados, rojos o púrpuras; dichas especies pertenecen al complejo *Stachys coccinea* Ortega. Inicialmente, el complejo constaba de tres especies, y Turner (1994b; 1995) basado en morfología, propuso cuatro especies más, incrementando el número de especies dentro del complejo a siete. Sin embargo, se considera que éste número de especies está sobreestimado y se requiere una clarificación de las relaciones filogenéticas entre sus integrantes.

ANTECEDENTES

Generalidades del área de estudio.

1. Localización geográfica.

México, con una superficie total de 1,964,375 km², se encuentra situado en la parte meridional de América del Norte, entre las coordenadas geográficas extremas de 14°32'-32°42' N y 86°42'-118°27' O; colina con los Estados Unidos de América al norte y con Guatemala y Belice al sur; además presenta costas con el océano Pacífico al oeste y con el Atlántico al este (Figura 1).

2. Fisiografía.

Con un rango altitudinal que va desde los 0 msnm hasta los 5,610 (5,715) msnm en su pico más alto (el Pico de Orizaba o Citlaltépetl), el territorio mexicano se caracteriza por ser sumamente variado y accidentado. En general se identifican los siguientes sistemas fisiográficos:

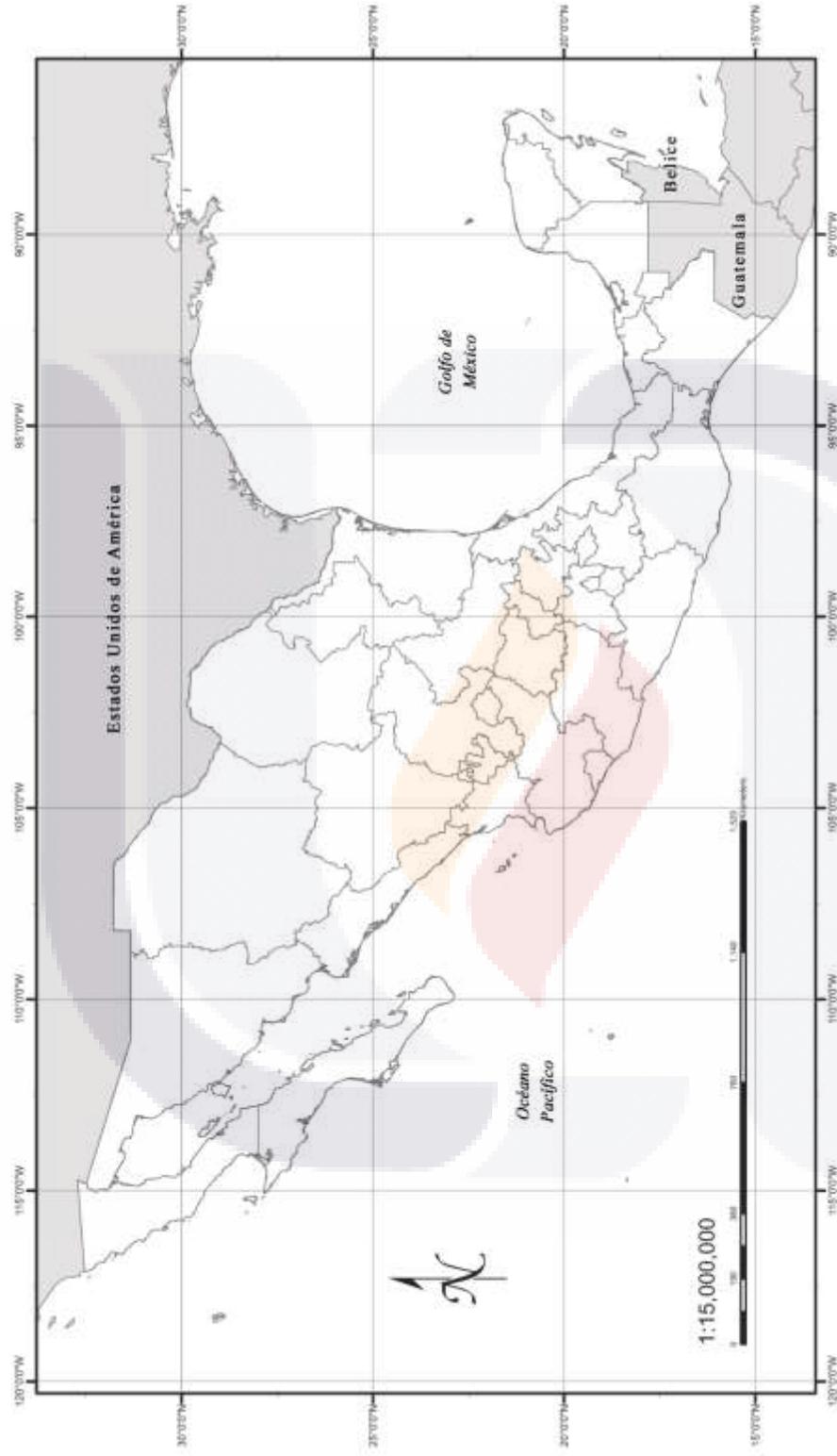


Figura 1. Mapa de la República Mexicana con división por entidades federativas. México colinda al norte con Estados Unidos de Norteamérica y al sur con Guatemala y Belize, al este con el Golfo de México y el Mar Caribe y al oeste con el océano Pacífico.

- Sistema Montañoso de Baja California, recorriendo en básicamente toda su longitud a la península de Baja California y enlazándose con las montañas de la Alta California al norte, presenta pendientes a menudo muy abruptas hacia el mar de Cortés y mucho más suaves hacia el Pacífico.
- Sierra Madre Occidental, es el más largo y continuo de los sistemas montañosos del país; corre paralelo a la costa del Pacífico desde la frontera con los Estados Unidos hasta converger con el Eje Volcánico Transversal por el sur; ésta sierra separa la Planicie Costera Noroccidental del Altiplano Mexicano.
- Sierra Madre Oriental, se inicia en la parte central del estado de Nuevo León y corre hacia el sur-sureste, uniéndose finalmente al Eje Volcánico Transversal; ésta sierra separa la Planicie Costera Nororiental del Altiplano Mexicano.
- Eje Volcánico Transversal, es un sistema montañoso situado a lo largo de los paralelos 19° y 20°, marcando el extremo sur del Altiplano Mexicano y separándolo de la Depresión del Balsas; presenta los picos más altos de México: Pico de Orizaba, Popocatepetl, Ixtaccíhuatl, entre otros.
- Sierra Volcánica del Sur, corre del noroeste a sureste paralelamente a la costa del Pacífico, presentando una serie de ríos con sus respectivos valles; hacia el norte confluye con el Eje Volcánico Transversal y comparte límites con la Depresión del Balsas.
- Sistema Montañoso del Norte de Oaxaca, con una topografía muy accidentada, podría considerarse como una prolongación de la Sierra Madre Oriental que queda interrumpida por el Eje Volcánico Transversal.
- Macizo Central de Chiapas, que se extiende a lo largo de la costa pacífica de Chiapas, introduciéndose hasta el Istmo de Tehuantepec, constituyendo una prolongación de las serranías americanas.
- Planicie Costera Noroccidental, es la costera del Pacífico que colinda directamente con la Sierra Madre Occidental, extendiéndose desde casi la desembocadura del río Colorado hasta la parte central de Nayarit.
- Altiplano Mexicano, delimitado por las Sierras Madre Oriental y Madre Occidental, así como por el Eje Volcánico Transversal al sur y continuándose con las grandes llanuras del oeste norteamericano hacia el norte, ocupando no menos de la cuarta parte del territorio nacional.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Planicie Costera Nororiental, ocupa la zona costera del Golfo de México, que nace desde el río Bravo al norte, limitando con el Altiplano Mexicano y la Sierra Madre Oriental, y al sur se fusiona con el Eje Volcánico Transversal.
 - Depresión del Balsas, es una amplia región que se ubica entre el Eje Volcánico Transversal y la Sierra Madre del Sur.
 - Planicie Costera Suroriental, abarca todo el Istmo de Tehuantepec, y ocupa también la mayor parte de la península de Yucatán; algunos autores la subdividen en una Península de Yucatán y en la Planicie de Sotavento.
 - Depresión Central de Chiapas, ubicada entre el Macizo Central y la Sierra Madre de Chiapas, da lugar al valle de drenado del río Grijalva.

3. Hidrología.

Debido a factores como la gran extensión de litorales así como la gran diversidad de condiciones fisiográficas y climáticas, la hidrología también presenta una gran diversidad, destacándose 4 principales vertientes:

- Vertiente del Pacífico, exorréica, representada por los ríos Yaqui, Fuerte, Mezquital, Lerma-Santiago y Balsas.
- Vertiente del Golfo, exorréica, representada por los ríos Bravo, Pánuco, Papaloapan, Grijalva y Usumacinta.
- Vertiente del Altiplano, endorréica, representada principalmente por los ríos Nazas, Aguanaval y Casas Grandes, aunque presenta otras subvertientes que conforman al “Bolsón de Mapimí” o el “Bolsón de Salado”.
- Península de Yucatán, arréica, presenta escaso relieve y está conformada por rocas muy permeables, por lo que casi todas sus corrientes de agua son subterráneas.

4. Climas.

Una serie de factores presentes en México, resumidos en forma gruesa como geografía, fisiografía, latitud y altitud, resultan en un mosaico muy diverso de climas muy ricos en variantes, siendo muy complicado clasificarlos adecuadamente, aunque resulta evidente que predominan los climas secos sobre los húmedos. Además, debido a esta misma diversidad es difícil encontrar atributos que sean comunes a todos los tipos de climas, sin embargo se puede afirmar que el punto en el que coinciden es el hecho de que

las estaciones hídricas son más evidentes que las estaciones térmicas, por lo que se puede hablar más de épocas secas y épocas lluviosas.

En este punto, el gradiente térmico en función de la altitud varía mucho de una región a otra como consecuencia de diversos factores (altura relativa, humedad, latitud, etc.). Esto da como resultado que las estaciones térmicas del año sean moderadamente más acentuadas en el extremo norte del país. Por otro lado, la oscilación térmica diurna-nocturna, constituye en muchas regiones un elemento climático de mayor importancia que la variación estacional.

Otro factor asociado al clima es la radiación solar, en donde comparativamente con otras regiones, en México la radiación solar es muy intensa básicamente todo el año.

Respecto a la precipitación, sucede algo similar que con la temperatura: la precipitación presenta grandes contrastes, en donde las cantidades mínimas anuales van desde los 50 mm con todos los meses secos, hasta los máximos de más de 5,500 mm con todos los meses húmedos. A grandes rasgos, México se puede dividir en 3 regiones gracias a la precipitación:

- una región húmeda, más o menos continua que se extiende desde el sureste de San Luis Potosí continuando a través de casi todo el estado de Veracruz y Tabasco hasta la base de la Península de Yucatán, incluyendo parte de Chiapas, Oaxaca, Puebla e Hidalgo.
- dos regiones áridas, separadas por la Sierra Madre Occidental; la primera una gran porción del Altiplano Mexicano, comúnmente llamada “Chihuahuense” que va desde los estados de Hidalgo, Guanajuato y Aguascalientes hasta la frontera con los Estados Unidos; y la segunda que abarca a la Planicie Costera Noroccidental y a la mayor parte de la Península de Baja California, comúnmente llamada “Sonorense”, y de las dos, es mucho menos privilegiada en precipitación.

Es importante resaltar que la distribución de las lluvias a lo largo del año constituye un factor de suma importancia para la vida vegetal, básicamente en la mayor parte del país.

De todo lo expuesto anteriormente, podemos llegar a un acuerdo con el sistema de Koeppen (1948), quién indica que en México se presentan básicamente cuatro de los cinco tipos fundamentales de climas:

- A (calientes y húmedos), se presentan en grandes extensiones de tierra a lo largo del litoral Pacífico, en la Península de Yucatán, en la porción sur de la Planicie Costera

Nororiental y en la Depresión Central de Chiapas; sobresalen las categorías Aw (con temporada seca larga), Am (con temporada seca corta) y Af (sin temporada seca).

- B (secos), cubren la mayor superficie de México, predominando en el Altiplano, en las Planicies Costeras Noroccidental y Nororiental, además de Baja California; sobresalen el Bw (seco desértico) y el Bs (seco estepario).

- C (templados y húmedos), son característicos de las zonas montañosas; sobresalen el Cw (con temporada lluviosa en la época caliente del año), Cf (con lluvias durante todo el año), Cs (con lluvias en la época fría del año) y Cx (con lluvias poco frecuentes pero intensas durante todo el año).

- E (frío o polar), que se restringe a las partes más altas de algunas montañas aisladas.

5. Vegetación.

Resulta más que evidente que la causa primordial de la gran riqueza florística de México sea debido a todos los elementos enumerados anteriormente. Sin embargo hay otro factor que contribuye a la riqueza florística del país: el hecho de que la situación continental de México, como puente entre las dos partes de América, ha sido escenario de migraciones de plantas de diversa procedencia, constituyendo actualmente una zona con influencia tanto de elementos florísticos neotropicales como de elementos holárticos.

Sin embargo, en un área como la de México, los rasgos de la distribución de la flora obedecen estrechamente a los del clima.

De acuerdo con Rzedowski (1978) existen a nivel nacional diez tipos de vegetación principales:

- Bosque tropical perennifolio, muy exuberante, pues corresponde a climas donde el calor ni el agua son limitantes del desarrollo de las plantas. Desarrollándose comúnmente en altitudes que van desde los 0 hasta los 1,000 msnm, con una temperatura media anual de 20-26°C y precipitaciones promedio de 1,500-3,000 mm, presenta afinidades geográficas con el sur (Centroamérica y América del Sur). Es una comunidad biológicamente compleja donde predominan árboles de más de 25 m de alto, con hojas de tamaño mediano a moderadamente grande, donde las coníferas son muy raras. En México representa un gran número de comunidades diferentes, algunas son bien reconocidas y otras poco o nulamente conocidas.

- Bosque tropical subcaducifolio, agrupa a comunidades con características entre el bosque tropical perennifolio y el bosque tropical caducifolio. Se desarrolla en altitudes que van desde los 1 a los 1,300 msnm, una temperatura media anual de 20-28°C y una media pluvial entre los 1,000 y los 1,600 mm. Presenta una distribución más amplia en la vertiente del Pacífico que en la del Atlántico. En él pueden distinguirse 2 estratos arbóreos donde el estrato inferior alcanza entre 8-15 m de altura; además puede presentarse un estrato arbustivo variable en ocasiones ausente. Las comunidades representadas bajo este tipo de vegetación presentan pocas especies codominantes, no más de cinco, aunque en ocasiones la codominancia no existe.

- Bosque tropical caducifolio, agrupa a los bosques de regiones cálidas que pierden sus hojas en la época seca del año (alrededor de 6 meses). Se desarrolla comúnmente entre altitudes de 0 a 1,900 msnm, su temperatura media anual es de 20-29°C, y la precipitación promedio es de 300-1,800 mm, aunque cabe resaltar que presenta dos estaciones bien definidas: la seca y la lluviosa. Por lo general es una comunidad densa cuya altura oscila entre 5-15 m, con uno o dos estratos arbóreos, donde se pierden las hojas durante un periodo de 5 a 8 meses. Presenta un gran número de endemismos (principalmente a nivel de especie).

- Bosque espinoso, caracterizado por comunidades más bien bajas cuyos elementos son en gran medida árboles espinosos. Sin embargo, no es tan fácil definirlos debido a que forman transiciones entre otros tipos de vegetación (bosque tropical caducifolio, matorral xerófilo y pastizal). Sus límites altitudinales van desde los 0 hasta los 2,200 msnm, con temperaturas medias anuales entre 17-19°C y una precipitación media anual de 350-1,200 mm, con 5 a 9 meses secos. Este tipo de vegetación es característico de terrenos más bien planos o poco inclinados, se caracteriza por presentar vegetación de 4-15 m de altura con bosques densos a más o menos abiertos. Esta flora tiene un evidente matiz neotropical, y presenta igualmente gran número de endemismos.

- Matorral xerófilo, ocupando aproximadamente el 40% de la superficie del país, se vuelve el tipo más extenso de vegetación. Ubicado en altitudes que pueden ir desde los 0 hasta los 3,000 msnm, con temperaturas medias de 12-26°C, y una precipitación media anual inferior a los 700 mm, con lluvias irregulares, suelen tener altos niveles de insolación y una humedad atmosférica generalmente baja. Estos matorrales se pueden observar

prácticamente en todo tipo de suelos, con formas más bien herbáceas y poca cobertura arbórea. Por esta razón, su composición florística es variada, pudiendo clasificarse de acuerdo a la forma predominante en la vegetación (crasicaules, rosetófilos, submontanos, etc.), y suele ser rica en endemismos tanto genéricos como específicos.

- Pastizal, se trata de comunidades vegetales en donde el papel predominante lo realizan las gramíneas, y son mucho más extensos en las regiones semiáridas y de clima más bien fresco, con suelos más bien planos o ligeramente ondulados. Se ubican principalmente a altitudes entre 1,100-2,500 msnm, con temperaturas medias anuales entre 12-20°C, y una precipitación media anual de 300-600 mm, con 6 a 9 meses secos y una humedad atmosférica relativamente baja. Generalmente, son de altura media (20-70 cm) y en la mayoría de los casos, los estratos arbóreos están ausentes.

- Bosque de *Quercus*, también conocidos como encinares, son comunidades vegetales características de las zonas montañosas de México, y junto con los bosques de coníferas constituyen la mayor parte de la cobertura vegetal en áreas de clima templado y semihúmedo, aunque también penetran en zonas de clima caliente y semiárido, básicamente en las serranías de la porción continental de país. Encontrándose desde los 0 hasta los 3,100 msnm, con temperaturas medias anuales entre los 10 y los 26°C, y precipitación media anual entre los 300 y los 2,000 mm. Los bosques de encinos son comunidades cuya altura varía entre los 2 y los 30 m (en ocasiones hasta 50 m, presentando también varios estratos) y la fisonomía de los encinares está influenciada por el tamaño de las hojas de las especies de árboles que lo forman, además pueden ser totalmente caducifolios o bien totalmente perennifolios.

- Bosque de coníferas, frecuentes en zonas de clima templado y frío, caracterizan muchos sectores del territorio nacional, pudiendo prosperar en regiones de clima semiárido, semihúmedo o francamente húmedo. Ubicados principalmente en altitudes que van de los 1,500 a los 3,000 msnm, temperaturas medias de 6-28°C y precipitaciones medias de 600-1,000 mm, dependiendo de la especie dominante en el bosque (de *Pinus*, *Pinus-Quercus*, *Abies*, *Juniperus*, *Pseudotsuga*, *Cupressus*, *Picea*, etc.), cambian las características ambientales del bosque, aunque podría decirse que comparten similitudes con los bosques de encinos.

- Bosque mesófilo de montaña, muy similar al bosque caducifolio, la diferencia fundamental es que en él, predomina la condición siempre verde y que las condiciones climáticas que requiere este bosque se presentan en zonas restringidas, por lo que tiene una distribución limitada y fragmentada. Su distribución se localiza entre los 600 y los 1,000 msnm, con temperaturas medias de 12-23°C, y precipitación media anual superior a los 1,000 mm aunque puede exceder a los 3,000 mm. Suele presentar frecuentes neblinas y una alta humedad atmosférica. Siendo fisonómicamente denso y alto (15-35 o hasta 60 m), con varios estratos arbóreos, tiene preferencia por regiones de relieve accidentado y laderas con pendientes pronunciadas. Presentan diversas asociaciones que a menudo difieren entre sí. Los endemismos a nivel genérico son escasos en este tipo de vegetación pero a nivel de especie no es despreciable el número de endemismos.

- Vegetación acuática y subacuática, se trata de las comunidades vegetales ligadas al medio acuático o permanentemente saturado de agua, y son muy variadas. Por esta razón, hay numerosas especies que tienen una distribución casi cosmopolita y hay otras especies que son muy restringidas e incluso endémicas. Se presenta en todos los climas propios para la vida vegetal, sin embargo se concentra en zonas cercanas a los litorales. De este modo tenemos la vegetación típica de los litorales marinos, los manglares, los popales, los tulares y carrizales, etc.

Además de estos principales tipos de vegetación, existen varios otros de muchísima menos distribución y sin embargo, no son de menor importancia.

Generalidades sobre la familia Lamiaceae Martinov.

La familia Lamiaceae Martinov (Orden Lamiales), con 200 a 236 géneros aproximadamente y alrededor de 4,000 a 7,137 especies a nivel mundial, y con un amplio rango de diversidad morfológica, tiene mucho para estimular el interés de los botánicos sin importar cuál sea su disciplina (Hedge, 1992; Harley *et al.*, 2004).

Con una distribución cosmopolita, se trata de plantas principalmente herbáceas, anuales o perennes, aunque pueden presentarse algunas arbustivas, y rara vez, árboles. Presentan una combinación de características vegetativas y florales que hacen que se trate de una familia fácilmente identificable: tallo cuadrangular en corte transversal, principalmente en tallos jóvenes, en ocasiones con estolones o rizomas; hojas opuestas en ocasiones verticiladas, simples o en ocasiones lobadas a palmaticompuestas; usualmente

aromáticas, ya que presentan glándulas que producen aceites esenciales; inflorescencias en cimas verticiladas, terminales o axilares; flores marcadamente bilabiadas y bisexuales, estilo ginobásico, y de 2-4 estambres didínamos fusionados a la corola; ovario bicarpelar con 4 lóbulos, que al madurar se fragmenta en 1-4 núculas (Hedge, 1992; Ramamoorthy & Elliot, 1993; Walters & Keil, 1996; García Zuñiga, 2001; Judd *et al.*, 2002; Martínez Gordillo *et al.*, 2013).

Dada su importancia económica como condimentos o medicinales, gracias a sus aceites esenciales, o como ornamentales, por sus flores muy llamativas la mayoría de las veces, es una familia que reviste gran importancia, y más cuando se trata de especies nativas de México. En particular el género *Stachys*, que es uno de los géneros más grandes dentro de las Lamiaceas (Lindqvist & Albert, 2002; Scheen *et al.*, 2010; Martínez Gordillo *et al.*, 2013).

Generalidades sobre el género *Stachys*.

El género *Stachys* L. es un género grande, taxonómicamente complejo y ampliamente distribuido, que se presenta principalmente en las regiones templadas y subtropicales del mundo (Turner, 1994a; García Zúñiga, 2001; Lindqvist & Albert, 2002; Scheen *et al.*, 2010; Salmaki *et al.*, 2012), y a pesar de que las especies pertenecientes a éste género muestran una extensa variación morfológica y citológica se distinguen por su cáliz tubular a turbinado que termina en dientes iguales a subiguales mucronados, y en un anillo de pelos, denominado annulus, en el interior del tubo de la corola (Mulligan & Munro, 1989; Ramamoorthy & Elliot, 1993; García Zúñiga, 2001; Lindqvist & Albert, 2002).

De acuerdo con algunos autores (Ramamoorthy & Elliot, 1993; Harley *et al.*, 2004), el género comprende alrededor de 200 a 300 especies; sin embargo, debido a estudios filogenéticos recientes que indican que si se incluyeran algunos otros géneros que se sabe están anidados dentro de *Stachys*, el número de especies dentro de *Stachys* podría incrementarse a más de 500 especies (Lindqvist & Albert, 2002).

En general se coincide en que *Stachys* representa un grupo con taxonomía difícil, y se considera que es un grupo no natural en extrema necesidad de ser revisado (García Zúñiga, 2001; Scheen *et al.*, 2010; Salmaki *et al.*, 2012). En clasificaciones previas, el género *Stachys* se ubicó en diferentes tribus (Cantino & Sanders, 1986), y actualmente

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

pertenece a la tribu Stachydeae (Scheen *et al.*, 2010); Epling (1934) dividió a las especies americanas del género en 10 grupos, de los cuales siete se presentan en México (Martínez Gordillo *et al.*, 2013).

En México, el género *Stachys* es uno de los géneros más grandes de la familia Lamiaceae, junto con *Salvia* L. y *Scutellaria* L., con 41 especies de las cuales 29 tienen el estatus de endémicas, y éste número podría cambiar al incrementarse el conocimiento taxonómico que se tiene del género (Martínez Gordillo *et al.*, 2013).

El complejo *Stachys coccinea* Ortega (Lamiaceae).

Dentro del conjunto de especies del género *Stachys* presentes en México, se encuentran aquellas pertenecientes al complejo *Stachys coccinea* Ortega. Se trata de siete especies que se identifican por sus grandes corolas de colores anaranjados, rojos o púrpuras, con el annulus cercano a la base del tubo de la corola; y que presentan una amplia distribución que va desde el SO de los Estados Unidos (Texas, Arizona y Nuevo Mexico) hasta Guatemala (Turner, 1994a; 1994b). De toda su área de distribución, México es el país donde se presentan las siete especies pertenecientes al complejo, teniendo cuatro de ellas el estatus de endémicas (Turner, 1994a; 1995; Martínez Gordillo *et al.*, 2013) (Tabla 1).

Turner (1994b; 1995) definió al complejo, tomando a tres especies de *Stachys* descritas previamente: *Stachys albotomentosa* Ramamoorthy, *S. coccinea* Ortega y *S. lindnii* Benth., y basándose en diferencias morfológicas presentadas en ejemplares previamente clasificados como *Stachys coccinea*, circunscribió tres especies nuevas: *S. jaimehintonii* el cual tiene lóbulos del cáliz ciliados y espigas terminales compactas; *S. pacifica*, la cual tiene hojas más delgadas, largos pecíolos, cálices más pequeños y tubos de corola más estrechos; *S. torresii*, que tiene gran parecido a *S. lindnii* debido a los tricomas del tallo que tienen amplias bases, pero difiere de *S. coccinea* y de *S. lindnii* en que tiene cálices grandes con lóbulos tan o más largos que el tubo del cáliz; y finalmente, de un ejemplar identificado como *S. pacifica*, se describió *S. manantlanensis*, el cual tiene tallos delgados trepadores y un color de corola más rojizo rosado. Sin embargo, al comparar los caracteres diagnósticos entre las especies y diversos ejemplares de herbario, se observa que hay algunas inconsistencias en la circunscripción de las especies, por lo que además de ser un grupo que llama la atención, valdría la pena analizar a profundidad para evaluar su situación filogenética.

Tabla 1. Listado de especies pertenecientes al Complejo *Stachys coccinea* Ortega (LAMIACEAE). Se presenta el nombre de la especie con su autor (y sus variedades según el caso), sinonimias (si las hay señaladas con >), lugar y año de publicación de la especie así como el tipo.

<p>1. <i>Stachys albotomentosa</i> Ramamoorthy 1a. <i>Stachys albotomentosa</i> Ramamoorthy var. <i>albotomentosa</i> <i>An. Inst. Biol. Univ. Nac. Auton. Mex. Bot.</i> 34: 158. 1987. TIPO: México. Hidalgo: Jacala. 9-sept-1940. <i>Moore 12</i>. 1b. <i>Stachys albotomentosa</i> Ramamoorthy var. <i>potosina</i> B.L. Turner <i>Phytologia</i> 76(5): 391-401. May 1994. TIPO: México. San Luis Potosí: 30 mi E of San Luis Potosí along hwy 86 to Río Verde, rocky open oak-wooded hill-side. 13-jul-1963. <i>R.L. McGregor 631</i>.</p>
<p>2. <i>Stachys coccinea</i> Ortega <i>Nov. Pl. Descr.</i> 20 December 1797. TIPO: Cuba (?). > <i>Stachys cardinalis</i> Kunze; <i>Stachys oaxacana</i> Fernald; <i>Stachys limitanea</i> A. Nels.</p>
<p>3. <i>Stachys jaimehintonii</i> B.L. Turner <i>Phytologia</i> 76(5): 391-401. *sp nov. May 1994. TIPO: México. Michoacán: Zitácuaro, Salto de Nandio, bushy bank by orchad, 1500 m. 26-dec-1938. <i>Jaime Hinton 13489</i>.</p>
<p>4. <i>Stachys lindenii</i> Benth. <i>Prodr.</i> 12: 467-468. 1848. SINTIPO: México. Nayarit: Tepic. <i>Sinclair s.n.</i></p>
<p>5. <i>Stachys manantlanensis</i> B.L. Turner <i>Phytologia</i> 78(3): 209-210. *sp nov. March 1995. TIPO: México. Jalisco: "cool valley at headwaters of Arroyo Las Joyas... 6 km WSW of Rincón de Manantlán, 17 km SSW of El Chante", (19°35'15-45" N, 104°15'30-45" W), "badly burned-over dense stands of <i>Pinus oocarpa</i>, on upper slopes and ridges of Cerro La Piedra Bola", 2100-2200 m. 1-jan-1984. <i>Hugh H. Iltis & Rafael Guzman M. 29063</i>.</p>
<p>6. <i>Stachys pacifica</i> B.L. Turner <i>Phytologia</i> 76(5): 391-401. *sp nov. May 1994. TIPO: México. Michoacán: Apatzinga, Aguililla, on cliffs. 12-oct-1939. <i>Hinton et al. 15319</i>.</p>
<p>7. <i>Stachys torresii</i> B.L. Turner <i>Phytologia</i> 76(5): 391-401. *sp nov. May 1994. TIPO: México. Oaxaca: Distr. Mixe, "En los primeros 5 km de el camino a Villa Alta, entrado por la desviación que esta aprox. a 10 km de Totontepec. Veg. Ruderal de bosque mesófilo con neblina". 13-dec-1985. <i>R. Torres C. 7925</i>.</p>

HIPÓTESIS

Se considera que el número de especies dentro del complejo *Stachys coccinea* Ortega *sensu* Turner (1994b; 1995) está sobreestimado. La variación morfológica observada no atribuible a plasticidad no es suficiente criterio para delimitar tantas especies, razón por la cual se hacen necesarios estudios morfológicos complementados con estudios moleculares que ayuden a definir la circunscripción de dichas especies.

OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo es inferir las relaciones filogenéticas existentes entre las especies del complejo *Stachys coccinea* Ortega presentes en México, basados en datos moleculares y morfológicos.

Los objetivos particulares que se definen para lograr el objetivo general son:

1. Determinar las relaciones filogenéticas entre las especies del complejo basados en datos moleculares.
2. Comparar los resultados de los análisis moleculares contra los resultados de los análisis morfométricos.
3. Determinar la monofilia de las especies del complejo y de éste modo realizar la circunscripción de las especies.
4. Llevar a cabo el tratamiento taxonómico de las especies, estableciendo sus características morfológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Trabajo de colecta.

El trabajo de colecta consistió en la revisión y recopilación de ejemplares en herbario. En ambos casos se corroboró la correcta identificación de los ejemplares considerando la actualización en la bibliografía y en la nomenclatura.

Se visitaron los herbarios HUAA y MEXU, de donde se revisaron un total de 690 especímenes: 546 ejemplares correspondientes a las especies *Stachys albotomentosa* Ramamoorthy, *Stachys coccinea* Ortega, *Stachys lindenii* Benth., *S. manantlanensis* B.L. Turner y *S. pacifica* B.L. Turner, todas ellas pertenecientes al complejo y que representan a colectas de 22 entidades del país; además se revisaron 144 ejemplares pertenecientes a las especies *Stachys bigelovii* A. Gray, *Stachys boraginoides* Schldl. & Cham., *Stachys drummondii* Benth., *Stachys nepetifolia* Cav. y *Stachys vulnerabilis* Rzed. & Calderón.

