

PROTOCOLO DE PROPAGACIÓN POR SEMILLA DE *Clinopodium mexicanum*, UNA PLANTA MEDICINAL NATIVA DE MÉXICO

PROPAGATION PROTOCOL BY SEED OF *Clinopodium mexicanum*, A NATIVE MEDICINAL PLANT FROM MEXICO

Ana Paola **Silva-Castellanos**¹, Fabiola **Magallán-Hernández**^{1*}, Santiago **Vergara-Pineda**¹,
Olivia **Ramírez-Segura**¹, Mónica **Queijeiro-Bolaños**²

¹Horticultura Ambiental. ²Biología. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ciencias Naturales. Avenida de las Ciencias s/n Juriquilla, Querétaro, Querétaro. 76230 México. (fabiola.magallan@uaq.mx).

RESUMEN

El poleo verde *Clinopodium mexicanum* es una especie nativa de México que tiene demanda en los mercados locales por sus propiedades medicinales. No se encontró información sobre su cultivo, por lo cual el objetivo del presente estudio fue elaborar un protocolo de germinación de su semilla que contribuya al conocimiento de esta especie para su manejo, cultivo, comercialización y conservación. Las muestras se recolectaron en dos poblaciones silvestres del estado de Querétaro, seleccionadas por la disponibilidad de plantas y accesibilidad al lugar. El cáliz persistente y las núculas se caracterizaron morfológicamente, y se evaluó porcentaje de viabilidad y de germinación. El experimento de germinación tuvo como factor la temperatura (T) con tres tratamientos: 28, 21 y 15 °C. La humedad del sustrato (100%), la humedad ambiental (30%) y el fotoperiodo (12:12 h luz/oscuridad) se mantuvieron constantes. Los resultados se analizaron con una prueba de t de Student, un modelo lineal generalizado y dos análisis para germinación (t10 y t50). El cáliz persistente midió en promedio 1.6 × 6.7 mm (anchura × longitud), y peso expresado como 436.5 cálices por gramo; cubierta estriada, con glándulas que presentaron tonalidades verdes y cafés. Las núculas midieron 0.8 × 1.6 mm (anchura × longitud) y peso expresado como 2686.5 núculas por gramo, ovaladas de color café a negro. Las núculas de color negro presentaron 100% de viabilidad y las cafés 33%. Las núculas presentaron mixocarpia. El tratamiento óptimo para la germinación fue incrementar temperatura a 28 °C. El 10% de las semillas germinó en 4.2 d, el 50% en 6.2 d, y el porcentaje máximo de germinación 93% se alcanzó en 12 d.

ABSTRACT

Clinopodium mexicanum (poleo verde) is a native species in Mexico with demand in local markets for its medicinal properties. No information on cultivation was found, so the objective of this study was to develop a seed germination protocol to contribute to the knowledge of this species for management, cultivation, commercialization and conservation. Samples were collected in two wild populations in the state of Querétaro, selected for the availability of plants and accessibility to the site. The fruiting calyx (persistent) and the nutlets were morphologically characterized, and viability and germination percentages were evaluated. The germination experiment had temperature (T) as a factor, with three treatments: 28, 21 and 15 °C. Water content in substrate (100%), ambient humidity (30%) and photoperiod (12:12 h light/dark) were kept constant. Results were analyzed with a Student t-test, a generalized linear model and two analyses for germination (t10 and t50). The fruiting calyx measured on average 1.6 × 6.7 mm (width × length), and weight expressed as 436.5 calyxes per gram; striated shell, with glands showing green and brown tones. Nutlets measured 0.8 × 1.6 mm (width × length) and weight expressed as 2686.5 nutlets per gram, oval, brown to black. The black colored nutlets showed 100% viability and the brown ones 33%. The nutlets showed myxocarpia. The optimum treatment for germination was to increase the temperature to 28 °C. Ten percent of the seeds germinated in 4.2 d, 50% in 6.2 d, and the maximum germination percentage of 93% was reached in 12 d.

Key words: *Clinopodium mexicanum*, medicinal plants, germination, propagation.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1304-2763>.

Recibido: abril, 2020. Aprobado: julio, 2021.

Publicado en *Agrociencia* 55: 433-450. 2021.

Palabras clave: *Clinopodium mexicanum*, plantas medicinales, germinación, propagación.

INTRODUCCIÓN

Las plantas aromáticas y medicinales contienen principios activos, es decir, son plantas que poseen sustancias con actividad terapéutica (Moré *et al.*, 2010). Dichos principios activos son producto del metabolismo secundario de las plantas, por lo que también se denominan metabolitos secundarios. Las principales funciones de los metabolitos secundarios en las plantas son la defensa contra depredadores y patógenos, como agentes alelopáticos, atracción de polinizadores, protección de la planta contra las radiaciones UV y resistencia a virus. Estos son importantes para la salud humana porque presentan valor medicinal y económico, y se pueden utilizar como ingredientes de medicamentos en la industria farmacéutica al extraerse de la planta (Moré *et al.*, 2010; Palma-Tenango *et al.*, 2017).