A partir de los ejemplares revisados, se tomaron los datos correspondientes a:

- Nombre específico, verificando la correcta identificación del ejemplar.
- Herbario donde se encuentra depositado.
- Colector y número de colecta del ejemplar.
- Fecha de colecta (año-mes-día).
- Lugar de colecta, empezando por la entidad de la república, el municipio y la localidad de colecta; además se tomaron las coordenadas geográficas cuando estuvieron disponibles.
- Tipo de vegetación presente en el lugar de colecta, cuando el dato estuvo disponible.
- Altitud del lugar donde fue colectado el ejemplar, cuando el dato estuvo disponible.

De todos los especímenes revisados para México se seleccionaron 50 ejemplares que por sus características permitieron tanto la obtención de información morfológica como la obtención de una muestra de tejido foliar: 45 ejemplares correspondientes a las especies *Stachys albotomentosa*, *Stachys coccinea*, *Stachys lindenii*, *Stachys manantlanensis* y a *Stachys pacifica*, todas ellas pertenecientes al complejo, y 5 ejemplares pertenecientes a las especies del grupo externo: *S. bigelovii*, *S. boraginoides*, *S. drummondii*, *S. nepetifolia* y *S. vulnerabilis*. Las muestras foliares obtenidas fueron colocadas en un sobre de celofán con sus datos de procedencia y preservadas con sílica gel.

El listado completo de los especímenes utilizados en los análisis morfológicos y moleculares a partir de la colecta de herbarios se encuentra en la Tabla 2, mientras que los datos de colecta de dichos especímenes se encuentran en el Anexo A.

Obtención de la información morfológica para los análisis morfométricos.

A partir de los caracteres diagnóstico y descripciones dados por la bibliografía (Standley & Williams, 1973; Turner, 1994b; 1995) se realizó una tabla comparativa entre las distintas especies pertenecientes al complejo (Anexo B).

Posteriormente a partir de la observación directa de los ejemplares de herbario, se establecieron los 43 caracteres morfológicos para su evaluación: 13 caracteres discretos, cuatro binarios y nueve categóricos multiestado, y 30 caracteres continuos (Tabla 3).

Tabla 2. Listado de taxa, códigos de identificación, información del voucher y números de accesión del GenBank para el intrón trnL, el espaciador intergénico trnL-F, y el intrón rps16, de los especímenes usados en los análisis morfológicos y moleculares. * Basado en Wallander & Albert (2000). ** Recuperado de GenBank, utilizado exclusivamente en el análisis molecular.

Código de identificación	Información del voucher.	trnL	trnL-F	rps16
<i>Galeopsis bifida</i> Boenn.				
GBi-LX086**	Liu & Xiang 086 (s/d)	JX893299	JX893328	JX893276
<i>Lamium album</i> L.				
LAI-LX128**	Liu & Xiang 128 (s/d)	JX893305	JX893334	JX893279
<i>Stachys agraria</i> Schltld. & Cham.				
SAG-BE5638**	B. Ertter 5638 (UTC)	KF235654	KF235708	KF235610
<i>S. albotomentosa</i> Ramamoorthy var. <i>albotomentosa</i>				
SA021	E. Carranza 560 (MEXU)	KU243870	KU243920	KU243970
SA022	Crecencio Guzmán M. 165 (MEXU)	KU243871	KU243921	KU243971
SA023	Benito Servin 125 (MEXU)	KU243872	KU243922	KU243972
SA024	Hiram Rubio 1010 (MEXU)	KU243873	KU243923	KU243973
SA025	Hiram Rubio 1984 (MEXU)	KU243874	KU243924	KU243974
<i>S. bigelovii</i> A. Gray				
SBi126	James Henrickson 6283 (MEXU)	KU243910	KU243960	KU244010

<i>S. boraginoides</i> Schldtl. & Cham.				
SBo130	<i>Heike Vibrans</i> 7062 (MEXU)	KU243913	KU243963	KU244013
<i>S. bullata</i> Benth.				
SBu-HKS4271**	<i>H.K. Sharsmith</i> 4271 (UPS)	KF529790	KF529897	KF529706
<i>S. chamissonis</i> Benth.				
SCh-CL1102**	<i>C. Lindqvist</i> 1102 (UB)	KF235660	KF235714	KF235608
<i>S. coccinea</i> Ortega				
SC001	<i>Gerardo García R.</i> 1948 (HUAA)	KU243865	KU243915	KU243965
SC002	<i>Gerardo García R.</i> 2406 (HUAA)	KU243866	KU243916	KU243966
SC003	<i>Gerardo García R.</i> 1949 (HUAA)	KU243867	KU243917	KU243967
SC007	<i>Margarita de la Cerda L.</i> 6133 (HUAA)	KU243868	KU243918	KU243968
SC008	<i>Carmen Cuéllar R.</i> 17 (HUAA)	KU243869	KU243919	KU243969
SC047	<i>C. Conzatti</i> 1965 (MEXU)	KU243881	KU243931	KU243981
SC058	<i>Annetta Carter</i> 4090 (MEXU)	KU243886	KU243936	KU243986
SC062	<i>M.H. Mayfield</i> 188 (MEXU)	KU243887	KU243937	KU243987
SC063	<i>Robert A. Bye</i> 9093 (MEXU)	KU243888	KU243938	KU243988
SC065	<i>R. Spellenberg</i> 8049 (MEXU)	KU243889	KU243939	KU243989
SC072	<i>José García P.</i> 882 (MEXU)	KU243890	KU243940	KU243990
SC074	<i>P. Tenorio L.</i> 9869 (MEXU)	KU243891	KU243941	KU243991
SC076	<i>C.L. Lundell</i> 12269 (MEXU)	KU243892	KU243942	KU243992
SC077	<i>M. Mayagoitia P.</i> 71 (MEXU)	KU243893	KU243943	KU243993
SC078	<i>S. Moreno G.</i> 295 (MEXU)	KU243894	KU243944	KU243994
SC087	<i>E. Martínez S.</i> 5610 (MEXU)	KU243895	KU243945	KU243995
SC090	<i>Ramiro Cruz Duran</i> 3574 (MEXU)	KU243896	KU243946	KU243996

SC091	<i>E. Martínez S. 4942</i> (MEXU)	KU243897	KU243947	KU243997
SC092	<i>Ramiro Cruz Duran 3683</i> (MEXU)	KU243898	KU243948	KU243998
SC097	<i>R. González Tamayo 308</i> (MEXU)	KU243900	KU243950	KU244000
SC098	<i>Roberto Banda 193a</i> (MEXU)	KU243901	KU243951	KU244001
SC101	<i>James L. Reveal 4151</i> (MEXU)	KU243902	KU243952	KU244002
SC103	<i>José C. Soto Nuñez 6340</i> (MEXU)	KU243903	KU243953	KU244003
SC104	<i>J.G. Teer 58</i> (MEXU)	KU243904	KU243954	KU244004
SC107	<i>R. Sanders 74133</i> (MEXU)	KU243905	KU243955	KU244005
SC108	<i>F. Ventura A. 16118</i> (MEXU)	KU243906	KU243956	KU244006
SC111	<i>Rafael Hernández M. 9749</i> (MEXU)	KU243907	KU243957	KU244007
SC115	<i>P. Tenorio L. 4546</i> (MEXU)	KU243908	KU243958	KU244008
SC118	<i>Francisco Ventura 15439</i> (MEXU)	KU243909	KU243959	KU244009
SC-KIM745**	<i>K.I. Mathews 745</i> (AAU)	KF235661	KF235715	KF235609
SC-LA355**	<i>C. Lindqvist & V.A. Albert</i> <i>355 cult. 911/97A</i> (NYBG)	AF502048	FJ854214	FJ854099
<i>S. drummondii</i> Benth.				
SDr129	<i>Carolyn J. Ferguson 7</i> (MEXU)	KU243912	KU243962	KU244012
<i>S. eriantha</i> Benth.				
SEr-AMDGN2495**	<i>A. McDonald & G. Nesom</i> <i>2495</i> (TEX)	KF235668	KF235720	KF235614
<i>S. herrerae</i> Epling				
SHe-FLH3499**	<i>F.L. Herrera 3499</i> (US)	KF235671	KF235723	KF235617
<i>S. lamioides</i> Benth.				
SLa-EA17092**	<i>E. Asplund 17092</i> (US)	KF529815	KF529922	KF529730
<i>S. langmaniae</i> Rzed. & Calderón				
SLg-AMD1620**	<i>A. McDonald 1620</i> (TEX)	KF235675	KF235726	KF235621
<i>S. lindenii</i> Benth.				

SL033	<i>T.P. Ramamoorthy 4450</i> (MEXU)	KU243875	KU243925	KU243975
SL034	<i>José C. Soto Nuñez 3830</i> (MEXU)	KU243876	KU243926	KU243976
SL038	<i>Fernando Chiang C. 1137</i> (MEXU)	KU243877	KU243927	KU243977
SL041	<i>R. Torres C. 4968</i> (MEXU)	KU243878	KU243928	KU243978
SL045	<i>Rito Vega 2241</i> (MEXU)	KU243879	KU243929	KU243979
SL046	<i>Brigada Vázquez 1343</i> (MEXU)	KU243880	KU243930	KU243980
SL049	<i>A.J. Sharp 441728</i> (MEXU)	KU243882	KU243932	KU243982
SL-PT11084**	<i>P. Tenorio L. 11084</i> (TEX)	KF235677	KF235727	KF235623
SL-TT4602**	<i>R. Torres C. & P. Tenorio L. 4602</i> (TEX)	AF502054	FJ854220	FJ854105
<i>S. manantlanensis</i> B.L. Turner				
SM095	<i>Rogers McVaugh 10274</i> (MEXU)	KU243899	KU243949	KU243999
<i>S. nepetifolia</i> Cav.				
SNe128	<i>Rzedowski 38214</i> (MEXU)	KU243911	KU243961	KU244011
SNe-IDV44**	<i>IDV 44</i> (TEX)	KF235679	KF235729	KF235625
<i>S. pacifica</i> B.L. Turner				
SP050	<i>T.F. Daniel 4873</i> (MEXU)	KU243883	KU243933	KU243983
SP051	<i>Howard Scott Gentry 1144</i> (MEXU)	KU243884	KU243934	KU243984
SP052	<i>Mark Fishbein 2137</i> (MEXU)	KU243885	KU243935	KU243985
SP-GF2344**	<i>G. Flores 2344</i> (TEX)	KF235680	KF235730	KF235627
<i>S. rotundifolia</i> Moc. & Sessé ex Benth.				
SRO-DEB55575**	<i>D.E. Breedlove 55575</i> (TEX)	FJ854324	FJ854227	KF235632
<i>S. sylvatica</i> L.				
SSy-MBAT06011**	<i>M. Bendiksby & A. Tribsch 06-011</i> (O)	KF529843	KF529950	KF529756
<i>S. torresii</i> B.L. Turner				
ST-AMD2917**	<i>A. McDonald 2917</i> (TEX)	KF235687	KF235736	KF235635
<i>S. vulnerabilis</i> Rzed. & Calderón				
SVu131	<i>Hinton et al. 25333</i> (MEXU)	KU243914	KU243964	KU244014
<i>Antonia ovata</i> Pohl				

AOv**	*	AF102379	AF102379	AF004091
<i>Jasminum odoratissimum</i> L.				
JOd-EW130**	<i>E. Wallander 130</i> (GB)	AF231842	AF231842	AF225251
<i>Lantana camara</i> L.				
LCa-VY526**	<i>C. Vazquez Yanes 526</i> (GB)	AF231884	AF231884	AF225294
<i>Verbena officinalis</i> L.				
VOf-HK506**	<i>H. Kalheber 78-506</i> (GB)	AF231885	AF231885	AF225295

Toda la información y mediciones fueron tomadas directamente de los ejemplares de herbario seleccionados, excepto para *S. jaimehintonii* y *S. torresii*, de los cuales la información tuvo que ser tomada directamente de la literatura. Los caracteres multiestado se basaron en Moreno (1984) y fueron codificados como no ordenados; las mediciones de caracteres continuos fueron hechas usando flores maduras y estructuras foliares en la porción media del tallo.

Tabla 3. Listado de caracteres y estado de carácter utilizados en el análisis morfológico. B: caracteres binarios; M: caracteres multiestado; y C: caracteres continuos.

Carácter	Estados de carácter.
1. Alto de la planta, C:	(cm).
2. Indumento del tallo, M:	(1) glabro, (2) hirsutulosos, (3) hirteloso, (4) hirsuto, (5) setoso, (6) canescente, (7) pubescente, (8) tomentoso.
3. Pelos glandulares en el tallo, B:	(0) ausentes, (1) presentes.
4. Aguijones en el tallo, B:	(0) ausentes, (1) presentes.
5. Forma de la hoja, M:	(1) lanceolada, (2) ov lanceolada, (3) ovada, (4) triangular.
6. Margen de la hoja, M:	(1) crenado, (2) crenulodentado, (3) dentado, (4) denticulado.
7. Longitud de la hoja, C:	(cm).
8. Ancho de la hoja, C:	(cm).
9. Longitud del peciolo, C:	(cm).
10. Pelos glandulares en hoja, B:	(0) ausentes, (1) presentes.
11. Indumento del haz, M:	(1) glabro, (2) hirsutulosos, (3) hirteloso, (4) velutinoso, (5) pubescente.

12. Indumento del envés, M:	(1) glabro, (2) hirsutulosos, (3) hirteloso, (4) pubescente, (5) tomentoso.
13. Forma de la bráctea del 1er verticilo, M:	(1) lanceolada, (2) ov lanceolada, (3) ovada, (4) triangular.
14. Longitud de la bráctea del 1er verticilo, C:	(cm).
15. Ancho de la bráctea del 1er verticilo, C:	(cm).
16. Distancia del último nudo al 1er verticilo floral, C:	(cm).
17. Número de flores en el 1er verticilo floral, C.	--
18. Largo de la bracteola, C:	(mm).
19. Ancho de la bracteola, C:	(mm).
20. Color de la flor, M:	(1) rosa oscuro, (2) rosa, (3) rosa rojizo, (4) rojo, (5) rojo amarillento, (6) rojo anaranjado, (7) anaranjado, (8) salmón, (9) lavanda, (10) lila claro, (11) morado.
21. Longitud total de la flor, C:	(cm).
22. Longitud del pedicelo, C:	(mm).
23. Longitud total del cáliz con dientes y espinas, C:	(mm).
24. Longitud del diente del cáliz, C:	(mm).
25. Longitud de la espina, C:	(mm).
26. Ancho del cáliz, C:	(mm).
27. Longitud total de la corola, C:	(cm).
28. Longitud del tubo de la corola, C:	(cm).
29. Ancho del tubo de la corola, C:	(mm).
30. Longitud del labio superior, C:	(mm).
31. Longitud del labio inferior, C:	(mm).
32. Longitud del estambre superior, C:	(mm).
33. Longitud del estambre inferior, C:	(mm).
34. Ancho de la base del filamento del estambre, C:	(mm).
35. Pelos en el filamento del estambre, M:	(1) pocos, (2) regulares, (3) abundantes, (4) muy abundantes.
36. Longitud de la antera, C:	(mm).
37. Longitud del estilo, C:	(cm).

38. Ancho del estilo en su base, C:	(mm).
39. Altura de la base del corola al annulus, C:	(mm).
40. Longitud de la nucela inmadura, C:	(mm).
41. Ancho de la nucela inmadura, C:	(mm).
42. Cerdas en los lóculos del ovario o nucelas, B:	(0) ausentes, (1) presentes.
43. Propagación clonal, CM:	(0) ausente, (1) estolón, (2) rizomas.

La información obtenida fue vaciada en una matriz de datos (Anexo C) generada con el programa Excel de Office (Microsoft, 2007), de donde fue exportada para su uso por los programas de análisis numérico y análisis filogenético. A partir de ésta matriz se generó una segunda matriz donde los valores fueron estandarizados (X-min/rango) para su uso tanto en los análisis morfométricos como en los filogenéticos

Obtención de ADN, amplificación y secuenciación.

El ADN fue extraído de las muestras foliares colectadas utilizando un protocolo CTAB (basado en Doyle & Doyle, 1987, descrito paso a paso en el Anexo D).

Se seleccionaron tres regiones de cloroplasto: el intrón *trnL*, el espaciador intergénico *trnL-F* y el intrón *rps16*, y se utilizaron los cebadores universales de las mismas; sin embargo, para algunas muestras fue necesario incluir un cebador adicional a la región *rps16* (Tabla 4). Los cebadores fueron resuspendidos en TE8 pH8 y utilizados en una concentración 10 µm.

Para la amplificación de las regiones se utilizó el kit de PCR REDTaq Ready Mix (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri): 17 µl de H₂O, 25 µl de mezcla de reacción REDTaq, 4 µl de mezcla de cebadores (1:1) y 4 µl de ADN, para obtener un volumen final de 50 µl; el programa de configuración del termociclador utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial de 2 min a 94°C, 35 ciclos de desnaturalización de 50 seg a 94°C, anillamiento de 50 seg a 50°C y extensión de 1 min a 72°C, y extensión final de 10 min @ 72°C, en un termociclador Techne TC-412 (Bibby Scientific, Vernon Hills, Illinois). Si la primera amplificación no daba resultados, se realizaban reamplificaciones, donde se utilizaban los productos previos de PCR sin purificar como moldes. Los productos de las

amplificaciones fueron limpiados con el kit de purificación QIAquick (QIAGEN, Valencia, California), posteriormente fueron enviados a secuenciar.

Tabla 4. Listado de cebadores que se utilizaron en los procesos de amplificación de secuencias. Se manejan por pares Forward y Reverse, con sus respectivos autores de referencia.

Taberlett <i>et al.</i> , 1991.	<i>trnL</i> foward (5'- CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG -3')
	<i>trnL</i> reverse (5'- GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC -3')
	<i>trnLF</i> foward (5'- GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC -3')
	<i>trnLF</i> reverse (5'- ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG -3')
Oxelman <i>et al.</i> , 1997.	<i>rps16</i> foward (5'- GTG GTA GAA AGC AAC GEG CGA CTT -3')
	<i>rps16</i> reverse (5'- TCG GGA TCG AAC ATC AAT TGC AAC -3')
Scheen <i>et al.</i> , 2010.	<i>rpsLR</i> (5'- TCA TTG GGT TTA GAC ATT ACT TCG -3')
	<i>rpsLF</i> (5'- CGG GAA TCG ACT GTC CAT AG -3')

La secuenciación de las regiones fue realizada en las instalaciones de LANGEBIO-CINVESTAV Irapuato, utilizando el método Dideoxi Terminal de Sanger (Sanger et al., 1977) con un analizador de DNA 3730x1 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts).

Las secuencias obtenidas fueron ensambladas utilizando el programa de ensamblaje CAP Contig (Huang, 1991) proporcionado por BioEdit (Hall, 1999), con la configuración preestablecida de la aplicación. Las secuencias ensambladas fueron guardadas en formato fasta (.fas) con los datos correspondientes a su ejemplar de origen y la región correspondiente.

Análisis numéricos de los datos morfológicos.

Para el análisis numérico de los datos morfológicos se utilizó el programa NTSYSpc versión 2.11T (Rohlf, 1998), y se ejecutaron los Análisis de Conglomerados (de tipo UPGMA y Single Linkage utilizando la distancia taxonómica promedio), los Análisis de Componentes Principales (PCoA), Coordenadas Principales (PCO) y Escalamiento Multidimensional (MDS). Los procedimientos de los análisis realizados están descritos a detalle en el Anexo E.

Análisis filogenético de los datos morfológicos.

La matriz de datos morfológicos fue importado al programa FastMorphology GFC (Chang & Smith, 2001), donde los caracteres fueron codificados en frecuencia de caracteres a través del algoritmo de Codificación de Frecuencias Generalizadas (GFC por sus siglas en inglés) de Smith y Gutberlet (2001).

Se realizaron análisis de Máxima Parsimonia utilizando el programa PAUP* v. 4.0b10 para Macintosh (Swofford, 2000). Los caracteres fueron tratados y pesados de acuerdo a Smith y Gutberlet (2001), los gaps fueron tratados como datos faltantes o perdidos, la búsqueda heurística comenzó con un árbol obtenido por adición stepwise con adición aleatoria de secuencias, un intercambio de ramas de tipo TBR donde se probaron 1 millón de reacomodos, y se estableció 1 millón de árboles como tope máximo (MAXTREES); sobre los árboles obtenidos se realizó un análisis de soporte de Bootstrap (Felsenstein, 1985) donde se utilizó una búsqueda rápida con adición stepwise y 10 mil replicas.

Análisis filogenético de los datos moleculares.

Para el análisis filogenético de los datos moleculares, se seleccionaron diversas secuencias del GenBank, pertenecientes a especies tanto del complejo como a grupo externo. El listado completo de las secuencias utilizadas se encuentra citado en la Tabla 2.

Tanto las secuencias obtenidas en laboratorio de cada región así como las secuencias obtenidas de GenBank fueron alineadas utilizando el programa BioEdit (Hall, 1999). Se realizó un alineamiento automático inicial con la herramienta de alineamiento multiple ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), y sobre el alineamiento obtenido se realizaron ajustes manuales. De este modo se generaron 4 alineamientos diferentes: el primero correspondiente al intrón *trnL*, el segundo al espaciador intergénico *trnL-F*, el tercero al intrón *rps16* y el último, un alineamiento con las 3 regiones concatenadas en el orden *rps16-trnLF-trnL*.

A todas y cada una de las matrices alineadas se les aplicaron análisis filogenéticos de: Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana. Además, se realizaron análisis de redes de haplotipos y estimación de tiempo de divergencia.

Análisis de Máxima Parsimonia.

El análisis de Máxima Parsimonia se realizó utilizando el programa PAUP* v. 4.0b10 para Macintosh (Swofford, 2000). Los caracteres fueron desordenados y pesados equitativamente, los gaps fueron tratados como datos faltantes o perdidos, la búsqueda heurística comenzó con un árbol obtenido por adición stepwise con adición aleatoria de secuencias, un intercambio de ramas de tipo TBR donde se probaron 1 millón de reacomodos, y se estableció 1 millón de árboles como tope máximo (MAXTREES); sobre los árboles obtenidos se realizó un análisis de soporte de Bootstrap (Felsenstein, 1985) donde se utilizó una búsqueda rápida con adición stepwise y 10 mil replicas.

Selección del modelo de sustitución de nucleótidos.

Previo a los análisis de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana, se seleccionó el modelo de sustitución de nucleótidos que mejor se ajustaba a cada conjunto de datos, excepto para la matriz de datos concatenada.

Se recurrió al software jModelTest 2 (Darriba *et al.*, 2012) proporcionado por la plataforma en línea CIPRES (Miller *et al.*, 2010), utilizando el criterio de información Akaike (AIC) y dejando el resto de los parámetros en default.

Análisis de Máxima Verosimilitud.

Se recurrió al software RAxML-HPC BlackBox proporcionado por la plataforma en línea CIPRES (Miller *et al.*, 2010), y los parámetros se dejaron configurados en default.

Inferencia Bayesiana.

En análisis de Inferencia Bayesiana fue realizado utilizando el software MrBayes v. 3.2.5 (Ronquist *et al.*, 2012) proporcionado por la plataforma en línea CIPRES (Miller *et al.*, 2010).

Iniciando de diferentes árboles aleatorios, se condujeron cuatro cadenas de Markov con 5 millones de generaciones con muestreo cada 2500 generaciones, dado que los modelos de sustitución de nucleótidos no era posible seleccionarlos en la configuración del programa, se indicó que considerara un modelo basado en 6 tipos de sustituciones, considerando las tasas de variaciones entre sitios (invgamma). El 25% de los árboles fueron quemados (burnin) una vez que se alcanzó la estabilidad de la desviación estándar de las búsquedas simultaneas por debajo de 0.01. Los árboles restantes fueron resumidos en un árbol de consenso del 50% con sus probabilidades posteriores.

Redes de Haplotipos.

El análisis de redes de haplotipos de cada región fue realizado con el software TCS v. 1.21 (Clement *et al.*, 2000); el límite de conexión fue establecido en 95% y los gaps fueron codificados como un quinto estado.

Estimación del Tiempo de Divergencia.

Para la estimación del tiempo de divergencia se utilizó el software MEGA v 6.06 (Tamura *et al.*, 2013).

A partir de la matriz concatenada, se obtuvo un árbol de máxima verosimilitud utilizando un modelo GTR con distribución gamma y sitios invariables, con 4 categorías gamma discretas y un filtro moderado de cambio de ramas, y dejando el resto de la configuración sin modificaciones.

La estimación del tiempo de divergencia se obtuvo utilizando la herramienta Compute TimeTree (RelTime-ML) de MEGA, utilizando un fósil de *Stachys laticarpa* (fruto/semilla) de entre 11.6 y 13.8 millones de años como punto de calibración (Mai, 2001; Roy *et al.*, 2013).

RESULTADOS

Resultados de los análisis numéricos de datos morfológicos.

Análisis de conglomerados.

Los análisis de conglomerados aplicados, UPGMA y Single Linkage (Vecino más cercano) mostraron valores de r similares: 0.901 y 0.867 respectivamente; sin embargo, los patrones de formación de grupos variaron entre ambos análisis mostrando agrupamientos diferentes.

El fenograma obtenido con análisis de conglomerados UPGMA (Figura 2A) con un valor r de 0.901, mostró de inicio que las distancias taxonómicas entre las distintas especies es muy corta, pues la mayor parte de la ramificación del fenograma se realizó entre una distancia de 0.64 y 1.48. Es en este rango donde se pudieron observar los 5 principales agrupamientos: el primer agrupamiento observado (A) está conformado básicamente por las especies propias del complejo, aunque incluyó a dos de las especies utilizadas como grupo externo (*S. boraginoides* y *S. bigelovii*); el siguiente agrupamiento observado (B1) está conformado por los tres ejemplares de *S. pacifica* y un ejemplar de *S. lindenii*; el tercer agrupamiento observado (B2) está conformado por ejemplares de *S. lindenii* y un ejemplar de *S. coccinea*; el cuarto agrupamiento observado (C) es el de mayor tamaño, pues engloba a la mayor parte de los ejemplares utilizados, quedando dentro de éste ejemplares de *S. coccinea* y *S. manantlanensis* con algunos ejemplares de *S. lindenii*; y finalmente el quinto agrupamiento (D), conformado por los ejemplares de *S. albotomentosa* y un ejemplar de *S. coccinea*. *S. torresii* y *S. jaimehintonii* quedaron incluidos dentro del agrupamiento A de las especies del complejo, sin embargo y muy probablemente no pudieron incluirse en ningún otro grupo debido a que faltaron más datos morfológicos (recordemos que fueron tomados de la bibliografía).

En el fenograma obtenido con el análisis de conglomerados Single Linkage o Vecino más cercano (Figura 2B), se tiene un valor de r de 0.867, y se observó que las distancias taxonómicas a las que se dan las principales ramificaciones del fenograma se reducen, pues van de 0.64 a 1.33. Se pudo observar en este caso solamente tres agrupamientos principales: el primer agrupamiento (A) está conformado por las especies propias del complejo, y nuevamente incluye a *S. boraginoides* y *S. bigelovii*, aunque en este

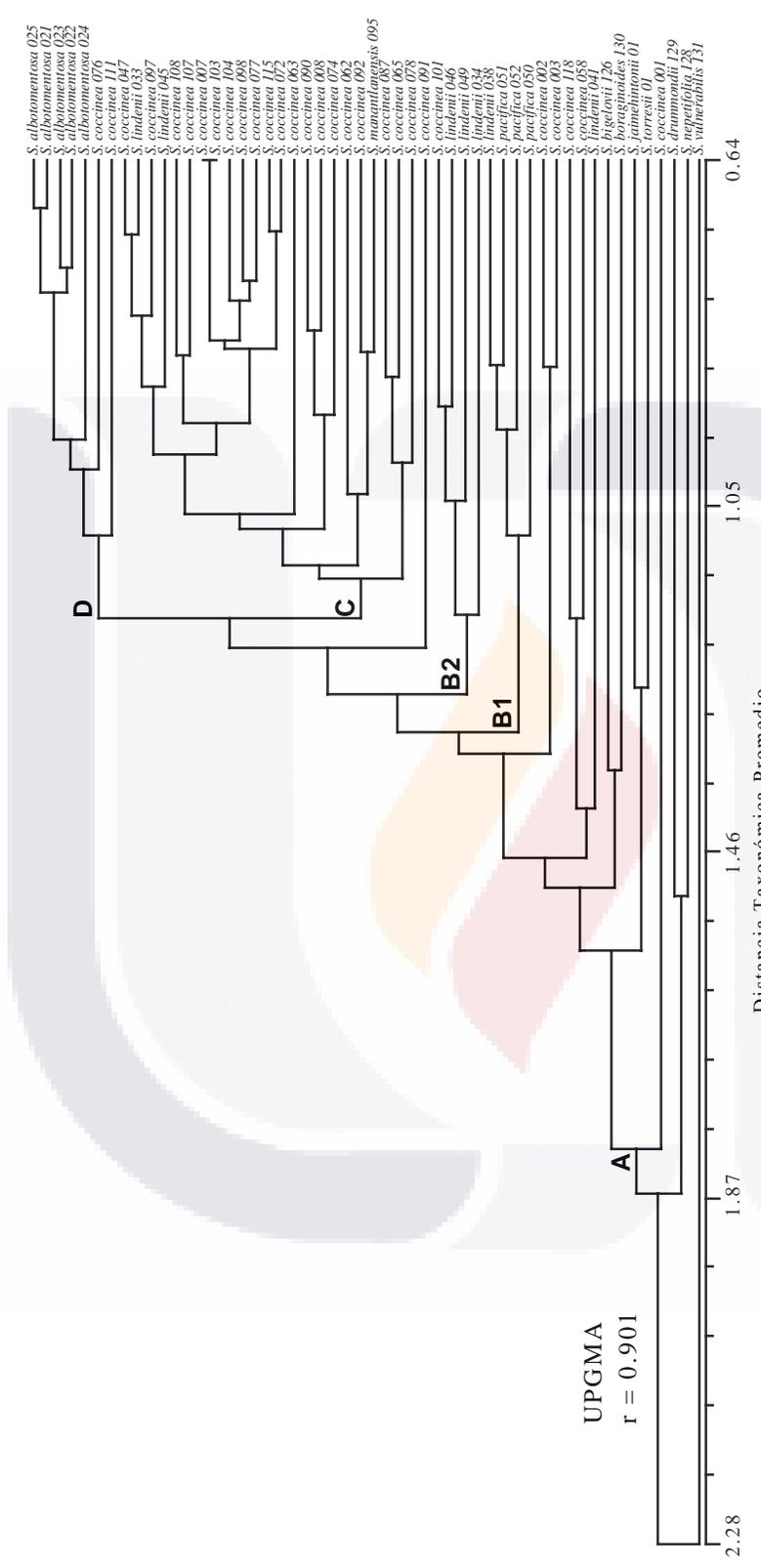


Figura 2A. Análisis de Conglomerados: UPGMA. Fenograma obtenido a partir de la distancia promedio con el método de UPGMA; se observó la formación de 5 agrupamientos principales: A) conformado por especies propias del complejo *Stachys coccinea*; B1 y B2) conformado por ejemplares de *S. lindemii*, *S. pacifica* y *S. coccinea*; C) conformado por la mayor parte de los ejemplares de *S. coccinea* junto con *S. coccinea* y *S. lindemii*; y D) conformado por *S. albotomentosa* y *S. coccinea*. *S. torresii* y *S. jaimehintonii* quedaron fuera del grupo principal. Valor $r=0.901$.

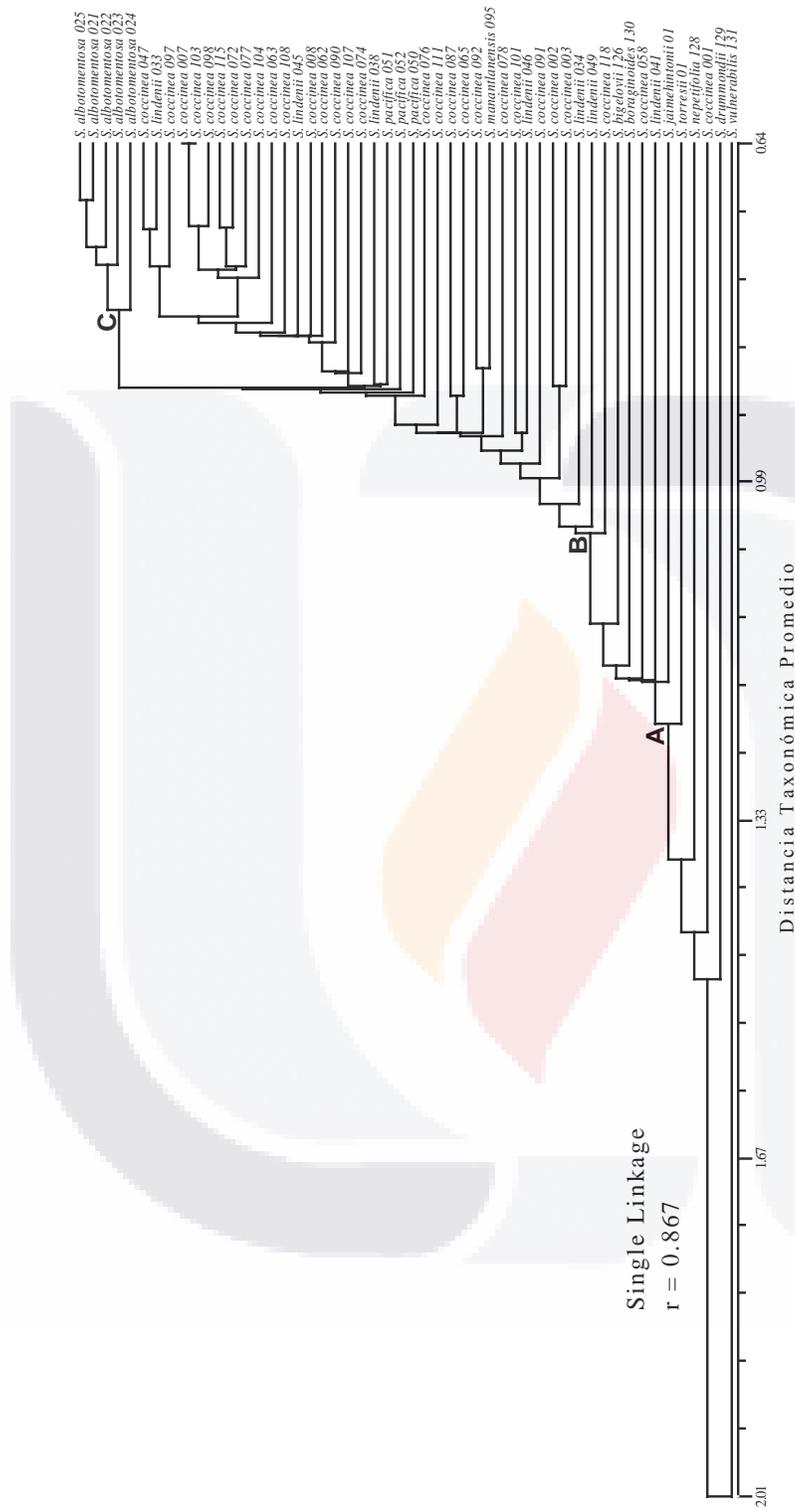


Figura 2B. Análisis de Conglomerados: Single Linkage. Fenograma obtenido a partir de la distancia promedio con el método de Single Linkage; se observó la formación de 3 agrupamientos: A) conformado por las especies propias del complejo *Stachys coccinea*, B) conformado por la mayoría de los ejemplares de *S. coccinea* junto con los ejemplares de *S. jaimehintonii*, *S. lindeni*, *S. manatlanensis*, *S. pacifica* y *S. torresii*; y C) conformado por los ejemplares de *S. albotomentosa* exclusivamente. Valor $r=0.867$.

caso una *S. coccinea* queda excluida del agrupamiento principal; el segundo agrupamiento (B) es un agrupamiento con un patrón de ramificación muy complejo de definir pues las distancias a las que se dan las ramificaciones son muy cortas, sin embargo, este agrupamiento incluyó a todos los ejemplares de *S. coccinea* (exceptuando el mencionado para el agrupamiento A, otro ejemplar de *S. coccinea* junto con los ejemplares de *S. torresii*, *S. jaimehintonii* y un ejemplar de *S. lindenii*), a los ejemplares de *S. lindenii* (excepto uno) a los ejemplares de *S. pacifica* y *S. manantlanensis*, y al conglomerado (C), conformado por los ejemplares de *S. albotomentosa* exclusivamente.

Análisis de Componentes Principales (PCoA).

En los análisis de Componentes Principales (PCoA) los primeros 3 componentes explicaron solamente el 34.8% de la variación observada, y no es sino hasta el 6to componente que se explicó más del 50% de la variación (53.49%). El primer componente explicó un 16.02% de la variación y estuvo definido por los caracteres: ancho del tubo de la corola, y las longitudes del pedicelo, labio superior, estambre superior y estambre inferior; el segundo componente explicó un 10.56% de la variación y estuvo definido por los caracteres: anchos de hoja y bráctea, y las longitudes de la hoja, peciolo y bráctea; el tercer componente explicó el 7.83% de la variación y estuvo definido por los caracteres: margen de la hoja, anchos de la bracteola y de la nucela inmadura, y por la longitud de la bracteola y del estilo.

Al graficar el primer componente contra el segundo componente (Figura 3A), donde los valores positivos indican estructuras de mayor tamaño y los valores negativos estructuras de menor tamaño, se hicieron las siguientes observaciones: el primer componente permitió la formación de dos grupos, uno de gran tamaño (ACD) que incluyó a la mayoría de las especies pertenecientes al complejo y otro de pequeño tamaño (B) que incluyó a algunos ejemplares de *S. coccinea* y *S. lindenii*. El segundo componente permitió la separación de tres grupos principales: un grupo conformado (A) por ejemplares de *S. coccinea*, *S. pacifica*, *S. lindenii* y *S. jaimehintonii*; un grupo (C) conformado por ejemplares de *S. coccinea*, *S. lindenii*, *S. torresii* y *S. manantlanensis*; y un pequeño grupo bien definido y separado del resto (D), conformado por los ejemplares de *S. albotomentosa* y un ejemplar de *S. coccinea*. Al graficar el segundo componente contra el tercer componente (Figura 3B) nuevamente los valores positivos de la gráfica indican estructuras

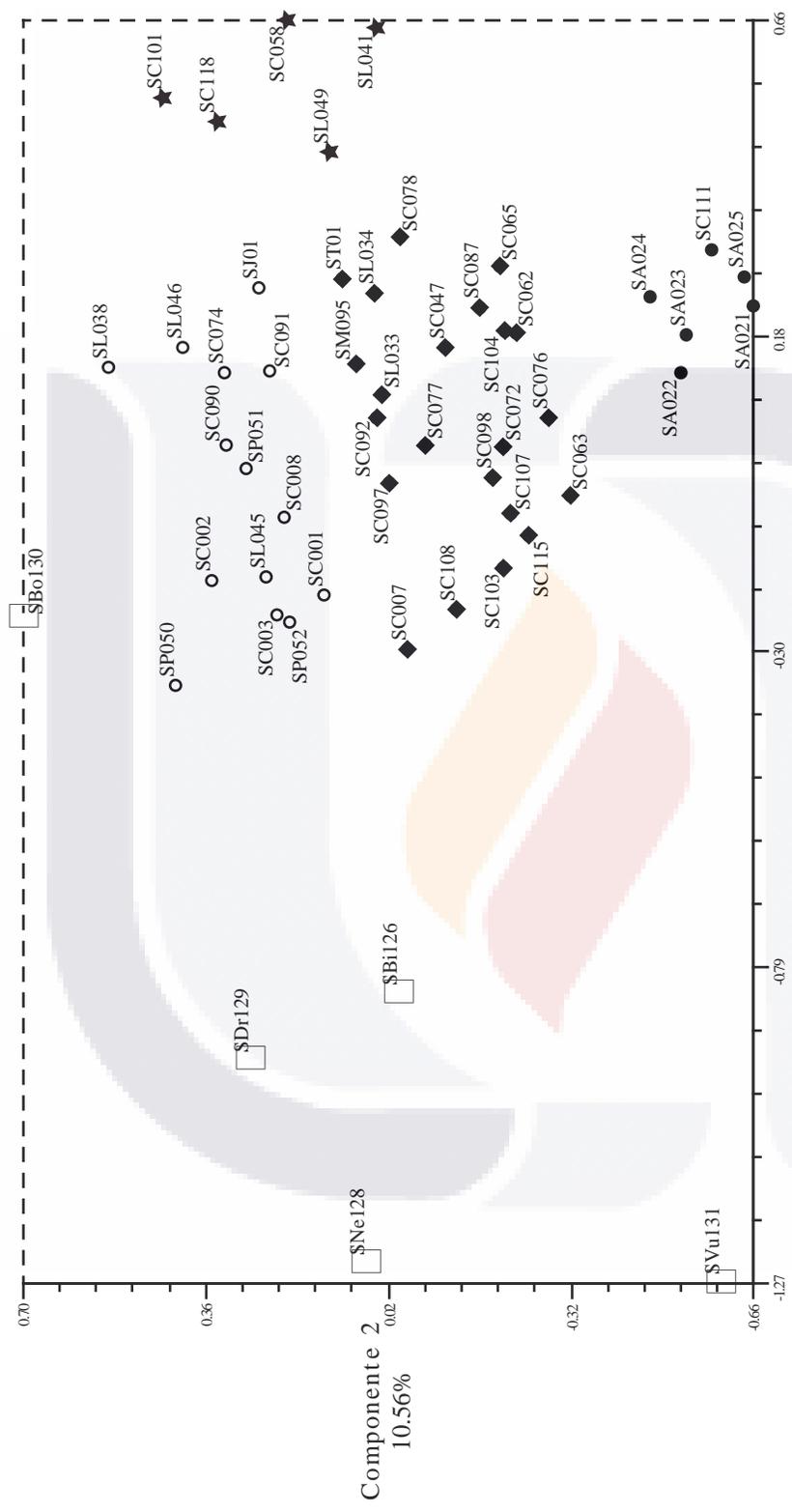


Figura 3A. Análisis de Componentes Principales. Gráfica del 1er componente (10.56%) contra 2do componente (16.02%); se identifican los siguientes grupos: A) (○) conformado por *S. coccinea*, *S. jaimehintonii*, *S. lindenii* y *S. pacifica*; B) (★) conformado por *S. coccinea* y *S. lindenii*; C) (◆) conformado por *S. coccinea*, *S. lindenii*, *S. manatlanensis* y *S. torresii*; y D) (●) conformado por *S. albotomentosa* y un ejemplar de *S. coccinea*.

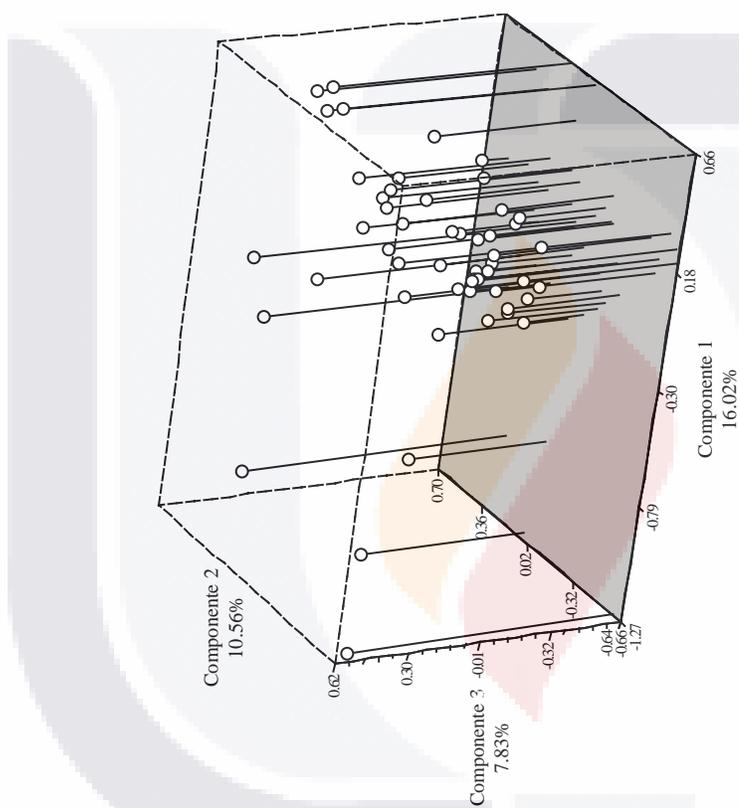


Figura 3C. Análisis de Componentes Principales. Gráfica de los tres primeros componentes, donde al combinar el 1er componente (16.02%) con el 2do componente (10.56%) y 3er componente (7.83%), se identificó la formación de una gran nube de especímenes pertenecientes al complejo *Stachys coccinea* entremezclados, sin embargo no se observó la formación de ningún grupo particular dentro de esa nube. Nuevamente se recalca que es hasta el 6to componente que se logra explicar más del 50% de la variación (53.49%).

de mayor tamaño y los valores negativos indican estructuras de menor tamaño; los agrupamientos que se observaron cambiaron: (A) un grupo bastante grande y definido conformado por varios ejemplares de *S. coccinea*, *S. lindonii*, *S. manantlanensis* y *S. torresii*; (B) un pequeño agrupamiento conformado por ejemplares de *S. lindonii* y *S. pacifica*; (C) un agrupamiento obtenido es muy pequeño y está conformado por ejemplares de *S. coccinea*; y finalmente se observó (D) un agrupamiento pequeño y compacto conformado por los ejemplares de *S. albotomentosa* y un ejemplar de *S. coccinea*. Al graficar los tres primeros componentes en conjunto, se obtuvo una densa nube de ejemplares que sigue la forma de agrupamiento dada por el primer componente sin embargo no fue posible distinguir ningún agrupamiento en particular (Figura 3C).

Análisis de Coordenadas Principales (PCO).

En el análisis de Coordenadas Principales (PCO) las tres primeras coordenadas explicaron un 34.5% de la variación para las especies y un 36.27% de la variación para los caracteres, y en ambos casos es hasta la 6ta coordenada que se explicó más del 50% de la variación (54.05% para las especies y 54.81% para los caracteres). La primera coordenada explicó el 15.79% de variación para las especies y el 15.36% de la variación para los caracteres; la segunda coordenada explicó el 10.67% de la variación para las especies y el 11.65% de variación para los caracteres; y la tercera coordenada explicó el 8.02% de variación para las especies y el 9.24% de la variación para los caracteres.

Al graficar la primera coordenada contra la segunda coordenada se observaron los mismos agrupamientos obtenidos en el análisis de Componentes Principales, con la salvedad de que estaban en imagen reflejada (Figura 4). Se observó que es complejo definir cuales caracteres son los responsables de cada agrupamiento, excepto para el agrupamiento conformado por *S. albotomentosa*, cuyos caracteres responsables son el alto de la planta, la longitud y ancho de las hojas, y el largo y ancho de las brácteas, que en general corresponden a estructuras de menor tamaño.

Escalamiento multidimensional.

El análisis de escalamiento multidimensional presentó un valor de estrés final de 0.20, y mostró los mismos agrupamientos observados tanto en PCoA como en PCO, aunque en agrupamientos más compactos.

También se observó que a pesar de que *S. albotomentosa* logró separarse en un pequeño grupo independiente, siguió estando muy cercana al resto de las especies del complejo.

Resultados de los análisis filogenéticos de datos morfológicos.

Al aplicar el análisis de parsimonia a la matriz de datos morfológicos, se presentó que la matriz constaba de 5,931 caracteres de los cuales: 2,264 fueron constantes, 1,015 fueron variables no informativos y 2,652 fueron parsimoniosamente informativos.

El árbol resultante (Figura 5) presentó 15,889 pasos con un CI de 0.23 y un RI de 0.769; los valores de soporte de bootstrap variaron entre 51 y 89%. Se observa la formación de un clado muy ramificado en los nodos basales que incluye únicamente a las especies pertenecientes al complejo; a su interior se identifican tres clados: el primero (A) que incluye a todas los ejemplares de *S. albotomentosa* en un clado con algunos ejemplares de *S. coccinea*; el segundo (B) que incluye a varios ejemplares de *S. coccinea*, todos los ejemplares de *S. lindenbergii*, a los ejemplares de *S. pacifica* formando un grupo bien definido (estrechamente relacionados con *S. lindenbergii*), a *S. torresii*, *S. jaimehintonii* y *S. manantlanensis* dispersos entre los ejemplares de *S. coccinea*; y el tercer clado (C) está constituido exclusivamente por ejemplares de *S. coccinea*.

Resultados de los análisis filogenéticos de datos moleculares.

Los resultados de los análisis filogenéticos aplicados a datos moleculares se presentan por tipo de análisis y por región utilizada, además de que se presentan también los resultados de la matriz concatenada.

Las matriz alineada del intrón *trnL* tuvo una longitud de 522 pares de bases, la matriz de la espaciador intergénico *trnL-F* tuvo una longitud de 390 pares de bases, la matriz del intrón *rps16* tuvo una longitud de 880 pares de bases, mientras que la matriz alineada de las tres regiones concatenadas tuvo una longitud de 1,792 pares de bases.

Análisis de Máxima Parsimonia.

a) **Intrón *trnL*.** De los 522 caracteres de la matriz alineada: 289 fueron constantes, 124 fueron parsimoniosamente no informativos y 109 caracteres fueron parsimoniosamente informativos.

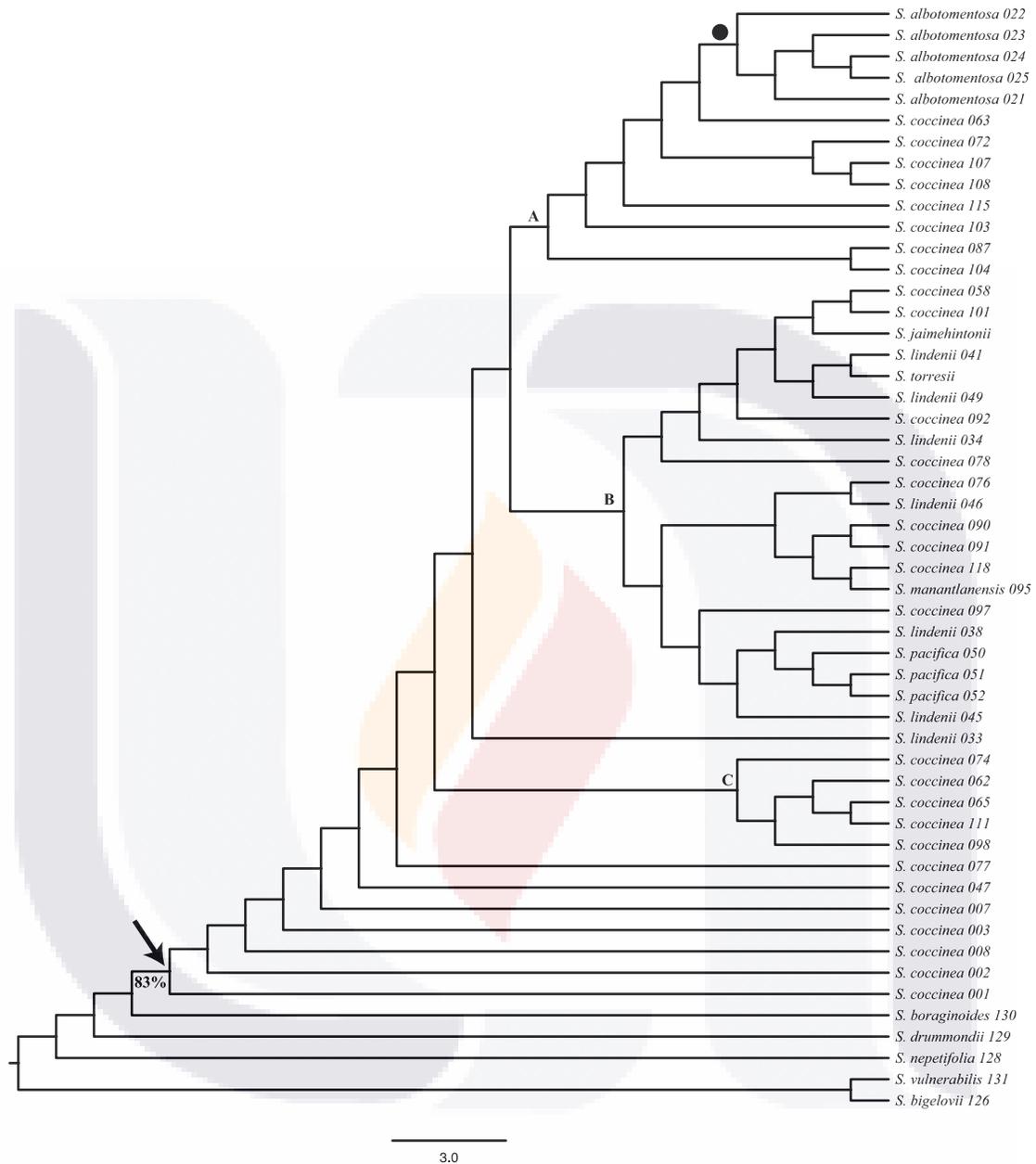


Figura 5. Análisis de Máxima Parsimonia de los Datos Morfológicos. Se identifica con una flecha el clado formado por los ejemplares pertenecientes al complejo *Stachys coccinea*; hacia el interior de éste clado solamente se identifican la formación de 3 clados, del que sobresale el de *S. albotomentosa* (●) al interior del clado A. Los números debajo las ramas indican el soporte bootstrap, solo se muestran aquellos valores superiores al 80%.

Los resultados de la búsqueda heurística arrojaron 125,476 árboles más parsimoniosos con una longitud de 450 pasos, el índice de consistencia fue de 0.744 y el de retención fue de 0.689, mientras que el índice de homoplasia fue de 0.256. En cuanto al soporte bootstrap, la mayoría de las ramas mostraron un soporte menor al 90% (59-90%), incluyendo en la rama del clado *Stachys* (89%).

Hacia el interior del clado *Stachys* todas las especies están intercaladas, tanto las especies propias del complejo como las utilizadas como grupo externo por lo que no hay un clado específico para el complejo *S. coccinea* (Figura 6A). Se logró formar un clado que agrupa a la mayor parte de los especies del complejo, el núcleo SCC (A), y dentro de este núcleo se incluyeron algunas especies propias del grupo externo (*S. boraginoides*, *S. eriantha* y *S. nepetifolia*). Algunos otros especímenes de especies del complejo quedaron fuera de este núcleo, particularmente especímenes de *S. lindenii*.

b) Espaciador intergénico *trnL-F*. De los 390 caracteres de la matriz alineada: 198 fueron constantes, 128 fueron parsimoniosamente no informativos y 64 caracteres fueron parsimoniosamente informativos.

Los resultados de la búsqueda heurística arrojaron 166,097 árboles más parsimoniosos con una longitud de 273 pasos, el índice de consistencia fue de 0.868 y el de retención fue de 0.768, mientras que el índice de homoplasia fue de 0.132. El soporte bootstrap para todo el grupo de interés fue menor al 90%, incluyendo a la rama del clado *Stachys* (79%).

Hacia el interior del clado *Stachys*, a pesar de que las especies están intercaladas, se observó la formación de 3 clados (Figura 6B): un primer clado (A) basal conformado básicamente por especímenes de *S. lindenii* y *S. herrerae*; un segundo clado (B) conformado por en su mayoría por especímenes de *S. coccinea* junto con ejemplares de *S. albotomentosa*, *S. lindenii* y *S. pacifica* y algunos especímenes del grupo externo (*S. bigelovii*, *S. chamissonis* y *S. rotundifolia*); un tercer clado (C) conformado por *S. coccinea* y ejemplares de *S. pacifica*, un ejemplar de *S. albotomentosa* y un espécimen de grupo externo (*S. vulnerabilis*); y un cuarto clado (D), que incluyó a especímenes tanto de *S. coccinea*, como de *S. albotomentosa*, *S. lindenii*, y *S. manantlanensis*, además de varios especímenes propios del grupo externo (*S. agraria*, *S. boraginoides*, *S. eriantha*, *S. drummondii*, *S. lamioides*, *S. langmaniae* y *S. nepetifolia*).

c) Intrón rps16. De los 880 caracteres de la matriz alineada: 535 fueron constantes, 205 fueron parsimoniosamente no informativos y 140 caracteres fueron parsimoniosamente informativos.

Los resultados de la búsqueda heurística arrojaron 32,107 árboles más parsimoniosos con una longitud de 479 pasos, el índice de consistencia fue de 0.855 y el de retención fue de 0.851, mientras que el índice de homoplasia fue de 0.144. El soporte bootstrap en general fue bajo, con valores de soporte entre 54-87%, sin embargo hubo clados que presentaron soporte superior al 90%, del que destaca el clado conformado por los especímenes de *Stachys* (100%).

Dentro del clado de *Stachys* se observó la formación de tres clados (Figura 6C): un primer clado (A), con buenos soportes bootstrap conformado por especímenes de *S. albotomentosa*, *S. coccinea* y *S. pacifica*, y un espécimen de grupo externo (*S. vulnerabilis*); un segundo clado (B) conformado también por ejemplares del complejo como *S. albotomentosa*, *S. coccinea*, *S. lindenii*, *S. manantlanensis* y *S. pacifica*, además de varios especímenes de grupo externo (*S. bigelovii*, *S. boraginoides*, *S. drummondii*, *S. herrerae*, *S. langmaniae* y *S. rotundifolia*); y finalmente un tercer clado (C) conformado por especímenes del complejo como *S. albotomentosa*, *S. coccinea* y *S. lindenii*, además de especímenes del grupo externo (*S. agraria*, *S. eriantha*, *S. lamioides* y *S. nepetifolia*).

d) Matriz concatenada. De los 1792 caracteres de la matriz alineada: 1024 fueron constantes, 453 fueron parsimoniosamente no informativos y 315 caracteres fueron parsimoniosamente informativos.

Los resultados de la búsqueda heurística arrojaron 11,571 árboles más parsimoniosos con una longitud de 1,259 pasos, el índice de consistencia fue de 0.779 y el de retención fue de 0.720, mientras que el índice de homoplasia fue de 0.221. El soporte bootstrap tuvo valores entre 53-100%, donde el clado conformado por las especies de *Stachys* tuvo un soporte del 100%.

Dentro del clado *Stachys* se observó la formación de cuatro clados (Figura 6D): un primer clado (A) en los nodos basales, que presenta a varios especímenes de *S. lindenii* junto con *S. sylvatica* y *S. bullata*, del grupo externo; un segundo clado (B) conformado por especímenes de *S. coccinea* con *S. albotomentosa*, *S. manantlanensis* y *S. pacifica*, además de tres especímenes del grupo externo (*S. bigelovii*, *S. drummondii* y *S. vulnerabilis*); un

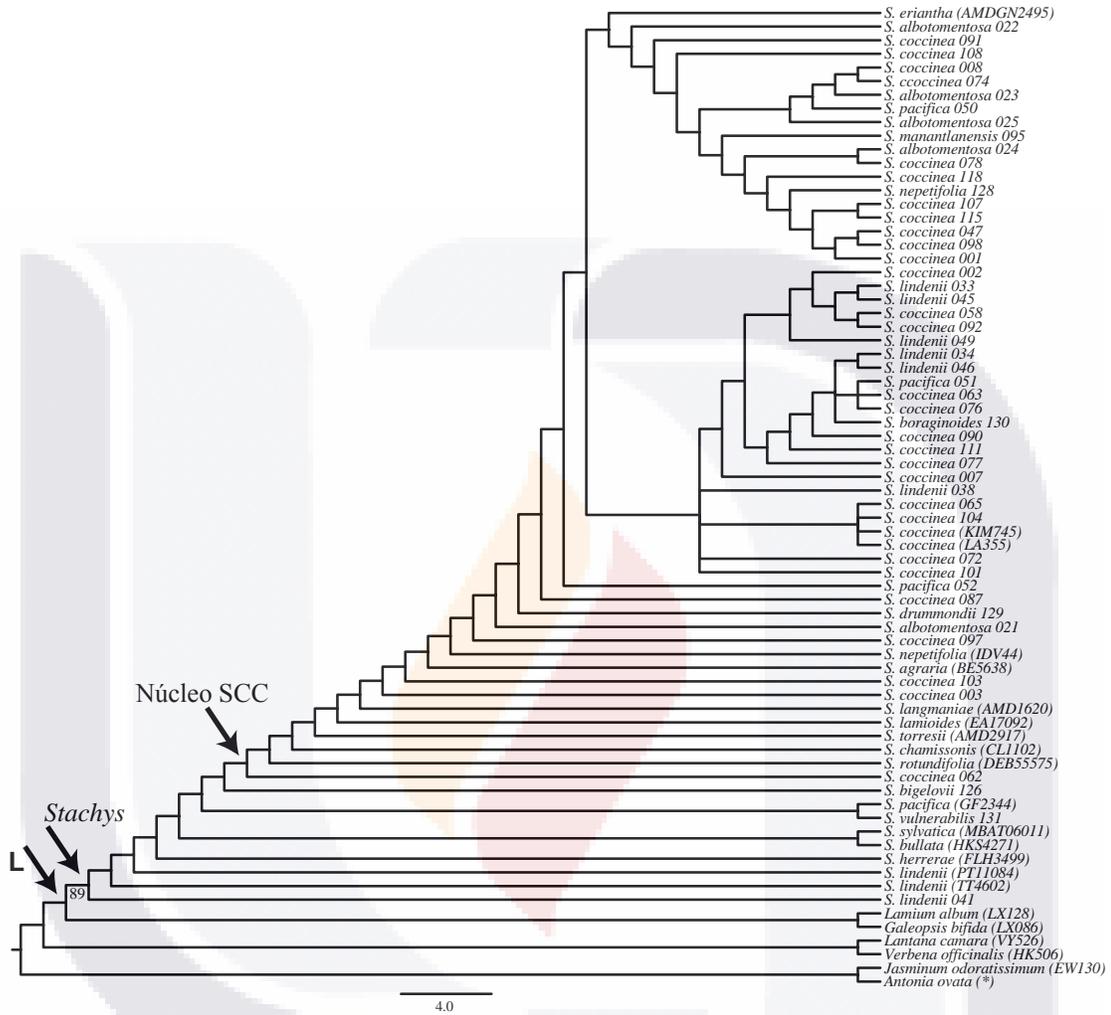


Figura 6A. Análisis de Máxima Parsimonia del intrón *trnL*. Las puntas de flecha señalan ramas para Lamiaceae (L), el género *Stachys* y para el clado que abarca a la mayor parte de los especímenes pertenecientes al complejo *Stachys coccinea* (Núcleo SCC). Los números debajo las ramas indican el soporte bootstrap, solo se muestran aquellos valores superiores al 80%.