El uso y comercialización de las plantas aromáticas y medicinales ha aumentado debido a la necesidad de la extracción de sus metabolitos secundarios y fabricación de diferentes productos en el mundo. Sin embargo, para muchas especies de plantas que producen metabolitos secundarios de importancia para la salud humana, se desconoce su forma de propagación y no hay información sobre su cultivo. Un ejemplo es *Clinopodium mexicanum* (Benth.) Govaerts, una especie nativa de México con demanda en los mercados locales de las regiones de su distribución natural debido a sus propiedades medicinales. Esta investigación contribuye al conocimiento de la germinación de la especie para cultivo, manejo, comercialización y conservación; con el fin de evitar que la diversidad de las poblaciones silvestres se agote.

C. mexicanum pertenece a la familia Lamiaceae, subfamilia Nepetoideae. Los taxónomos la ubicaban en el género *Satureja*. Ahora dicho género está confinado a Europa y las 100 especies americanas pertenecen al género *Clinopodium*. De las cuales 14 se distribuyen en México y 10 de ellas son endémicas (Martínez-Gordillo *et al.*, 2013). *C. mexicanum* es una especie endémica de México con distribución en los estados de Chiapas, Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas y Veracruz, en la provincia fisiográfica de la Sierra Madre Oriental (Martínez-Gordillo *et al.*, 2017). Los tipos de vegetación en que se encuentra

INTRODUCTION

Aromatic and medicinal plants contain active principles, *i.e.* they are plants that possess substances with therapeutic activity (Moré *et al.*, 2010). These active principles are products of the secondary metabolism of plants and therefore they are called secondary metabolites. The main functions of secondary metabolites in plants are defense against predators and pathogens, as allelopathic agents, attraction of pollinators, plant protection against UV radiation and resistance to viruses. These are important for human health because they present medicinal and economic value and can be used as drug ingredients in the pharmaceutical industry once extracted from the plant (Moré *et al.*, 2010; Palma-Tenango *et al.*, 2017).

The use and commercialization of aromatic and medicinal plants has increased due to the need for the extraction of their secondary metabolites and the manufacture of different products around the world. However, the form of propagation of many plant species that produce secondary metabolites important for human health is still unknown and there is no information on their cultivation. One example is *Clinopodium mexicanum* (Benth.) Govaerts, a native species of Mexico with demand at local markets in the regions of its natural distribution due to medicinal properties. This research contributes to the knowledge of this species germination for cultivation, management, commercialization, and conservation, in order to prevent depletion of the diversity of wild populations.

C. mexicanum belongs to the family Lamiaceae, subfamily Nepetoideae. Taxonomists used to place it in the genus *Satureja*. Now that genus is confined to Europe and the 100 American species belong to the genus *Clinopodium*. Fourteen of which are distributed in Mexico and 10 are endemic (Martínez-Gordillo *et al.*, 2013). *C. mexicanum* is an endemic species of Mexico with distribution in the states of Chiapas, Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas and Veracruz, in the physiographic province of the Sierra Madre Oriental (Martínez-Gordillo *et al.*, 2017). The vegetation types where it is found are scrublands, grasslands, secondary vegetation and coniferous forests; also in transition zones between semi-arid and humid climates.

son matorrales, pastizales, vegetación secundaria y bosques de coníferas; también en zonas de transición entre climas semiáridos y húmedos.

En Querétaro, su nombre común es “poleo verde”; en algunas regiones de Oaxaca se consume como infusión para aliviar los efectos del alcohol (“hierba del borracho”) y problemas digestivos y gastrointestinales; en Guerrero se le conoce como “toronjil de monte” (Alvarado *et al.*, 2020). En la medicina tradicional mexicana, *C. mexicanum* se utiliza contra el dolor de muelas y como remedio de enfermedades del sistema nervioso (Estrada-Reyes *et al.*, 2010). En estudios fitoquímicos y farmacológicos de la especie se encontró que su extracto acuoso contiene Neoponcirina como compuesto principal. Esta es una sustancia con efectos sedantes, anticonvulsivos, ansiolíticos similares al Diazepam, y antinociceptivos mayores que el Ibuprofeno, similares al Ketorolaco (Estrada-Reyes *et al.*, 2010 y Cassani *et al.*, 2013). A pesar de sus usos, hay poca información que permita su cultivo y manejo para la conservación de la especie.