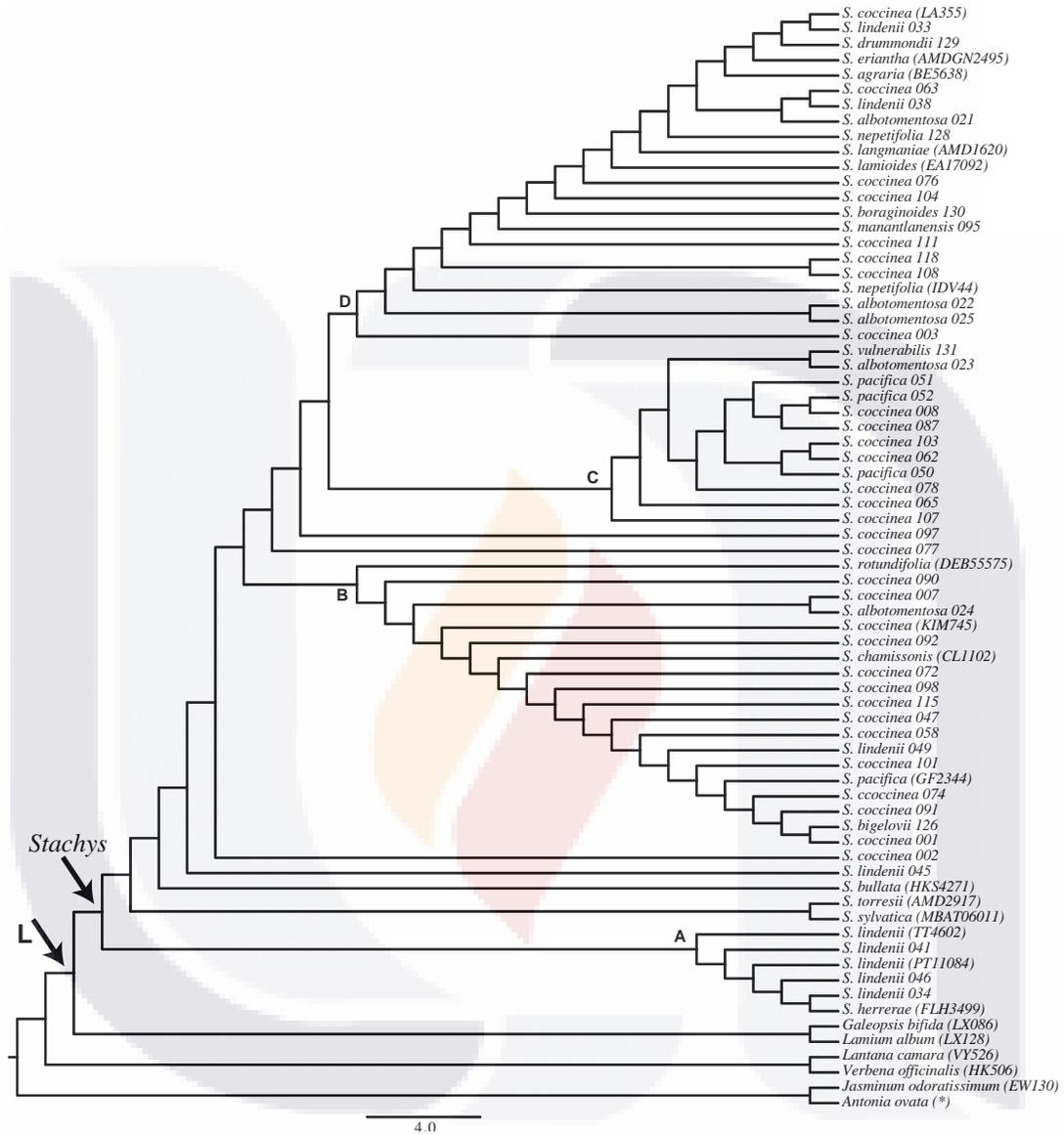


Figura 6B. Análisis de Máxima Parsimonia del espaciador intergénico *trnL-F*. Las puntas de flecha señalan ramas para Lamiaceae (L) y el género *Stachys*; y hacia el interior de *Stachys* se identifican 4 clados, todos incluyen especímenes propios del grupo externo. No se muestran valores bootstrap pues todos son menores a 80%.

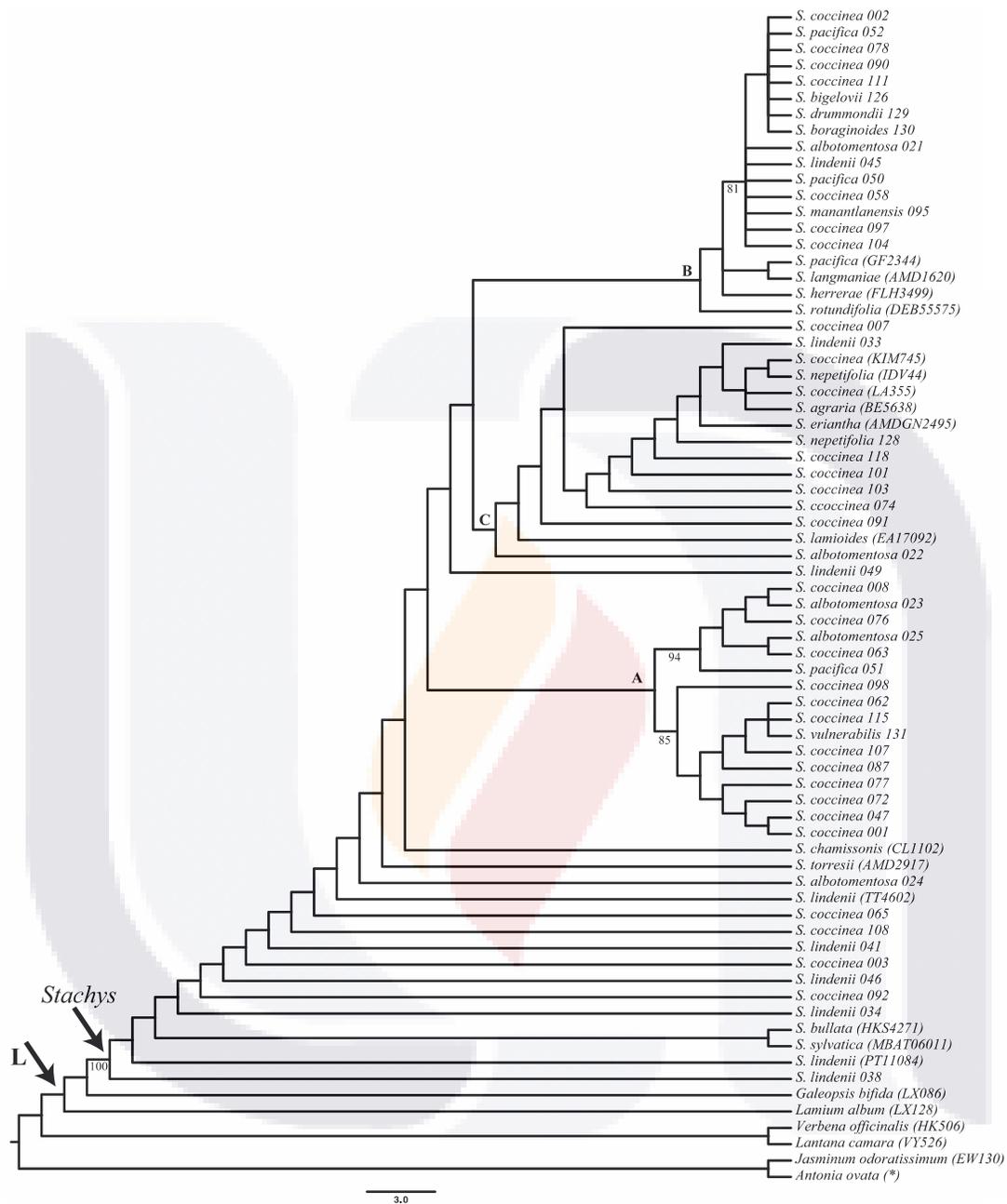


Figura 6C. Análisis de Máxima Parsimonia del intrón *rps16*. Las puntas de flecha señalan ramas para Lamiaceae (L) y el género *Stachys*; y hacia el interior de *Stachys* se identifican 3 clados, con especímenes del grupo externo entremezclados. Los números debajo las ramas indican el soporte bootstrap, solo se muestran aquellos valores superiores al 80%.

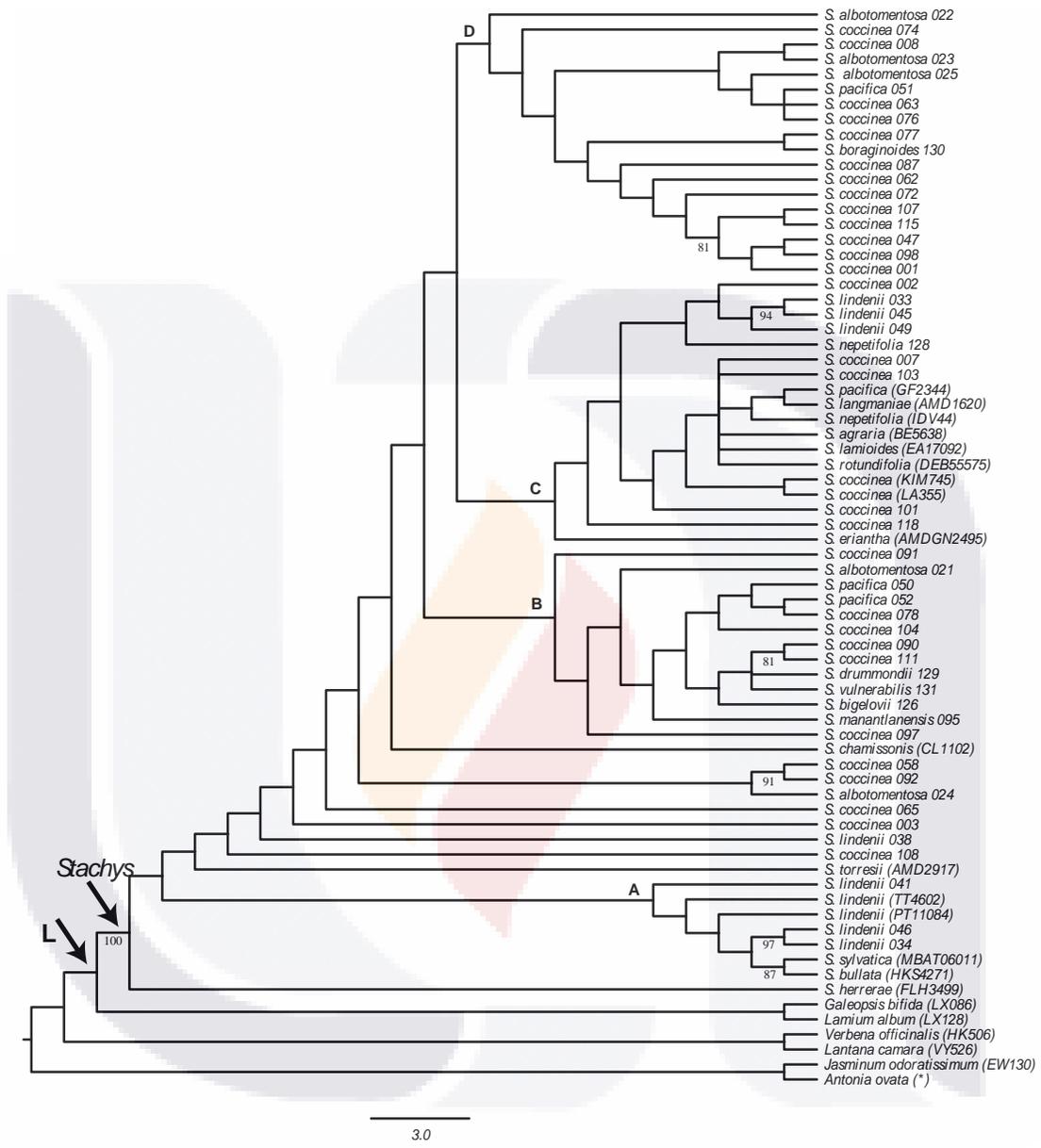


Figura 6D. Análisis de Máxima Parsimonia de la matriz concatenada. Las puntas de flecha señalan ramas para Lamiaceae (L) y el género *Stachys*; y hacia el interior de *Stachys* se identifica la formación de 4 clados. Los números debajo las ramas indican el soporte bootstrap, solo se muestran aquellos valores superiores al 80%.

tercer clado (C) conformado por especímenes de *S. coccinea* con *S. lindenii* y *S. pacifica*, además de especímenes del grupo externo (*S. agraria*, *S. eriantha*, *S. lamioides*, *S. langmaniae*, *S. nepetifolia* y *S. rotundifolia*); y un cuarto clado (D) conformado por especímenes de *S. coccinea* con *S. albotomentosa* y *S. pacifica*, además de un ejemplar del grupo externo (*S. boraginoides*).

Análisis de Máxima Verosimilitud.

a) Intrón *trnL*. Se obtuvo un árbol con un Log Likelihood de -2,349.70 (Figura 7A). Las probabilidades para algunos nodos en particular, fueron desde los valores muy bajos o muy poco probables (0.2%) hasta probabilidades del 100% la más alta, que definió al clado de las Lamiaceae.

En general se observó una baja resolución en la topografía del árbol obtenido. Se formó un clado principal que abarca a casi todos los especímenes del complejo *Stachys coccinea* (*S. albotomentosa*, *S. lindenii*, *S. manantlanensis* y *S. pacifica*) además de la mayoría de los especímenes del grupo externo, sin embargo, algunos especímenes de *S. lindenii* y el espécimen de *S. torresii* fueron excluidos de este clado junto con *S. bullata*, *S. herrerae* y *S. sylvatica*.

b) Espaciador intergénico *trnL-F*. Se obtuvo un árbol con un Log Likelihood de -1,292.54 (Figura 7B). En los nodos principales, que conformaron al clado de Lamiaceae y al clado de *Stachys*, se obtuvieron probabilidades muy altas, de 99.8% y 90.3% respectivamente; sin embargo, al interior del clado de *Stachys* abundan las probabilidades bajas (0.5-48.5%).

La resolución en este árbol es básicamente inexistente, ya que solamente se logran formar los clados de Lamiaceae, de *Stachys*, y al interior de *Stachys* se forma un clado que incluye a todas las especies del género excepto a *S. bullata*, *S. herrerae*, la mayoría de los especímenes de *S. lindenii*, *S. sylvatica* y el espécimen de *S. torresii*.

c) Intrón *rps16*. Se obtuvo un árbol con un Log Likelihood de -1807.30 (Figura 7C). Los nodos principales obtuvieron probabilidades de 45.9%-100%, sobresaliendo los nodos que definen a las Lamiaceae (100%) y el nodo de *Stachys* (99.8%).

Hacia el interior del clado de *Stachys* no hay resolución en la topología del árbol: se distingue un clado que abarca básicamente a todos los especímenes de *Stachys* pero que excluye a *S. bullata*, a algunos especímenes de *S. coccinea* y de *S. lindenii*, y a *S. sylvatica*.

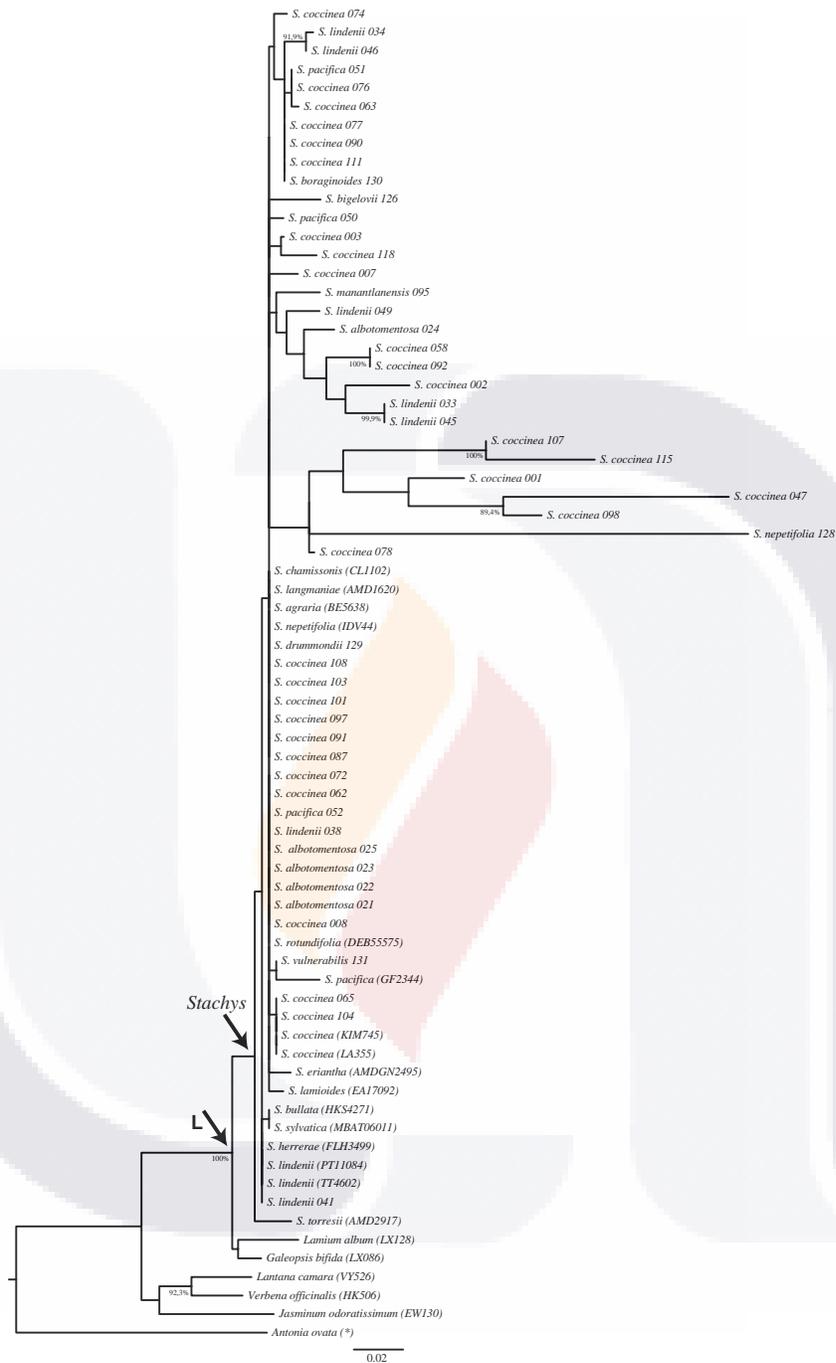


Figura 7A. Análisis de Máxima Verosimilitud del intrón *trnL*. Las puntas de flecha señalan nodos para Lamiaceae (L) y el género *Stachys*; y hacia el interior de *Stachys* en general se observa no hay mucha resolución al interior del clado, aunque se presentan varios especímenes con cambios acumulados en sus ramas (ramas largas). Los números junto a los nodos representan la probabilidad de la rama, solo se muestran aquellos valores superiores a 80%.

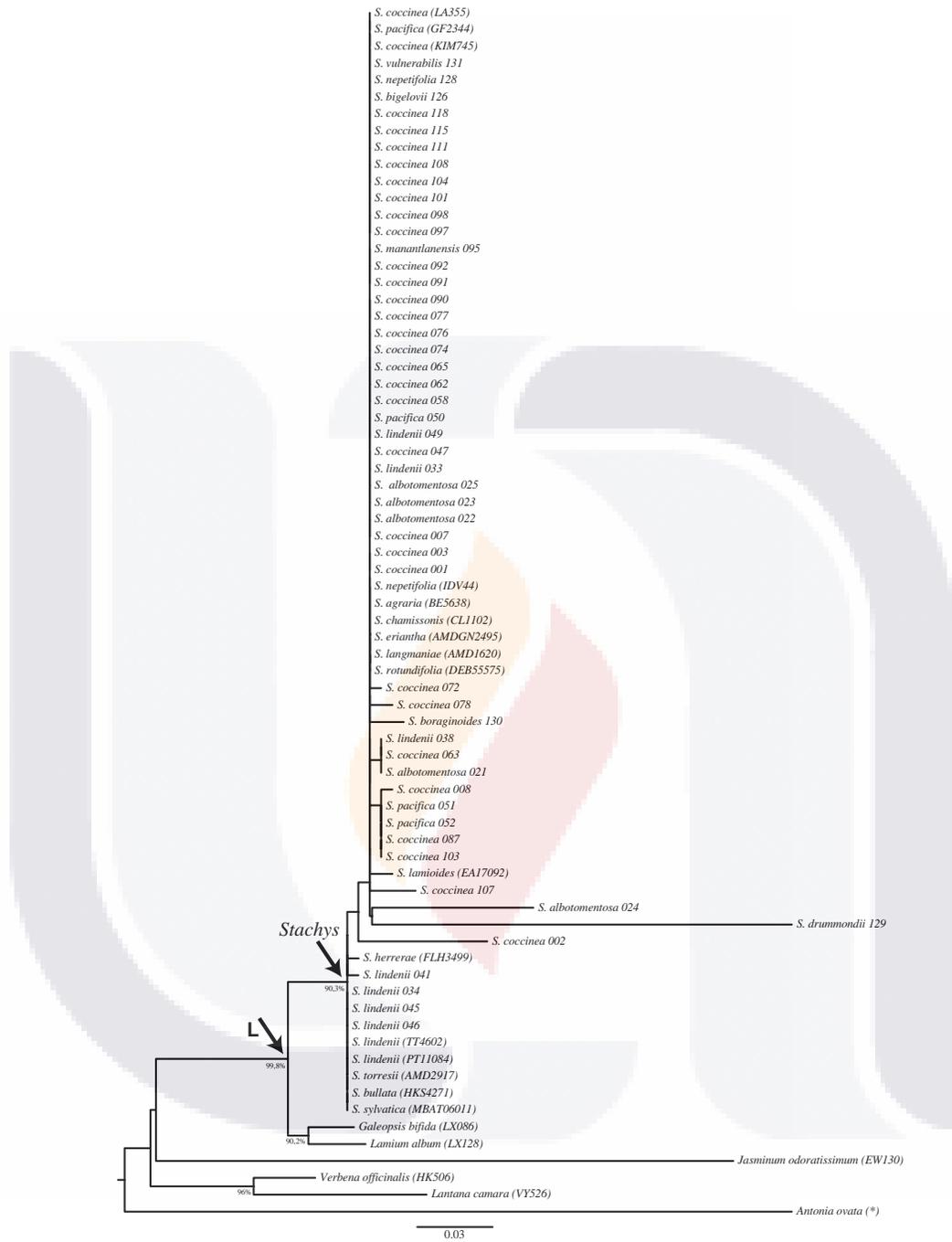


Figura 7B. Análisis de Máxima Verosimilitud del espaciador intergénico *trnL-F*. Las puntas de flecha señalan nodos para Lamiaceae (L) y el género *Stachys*; y hacia el interior de *Stachys* se observa no hay resolución al interior del clado, presentándose solamente algunos especímenes con cambios acumulados en sus ramas. Los números junto a los nodos representan la probabilidad de la rama, solo se muestran aquellos valores superiores a 80%.

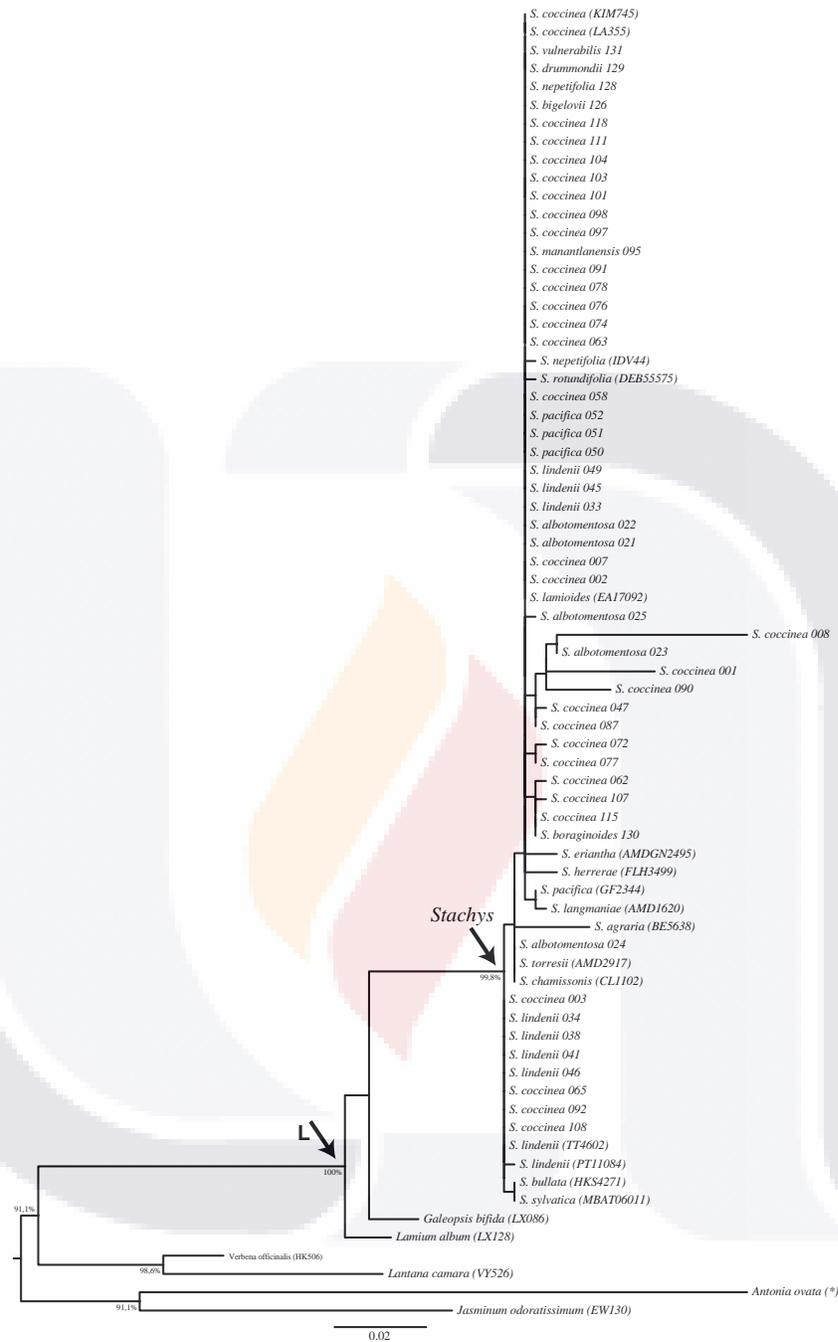


Figura 7C. Análisis de Máxima Verosimilitud del intrón *rps16*. Las puntas de flecha señalan nodos para Lamiaceae (L) y el género *Stachys*; y hacia el interior de *Stachys* se observa no hay resolución al interior del clado, presentándose solamente algunos especímenes con cambios acumulados en sus ramas. Los números junto a los nodos representan la probabilidad de la rama, solo se muestran aquellos valores superiores a 80%.

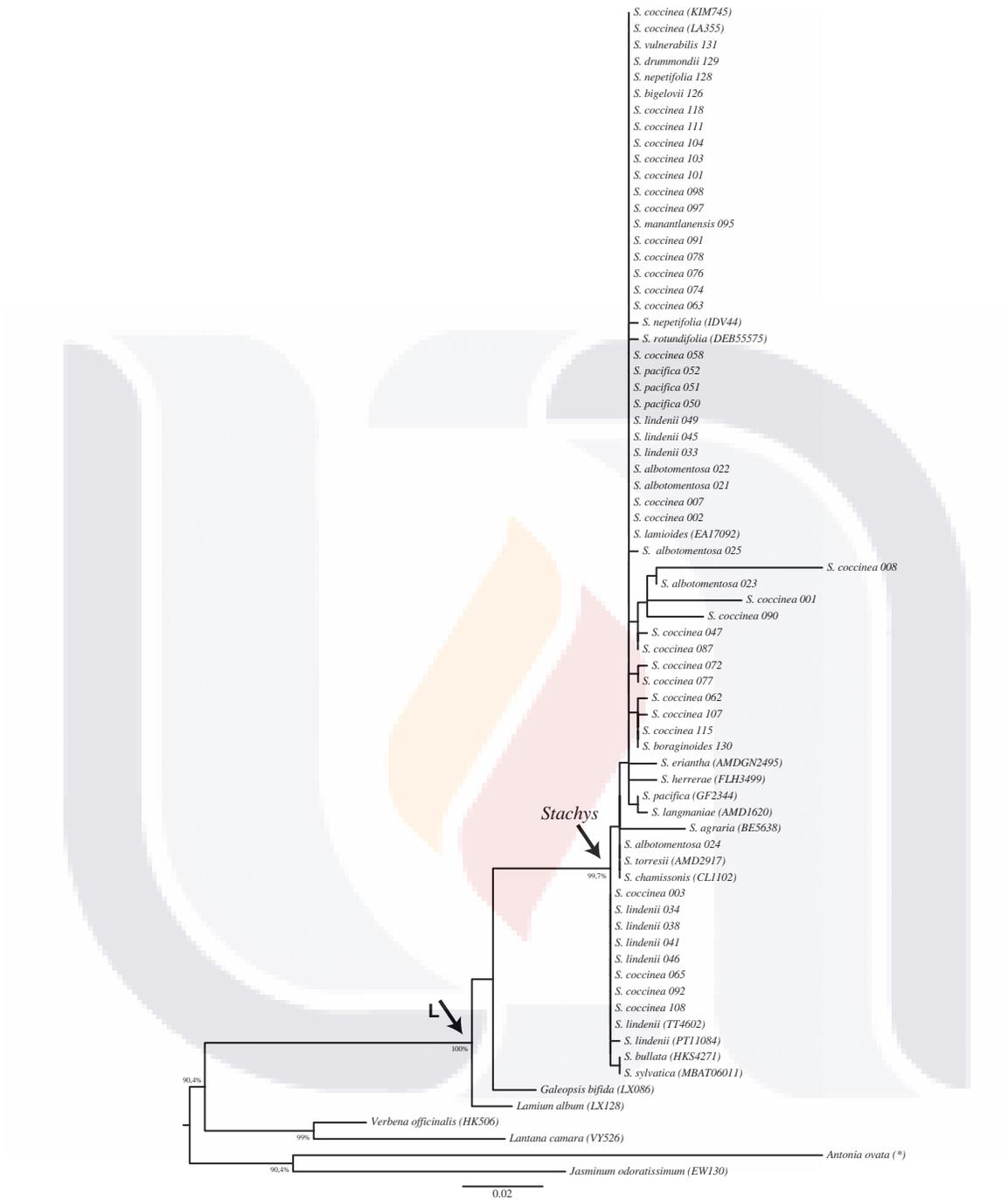


Figura 7D. Análisis de Máxima Verosimilitud de la matriz concatenada. Las puntas de flecha señalan nodos para Lamiaceae (L) y el género *Stachys*; y hacia el interior de *Stachys* se observa no hay resolución al interior del clado, presentándose solamente algunos especímenes con cambios acumulados en sus ramas. Los números junto a los nodos representan la probabilidad de la rama, solo se muestran aquellos valores superiores a 80%.

d) Matriz concatenada. Se obtuvo un árbol con un Log Likelihood de -1807.30 (Figura 7D). En general se observa una topología muy similar a la obtenida para el intrón rps16, donde cambiaron los valores de probabilidad, incrementándose. Los nodos principales obtuvieron probabilidades de 41.6%-100%, sobresaliendo el nodo que define a Lamiaceae (100%) y el nodo de *Stachys* (99.7%).

Inferencia Bayesiana.

a) Intrón trnL. En el árbol obtenido (Figura 8A) se observaron probabilidades posteriores de 0.93 a 1 en los nodos principales; se definieron claramente los clados de Lamiaceae (probabilidad posterior de 0.98) y de *Stachys* (probabilidad posterior de 1).

Dentro del clado *Stachys*, se formó un clado corona (probabilidad posterior de 0.93) que incluye a todas las especies del complejo de *Stachys coccinea*, quedando excluidas de este clado algunos especímenes de *S. lindenii*, y los especímenes de *S. bullata*, *S. herrerae* y *S. sylvatica*. El resto de los especímenes al interior del clado corona, no formaron agrupamientos en particular y se observan una gran cantidad de ramas cortas..

b) Espaciador intergénico trnL-F. En el árbol obtenido (Figura 8B) se observaron probabilidades posteriores que iban de 0.53 a 1 en los nodos principales; nuevamente se definieron claramente los clados de Lamiaceae (con probabilidad posterior de 1) y de *Stachys* (probabilidad posterior de 1).

Dentro del clado *Stachys* se formó un clado corona (probabilidad posterior de 0.77) que incluyó a casi todos los especímenes utilizados en el análisis, mostrando muy baja resolución en la topología al interior del clado y una gran cantidad de ramas cortas, aunque se mostraron algunos especímenes con ramas largas. Quedaron excluidos de este clado corona *S. bullata*, *S. herrerae*, la mayoría de los especímenes de *S. lindenii*, *S. torresii* y *S. sylvatica*.

c) Intrón rps16. En el árbol obtenido (Figura 8C) se observaron probabilidades posteriores de 0.66 a 1 en los nodos principales; se definieron claramente los clados de Lamiaceae (probabilidad posterior de 1) y de *Stachys* (probabilidad posterior de 1).

Dentro del clado *Stachys* se forma un clado corona (probabilidad posterior de 0.98) conformado por la mayoría de los ejemplares pertenecientes a las especies del complejo *Stachys coccinea* además de la mayoría de los especímenes utilizados como grupo externo.

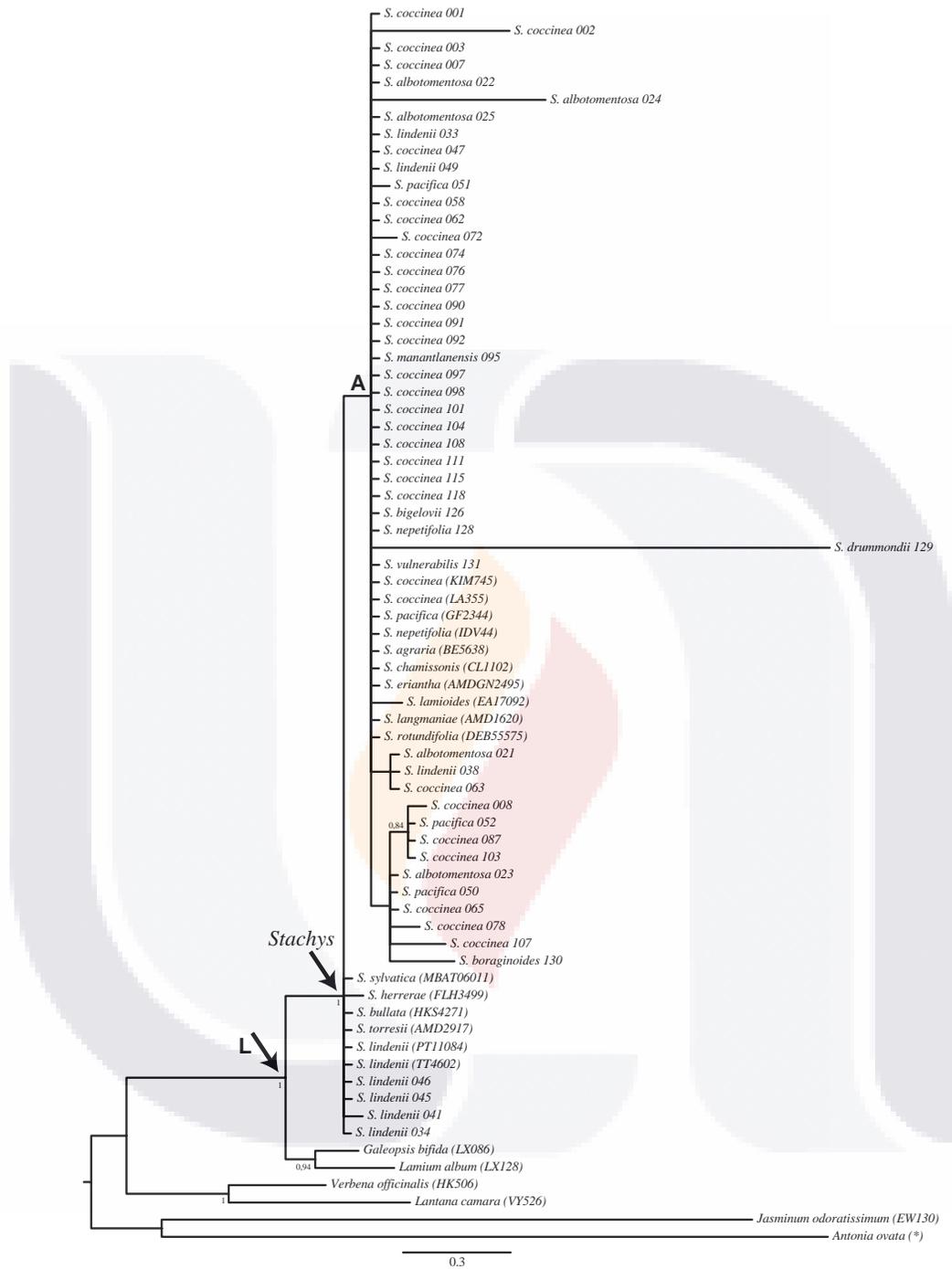


Figura 8A. Inferencia Bayesiana del intrón *trnL*. Las puntas de flecha señalan nodos para Lamiaceae (L) y el género *Stachys*; y hacia el interior de *Stachys* se identifica la formación de un grupo corona (A) conformado por la mayoría de los especímenes pertenecientes al complejo *Stachys coccinea*, se observa no hay mucha resolución al interior del clado. Los números junto a los nodos representan la probabilidad posterior, solo se muestran aquellos valores superiores a 0.8.

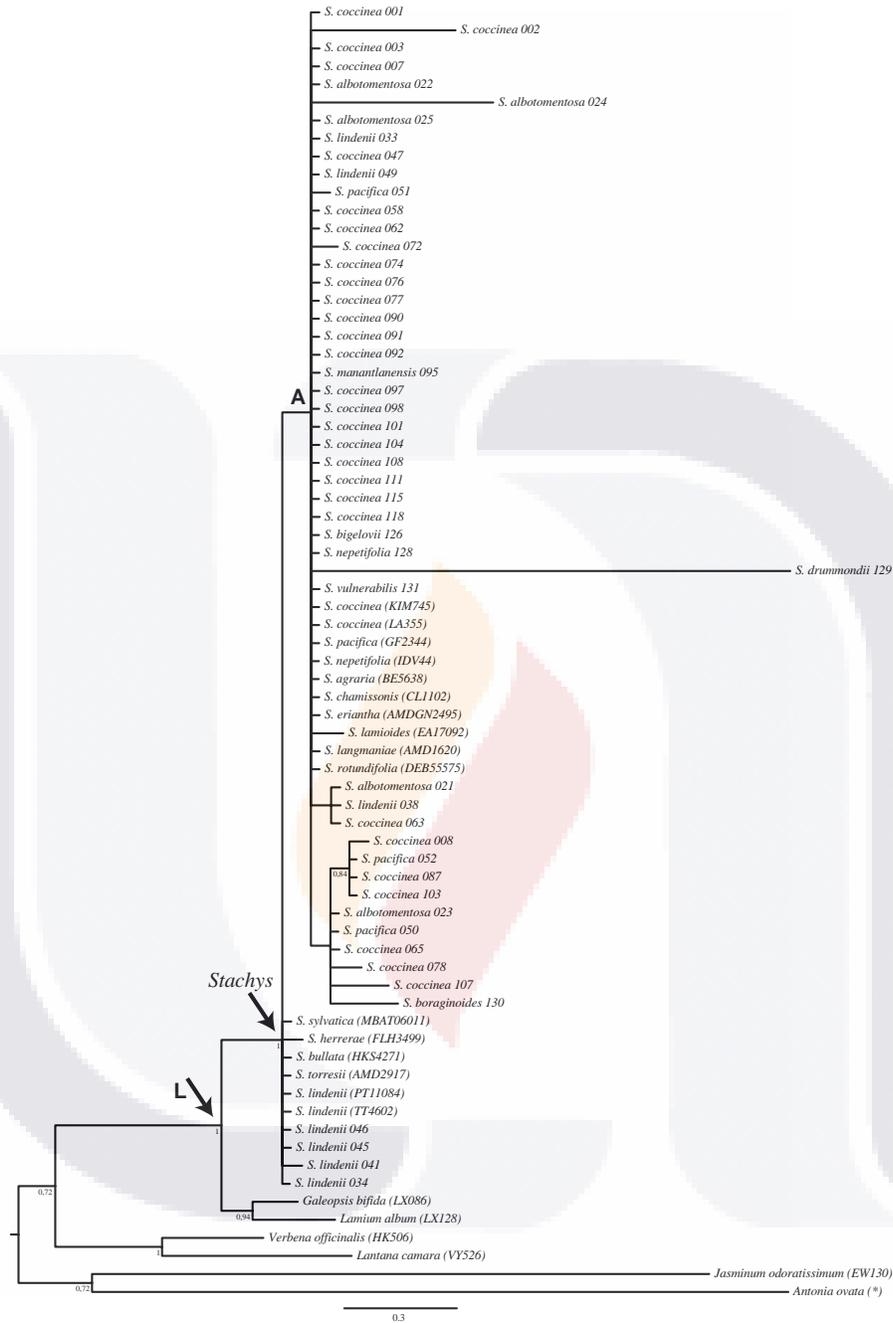


Figura 8B. Inferencia Bayesiana del espaciador intergénico *trnL-F*. Las puntas de flecha señalan nodos para Lamiaceae (L) y el género *Stachys*; y hacia el interior de *Stachys* se identifica la formación de un grupo corona (A) conformado por la mayoría de los especímenes pertenecientes al complejo *Stachys coccinea* y se observa que no hay mucha resolución al interior del clado. Los números junto a los nodos representan la probabilidad posterior, solo se muestran aquellos valores superiores a 0.8.

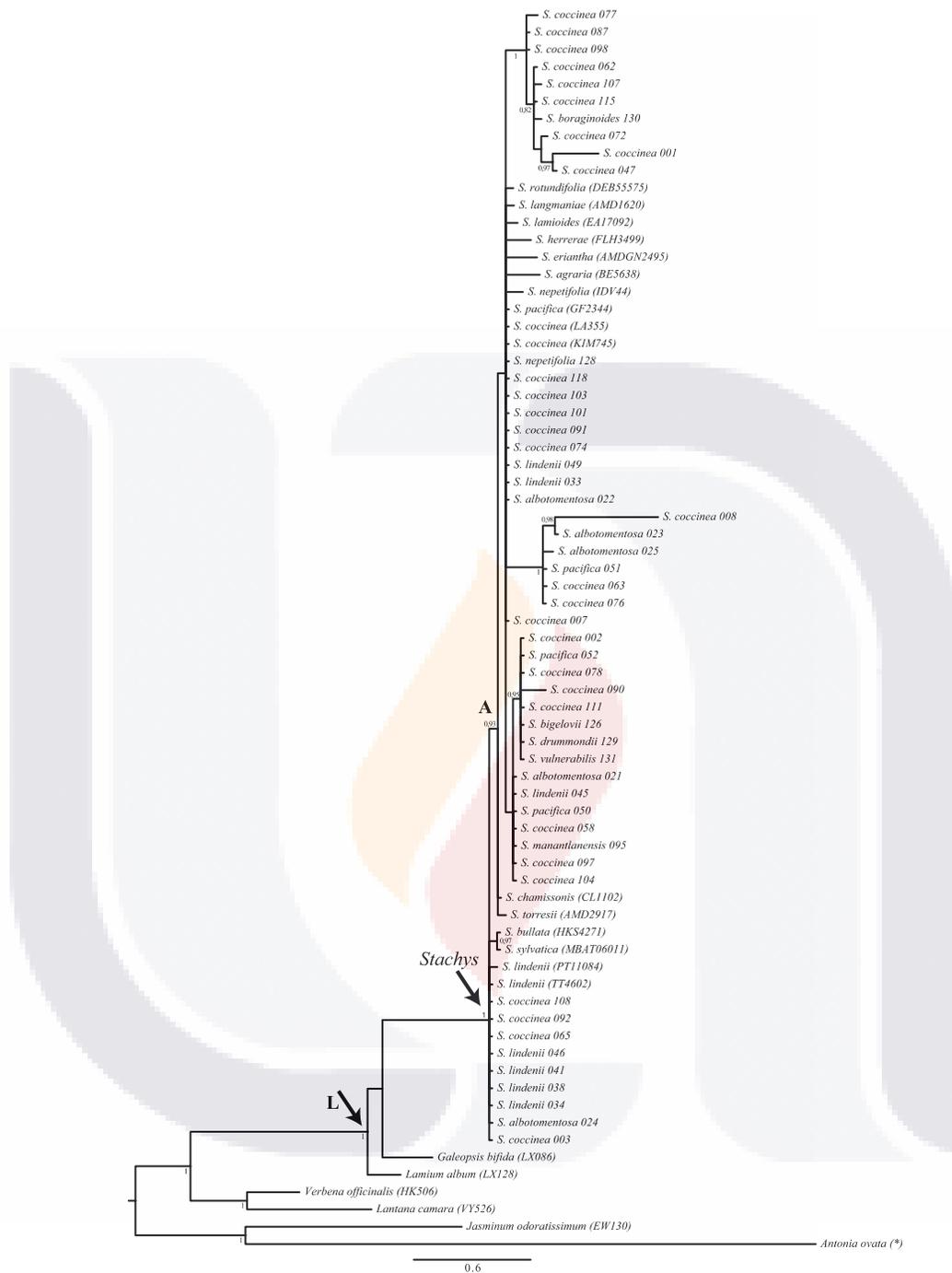


Figura 8C. Inferencia Bayesiana del intrón *rps16*. Las puntas de flecha señalan nodos para Lamiaceae (L) y el género *Stachys*; y hacia el interior de *Stachys* se identifica la formación de un grupo corona (A) conformado por la mayoría de los especímenes pertenecientes al complejo *Stachys coccinea*. Los números junto a los nodos representan la probabilidad posterior, solo se muestran aquellos valores superiores a 0.8.

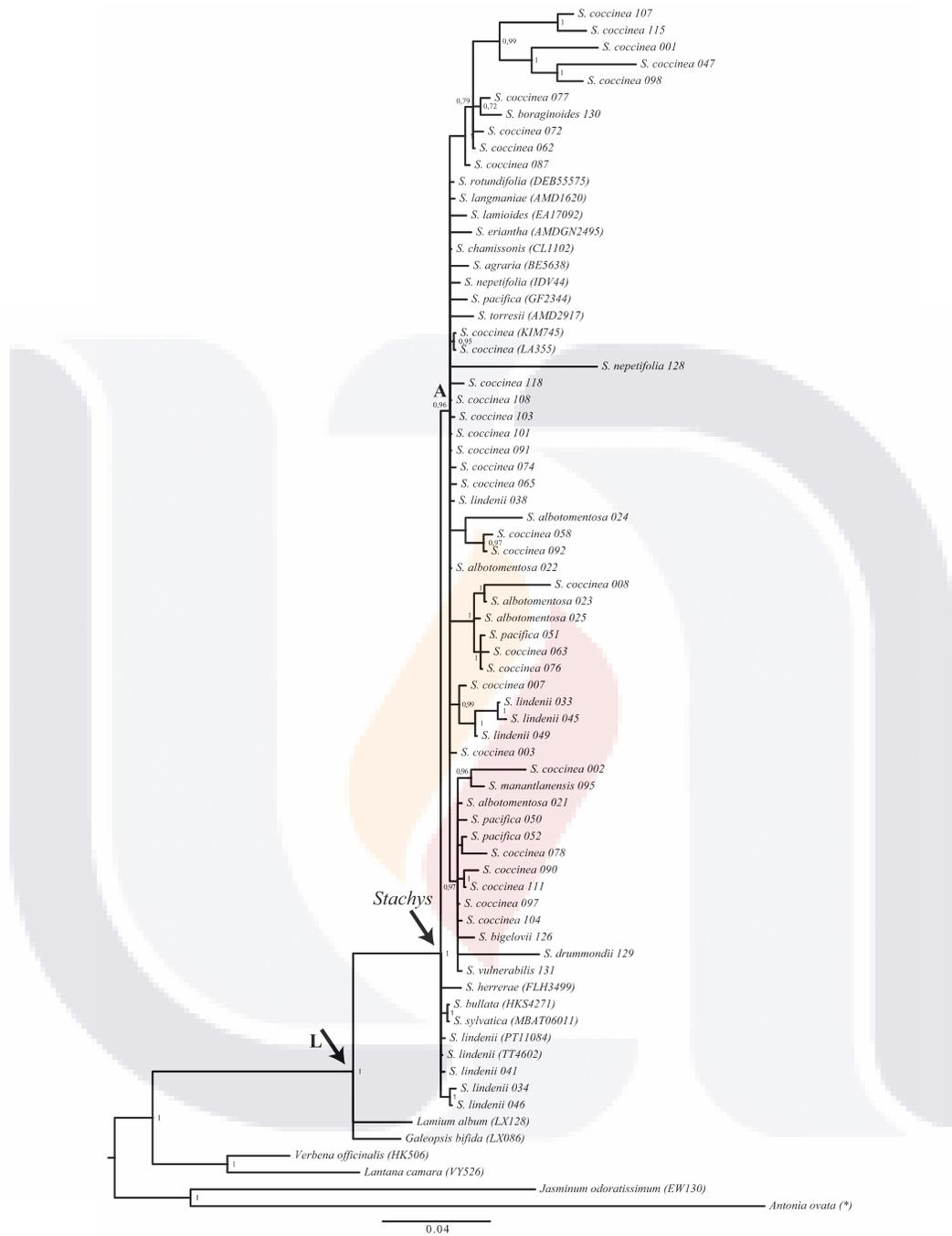


Figura 8D. Inferencia Bayesiana de la matriz concatenada. Las puntas de flecha señalan nodos para Lamiaceae (L) y el género *Stachys*; y hacia el interior de *Stachys* se identifica la formación de un grupo corona (A) conformado por la mayoría de los especímenes pertenecientes al complejo *Stachys coccinea*. Los números junto a los nodos representan la probabilidad posterior, solo se muestran aquellos valores superiores a 0.8.

Quedaron excluidos de este clado, algunos especímenes de *S. coccinea*, *S. albotomentosa* y *S. lindenii*, además de especímenes de *S. bullata* y *S. sylvatica*.

d) Matriz concatenada. En el árbol obtenido (Figura 8D) se observaron probabilidades posteriores de 0.62 a 1 en los nodos principales; nuevamente, se volvieron a definir claramente los clados propios de Lamiaceae (con probabilidad posterior de 1) y del género *Stachys* (con probabilidad posterior de 1).

Hacia el interior del clado de *Stachys* se observó la formación de un clado conformado por todos los especímenes de la especie *S. coccinea*, *S. albotomentosa*, *S. pacifica* y *S. torresii*, además de la mayoría de los especímenes de *S. lindenii*, junto con la mayoría de los especímenes pertenecientes al grupo externo, todos estos especímenes se muestran intercalados entre sí; nuevamente se observó que algunos especímenes de *S. lindenii* quedaron excluidos de este clado corona junto con *S. bullata*, *S. herrerae* y *S. sylvatica*.

Redes de haplotipos.

Para las secuencias de cada región individual se describieron las siguientes redes de haplotipos, cabe resaltar que no se consideraron los haplotipos de las especies del grupo externo (6 haplotipos únicos en todos los casos).

a) Intrón *trnL*. Se encontraron 41 haplotipos pertenecientes al género *Stachys*, organizados en: una red de haplotipos con 25 haplotipos derivados, y 15 haplotipos únicos (Figura 9A).

b) Espaciador intergénico *trnL-F*. Se encontraron 31 haplotipos pertenecientes al género *Stachys*, organizados en: una red de haplotipos con 27 haplotipos derivados, y tres haplotipos únicos (Figura 9B).

c) Intron *rps16*. Se encontraron 38 haplotipos pertenecientes al género *Stachys*, organizados en: 2 redes, una red con 30 haplotipos derivados y otra red con 3 haplotipos derivados, y 3 haplotipos únicos (Figura 9C).

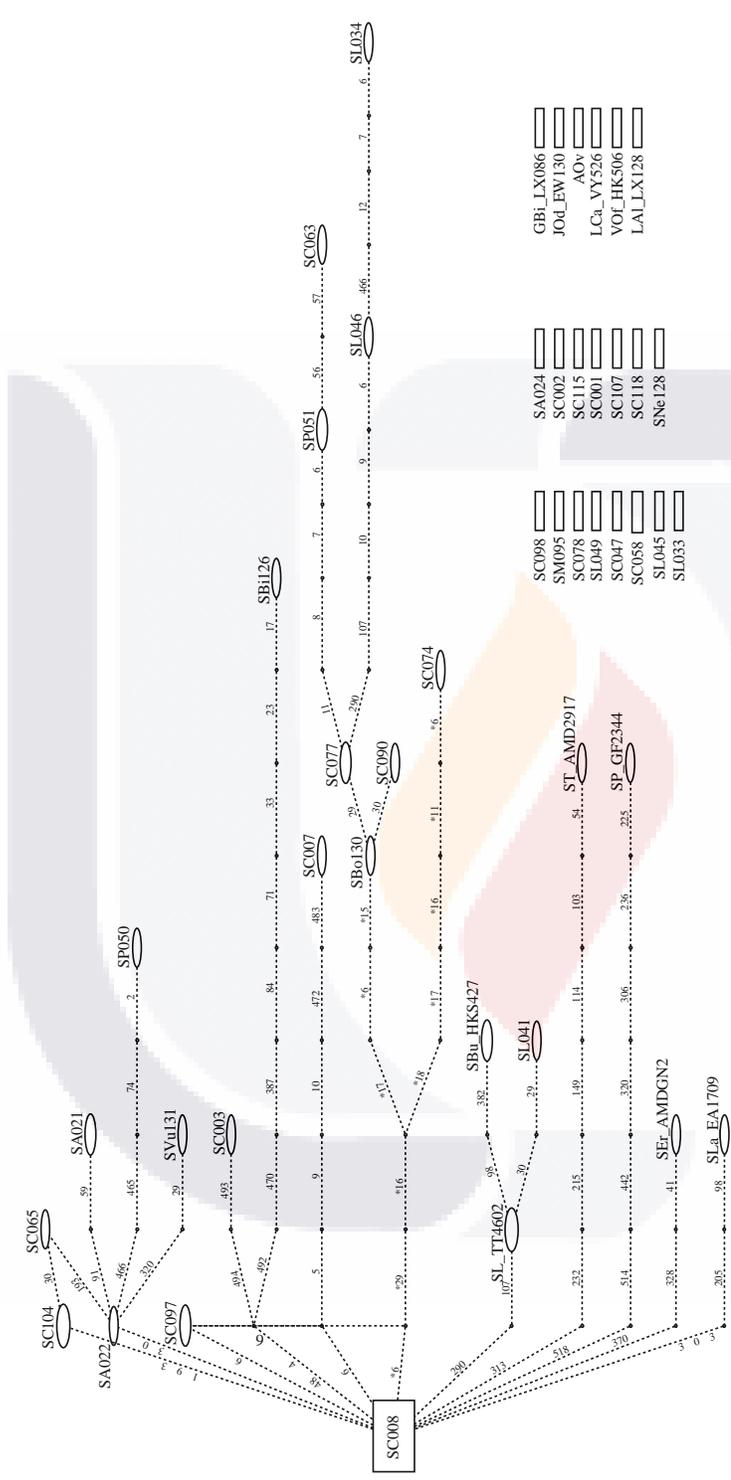


Figura 9A. Red de Haplotipos del intrón *trmL*. Para el intrón *trmL* se identificaron 41 haplotipos pertenecientes al género *Stachys*; se presentaron 15 haplotipos únicos y una red con 25 haplotipos derivados. Los números junto a las líneas indican la cantidad de cambios entre los haplotipos relacionados.

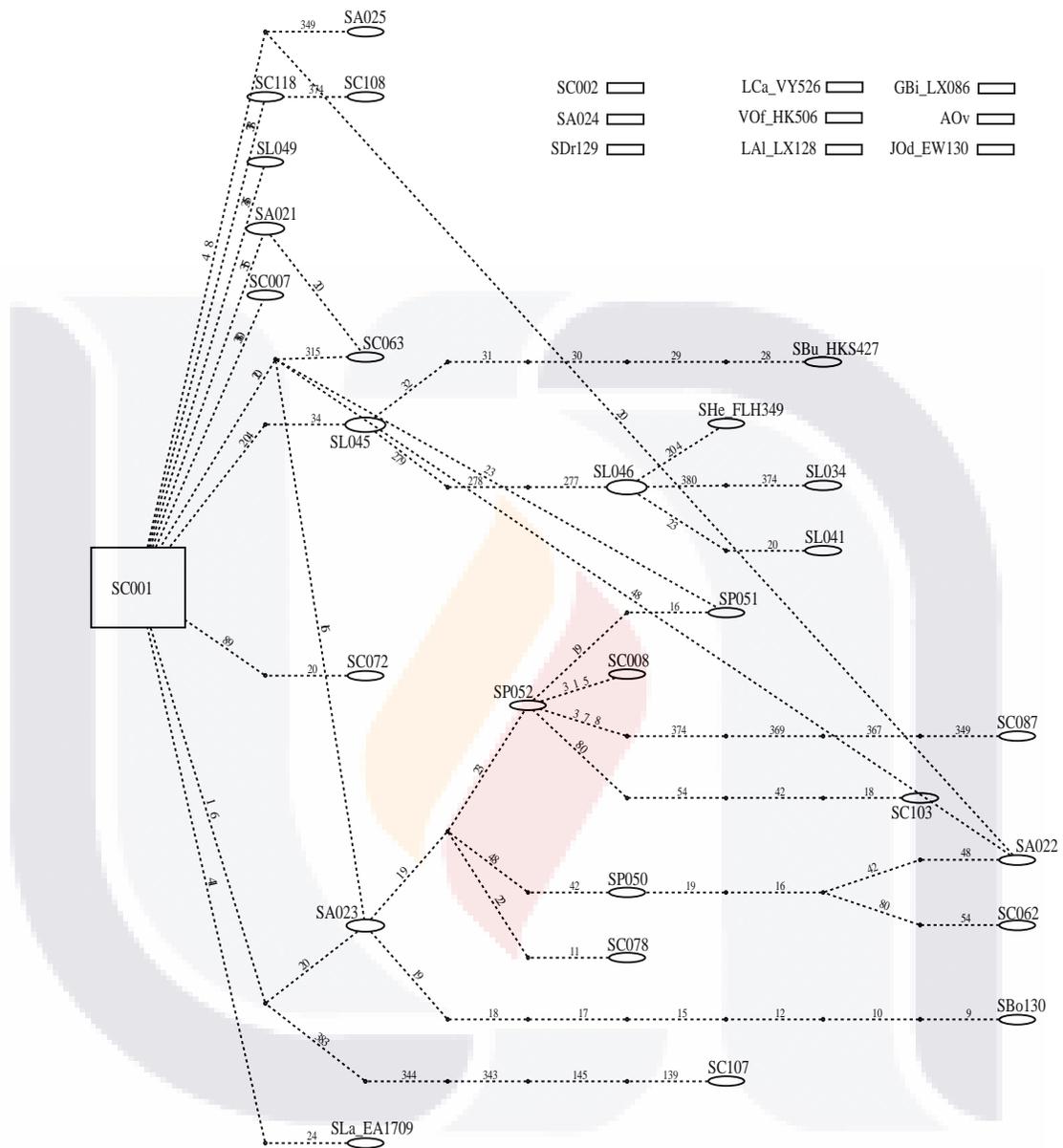


Figura 9B. Red de Haplotipos del espaciador intergénico *trnL-F*. Para el espaciador intergénico *trnL-F* se identificaron 31 haplotipos pertenecientes al género *Stachys*; se presentaron 3 haplotipos únicos y una red con 27 haplotipos derivados. Los números junto a las líneas indican la cantidad de cambios entre los haplotipos relacionados.

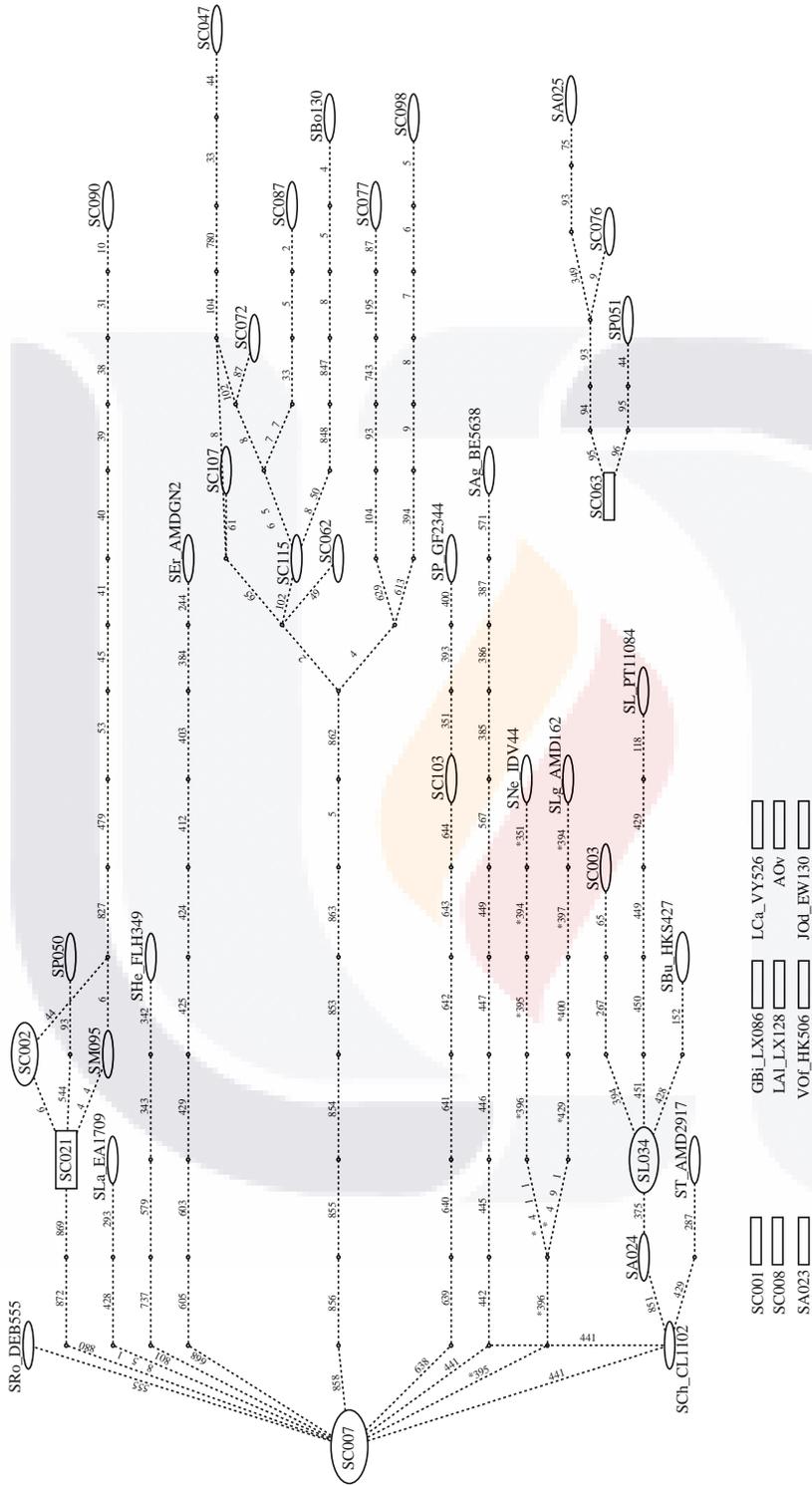
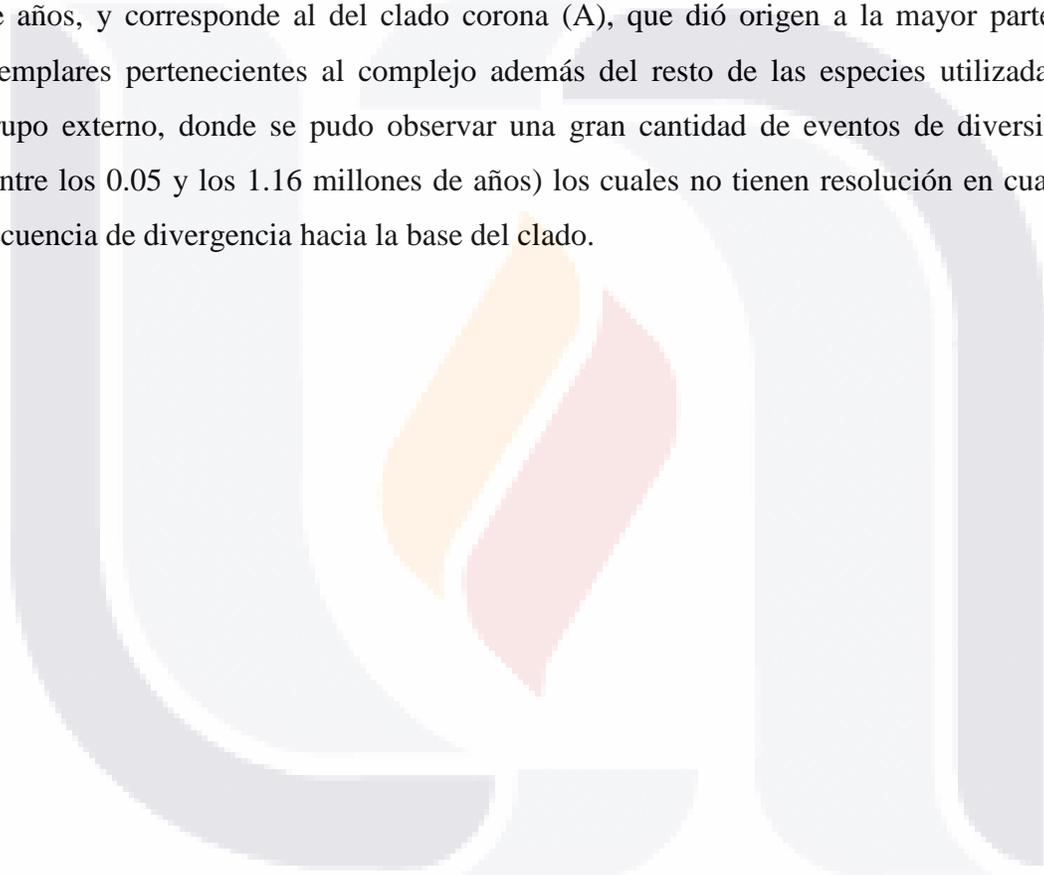


Figura 9C. Red de Haplotipos del intrón *rps16*. Para el intrón *rps16* se identificaron 38 haplotipos pertenecientes al género *Stachys*; se presentaron 3 haplotipos únicos y dos redes, la primera con 30 haplotipos derivados y la segunda con 3 haplotipos derivados. Los números junto a las líneas indican la cantidad de cambios entre los haplotipos relacionados.