C. mexicanum es una planta perenne, la cual se encuentra con botones florales, flores y núculas maduras e inmaduras todo el año, de acuerdo con un reporte preliminar del autor³. No se han realizado estudios sobre sus órganos de dispersión, pero se conoce que en algunos géneros de la familia Lamiaceae ocurre dispersión por gravedad, mixocarpia y nautocoria (Bonzani *et al.*, 2011; FSC-GEF-UNEP, 2016). En la familia Lamiaceae el fruto es una tetranúcula incluida en un cáliz persistente considerado la unidad de dispersión en dicha familia. Es decir, desde el enfoque agronómico, las núculas (frutos) se consideran “semillas”, porque son las que dan origen a la planta. Esta consideración es útil para *C. mexicanum*, por ello es importante reconocer las características del cáliz persistente ya que en sentido funcional es equivalente al fruto, y de las núculas que funcionan como semillas (Scandaliaris y Barboza, 2013).

El objetivo del estudio fue obtener un protocolo de germinación para *C. mexicanum* a través de caracterizar la morfología del cáliz persistente y de las núculas (tamaño, color, forma, cubierta y peso), determinar el porcentaje de viabilidad en una población y definir la temperatura óptima para la germinación de semillas.

In Querétaro, *C. mexicanum* common name is “poleo verde”. In some regions of Oaxaca it is consumed as an infusion to alleviate the effect of alcohol abuse; it also alleviates indigestion and other gastrointestinal problems. In Guerrero it is known as “toronjil de monte” (Alvarado *et al.*, 2020). In traditional Mexican medicine, *C. mexicanum* is used against toothache and as a remedy for nervous system diseases (Estrada-Reyes *et al.*, 2010). In phytochemical and pharmacological studies on the species, it was found that its aqueous extract contains Neoponcirin as the main compound. This is a substance with sedative, anticonvulsant, anxiolytic effects similar to Diazepam, and more antinociceptive effects than Ibuprofen, rather as Ketorolac (Estrada-Reyes *et al.*, 2010 and Cassani *et al.*, 2013). Despite these uses, there is little information that allows *C. mexicanum* cultivation and management for the conservation of the species.

C. mexicanum is a perennial plant flowering and fruiting throughout the year, flower buds, flowers and mature and immature nutlets are found all year round, as it was established in a preliminary report³. No studies have been conducted on dispersal organs, but it is known that in some genera of the Lamiaceae family, dispersal by gravity, myxocarpia and nautochory occurs (Bonzani *et al.*, 2011; FSC-GEF-UNEP, 2016). In the family Lamiaceae the fruit is a structure of four grouped nutlets included in a fruiting calyx which is persistent and considered the dispersal unit in that family. This means, from the agronomic point of view, nutlets are considered as “seeds” because plants rise from them. This consideration is useful for *C. mexicanum*; therefore, it is important to recognize the characteristics of the fruiting calyx, since in a functional sense it is equivalent to a fruit; and of the nutlets that function as seeds (Scandaliaris and Barboza, 2013).

The objective of the study was to obtain a germination protocol for *C. mexicanum* by characterizing the morphology of the fruiting calyx and nutlets (size, color, shape, shell and weight), determining the percentage of viability in a population and defining the optimum temperature for seed germination.

³Magallán, F., A. Alvarado, R. Ocampo, y L. Guerrero. 2015. Informe técnico: Protocolos de propagación de plantas nativas aromáticas y medicinales con uso potencial en la industria farmacéutica y cosmética. Fondo de vinculación tecnológica. Universidad Autónoma de Querétaro. 52 p.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

La recolecta de cálices persistentes y núculas de poleo verde se realizó en dos poblaciones del estado de Querétaro, México, en noviembre 2017 (Cuadro 1). La accesibilidad y disponibilidad de plantas se consideró como criterio para la selección de las localidades. Para el registro de las coordenadas se utilizó un sensor GPS (Oregon 650®, EUA).

Modo de recolecta, selección y almacenamiento

En cada localidad de estudio se recolectaron los tallos de las plantas con presencia de cálices persistentes (sin distinción de colores) en transectos de 1 km dentro de la localidad. Las coordenadas y altitud se registraron al inicio del recorrido. Para coleccionar los tallos de las plantas se utilizaron tijeras de poda. El material se colocó en bolsas de papel estraza y se transportó a temperatura ambiente. En el laboratorio, las muestras se extendieron sobre charolas de plástico para separar los cálices y las núculas, mientras que el resto del material (hojas y ramas) se regresó a las bolsas.

Para extraer las núculas de los cálices se usaron pinzas planas de punta delgada y una lámpara de escritorio con lupa (Stereon HER-730BL®, China). Para separar las núculas que se encontraban entre las hojas y las ramas (material restante) se utilizó un tamiz metálico del número 10 con abertura entre celdas de 2 mm y las núculas se almacenaron en frascos de vidrio con sílica gel, en condiciones de temperatura ambiental (21-23 °C) y sombra.