Tiempo de divergencia.

En el árbol de tiempo de divergencia (Figura 10) se observó que las especies del género *Stachys* utilizadas en el análisis tienen un origen estimado en 11.6 millones de años, sin una secuencia resuelta de diversificación; en este punto inicial de diversificación se observaron además del clado corona con la mayoría de los especímenes, algunos ejemplares de *S. coccinea* y *S. lindenii*, además de los ejemplares de *S. bullata* y *S. sylvatica*. El siguiente punto de diversificación observado fue alrededor de los 2 millones de años, y corresponde al del clado corona (A), que dió origen a la mayor parte de los ejemplares pertenecientes al complejo además del resto de las especies utilizadas como grupo externo, donde se pudo observar una gran cantidad de eventos de diversificación (entre los 0.05 y los 1.16 millones de años) los cuales no tienen resolución en cuanto a la secuencia de divergencia hacia la base del clado.



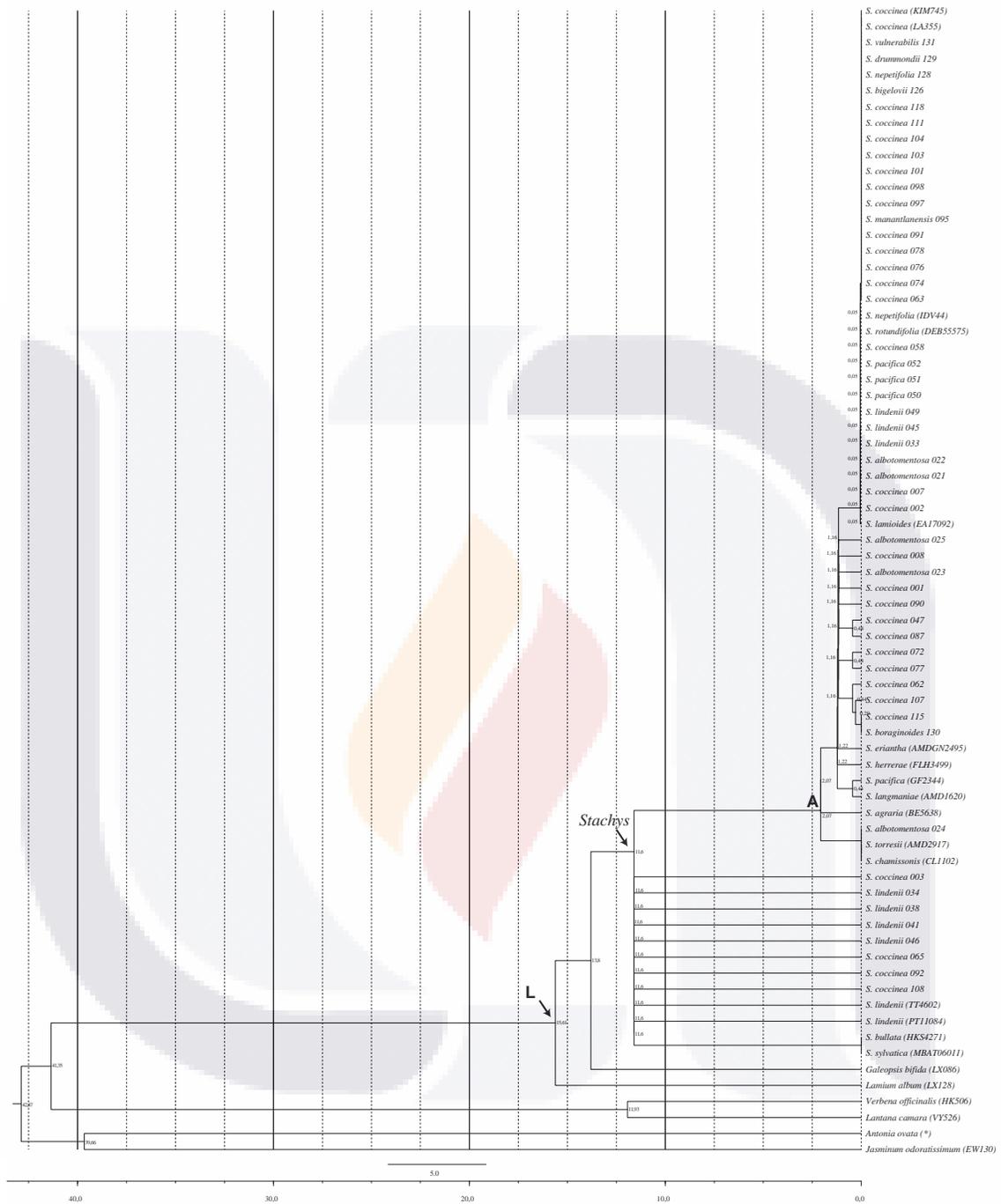


Figura 10. Tiempo de Divergencia. Árbol obtenido con el método de Máxima Verosimilitud. Las puntas de flecha señalan nodos para Lamiaceae (L) y el género *Stachys*, que tiene una antigüedad estimada en 11.6 mda; el siguiente punto de diversificación se presenta a los 2.07 mda, en el nodo de origen del clado corona (A), que incluye a la mayor parte de las especies pertenecientes al complejo *Stachys coccinea*. Los números en los nodos indican la edad estimada en millones de años.

DISCUSIONES

Análisis morfológico.

Para todos los análisis numéricos de morfología realizados, las tendencias de agrupamiento son conservadas y las variaciones explicadas son similares, lo que es una señal inicial de la similitud o poca variación morfológica entre las especies pertenecientes al complejo *Stachys coccinea*.

En el análisis de Conglomerados, que muestra un buen soporte, ya que los valores r obtenidos (0.901 para UPGMA y 0.867 para Single Linkage) son significativos, y sus agrupamientos son consistentes a pesar de sus diferencias, lo cual puede ser explicado con el argumento de similitud/diferencia: mientras que UPGMA utiliza una similitud promedio, en Single linkage (Vecino más cercano) la búsqueda de similitud fue forzada, mostrando que todas las especies son de hecho muy similares entre ellas morfológicamente. De los agrupamientos observados sobresale en ambos casos el mantenimiento del grupo formado por los ejemplares de *S. albotomentosa*, a pesar de que se encuentra anidado dentro del conjunto de formado principalmente por *S. coccinea*; respecto a *S. manantlanensis* era de esperarse que mostrara más afinidad por los ejemplares de *S. pacifica*, especie a partir de la cual fue identificada por Turner (1995), sin embargo, mostro más afinidad por *S. coccinea*; también fue interesante observar la afinidad morfológica entre *S. lindenii* y *S. pacífica*. En ambos casos también se observó que *S. jaimehintonii* y *S. torresii* se agrupaban separados, casi como si formaran parte del grupo externo, y esto fue debido a la carencia de más información respecto a las estructuras florales, que como se ve más adelante, son la principal fuerza de agrupamiento.

Ahora bien, para los resultados de los análisis de Componentes Principales (PCA) y Coordenadas Principales (PCO), tenemos que la variación explicada por los primeros componentes, y en su caso las primeras coordenadas, son casi iguales.

En el análisis de Componentes Principales, el primer componente está determinado por caracteres florales mientras que el segundo componente está determinado por caracteres foliares, y como se observó, no tienen suficiente variación como para separar grupos bien definidos, y por lo tanto existe cierto solapamiento entre especies debido a estos caracteres. Algo similar sucede con el análisis de Coordenadas Principales, pues son pocos

caracteres los que influyen en la separación de diferentes grupos y en general, tienden a formar un grupo compacto de especies. Ambos resultados son resumidos por el análisis de Escalamiento Multidimensional.

Estos análisis muestran que *S. albotomentosa* está claramente separada del resto de las especies formando un grupo definido por estructuras foliares y florales más pequeñas y estrechas; que *S. coccinea* forma un grupo mixto con un amplio rango de variación morfológica, dentro del cual se incluyen *S. manantlanensis*, *S. jaimehintonii*, *S. torresii*, y algunos ejemplares de *S. lindenii* y *S. pacifica*; y finalmente que *S. pacifica* y *S. lindenii* muestran afinidades morfológicas. En común, todos estos agrupamientos se caracterizan por presentar gran variación foliar, sin embargo presentan poca variación floral.

Estos resultados nos dan la base para pensar que la variación morfológica no es suficiente criterio para la delimitación de tantas especies dentro del complejo *Stachys coccinea*. Los caracteres florales, que son la primer y más importante fuente de variación explicada, no permiten la separación de grupos, probablemente porque están bajo presión selectiva (Galen, 1999) y por ello tienden a formar un grupo compacto. Por el otro lado, los caracteres foliares son la segunda fuente de variación explicada, permitiendo la formación de ciertos grupos, y coincidentemente son usados como caracteres diagnóstico (particularmente para *S. jaimehintonii*, *S. manantlanensis*, *S. pacifica* y *S. torresii*); sin embargo, se sabe que son caracteres plásticos no solo entre las especies del complejo *Stachys coccinea*, sino también en otras especies (St. Hilaire & Graves, 1999; Fothergill *et al.*, 2001; Uribe-Salas *et al.*, 2008; Li & Yu, 2009). Finalmente, aunque hay ciertos caracteres morfológicos que ayudan a diferenciar entre especies, en este análisis queda demostrado que no siempre son definitivos (por ejemplo, los indumentos), por lo que dentro del complejo *Stachys coccinea* es difícil establecer cuales caracteres tienen mayor valor taxonómico: tal vez los caracteres seleccionados como diagnóstico para las especies del complejo, son útiles o estables en otros grupos de plantas (Mayr, 1969; Crisci, 1983) pero dentro del complejo, no lo son.

Esta dificultad en establecer caracteres diagnóstico a partir de los análisis numéricos es reforzada por los análisis filogenéticos de parsimonia de los datos morfológicos. La homoplasia (dada por el alto número de pasos obtenidos en el árbol, el bajo índice de consistencia y el bajo soporte de bootstrap) es debida a la baja variabilidad en los

caracteres, y es claramente evidente dentro del complejo; debido a eso, dichos caracteres no pueden ni deben ser utilizados como caracteres diagnósticos. Toda esta homoplasia es bastante común dentro de la tribu Lamioideae, donde *Stachys* está incluida (Scheen *et al.*, 2010), además de que hay que considerar de que *Stachys* es un género altamente polimorfo (Lindqvist & Albert, 2002; Salmaki *et al.*, 2013).

Análisis molecular.

Los análisis filogenéticos de las tres regiones aisladas y de la matriz concatenada, tienen diferentes topologías dependiendo del análisis aplicado, sin embargo, tienen elementos redundantes, de los que sobresalen los bajos soportes bootstrap y las bajas resoluciones en las topologías.

En el Análisis de Máxima Parsimonia, fueron pocos los caracteres parsimoniosamente informativos independientemente de la región utilizada, inclusive en la matriz de regiones concatenadas, lo cual nos indica que muy probablemente no hay mucha variación entre las distintas especies y entre los especímenes. Esto se vió reflejado en la formación de los clados: se identificaron los clados correspondientes a Lamiaceae y al género *Stachys*, pero sobre nuestro grupo de interés no se formó ningún clado, todas las especies tanto las pertenecientes al complejo *Stachys coccinea* como las especies del género *Stachys* propias del grupo externo estaban entremezcladas.

En el Análisis de Máxima Verosimilitud, independientemente de la región analizada, se distinguieron claramente los clados de Lamiaceae y del género *Stachys* con muy buenas probabilidades pero con baja resolución y gran cantidad de ramas cortas. lo que indica nuevamente la poca variación entre las especies. Al interior del clado de *Stachys* se observó la formación de un clado que se caracterizó por presentar a la mayoría de los especímenes utilizados, lo cual representaba a especies propias de Mesoamérica y Sudamérica, este clado excluyó a algunas especies propias de Norteamérica y Viejo Mundo (*S. bullata* y *S. sylvatica* respectivamente) y a algunas de Mesoamérica (principalmente algunos especímenes de *S. lindonii*, y en otras ocasiones a especímenes de *S. coccinea*, *S. herrerae* y *S. torresii*).

En la Inferencia Bayesiana, tanto las tres regiones aisladas como la matriz concatenada tienen una buena probabilidad posterior en los nodos, algunas de ellas superiores al 90%, y a pesar de eso, hay baja resolución y gran cantidad de ramas cortas.

Las topologías obtenidas son similares a las que se obtuvieron para el análisis de Máxima Verosimilitud: se identifican claramente los clados de Lamiaceae y de *Stachys* con buenas probabilidades posteriores; dentro del clado de *Stachys* se identifica la formación de un clado polifilético que en general incluye a las distintas especies de *Stachys* utilizadas, tanto las propias de complejo como las del grupo externo; sin embargo, nuevamente se observa que algunos especímenes quedaron excluidos de este clado: particularmente especímenes propios de Norteamérica y del Viejo Mundo (*S. bullata* y *S. sylvatica* respectivamente) y algunos especímenes de Mesoamérica como son *S. herrerae* y varios especímenes de *S. lindenbergii*, y dependiendo de la región de cpDNA, especímenes de *S. albotomentosa*, *S. coccinea* y *S. torresii*.

En todos los análisis realizados se observa que las filogenias basadas en cpDNA no son capaces de resolver un clado para el complejo *Stachys coccinea*. Es evidente que las especies Mesoamericanas y Sudamericanas utilizadas en los análisis, tanto las pertenecientes al complejo como las del grupo externo, muestran grandes similitudes y afinidades entre ellas. Este mismo fenómeno es observado inclusive con regiones nucleares, donde se observan buenas resoluciones a niveles de género o de regiones geográficas (Roy *et al.*, 2013; 2015), sin embargo, a niveles específicos no es posible definir un clado particular.

Se sabe que el DNA de cloroplasto se hereda por línea materna dentro de las Lamiaceae (Corriveau & Coleman, 1988; Welch *et al.*, 2016), por lo que se espera que las regiones no codificantes del cloroplasto se encuentren libres de las presiones selectivas y evolucionen a tasas más rápidas que las regiones codificantes (Kelchner, 2000), siendo esta la razón por la que son usados ampliamente en estudios filogenéticos (Shaw *et al.*, 2007). Las regiones de DNA de cloroplasto usados en el presente estudio han dado resultados satisfactorios en la delimitación de muchas especies (por ejemplo Wink & Kaufmann, 1996; Andersson & Rova, 1999; Downie & Katz-Downie, 1999; Wallander & Albert, 2000), y aunque no fueron suficientes para resolver las relaciones filogenéticas entre las especies del complejo *Stachys coccinea*, si han demostrado ser eficientes en la resolución de filogenias de otras Lamiaceae (Bunsawat *et al.*, 2004; Bräuchler *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2012; Jenks *et al.*, 2013). Particularmente la región *rps16*, que ha mostrado presentar buenos niveles de variación entre las especies de *Stachys* (Welch *et al.*, 2016), hecho que se

corroboró al observar que los árboles generados de la matriz concatenada eran muy similares a los obtenidos de la matriz de *rps16*, lo que demostraba el efecto de esta región sobre los análisis conjuntos.

Ahora bien, la falta de resolución en las topologías puede ser debida a dos factores. El primero es que las especies de *Stachys* del Nuevo Mundo son altamente poliploides y muchas exhiben señales de pasados eventos de hibridización (Lindqvist & Albert, 2002; Salmaki *et al.*, 2012; 2013; Roy *et al.*, 2013; 2015). El segundo factor, podría ser el relativamente corto tiempo de diversificación que tiene el género en particular con las especies Mesoamericanas y Centroamericanas. México por sus características fisiográficas y climáticas es el centro de diversificación de muchas familias de plantas, incluyendo a las Lamiaceae (Martínez-Gordillo *et al.*, 2013); y a pesar de que *Stachys* podría no ser tan diverso en las Américas como otras Lamiaceae (por ejemplo *Salvia*), se han descrito ya 41 especies para México y nuevas especies son agregadas continuamente (Martínez-Gordillo, *et al.*, 2013; Gonzalez-Gallego, 2015). Nuestro tiempo de divergencia estimado, menor a 2 millones de años para la mayoría de las especies del complejo *Stachys coccinea*, es congruente con estimados previos que coinciden también con los procesos de dispersión de las especies (Roy *et al.*, 2013). Esto sugiere tiempos de divergencia realmente cortos entre las especies de *Stachys* mexicanas, incluyendo a los miembros del complejo, y podrían representar especies de reciente aparición que no han tenido tiempo suficiente para completar la separación total a nivel genético, además de que podrían estarse presentando procesos de selección disruptiva (Rueffler *et al.*, 2006). Por lo tanto, la reciente edad del complejo podría ser la fuente de la baja variación genética (Roy *et al.*, 2013; Welch *et al.*, 2016), fenómeno que se ha presentado en otros grupos de plantas (Vargas, 2003; Bailey *et al.*, 2006; Beilstein *et al.*, 2006; Moore & Donoghue, 2007). Esta reciente diversificación con poca resolución en la secuencia de divergencia entre las especies vuelve un reto el resolver las relaciones filogenéticas entre las mismas a través de los métodos tradicionales de reconstrucción a través de regiones génicas (gen por gen) (Welch *et al.*, 2016).

CONCLUSIÓN

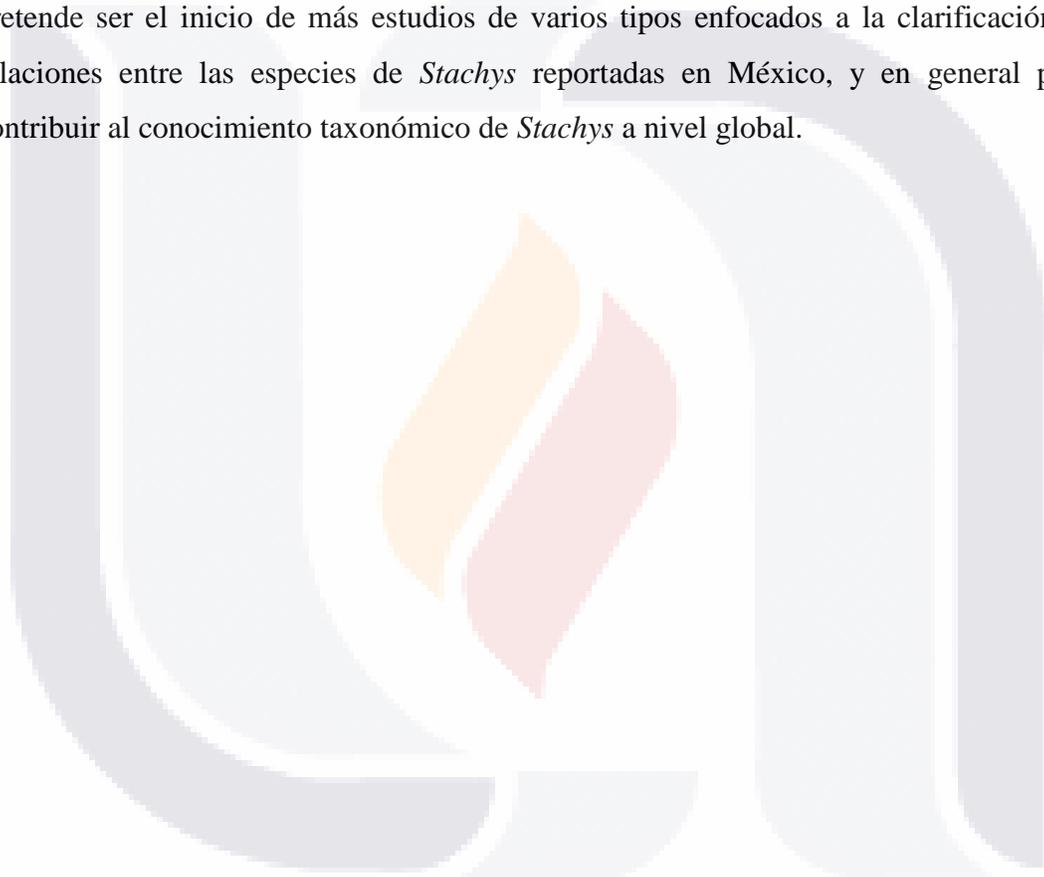
Con los resultados observados, y comparando con los resultados de Scheen *et al.* (2010), Salmaki *et al.* (2012; 2013), Dündar *et al.* (2013) y Roy *et al.* (2013; 2015), se puede afirmar que en el caso del complejo *Stachys coccinea* se enfrenta claramente un problema de delimitación de especies, debido principalmente a la baja variación observada en las reconstrucciones filogenéticas a partir de secuencias de cloroplasto (inclusive en regiones nucleares como son ITS y ETS) y al poco tiempo de divergencia de las especies, aunado a que *Stachys* es una especie altamente poliploide.

Tanto los resultados morfológicos como los resultados moleculares son consistentes en el sentido de que es difícil definir grupos de especies (por morfología) y clados (por molecular), y que ambos enfoques muestran que no hay los suficientes elementos para delimitar el número de especies *sensu* Turner (1994b; 1995) debido a que: i) aunque si hay algo de variación morfológica, ésta no es lo suficientemente consistente para soportar la delimitación de especies, y ii) el complejo *Stachys coccinea* es claramente polifilético tal cual está circunscrito actualmente, presentándose incluso especies parafiléticas, siendo *S. lindenii* el ejemplo de esta situación, de acuerdo a lo observado en nuestros resultados, sin posibilidad de definir algún clado en particular.

Ambos resultados, nos conducen al dilema de clasificación mencionado por Salmaki *et al.* (2013): o se hace una circunscripción más amplia del complejo *Stachys coccinea* para incluir a todas las especies relacionadas, o se reduce el complejo y se retienen las especies monofiléticas. Se propone reducir el complejo *Stachys coccinea* a las siguientes tres especies: a *S. albotomentosa*, a *S. coccinea* (la cual incluiría a *S. jaimehintonii*, *S. manantlanensis*, *S. pacifica* y *S. torresii*), y a *S. lindenii*, todo esto en base a sus afinidades morfológicas y moleculares, quedando pendiente una revisión a mayor profundidad de esta última especie, por lo que el complejo *Stachys coccinea sensu* Turner no existe como grupo natural. La recircunscripción es razonable debido a que por un lado se mantienen las variedades geográficas que pueden ser reconocidas en campo (la taxonomía, en particular la taxonomía botánica, sigue basándose en caracteres morfológicos) y por el otro lado porque se está tomando en cuenta la información molecular que se tiene al momento.

Aún cuando es necesaria hacer esta recircunscripción, es importante resaltar la necesidad de mayor cantidad de información molecular para clarificar la situación de éstas especies.

Para el caso de las *Stachys* mexicanas, y en particular para las especies del complejo *Stachys coccinea*, es indispensable complementar los estudios con análisis biogeográficos que nos ayuden a entender de mejor manera qué es lo que está influenciando la variación morfológica con bajos niveles de variación genética entre estas especies. Este estudio pretende ser el inicio de más estudios de varios tipos enfocados a la clarificación de las relaciones entre las especies de *Stachys* reportadas en México, y en general pretende contribuir al conocimiento taxonómico de *Stachys* a nivel global.



GLOSARIO

Annulus : anillo de pelos de diferente longitud al interior de la corola o del cáliz.

Arréica : es una cuenca hidrográfica cuyas aguas, usualmente de caudales escasos, no desembocan ni en lagos ni en mares, pues se evaporan o se infiltran al suelo, desapareciendo del paisaje.

Caducifolio : término que se aplica a plantas que permanecen sin hojas durante una parte del año.

Cebador : también conocido como primer, es una pequeña cadena de nucleótidos a partir de la cual la DNAPolimerasa inicia la síntesis de una nueva cadena de DNA.

cpDNA : es el DNA propio del cloroplasto; presenta una estructura molecular circular y por lo regular presenta de 120mil a 170mil pares de bases de longitud.

Cima : tipo de inflorescencia definida con aspecto ancho y redondeado.

Crasicaule : término que se aplica a plantas con el tallo grueso y carnoso.

CTAB : por sus siglas en inglés: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide. Bromuro de hexadeciltrimetilamonio. Surfactante catiónico con acción antiséptica contra bacterias y hongos, es utilizado ampliamente como solución tamponante para la extracción de DNA.

Didínamo : con dos pares desiguales de estambres, generalmente un par más corto que el otro.

Endorréica : es una cuenca hidrográfica cuyas aguas no tienen salida hacia el océano, por lo que se denominan sistemas de drenaje interno.

Estolón : brote lateral, basal, con entrenudos largos que desarrolla raíces para formar una nueva planta en la punta.

Exorréica : es una cuenca hidrográfica cuyas aguas tienen salida al océano,

Ginobásico : cuando el estilo del gineceo de la flor está unido a la base del ovario en una cavidad central o entre los lóbulos del mismo.

Holártico : hace referencia a los hábitats encontrados en los continentes boreales del mundo como un conjunto, refiriéndose en particular como Neártico a la ecozona que comprende toda Norteamérica hasta el norte de México.

Intrón : también conocido como secuencia intercalada, es un segmento del transcrito primario de un gen eucariota que se elimina antes de ser traducido a RNAm maduro, y en estos casos, la secuencia del intrón no aparece en la molécula funcional de RNA.

Mesófilo : término aplicado en ecología para referirse a poblaciones vegetales que prefieren condiciones ambientales moderadas a abundantes, especialmente en los relativo a la humedad.

Núcula : cada una de las unidades indehiscentes, secas, procedentes de la división de un ovario sincárpico, súpero, plurilocular.

PCR : la Reacción en Cadena de la Polimerasa, por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction, es una de las técnicas más utilizadas en biología molecular para la amplificación de secuencias específicas de DNA.

Perennifolio : término que se aplica a plantas o poblaciones vegetales que permanecen con hojas durante todo el año.

Rizoma : tallo plagiótopo, generalmente subterráneo.

Rosetófilo : término que se aplica a plantas con hojas organizadas en roseta.

Subcaducifolio : término que se aplica a poblaciones o individuos vegetales que dejan caer sus hojas durante la temporada de sequía.

Taxa : plural de taxón. Conjunto de organismos emparentados, y puede ser de distintos niveles (especie, género, familia, etc).

Tricoma : prominencia que consiste solamente de tejidos epidérmicos, a menudo en forma de pelo.

Turbinado : Obconico, en forma de cono con el vértice obtuso.

Verticilo : cada grupo de unidades o piezas florales; algunas veces el término se utiliza para describir cada agrupación cíclica dentro de un mismo grupo floral.

Voucher : espécimen de referencia a partir del cual se obtienen los datos de referencia de una hipótesis taxonómica, de éstos sobresalen los tipos nomenclaturales.

Xerófilo : término aplicado en ecología para referirse a poblaciones vegetales que están adaptadas a la escasez de agua en la zona en la que habitan (por escasez de precipitación, por elevada evapotranspiración o por la estructura del suelo que no retiene la humedad).

BIBLIOGRAFÍA

- Andersson, L. & H.E. Rova. 1999. The rps16 intron and the phylogeny of the Rubioideae (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 214: 161-186.
- Bailey, C.D., M.A. Koch, M. Mayer, K. Mummenhoff, S.L. O'Kane, S.I. Warwick, M.D. Windham & I.A. Al-Shehbaz. 2006. Towards a global phylogeny of the Brassicaceae. *Molecular Biology and Evolution*, 23: 2142-2160.
- Beilstein, M.A., I.A. Al-Shehbaz, & E.A. Kellogg. 2006. Brassicaceae phylogeny and trichome evolution. *American Journal of Botany*, 93: 607-619.
- Bräuchler, C., H. Meimberg, T. Abele & G. Heubl. 2005. Polyphyly of the genus *Micromeria* (Lamiaceae) – evidence from cpDNA sequence data. *Taxon*, 54(3): 639-650.
- Bunsawat, J., N.E. Elliott, K.L. Hertweck, E. Sproles & L.A. Alice. 2004. Phylogenetics of *Mentha* (Lamiaceae): evidence from chloroplast DNA sequences. *Systematic Botany*, 29(4): 959-964.
- Cantino, P.D. & R.W. Sanders. 1986. Subfamilial classification of Labiatae. *Systematic Botany*, 11(1): 163-185.
- Chang, V. & E.N. Smith. 2001. FastMorphologyGFC Version 1.0. Available on: [www3.uta.edu/faculty/ensmith].
- Clement, M., D. Posada & K.A. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9(10): 1657-1660.
- CONABIO. 1998. La diversidad biológica de México: estudio del país, 1998. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. Pp.: 62-102.
- Corriveau, J.L. & A.W. Coleman. 1988. Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species. *American Journal of Botany*, 75: 1443-1458.
- Crisci, J.V. 1983. Introducción a la teoría práctica de la taxonomía numérica. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos. Washington, D.C. 132 p.
- Darriba, D., G.L. Taboada, R. Doallo & D. Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristic and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8): 772.

- Downie, S.R. & D.S. Katz-Downie. 1999. Phylogenetic analysis of chloroplast *rps16* intron sequences reveals relationships within the woody southern African Apiaceae subfamily Apioideae. *Canadian Journal of Botany*, 77: 1120-1135.
- Doyle, J.J. & J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1): 11-15.
- Dündar, E., E. Akçiçek, T. Dirmenci & S. Argün. 2013. Phylogenetic analysis of the genus *Stachys* sect. *Eriostomum* (Lamiaceae) in Turkey based on the nuclear ribosomal ITS sequences. *Turkish Journal of Botany*, 37: 14-23.
- Epling, C. 1934. Preliminary revision of american *Stachys*. *Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis Beihefte*, 80: 1-75.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Fothergill, M., C.T. Morgan, S. Jones, T.P.T. Michaelson-Yeates & D.A. Davies. 2001. Using leaf-mark material to monitor the morphology of white clover (*Trifolium repens* L.) at the clone and ramet level in grazed swards. *Annals of Botany*, 88(special issue): 797-802.
- Galen, C. 1999. Why do flowers vary? *BioScience*, 49(8): 631-640.
- García Zuñiga, A. 2001. Labiatae. Pp.: 624-648. *En*: Rzedowsky, G.C. & J. Rzedowsky (eds.). Flora fanerogámica del Valle de México. 2da edición. Instituto de Ecología, A.C. y CONABIO. Pátzcuaro, Michoacán.
- Gonzalez-Gallego, J.G. 2015. *Stachys harkeriae* (Lamioideae, Lamiaceae), a new species from western Mexico. *Annales Botanici Fennici*, 52: 345-351.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Harley, R.M., S. Atkins, A.L. Budanstsev, P.D. Cantino, B.J. Conn, R. Grayer, M.M. Harley, R. de Kok, T. Krestovskaja, R. Morales, A.J. Paton, O Ryding & T. Upson. 2004. Labiatae. *In*: K. Kubitzki & J.W.Kadereit (eds.). Labiatae. The families and genera of vascular plants VII. Flowering plants dicotyledons: Lamiales (except Acanthaceae, including Avicenniaceae). Springer. Berlin. Pp.: 167-275.
- Hedge, I.C. 1992. A global survey of the biogeography of the Labiatae. Pp.: 7-17. *In*: Harley, R.M. & T.P. Reynolds (eds.). Advances in Labiatae science. Royal Botanical Gardens, Kew.

- Huang, X. 1991. A contig assembly program based on sensitive detection of fragment overlaps. *Genomics*, 14(1): 18-25.
- Jenks, A.A., J.B. Walker & S.C. Kim. 2013. Phylogeny of New World *Salvia* subgenus *Calosphace* (Lamiaceae) based on cpDNA (*psbA-trnH*) and nrDNA (ITS) sequence data. *Journal of Plant Research*, 126(4): 483-496.
- Judd, W.S., C.S. Campbell, E.A. Kellogg, P.F. Stevens & M.J. Donoghue. 2002. Plant systematics. A phylogenetic approach. 2nd edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. 576 p.
- Kelchner, S.A. 2000. The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 87:482-498.
- Koeppen, W. 1948. Climatología. Fondo de Cultura Económica. México. 478 p.
- Li, Q.Q., M.H. Li, Q.J. Yuan, Z.H. Cui, L.Q. Huang & P.G. Xiao. 2012. Phylogenetic relationships of *Salvia* (Lamiaceae) in China: evidence from DNA sequence datasets. *Journal of Systematics and Evolution*, 51(2): 184-195.
- Li, Z. & D. Yu. 2009. Factors affecting leaf morphology: a case study of *Ranunculus natans* C.A. Mey. (Ranunculaceae) in the arid zone of northwest China. *Ecological Research*, 24: 1323-1333.
- Lindqvist, C. & V.A. Albert. 2002. Origin of the Hawaiian endemic mints within North American *Stachys* (Lamiaceae). *American Journal of Botany*, 89(10): 1709-1724.
- Mai, D.H. 2001. Die mittelmiozaenen und obermiozaenen Floren aus der Meuroer und Raunoer Folge in der Lausitz: Teil II: Dicotyledonen. *Palaeontographica Abteilung B Palaeophytologie*: 35-174.
- Martínez-Gordillo, M., I. Fragoso-Martínez, M.R. García-Peña & O. Montiel. 2013. Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84: 36-86.
- Mayr, E. 1969. Principles of systematic zoology. McGraw-Hill. New York, USA. 434 p.
- Miller, M.A., W. Pfeiffer & T. Schwartz. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*: 1-8.

- Moore, B.R. & M.J. Donoghue. 2007. Correlates of diversification in the plant clade Dipsacales: geographic movement and evolutionary innovations. *The American Naturalist*, 170(S2): 28-55.
- Moreno, N.P. 1984. Glosario Botánico Ilustrado. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V. México. 300 pp.
- Mulligan, G.A. & D.B. Munro. 1989. Taxonomy of species of North American *Stachys* (Labiatae) found north of Mexico. *Le Naturaliste Canadien*, 116: 35-51.
- Oxelman, B., M. Linden & D. Berglund. 1997. Chloroplast *rps16* intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 206: 393-410.
- Ramamoorthy, T.P. & M. Elliott. 1993. Mexican Lamiaceae: diversity, distribution, endemism, and evolution. Pp.: 513-539. In: Ramamoorthy, T.P., R. Bye, A. Lot & J. Fa (eds.). Biological diversity of Mexico: origins and distribution. Oxford University Press. USA.
- Rohlf, F.J. 1998. NTSYS-PC, Numerical taxonomy an Multivariate Analysis System. New York: Exeter Software.
- Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D.L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M.A. Suchard & J.P. Huelsenbeck. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61: 539-542.
- Roy, T., T.H. Chang & C. Lindqvist. 2013. Phylogeny and biogeography of New World Stachydeae (Lamiaceae) with emphasis on the origin and diversification of Hawaiian and South American taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69: 218-238.
- Roy, T., L.W. Cole, T.H. Chang & C. Lindqvist. 2015. Untangling reticulate evolutionary relationships among New World and Hawaiian mints (Stachydeae, Lamiaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 89: 46-62.
- Rueffler, C., T.J.M. Van Dooren, O. Leimar & P.A. Abrams. 2006. Disruptive selection and then what? *Trends in Ecology and Evolution*, 21(5): 238-245.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Ed. Limusa. México. 432 p.
- Salmaki, Y., S. Zarre, R. Govaerts & C. Bräuchler. 2012. A taxonomic revision of the genus *Stachys* (Lamiaceae: Lamioideae) in Iran. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 170: 573-617.

- Salmaki, Y., S. Zarre, O. Ryding, C. Lindqvist, C. Bräuchler, G. Heubl, J. Barber & M. Bendiksby. 2013. Molecular phylogeny of tribe Stachydeae (Lamiaceae subfamily Lamioideae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(3): 535-551.
- Sanger, F., S. Nicklen & A.R. Coulson., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 74(12): 5463-5467.
- Scheen, A.C., M. Bendiksby, O. Ryding, C. Mathiesen, V.A. Albert & C. Lindqvist. 2010. Molecular phylogenetics, character evolution, and suprageneric classification of Lamioideae (Lamiaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 97: 191-217.
- Shaw, J., E.B. Lickey, E.E. Schilling & R.L. Small. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*, 94: 275-288.
- Smith, E.N. & R.L. Gutberlet Jr. 2001. Generalized frequency coding: a method of preparing polymorphic multistate characters for phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, 50(2): 156-169.
- St. Hilaire, R. & W.R. Graves. 1999. Foliar traits of sugar maples and black maples near 43°N latitude in the eastern and central United States. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124(6): 605-611.
- Standley, P.C. & L.O. Williams. 1973. *Stachys*. In: Flora of Guatemala. Fieldiana: *Botany*, 24: 310-314.
- Swofford, D.L. 2000. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4. Sinauer. Sunderland, Massachusetts, USA.
- Taberlett, P., L. Gielly, G. Pautou & J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17: 1105-1109.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski & S. Kumar. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins & T.J. Gibson. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22): 4673-4680.

- Toledo, V.M. 1988. La diversidad biológica de México. *Ciencia y Desarrollo*, XIV(81): 17-30.
- Turner, B.L. 1994a. Synopsis of mexican and central american species of *Stachys* (Lamiaceae). *Phytologia*, 77(4): 338-377.
- Turner, B.L. 1994b. Taxonomic study of the *Stachys coccinea* (Lamiaceae) complex. *Phytologia*, 76(5): 391-401.
- Turner, B.L. 1995. A new species of *Stachys* (Lamiaceae) from the Sierra de Manantlan of Jalisco, Mexico. *Phytologia*, 78(3): 209-210.
- Uribe-Salas, D., C. Sáenz-Romero, A. González-Rodríguez, O. Téllez-Valdéz and K. Oyama. 2008. Foliar morphological variation in the white oak *Quercus rugosa* Née (Fagaceae) along a latitudinal gradient in Mexico: potential implications for management and conservation. *Forest Ecology and Management*, 256: 2121-2126.
- Vargas, P. 2003. Molecular evidence for multiple diversification patterns of alpine plants in Mediterranean Europe. *Taxon*, 52: 463-476.
- Wallander, E. & V.A. Albert. 2000. Phylogeny and classification of Oleaceae based on rps16 and trnL-F sequence data. *American Journal of Botany*, 87(12): 1827-1841.
- Walters, D.R. & D.J. Keil. 1996. Vascular plant taxonomy. 4th edition. Kendall/Hunt Publishing Company. Dubuque, Iowa. Pp.: 265-294.
- Welch, A.J., K. Collins, A. Ratan, D.I. Drautz-Moses, S.C. Schuster & C. Lindqvist. 2016. The quest to resolve recent radiations: plastid phylogenomics of extinct and endangered Hawaiian endemic mints (Lamiaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 99: 16-33.
- Wiens, J.J. 2004. The role of morphological data in phylogeny reconstruction. *Systematic Biology*, 53(4): 653-661.
- Wink, M. & M. Kaufmann. 1996. Phylogenetic relationships between some members of the subfamily Lamioideae (family Labiatae) inferred from nucleotide sequence of the *rbcL* gene. *Botanica Acta*, 109: 139-148.

ANEXO A.

DATOS DE COLECTA DE EJEMPLARES UTILIZADOS EN EL PRESENTE ESTUDIOS.

1. *Stachys albotomentosa* Ramamoorthy var. *albotomentosa*

QUERÉTARO: mpio. Landa: 1.5 al Suroeste de La Yesca, *Hiram Rubio 1010* (MEXU); 2 km al Sureste de La Yesca, El Banco, *Hiram Rubio 1984* (MEXU); mpio. Jalpan: 4-5 km al Oriente y Sur de La Parada, *Benito Servin 125* (MEXU); cerro La Cercada, camino Joya del Duraznal, *Crecencio Guzmán M 165* (MEXU); mpio. Pinal de Amoles: +-2km al E de San Pedro El Viejo, *E. Carranza 560* (MEXU).

2. *Stachys bigelovii* A. Gray

ZACATECAS: 3.1 rd. miles above Concepcion del Oro, on ridge Wof city, on S-facing granite slopes, *James Henrickson 6283* (MEXU).

3. *Stachys boraginoides* Schltld. & Cham.

VERACRUZ: mpio. Coatepec: carretera vieja Jalapa-Coatepec, antes de Consolapa, *Heike Vibrans 7062* (MEXU).

4. *Stachys coccinea* Ortega

AGUASCALIENTES: mpio. Calvillo: km 15 Malpaso-Sierra del Laurel, *Carmen Cuéllar R. 17* (HUAA); Salto del Pilar, *Gerardo García R. 2406* (HUAA); mpio. San José de Gracia: 4.5km al SW de Paredes (Arroyo Viejo), *Margarita de la Cerda L. 6133* (HUAA); ejido El Bajío, Sierra San Blas de Pabellón, *Gerardo García R. 1948* (HUAA), *Gerardo García R. 1949* (HUAA). BAJA CALIFORNIA SUR: in south-heading branch of Cañon del Gavilán, Sierra de la Giganta, *Annetta Carter 4090* (MEXU). CHIHUAHUA: mpio. Guerrero: between Nogal and Ranchito Blanco on San Juanito-La Junta road, *Robert A. Bye 9093* (MEXU); mpio. Ocampo: Parque Nacional de Cascada Basaseachic, *R. Spellenberg 8049* (MEXU); W-SW of Buenaventura ca. 12 air miles, Rancho de La Tinaja, *M.H. Mayfield 188* (MEXU). DURANGO: mpio. Durango: 13km al O por la carretera Durango-Mazatlán, *José García P. 882* (MEXU); mpio. Topia: Topia, *P. Tenorio L. 9869* (MEXU). GUERRERO: 26 km SW de Filo de Caballo, carr. a Puerto del Gallo, *E. Martínez S. 4942* (MEXU); mpio. Atoyac de Álvarez: 2 km al SW de Puerto del Gallo,

camino a Atoyac, *E. Martínez S. 5610* (MEXU); mpio. General Heliodoro Castillo (Tlacoapa): El Jilguero, 13 km al NO, *Ramiro Cruz Duran 3683* (MEXU); El Jilguero, 13.3 km al NO, *Ramiro Cruz Duran 3574* (MEXU). JALISCO: mpio. Ojuelos: extremo sur del cerro La Alberca, 6 km al NE de Ojuelos, *Roberto Banda 193a* (MEXU); mpio. Talpa: camino La Crucecita-El Desmoronado, *R. González Tamayo 308* (MEXU). ESTADO DE MÉXICO: mpio. Ecatepec: Sierra de Guadalupe, entre Cuatepec y San Andrés, *S. Moreno G. 295* (MEXU); mpio. Ixtapaluca: cerro del Pino, laderas inferiores SW, *M. Mayagoitia P. 71* (MEXU); Parque Nacional Lagunas de Zempoala, *J.G. Teer 58* (MEXU). HIDALGO: cerca de El Salto, km 252.5 de la carr. Jacala-Zimapan, *C.L. Lundell 12269* (MEXU). MICHOACAN: along Mexico highway 15 between Morelia and Toluca, 19.4mi east of Mexico highway 120 at the eastern edge of Morelia and 26.6mi west of Mexico highway 51 at Triguillos, *James L. Reveal 4151* (MEXU); en El Salto, 29km al E de Morelia, *José C. Soto Nuñez 6340* (MEXU). OAXACA: along Oaxaca-Tuxtepec highway (Mex 175) ca. 20 km by road N of Oaxaca at km 220.5, *R. Sanders 74133* (MEXU); Cerro San Antonio, *C. Conzatti 1965* (MEXU); mpio. Atepec: La Cabaña, *F. Ventura A. 16118* (MEXU). QUERÉTARO: Jardín botánico regional de Cadereyta "Ing. Manuel González de Cosío", *Rafael Hernández M. 9749* (MEXU). SONORA: mpio. Yecora: a 4 km al W de El Talayote ó 35 km al E de Yecóra, límites de Sonora y Chihuahua, *P. Tenorio L. 4546* (MEXU). VERACRUZ: mpio. Acultzingo: La Barranca del Tule, *Francisco Ventura 15439* (MEXU).
5. *Stachys drummondii* Benth.

NUEVO LEÓN: mpio. Cadereyta: 1.2 km SW of the junction with the main road from Cadereyta to Allende towards Santiago along the road through La boca Canyon to Santiago in the Sierra La Silla y lowlying areas; east of the Sierra La Silla, *Carolyn J. Ferguson 7* (MEXU).

6. *Stachys lindenii* Benth.

MICHOACAN: carretera Zitácuaro-Toluca, en Boca de Cañada 19km al NE de Zitácuaro, *José C. Soto Nuñez 3830* (MEXU); mpio. Zitácuaro: 15 km al SO de Zitácuaro, *T.P. Ramamoorthy 4450* (MEXU). NAYARIT: Islas Marías: Isla María Madre, antena de telecomunicaciones, *Fernando Chiang C. 1137* (MEXU). OAXACA: 2 km al N de San Miguel Metepec, distrito Mixe, *R. Torres C. 4968* (MEXU). PUEBLA: Cerro de Cohautepec, *A.J. Sharp 441728* (MEXU). SINALOA: mpio. Cosalá: Vado Hondo a 8km al

pte. de Cosalá, *Rito Vega 2241* (MEXU). VERACRUZ: mpio. Hidalgotitlán: 4 km brecha Cedillo a Melgar, Brigada Vázquez 1343 (MEXU).

7. *Stachys manantlanensis* B.L. Turner

JALISCO: about 15 mi SE of Autlan near trail from Chante to Rancho Manantlán and thence SE 3-4 hours toward El Cuartón, *Rogers McVaugh 10274* (MEXU).

8. *Stachys nepetifolia* Cav.

MEXICO: mpio. Coyotepec: parte alta de la Sierra de Alcaparrosa, Rzedowski 38214 (MEXU).

9. *Stachys pacifica* B.L. Turner

JALISCO: El Tigre, along hwy. 80, 14.6 mi S turn to Ahuacapan, *T.F. Daniel 4873* (MEXU). SONORA: Arroyo Gochico, about 4.5 km east of San Bernardo, where the ridge-top trail from Gochico Viejo to San Bernardo enters the canyon below the cajon, *Mark Fishbein 2137* (MEXU); San Bernardo, Río Mayo, *Howard Scott Gentry 1144* (MEXU).

10. *Stachys vulnerabilis* Rzed. & Calderón

NUEVO LEON: mpio. Galeana: cerro El Potosí, summit, *Hinton et al. 25333* (MEXU).

ANEXO B.

CUADRO COMPARATIVO DE ESPECIES PERTENECIENTES AL COMPLEJO *Stachys coccinea* Ortega (LAMIACEAE).

La información presentada corresponde a datos proporcionados por la literatura (*Turner, 1994b; **Turner, 1995; ***Standley & Williams, 1973). El -- indica ausencia de información en la bibliografía consultada. SA: *S. albotomentosa*, SC: *S. coccinea*, SJ: *S. jaimehintonii*, SL: *S. lindenii*, SM: *S. manantlanensis*, SP: *S. pacifica* y ST: *S. torresii*.

	SA	SC	SJ	SL	SM	SP	ST
Literatura	*	*	*	***	**	*	*
Forma de vida	Herbácea subarborescente.	Herbácea erecta	Herbácea suculenta	Herbácea semitrepadora	Herbácea erecta a semiprostrada	Herbácea erecta	Herbácea
Duración	ND	Perenne	--	--	--	Perenne	Perenne
Alto de la planta	30-50 cm	40-150 cm	50 cm	200+ cm	20-40 cm	40-150 cm	ca 40 cm
Ancho del tallo	2-4 mm	2-4.8 mm	2-4 mm	--	1-2 mm	1.5-3.0 mm	ca 3 mm
Indumento del tallo	Densamente tomentoso	Pubescente usualmente piloso	Minuciosamente pubescente	--	Escasa a moderadamente pubescente	Escasa a moderadamente piloso	Escasamente pubescente
Accesorios del tallo	--	--	--	Aguijones recurvados de base ancha	--	--	--
Pelos glandulares en tallo (longitud)	--	--	Presentes (ca 0.1 mm)	--	Ausentes	Presentes (0.1-0.3 mm), Ausentes	Presentes (ca 0.25 mm)

	SA	SC	SJ	SL	SM	SP	ST
Características de los pelos del tallo	--	Extensos	Multiseptados erectos	(se refieren como los agujones)	Curvados hacia abajo	Extensos	Base ancha
Longitud de los pelos del tallo	--	--	0.5-2 mm	--	0.1-0.6 mm	0.7-1.5 mm	1-1.5 mm
Longitud de las hojas (mitad del tallo)	4 - 8 cm	6-10 (12) cm	8-15 cm	5-13 cm	4 - 10 cm	7 - 11 cm	10 cm
Ancho de las hojas (mitad del tallo)	1.5 - 3.5 cm	3 - 4 (5) cm	4 - 7 cm	--	1.5 - 4 cm	3 - 5 cm	5 cm
Peciolos	1 - 3 cm	1 - 3 cm	2.5 - 5 cm	long	1.5 - 4 cm	(3) 4 - 5 (6) cm	ca 3.5 cm
Indumento del peciolo	--	--	Pubescente	--	--	--	--
Lamina de la hoja	Ovada a deltoide	Ovada a ovadocordada	Cordada	Ovada a oblongoovada	Ampliamente ovada	Cordada	Cordada
Nervadura de hoja	--	3 - 5 nervada	--	--	3 - 5 nervada	--	3 - 5 nervada
Indumento de la hoja	Densamente aterciopelada y tomentosa debajo	Variadamente pilosa (moderado)	Escasamente pubescente (pelos aplanados)	Haz hirsuto, envés pelos retróscos con bases gruesas / glabro.	Escasamente pilosa	Escasamente pilosa	Escasamente pilosa
Margen de la hoja	Finamente crenulado	Crenulado	Crenulodentado	Crenulodentado	Crenulodentado	Crenulodentado	Crenulado

	SA	SC	SJ	SL	SM	SP	ST
Inflorescencia	--	Laxa terminal	Espiga columnar terminal	Espigas largas o flores axilares	--	Laxa terminal interrumpida	Laxa terminal interrumpida
Largo de inflorescencia	--	--	8 - 15 cm	--	--	--	--
Ancho de inflorescencia	--	--	3 - 4.5 cm	--	--	--	--
Brácteas (longitud)	Presentes	Presentes	Presentes (15 - 25 mm)	Presentes	--	--	Presentes
Verticilos florales	4 - 6	4 - 6	6	1-6	(2) 4 - 6	(2) 4 - 6	4 - 6
Pedúnculos (longitud)	Presentes Ausentes	--	--	--	Presentes (1 - 4 mm)	--	--
Longitud del pedicelo	--	--	2 - 3 mm	--	--	--	--
Forma del cáliz	Tubular	Tubular	--	--	--	--	--
Indumento del cáliz (longitud del pelo)	Piloso aterciopelado	Pubescente a piloso	Pubescente (0.5 - 2.5 mm)	Piloso a glabro	Escasamente piloso	Minuciosamente pubescente	Pubescente
Pelos glandulares en el cáliz (longitud)	--	Presentes	--	--	Ausentes	Presentes	Presentes (ca 0.5 mm)

	SA	SC	SJ	SL	SM	SP	ST
Longitud total del cáliz	12 - 14 mm	(6) 7 - 12 mm	12 - 14 mm	--	6 - 8 mm	4 - 6 (7) mm	13 - 14 mm
Longitud del tubo del cáliz	(7) 10 12 mm	--	8 - 10 mm	6 - 7 mm	4 - 5 mm	--	6 - 7 mm
Longitud del lóbulo del cáliz	2.5 - 3.5 mm	2 - 4 (5) mm	ca 4 mm	3.5 - 4.5 mm	2 - 3 mm	2 - 4 mm	6 - 7 mm
Ancho de la base del lóbulo del cáliz	--	--	2 - 3 mm	--	--	--	--
Forma del lóbulo del cáliz	Estrechamente acuminado	Apiculado	Apiculado ciliado	Deltoide lanceolado	Lanceolado aristado (superior más largo que inferior)	Linear lanceolado a estrechamente triangular	Linear lanceolados
Color de la corola	Salmón a rojo	Naranja a rojo	Naranja	Rojo brillante a rojo purpúreo	Magenta a lilas	Rojas	Naranja a rojo
Longitud total de la corola	--	15 - 25 mm	--	--	12 - 20 mm	2.5 - 3.5 cm	3 - 3.5 cm
Longitud del tubo de la corola	14 - 20 mm	--	15 - 18 mm	18 - 23 mm	10 - 13 mm	20 - 25 mm	--
Ancho del tubo de la corola	--	--	--	--	--D	2 - 3.5 mm	--

	SA	SC	SJ	SL	SM	SP	ST
Distancia del annulus desde la base	ca 4 mm	3 - 4 mm	ca 4 mm	--	ca 2.5 mm	ca 2 mm	ca 3 mm
Longitud del labio superior	ca 6 mm	4 - 6 mm	ca 7 mm	6 - 7 mm	ca 4 mm	4 - 5 mm	ca 9 mm
Longitud del labio inferior	ca 9 mm	6 - 9 mm	ca 8 mm	12 - 14 mm	5 - 8 mm	4 - 10 mm	12 mm
Estambres	Exsertas (ca 4 mm)	Exsertos (4 - 6 mm)	Exsertas (ca 4 mm)	Incluidos en el labio superior	Exsertas (ca 4 mm)	Exsertos (7 - 10 mm)	--
Longitud de las anteras	--	ca 1 mm	--	--	--	ca 0.7 mm	--
Forma de la núcula	ND	Ovoide	--	--	Ovoide	Obovoide a ovoide	Ovoide
Longitud de la núcula	ca 2.2 mm	ca 2.5 mm	ca 2 mm	--	2 mm	ca 1 - 3 mm	ca 2.5 mm
Ancho de la núcula	1.8 mm	2 mm	1.9 mm	--	1.6 - 1.7 mm	2 mm	2 mm
Ornamento de la núcula	Minuciosament e rugoso	Minuciosament e rugoso	Minuciosament e rugoso a lisa	--	Al madurar con excrecencias verrugosas	Minuciosament e rugosa con enconstramientos ocasionales	Minuciosament e rugoso
Estructuras especiales	--	Rizomas cortos	--	--	Estolones	Rizomas	--

ANEXO C.

MATRIZ DE DATOS MORFOLÓGICOS.

Parte 1. La información presentada corresponde a las mediciones obtenidas de los ejemplares utilizados en el estudio. La codificación de las especies es de acuerdo a la tabla 2 y la codificación de los caracteres y estados de carácter es de acuerdo a la tabla 3.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
SA021	50	8	0	0	4	1	3.2	2.6	2.6	0	4	5	1	3	1.2	4	6	2.6	0.3	5	2.9	1.7
SA022	50	7	1	0	1	1	3.8	1.2	0.9	0	3	5	1	3	1	5.75	6	2.3	0.3	4	2.8	2.7
SA023	65	7	1	0	4	1	5.35	2.05	2.2	0	3	5	1	4.25	1.3	4.9	6	2	0.3	7	3.9	3
SA024	---	7	1	0	4	1	4.3	2	1.25	0	3	5	4	4.3	1.2	11	5	2.1	0.2	7	3.4	4
SA025	100	7	0	0	2	1	4.2	1.5	1.5	0	3	5	1	4	1.2	3.5	6	2.5	0.2	2	3.8	2.5
SC001	---	2	---	0	3	1	5.3	3.3	3.4	1	3	2	3	4	2.2	10.2	6	1	1	4	2.7	1.5
SC002	---	2	1	0	4	1	7	4.5	4	1	2	1	1	5	1.5	14.8	6	2.8	0.4	4	2.8	2.4
SC003	---	2	1	0	2	1	5	3.5	4.5	1	2	1	3	2.5	1.2	14.5	6	1	0.3	4	2.4	1.4
SC007	50	2	---	0	4	1	5.5	3.5	3.1	1	2	1	1	1.5	0.6	6	6	1.7	0.3	2	2.8	2.8
SC008	---	2	0	0	2	1	6.4	4	3.6	1	2	1	1	4.7	2.1	16.7	6	1.5	0.2	---	3	2.5
SC047	---	6	0	0	3	1	5.2	4.4	3	0	2	3	4	2.8	1.3	9	6	1.4	0.2	4	2.9	2.8
SC058	---	3	0	0	3	3	7.8	6.5	6	1	3	2	3	4.2	2.8	15.4	6	1.7	0.4	4	2.9	6
SC062	43.5	7	1	0	3	1	3.3	2.4	2	0	3	2	1	4	1.4	10.9	6	0.7	0.2	4	3.3	3.3
SC063	---	1	0	0	1	1	4.8	1.4	2.2	0	3	2	1	2.3	0.6	6.9	6	1.2	0.5	4	2.8	1.6
SC065	65	1	0	0	1	1	3.5	2.1	1.8	0	2	2	1	4.3	2.1	14.1	5	0.6	0.2	6	3.2	3
SC072	100	2	0	0	4	1	4.4	2.4	2.1	0	3	2	1	2.5	1.1	11.2	6	1.3	0.2	4	3	2.1
SC074	60	4	0	0	4	2	9.5	3.5	7.5	0	2	1	1	6.3	1.9	11.3	6	1	0.2	7	2.7	2.6
SC076	---	8	0	0	4	1	5.8	4.1	2.5	1	4	5	1	4.8	1.9	6.1	6	1.4	0.2	8	2.15	3.3
SC077	100	3	1	0	4	1	6.6	2.8	1.1	0	2	3	1	5.2	1.4	10.3	6	1.1	0.2	2	2.35	2.9
SC078	50	3	0	0	4	1	5.8	2.9	2.6	0	2	1	4	4.1	2.2	11.5	5	1.5	0.2	2	2.7	3
SC087	60	2	0	0	4	1	3.6	2.5	1.3	0	2	2	1	2.2	1	15.1	5	1.4	0.5	8	2.7	3.7

Continuación de la matriz de datos morfológicos, Parte 1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
SC090	100	5	0	0	2	2	10	6	4.5	0	2	1	1	3.1	1.4	10	6	1.8	0.4	7	2.3	1.8
SC091	150	3	0	0	4	1	9	5.2	3	0	3	2	2	4.1	2	9.1	6	2.5	0.6	7	2.6	4
SC092	50	3	1	0	2	1	4.4	2.7	2.1	0	2	1	1	4.35	1.8	8.7	6	1.6	0.4	7	2.9	3.6
SC097	3	1	0	0	4	1	4.9	2.5	2	0	2	1	4	4.5	---	9.5	6	1	0.2	4	2.3	1.5
SC098	---	3	1	0	3	1	4	2.5	2.8	1	3	3	---	---	---	---	---	1	0.15	---	2.9	2.8
SC101	---	1	0	1	3	1	8	6.3	6.1	0	2	1	4	8.2	4.5	7.8	6	2.1	0.3	7	2.6	3.7
SC103	---	3	1	0	4	1	3.7	2.8	2.3	1	2	3	1	1.1	0.5	5.6	6	1.3	0.2	2	2.45	2.4
SC104	60	3	1	0	3	1	4.4	3.4	3.6	0	2	3	1	2.5	1.1	14.4	6	1.5	0.2	7	3.1	2.4
SC107	---	4	1	1	4	1	2.6	1.3	1.3	0	3	2	1	1.6	0.7	12.5	6	1.2	0.2	6	1.85	2.4
SC108	80	2	1	0	4	1	2.9	1.3	1.9	1	3	2	1	1.1	3	13.7	6	0.6	0.15	4	2.1	2
SC111	60	7	1	0	4	1	3.5	2.3	2.3	1	3	4	4	3.5	1.6	11.9	6	1	0.15	4	3.7	1.9
SC115	60	2	0	0	4	1	3.4	1.6	1.6	0	3	2	1	1.4	0.7	8.9	6	1	0.3	4	2.5	2.1
SC118	80	2	0	0	2	2	4.7	3.2	6.2	0	2	3	4	9.8	4	16.1	6	2.5	0.4	4	2.4	2.5
SJ01	50	7	1	0	---	2	15	7	5	1	2	2	---	2.5	---	---	6	---	---	7	2.6	3
SL033	---	3	0	0	2	1	4.1	2.6	3.1	0	2	3	4	3.85	2.4	11	9	1.7	0.25	2	2.2	2.75
SL034	---	1	1	1	4	1	7	3	3	1	2	1	4	3.65	1.3	7.5	6	1.6	0.2	8	2.6	2.7
SL038	---	2	1	0	2	1	7	5	8.4	1	2	1	1	5.6	2.5	13	5	0.8	0.1	4	2.6	4.15
SL041	---	1	0	1	4	4	5.5	3.4	3.4	0	2	1	2	4	2.2	6.1	6	2	0.45	1	3.7	3
SL045	50	2	0	0	4	1	6	4	3.4	1	1	1	2	3.15	1.2	9.8	6	0.7	0.3	4	2.5	3.8
SL046	70	1	0	1	3	1	6.2	5.1	2.1	0	2	1	3	6	3.8	13	6	1.6	0.15	4	2.1	4.3
SL049	---	1	0	1	3	1	5.7	5.3	3.1	0	3	2	1	---	---	8	6	0.9	0.1	3	2.7	3.3
SM095	---	2	1	0	3	1	4.4	3.3	3.1	0	2	1	3	5	2.8	7.3	6	2.1	0.4	4	3	2.8
SP050	50	5	0	0	3	1	9.5	6	7	0	2	1	1	4.5	1.4	5.1	6	0.7	0.05	4	2.37	2.1
SP051	90	5	1	0	3	1	7.3	5.6	5.5	0	2	1	1	2.5	1.1	10.1	6	1.1	0.1	---	3	3.7
SP052	---	2	1	0	3	1	3.4	2.4	1.4	0	1	1	1	3.1	1.5	12.5	5	1	0.1	4	3	3.5
ST01	40	---	1	0	3	1	10	5	3.5	---	---	---	---	---	---	---	6	---	---	4	3.6	---

Continuación de la matriz de datos morfológicos, Parte 1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
SBi126	42	2	0	0	2	1	1.9	1.1	0.8	1	2	1	1	1.5	0.4	5	6	1.9	0.3	9	1.6	1
SNe128	70	2	0	0	4	1	2.8	1.5	6	1	2	2	1	2.1	0.9	6.5	6	1.5	0.15	12	1	1
SDr129	70	1	1	0	3	2	5.8	4	3.5	1	1	2	1	1.7	0.4	7.6	6	1.5	0.3	11	1.5	1.5
SBo130	150	1	1	0	3	1	6.4	4.3	4.7	0	1	2	3	7.5	2.9	9	6	2	0.5	10	1.7	2
SVu131	30	1	0	0	3	1	2.8	1.5	1	1	2	1	3	1.8	0.7	3.5	6	1	0.2	2	14.5	1

Parte 2. La información presentada corresponde a las mediciones obtenidas de los ejemplares utilizados en el estudio. La codificación de las especies es de acuerdo a la tabla 2 y la codificación de los caracteres y estados de carácter es de acuerdo a la tabla 3.

	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
SA021	10	2	1.3	3.2	2.8	1.7	4	7	11.5	6.3	8	0.9	3	1.4	1.9	0.2	3.4	0.2	0.4	0	0
SA022	11	1.9	1.4	3.3	2.7	1.6	3.8	5.1	11	7	8.5	0.5	3	1.5	2.1	0.25	3.75	0.4	0.6	0	0
SA023	11.5	2.7	1.2	3.3	3.8	2.8	3.5	5.5	10	6.5	7.5	0.8	3	1.7	2	0.35	4.25	0.4	0.5	0	0
SA024	11	2.7	1.1	3.3	3.3	2.2	3.1	5	11	6.1	8	0.7	3	1.4	2.55	0.25	5	0.35	0.6	0	0
SA025	11	2	1.5	3	3.7	2.5	3.5	7	12	6.5	9	1	3	1.5	2.9	0.25	4.5	0.35	0.5	0	0
SC001	9	1.6	6	2.8	2.6	1.7	3	5	9	6	7.6	0.4	4	1.1	2.1	0.2	4	0.7	0.8	1	0
SC002	9	1.7	1	2.9	2.7	1.8	2.4	4.5	9	7.2	8	0.5	3	1.2	2.4	0.1	4	0.7	0.8	1	0
SC003	7.2	0.6	0	2.7	2.3	1.5	3.2	5.6	7.5	6.2	8.5	0.6	3	1.2	2	0.2	3.8	0.5	0.7	1	0
SC007	9.5	1.4	1.1	2.4	2.7	1.9	2.3	5.5	7.5	6.5	7.5	0.6	4	1.1	2.2	0.2	4	0.6	0.7	0	0
SC008	9	1.7	0.9	2.6	2.9	1.9	3.4	6	10	6	7	0.7	1	0.9	2.1	0.2	4	0.5	0.6	0	0
SC047	7	1.7	1	2.8	2.8	2	5	6.7	8.2	---	---	---	---	1.5	---	---	---	---	---	---	0
SC058	12	2.1	1.1	5.8	2.8	1.9	4.7	6.3	8.8	7.1	8.7	0.8	4	1.6	2.55	0.25	4.3	0.5	0.6	0	0
SC062	12	3.2	1.4	3.5	3.25	2.4	4.5	6.2	8.5	8.3	10.8	0.5	1	1.3	2.4	0.2	4	---	---	0	0
SC063	9.3	2	1	2.9	2.7	2	3.8	4.8	7	6.6	7.9	0.5	3	1.8	2.7	0.25	4.5	0.2	0.3	0	0
SC065	10	1.9	0.8	3.9	3.1	2.1	4.3	5.9	9.8	6.8	9	0.6	3	1.9	2.5	0.3	5.7	0.4	0.5	0	0
SC072	8.7	1.6	1	3	2.9	1.7	3.6	6.9	12	6.5	7.8	0.5	4	1.5	2.2	0.2	3.5	0.5	0.6	0	0

Continuación de la matriz de datos morfológicos, Parte 2.

	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
SC074	9.1	2.1	1	4	2.6	1.9	3.8	6	7.2	6.5	8	0.6	1	1.1	2.5	0.4	3.7	0.4	0.6	0	0
SC076	10.5	2	1.2	3.4	2.05	1.3	3.1	5.3	7.5	5.4	7	0.5	4	1.8	1.8	0.2	3.2	0.4	0.5	0	0
SC077	8.6	2.4	0.9	3.1	2.25	1.4	3.5	5.9	8.5	5	7.1	0.6	4	1.1	1.85	0.3	4.5	0.6	0.7	0	0
SC078	10	2	1	4.5	2.6	1.6	3.7	8.3	10	7.2	8.7	0.5	1	1.4	2.2	0.25	4.2	0.35	0.5	0	0
SC087	8.9	1.7	0.7	3.7	2.6	1.7	3.3	6.1	8.8	7.7	9.7	0.6	4	1.9	2.1	0.4	3.5	0.35	0.5	0	0
SC090	7.5	1.6	1	2.8	2.2	1.5	3.5	6	8.6	6.4	7.5	0.5	1	1.5	---	0.25	---	---	---	0	0
SC091	11	2	1	4	2.5	1.7	2.6	6	7.8	7	8	0.3	1	1.2	2.1	0.2	3.3	0.3	0.4	0	0
SC092	12.5	3.9	0.8	2.3	2.8	1.8	3.8	6	10	7.1	8.2	0.7	1	1.5	2.4	0.3	3	0.55	0.6	0	0
SC097	7.8	3	0.4	2.1	2.2	1.4	3	6	9	6.1	9.6	0.5	3	1.5	1.9	0.3	3	0.4	0.4	0	0
SC098	9.1	2.1	1	4.3	2.8	2	3	5.8	8.2	6.3	8.2	0.6	1	1.1	2.6	0.3	5	0.5	0.6	0	0
SC101	9.3	2	1.1	3.8	2.5	1.6	3.9	7.2	9.3	6.6	8.5	0.9	3	1.5	3.1	0.3	4.5	---	---	0	0
SC103	8.5	1.5	0.9	4	2.35	1.6	2.8	5.6	7.5	6.9	8.2	0.6	3	1.5	2.1	0.3	3	0.55	0.6	0	0
SC104	9.1	1.8	0.7	4.5	3	1.9	3.5	7.5	11	6.6	8.6	0.7	4	1.2	2	0.3	4.5	0.35	0.5	0	0
SC107	7.3	1.7	1.3	3.5	1.75	1.1	3.6	4.8	6.5	6.8	8.3	0.6	3	1.2	2.1	0.15	3.4	0.4	0.45	0	0
SC108	6.2	1.1	1	2.3	2	1.35	3.6	5.7	6.3	5.8	6.9	0.4	4	1.4	1.9	0.2	4	0.4	0.5	0	0
SC111	10	1.7	1.1	3.8	3.6	2.15	4.6	6.5	7.4	7.2	8.3	0.9	4	1.8	2.6	0.32	5.7	0.3	0.3	0	0
SC115	8.7	1.7	0.7	4	2.4	1.6	3.8	5.9	7.8	6	8	0.3	1	1.6	2.1	0.3	3.5	---	---	---	0
SC118	8.1	2.7	0.7	4.5	2.3	1.45	4.8	6.7	8.5	6.7	8.8	0.5	3	1.7	1.9	0.2	3.5	0.45	0.5	0	0
SJ01	14	4	---	---	2.5	1.8	---	7	8	---	---	---	---	---	---	---	4	---	---	---	0
SL033	9.2	1.8	1	3	2.1	1.5	3.4	5.4	6	7.8	8.4	0.6	3	1.1	2.15	0.3	3.4	0.45	0.5	0	0
SL034	12	3.7	1.3	3	2.5	1.6	3.3	7	9.1	7.2	9.4	0.4	4	2.2	2.2	0.3	4	0.4	0.5	0	0
SL038	7.5	2	1	2.1	2.5	1.8	3.3	7.2	6.1	7.6	13	0.5	3	1.1	2.4	0.25	2	0.35	0.5	0	0
SL041	10	3.2	1.5	3.3	3.6	2.2	4.4	8	14	9	11	0.7	3	1.8	2.8	0.3	4.5	0.5	0.8	0	0
SL045	5.2	1.6	0.9	1.7	2.4	1.7	2.5	6.8	6.6	7	8	0.5	3	1.3	2.2	0.3	0	0.35	0.5	0	0
SL046	7.4	3.4	0	3.1	2	1.3	2.9	4.5	7.7	5.8	7.2	0.6	2	1.2	1.6	0.2	3.5	0.4	0.45	0	0
SL049	7.4	2.2	1	3.1	2.6	1.55	2.7	7	11	9	11	0.7	3	1.8	2.8	0.3	4.5	0.5	0.8	0	0

Continuación de la matriz de datos morfológicos, Parte 2.

	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
SM095	8	1.4	1.1	3	2.9	1.8	4.4	5.7	11	7.3	8.7	0.5	1	1.9	2.1	0.2	3.5	0.4	0.4	0	0
SP050	5.7	1.5	0.7	2.4	2.27	1.75	1.8	5.2	3.5	6	8	0.35	3	1.4	2.1	0.2	2	0.5	0.3	0	0
SP051	7.2	1.75	0.8	2.1	2.9	2.1	2.4	8.7	6	8	11	0.4	3	1	2.9	0.2	2.6	0.3	0.4	0	0
SP052	6.9	1.7	0.7	2.4	2.9	2.2	2.4	8	---	---	---	---	1	1.1	2.5	0.2	---	---	---	---	0
ST01	14	7	---	---	3.5	2.3	---	9	12	---	---	---	---	---	---	---	3	---	---	---	0
SBi126	7	2.5	1	2.8	1.7	1	2.5	3.1	7	4	4	0.2	1	1	1.3	0.25	2.8	0.8	0.5	0	0
SNe128	12	2	1.2	2	0.9	6	2	2	3	2.7	2	0.1	2	1	7	0.2	---	0.4	0.5	0	0
SDr129	6.5	2.3	0.8	3	1.35	5	3	4.2	8.5	4.8	4.5	0.5	2	1.1	8.5	0.3	2.2	0.7	0.8	0	2
SBo130	6.5	1.9	0.3	2.8	1.6	1	3.5	4.5	6.5	4.5	6	0.4	1	1.5	1.35	0.3	2.5	1	0.8	0	0
SVu131	6	1.5	0.8	2.8	13.5	6.5	2.5	5.5	7	2.5	3.5	0.6	2	1	8.5	0.2	3	0.8	0.5	0	0

ANEXO D.

PROTOCOLO CTAB DE EXTRACCIÓN DE DNA (ALTO RENDIMIENTO).

Notas a tener en cuenta al iniciar el protocolo de extracción:

- * Todos los centrifugados deberán ser a temperatura ambiente (15-25°C).
- * Precalentar baño María a 65°C y el termoblock a 37°C.
- * Precalentar el Buffer de extracción a 65°C (solo la cantidad requerida para la extracción del momento).
- * Buffer CTAB: Tris-HCl 100mM pH 8; NaCl 1.4M; EDTA 20mM, CTAB 2%; β -mercaptoetanol 0.3%.

Protocolo de extracción.

1. Pesar y pulverizar las muestras en mortero con nitrógeno líquido (1gr peso).
2. Agregar 10 μ l Buffer CTAB por cada gr de muestra (de otra forma ajustar la cantidad al peso obtenido) y agitar suavemente hasta homogeneizar.
3. Incubar en baño maría durante 10min a 65°C.
4. Dejar reposar las muestras durante 5min a temperatura ambiente.
5. Agregar 1Vol Cloroformo-Alcohol Isoamílico 24:1, y agitar suavemente hasta homogeneizar.
6. Centrifugar el lisado durante 10min a 10,000 rpm.
7. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
- * Importante calcular el volumen recuperado, es recomendable extraer de 100 μ l en 100 μ l.
8. Agregar 1/2Vol NaCl 5M y 1Vol Isopropanol frío, y agitar suavemente hasta homogeneizar, para precipitar DNA.
9. Dejar reposar 12hr a -20°C.
-
10. Centrifugar durante 10min a 10,000 rpm.
11. Descartar el sobrenadante, cuidando de no dañar la pastilla.
12. Agregar 300 μ l Etanol al 70%, y agitar suavemente, para limpiar la pastilla.

13. Centrifugar durante 5min a 10,000 rpm.
14. Repetir el paso 11-13 de 3 a 5 veces dependiendo de la limpieza de la pastilla obtenida.
15. Agregar 300µl H₂O destilada para re-suspender la pastilla.
16. Agregar 5µl RNAsa e incubar en termoblock durante 30min a 37°C.
17. Agregar 1Vol Cloroformo-Alcohol Isoamílico 24:1, y agitar suavemente hasta homogeneizar.
18. Centrifugar durante 10min a 10,000 rpm.
19. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
20. Agregar 1Vol Fenol-Cloroformo (1:1), y agitar suavemente hasta homogeneizar.
21. Centrifugar durante 5min a 14,000 rpm.
22. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
23. Agregar 1Vol Acetato de amonio 2.5M y 2Vol Etanol absoluto, y agitar suavemente hasta homogeneizar.
24. Dejar reposar 12hr a -20°C.
-
25. Centrifugar durante 10min a 14,000 rpm.
26. Descartar el sobrenadante, cuidando de no dañar la pastilla.
27. Agregar 300µl Etanol al 70%, y agitar suavemente, para limpiar la pastilla.
28. Centrifugar durante 5min a 10,000 rpm.
29. Repetir el paso 25-27 de 3 a 5 veces dependiendo de la limpieza de la pastilla obtenida.
30. Dejar evaporar el etanol residual a temperatura ambiente.
31. Agregar 30µl H₂O destilada para re-suspender la pastilla.

EL FILTRADO RESULTANTE CONTIENE EL DNA, CONSERVARLO A -20°C.

ANEXO E.

PROTOCOLOS DE LOS ANÁLISIS NUMÉRICOS DE LOS DATOS MORFOLÓGICOS

CREACIÓN DE LA MATRIZ DE DATOS EN NTedit.

Nota importante a tener en cuenta al crear la matriz de datos a utilizarse en los análisis numéricos es que los especímenes deben estar por columnas y los datos morfológicos deben estar por filas.

Utilizando el editor de matrices NTedit, se especifican las características de la matriz: el tipo de matriz, comentarios sobre la matriz, el número de filas y de columnas, y el valor que representará a los valores ausentes, también se pueden modificar las etiquetas de las filas y de las columnas. Se introduce la información celda por celda. Se guarda en formato .nts (que es el formato del programa NTSYS), aunque también puede guardarse en formato de texto separado por tabulaciones o en formato .csv.

Para poder visualizar la matriz generada, o cualquier otra matriz dentro de NTSYSpc:

NTSYS / Output & transf. / Output

Parameters:	Arguments:
Input file	MatrizDeDatos.nts
Field width	9
Decimal places	3
Page width	90
Roworder	--
Columnorder	--

Compute

Donde los argumentos son los siguientes:

- **Field width:** es el ancho de celda, aquí se establece el tamaño deseado de celda en número de caracteres.
- **Decimal places:** es el número de decimales que deseamos que el programa nos muestre en la tabla generada.
- **Page width:** es el ancho de la página dado por el número de caracteres (de tamaño idéntico).

La tabla se desplegara en una ventana separada, la cual podrá ser guardada como archivo de texto:

FILE / Save / Current section...

Save as	MatrizDeDatos.txt
---------	-------------------

Save

Este archivo de texto podrá ser editado posteriormente en cualquier editor de textos.

ESTANDARIZACIÓN DE LA MATRIZ DE DATOS.

Para estandarizar los datos de nuestra matriz se sigue el siguiente proceso:

NTSYS / Output & transf. / Standardization

Parameters:	Arguments:
Input file	MatrizDeDatos.nts
Stand by rows?	<input checked="" type="checkbox"/>
Output file	MatrizSTD.nts
Subtract option	MIN ▼
Divide option	RANGE ▼
Constant	0.00000

Compute

Los argumentos pueden ser:

- **Stand by rows?:** hay que tener en cuenta en qué sentido van los valores para un carácter, si en columnas o en filas.
- **Subtract option :** puede variar YBAR y MIN.
- **Divide option:** puede ser RANGE, STD, SUMY, etc.

La matriz de datos estandarizados nos permitirá realizar todos los demás procesos (salvo que se indique lo contrario).

En nuestro análisis se estandarizó restando el valor mínimo (MIN) y dividiendo entre el rango (RANGE).

ÍNDICES DE SIMILITUD Y DISTANCIA.

Este procedimiento nos permitirá obtener las diferencias o similitudes entre los OTUs, dependiendo del coeficiente que se vaya a utilizar.

NTSYS /Similarity / Interval data

Parameters:	Arguments:
Input file	MatrizSTD.nts
By rows?	<input type="checkbox"/>
Coefficient	DIST ▼
Output file	SCC-DistTaxProm.nts

Compute

Los argumentos son los siguientes:

- **By rows?:** es importante siempre tener presente si nuestros OTUs están en líneas o en columnas, para hacer la anotación correspondiente, ya que la similitud o distancia será entre ellos.

- **Coefficient:** es el coeficiente que se utilizará, pudiendo ser:

CORR: Correlación, similitud. Donde 1 representa la similitud total, y todos los valores por debajo de él, indican menos similitud.

DIST: Distancia Taxonómica Promedio; diferencia. A menor distancia mayor similitud y, a mayor distancia menor similitud.

EUCLID: Distancia Euclidiana; diferencia. A menor distancia mayor similitud y a mayor distancia menor similitud.

SM: Simple Matching, similitud. Para datos binarios. Donde 1 representa la similitud total y 0 la diferencia total.

J: Jaccard, similitud. Para datos binarios. Donde 1 representa la similitud total, y 0 la diferencia total.

PHI: Phi, similitud. Para datos binarios. Donde 1 representa la similitud total, y todos los valores por debajo de él, indican menos similitud.

ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS.

El proceso del Análisis de Conglomerados se divide en varias etapas: 1) la generación de la matriz del árbol fenético, 2) la generación del árbol fenético correspondiente (fenograma), 3) la obtención de la matriz cofenética del árbol fenético generado, y 4) la obtención del valor r del árbol fenético.

1. Para generar la matriz del árbol fenético, a partir de los índices de similitud o distancia.

NTSYS / Clustering / SAHN

Parameters:	Arguments:
Input file	SCC-DistTaxProm.nts
Output tree file	SCC-UPGMA Tree.nts
Clustering method	UPGMA ▼
In case of ties	WARN
Maximum no. tied tres	25
Tie tolerance	0.00000000
Beta	0.00000000

Compute

Los argumentos son los siguientes:

- **Clustering method:** es el agrupamiento que se utilizará, pudiendo ser:

SINGLE: Single linkage o Vecino más cercano, agrupa en base a la mayor similitud entre los OTUs.

UPGMA: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, agrupa en base al promedio de las distancias entre los OTUs.

COMPLETE: Complete linkage o Vecino más lejano, agrupa en base a la mayor diferencia entre los OTUs.

2. Para generar el árbol fenético o fenograma correspondiente.

NTSYS / Graphics / Treeplot

Parameters:	Arguments:
Input file	SCC-UPGMA Tree.nts

Compute

Al ejecutar el comando, se abrirá una ventana donde se mostrará el árbol fenético generado. En esta ventana también se podrán modificar las características gráficas del fenograma:

OPTIONS / Plot options

En esta sección se puede modificar tanto el título del gráfico así como las etiquetas, la fuente, las líneas, etc.

El archivo del grafico se guarda de la siguiente forma:

FILE / Save as Metafile...

Save as	SCC-UPGMA Tree.emf
----------------	--------------------

Save

En este formato, el archivo del gráfico puede ser modificado o editado con otros programas para tal fin.

3. Para obtener la matriz cofenética correspondiente.

NTSYS / Clustering / Cophenetic values

Parameters:	Arguments:
Input file	SCC-UPGMA Tree.nts
Output coph. file	SCC-UPGMA Coph.nts
Method	Ultrametric Dis
O-U alpha	0.00000000

Compute

4. Para obtener el coeficiente de correlación cofenética (valor r).

NTSYS / Graphics / Matrix comparison plot

Parameters:	Arguments:
Input file 1 (X)	SCC-DistTaxProm.nts
Input file 2 (Y)	SCC-UPGMA Coph.nts
Input file 3 (Z)	--
Normalize Mantel stat	<input checked="" type="checkbox"/>
Number of permutations	0

Compute

El valor r nos indicará la consistencia del árbol fenético obtenido. El rango del valor r va del 0 a 1, donde 0 indica ninguna consistencia y 1 indica consistencia total, por lo que los valores más cercanos a 1 son los más deseables.

ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCoA).

El proceso de Análisis de Componentes Principales (PCoA) se divide en varias etapas: 1) la generación de la matriz de correlación entre caracteres, 2) la obtención de los valores y vectores Eigen, 3) la obtención de la matriz de proyección, y 4) el graficado de los componentes.

1. Para generar la matriz de correlación entre caracteres, se utiliza un coeficiente de correlación (similitud).

NTSYS / Similarity / Interval data

Parameters:	Arguments:
Input file	MatrizSTD.nts
By rows?	<input checked="" type="checkbox"/>
Coefficient	CORR
Output file	SCC-Correlacion.nts

Compute

Es importante recordar si los caracteres están en filas o en columnas para marcar la casilla correspondiente.

2. Para la obtención de los valores Eigen así como de los vectores Eigen.

NTSYS / Ordination / Eigen

Parameters:	Arguments:
Input matrix file	SCC-Correlacion.nts
Number of dimensions	3
Output eigenvector file	SCC-PCA Evec.nts
Output eigenvalue file	SCC-PCA Eval.nts
Vector scaling	SQRT(LAMBDA)
Sample size	0
Degrees of freedom	0
Show details?	<input type="checkbox"/>
Cut off for roots	0

Compute

Es importante que al concluir la generación de los valores Eigen y los vectores Eigen, sus matrices sean impresas, ya que los datos contenidos en dichas matrices serán utilizados al momento de explicar los componentes:

- *valores Eigen*: indicaran el porcentaje de variación explicada por componente o acumulada.
- *vectores Eigen*: indicaran cuales son los elementos de mayor peso o valor en la conformación de cada componente.

3. Para obtener la matriz de proyección.

NTSYS / Ordination / Projections

Parameters:	Arguments:
Input file	MatrizSTD.nts
OTU's are rows?	<input type="checkbox"/>
Input factor matrix file	SCC-PCA Evec.nts
Output projection file	SCC-PCA Proj.nts
Projectiontypeoption	PROJ
Input eigenvalues file	--

Compute

4. Para graficar los componentes.

NTSYS / Graphics / Matrix plot

Parameters:	Arguments:
Input file	SCC-PCA Proj.nts
Plot by rows?	<input checked="" type="checkbox"/>
Abscissa	1 (2)
Ordinate	2 (3)
Graph matrix file	--
Plot symbol input file	--
Secondary input file	--
Plot secondary by rows?	<input type="checkbox"/>

Compute

Con esta configuración se graficaran los componentes 1 y 2 (en el eje de las “x” y de las “y” respectivamente), solamente se modificaría a 2 y 3 si deseamos que se grafiquen dichos componentes.

Ahora bien, también se puede generar una gráfica en donde se muestran los 3 componentes al mismo tiempo:

NTSYS / Graphics / Mod 3D plot

Parameters:	Arguments:
Input file	SCC-PCA Proj.nts
Plot by rows?	<input checked="" type="checkbox"/>
Abscissa	1
Ordinate	2
Graph matrix file	3
Plot symbol input file	--

Compute

Es muy deseable que los primeros 3 componentes juntos expliquen más del 50% de la variación observada o acumulada, de otro modo indicarían que los elementos responsables de dichos componentes no tienen la “fuerza” suficiente para soportar los grupos formados.

ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES (PCO).

El Análisis de Coordenadas Principales (PCA) contrasta las coordenadas de los OTU’s contra las coordenadas de las variables o caracteres medidos.

Es un proceso doble, ya que el mismo procedimiento se aplica a los OTU’s y a las variables (caracteres) a partir de la matriz estandarizada de datos: 1) se obtiene la matriz de distancia tanto entre OTU’s como entre variables, 2) se hace un doble centrado para los OTU’s y para las variables, 3) se obtienen los valores y vectores Eigen para los OTU’s y para las variables, y 4) se grafican las coordenadas en conjunto.

1. Para la generación de las matrices de distancia.

NTSYS / Similarity / Interval data

Parameters:	Arguments:
Input file	MatrizSTD.nts
By rows?	<input type="checkbox"/>
Coefficient	DIST
Output file	SCC-PCO OTU-DistTaxProm.nts

Compute

NTSYS / Similarity / Interval data

Parameters:	Arguments:
Input file	MatrizSTD.nts
By rows?	<input checked="" type="checkbox"/>
Coefficient	DIST
Output file	SCC-PCO CAR-DistTaxProm.nts

Compute

2. Para el doble centrado de las matrices de distancia obtenidas.

NTSYS / Output & transf. / Dcenter

Parameters:	Arguments:
Input matrix file	SCC-PCO OTU-DistTaxProm.nts
Result matrix	SCC-PCO OTU DCen.nts
Square distances?	<input checked="" type="checkbox"/>

Compute

NTSYS / Output & transf. / Dcenter

Parameters:	Arguments:
Input matrixfile	SCC-PCO CAR-DistTaxProm.nts
Result matrix	SCC-PCO CAR DCen.nts
Square distances?	<input checked="" type="checkbox"/>

Compute

3. Para la obtención de los valores y vectores Eigen.

NTSYS / Ordination / Eigen

Parameters:	Arguments:
Input matrix file	SCC-PCO OTU DCen.nts
Number of dimensions	3
Output eigenvector file	SCC-PCO OTUEvec.nts
Output eigenvalue file	SCC-PCO OTUEval.nts
Vector scaling	SQRT(LAMBDA)
Sample size	0
Degrees of freedom	0
Show details?	<input type="checkbox"/>
Cut off for roots	0

Compute

NTSYS / Ordination / Eigen

Parameters:	Arguments:
Input matrix file	SCC-PCO CAR DCen.nts
Number of dimensions	3
Output eigenvector file	SCC-PCO CAREvec.nts
Output eigenvalue file	SCC-PCO CAREval.nts
Vector scaling	SQRT(LAMBDA)
Sample size	0
Degrees of freedom	0
Show details?	<input type="checkbox"/>
Cut off for roots	0

Compute

4. Para el graficado de las coordenadas principales.

NTSYS / Graphics / Matrix plot

Parameters:	Arguments:
Input file	SCC-PCO OTU Evec.nts
Plot by rows?	<input type="checkbox"/>
Abscissa	1
Ordinate	2
Graph matrix file	--
Plot symbol input file	--
Secondary input file	SCC-PCO CAR-Evec.nts
Plot secondary by rows?	<input type="checkbox"/>

Compute

ANÁLISIS DE ESCALAMIENTO MULTIDIMENSIONAL.

Es un análisis que puede manejarse como complementario a todos los análisis previos.

NTSYS / Ordination / MDSCALE

Parameters:	Arguments:
Input file	SCC-PCO OTU-DistTaxProm.nts
Number of dimensions	2
Input initial matrix	SCC-PCO OTU Evec.nts
Vectors are rows?	<input type="checkbox"/>
Output final file	SCC-MULTIDIMENSIONAL.nts
Stress coefficient	STRESS2
Regression type	MONO
Maximum iterations	40
Minimum stress	0.00
Maximum stress ratio	0.999
Minimum gradient	0.00
Output dhat file	--
Output config. d file	--

Compute

Para el graficado del escalamiento multidimensional.

NTSYS / Graphics / Matrix plot

Parameters:	Arguments:
Input file	SCC-MULTIDIMENSIONAL.nts
Plot by rows?	<input checked="" type="checkbox"/>
Abscissa	1
Ordinate	2
Graph matrix file	--
Plot symbol input file	--
Secondary input file	--
Plot secondary by rows?	<input type="checkbox"/>

Compute

ANEXO F.

CARTA DE ACEPTACIÓN DE ARTÍCULO DERIVADO.

Systematic Botany <em@editorialmanager.com> nov 21 a las 2:30 P.M.
Para Adriana María Berumen Cornejo

Ref.: Ms. No. SYSBOT-D-16-00052R2
Phylogeny of the *Stachys coccinea* (Lamiaceae) Complex Based on Molecular and Morphological Data.
Systematic Botany

Dear Dr. Berumen,

I am pleased to tell you that your work has now been accepted for publication in Systematic Botany.

It was accepted on November 21, 2016 for publication in issue 1 of 2017. You will receive a second e-mail shortly with the copyright transfer and non-waivable charge form. Please be certain that one author signs these and returns them to the address on the forms (a scanned signed form is acceptable).

We are also soliciting possible cover images. Photographs or illustrations that pertain to your manuscript (whole plants, flower, fruits, leaves, SEMs, etc) are good possibilities. These can be sent as original unedited JPGS (if that is the native format) and we can crop and format them, or you can crop them and send them as TIFF images with LZW compression, CMYK color mode. They should measure 2.5 X 2.5 inches, with a minimum resolution of 750 x 750 pixels (300 dpi). Non-color images of should be sent as grayscale rather than CMYK, with the same dimensions (2.5 X 2.5 inches) and a minimum resolution of 2250 x 2250 pixels (900 dpi). Along with the picture, we will need the name of the species and family it belongs to. Please label your file as AUTHOR_FULL.TAXON.NAME (replacing the AUTHOR with author(s) for the paper, FULL.TAXON.NAME with the genus, species, and infraspecific name [if any] delimited by periods). We will assume any images are yours, or that you have permission to use them. We cannot guarantee that we will use any images you send, but we will consider any images we receive. Please send them by email to: Managing Editor Daniel Potter, systematic.botany.me@gmail.com, Managing Editor Benjamin van Ee, bvanee@uwalumni.com, and Copy Editor Sarina Lambert, systematic.botany.copveditor@gmail.com. Thank you.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards

James Smith
Editor-in-Chief
Systematic Botany

Adriana,

Thank you very much for your revision. I have now accepted it (Congratulations) and I am forwarding it along to the Editor in Chief.

Best,
Chuck