Caracterización morfológica de cálices persistentes y núculas de *C. mexicanum*

Para obtener el tamaño promedio se usó un vernier manual y se midieron 30 núculas y 30 cálices por población. El color de los cálices y núculas se determinó con tablas Munsell (2011). Para

MATERIALS AND METHODS

Study area

The collection of fruiting calyces and nutlets of *C. mexicanum* was conducted in two populations in the state of Querétaro, Mexico, in November 2017 (Table 1). The accessibility and availability of plants was considered as a criterion for the selection of localities. A GPS sensor (Oregon 650®, USA) was used to register the coordinates.

Mode of collection, selection and storage

In each study locality, the stems of plants with fruiting calyces (without color distinction) were collected in 1 km transects within the locality. The coordinates and altitude were recorded at the beginning of the transect. Pruning shears were used to collect plant stems. The material was placed in brown paper bags and transported at room temperature. In the laboratory, the samples were spread out on plastic trays to separate the calyces and nutlets, while the rest of the material (leaves and branches) was returned to the bags.

To extract the nutlets from the calyces, thin-tipped flat tweezers and a desk lamp with magnifying glass (Stereon HER-730BL®, China) were used. A metal sieve mesh (Num. 10, sieve size 2 mm) was used to separate the nutlets from the leaves and branches (remaining material) and the nutlets were stored in glass jars with silica gel under room temperature (21-23 °C) at shaded conditions.

Morphological characterization of fruiting calyces and nutlets of *C. mexicanum*.

To obtain the average size, a manual Vernier rule was used and 30 nutlets and 30 calyces were measured per population. The color of calyces and nutlets was determined with Munsell

Cuadro 1. Descripción de sitios y poblaciones para recolecta de cálices persistentes y núculas de *C. mexicanum*.

Table 1. Description of sites and populations for collection of fruiting calyces and nutlets of *C. mexicanum*.

Poblaciones		
Nombre	Sombrerete	Maguey Verde
Municipio	Cadereyta de Montes	Peñamiller
Coordenadas	20° 47' 84" N, 99° 39' 97" O	21° 05' 85" N, 99° 41' 77" O
Tipo de vegetación	Matorral xerófilo, micrófilo, y plantación de <i>Pinus cembroides</i>	Transición entre bosque de matorral xerófilo y bosque de <i>Juniperus</i>
Altitud	2512 m	2296 m

describir la cubierta del cáliz y de las núculas se seleccionó un cáliz persistente y cuatro núculas para su observación por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB). La muestra se limpió y montó en un porta muestras, para favorecer las características por observar; se capturó imagen con distintos aumentos, del cáliz y de la cubierta de las núculas tanto de la cara interna como de la externa.

Un microscopio de barrido (Carl Zeiss EVO-50°, Alemania) se utilizó en modo de presión variable sin recubrimiento. La descripción de las núculas se basó en los estudios de Scandaliaris y Barboza (2013). Para obtener el peso promedio de los cálices y las núculas que son muy pequeñas, se obtuvo el peso de 100 núculas y 100 cálices por población en una balanza analítica (Denver Instrument APX-200°, EUA) y luego se estimó el peso promedio por cáliz persistente y por núcula.

Porcentaje de viabilidad de semillas en *C. mexicanum*

Para las pruebas de viabilidad se usaron sólo semillas de la población Magüey Verde debido a su disponibilidad. En estas pruebas se separó a las núculas por color en dos muestras: 30 núculas de color negro y 30 núculas de color café. Para la prueba de viabilidad de semillas se siguió el protocolo general propuesto por González *et al.* (2019) con modificaciones. Las muestras se sumergieron en agua destilada por 48 h; transcurrido el tiempo a cada núcula se le hizo una incisión longitudinal con navaja delgada y se sumergió en una solución de cloruro de 2, 3, 5, -trifenil-tetrazolio (Golden Bell Reactivos®) al 0.5% por 24 h a 22 °C. Después de 24 h, cada semilla se observó en el microscopio de disección (Leica Zoom 2000°, China) y el resultado de su tinción se registró. La clasificación de viabilidad fue, embriones teñidos de color rojo carmín se consideraron viables, mientras que embriones teñidos en color rojo suave o blanco lechoso se consideraron no viables.

Temperatura óptima para la germinación de *C. mexicanum*

Revisión de condiciones ambientales para las pruebas de germinación

Para definir las temperaturas por probar en el estudio se revisaron los datos climatológicos de tres estaciones meteorológicas del estado de Querétaro, en los municipios de Cadereyta de Montes, Peñamiller y Pinal de Amoles, de enero 2000 a diciembre 2017 (TWC, 2018). Estos municipios se seleccionaron por tener poblaciones silvestres de la especie en estudio y por su cercanía a los puntos de colecta. La información obtenida se consideró la base para definir las condiciones ambientales del diseño experimental.

tables (2011). To describe the calyx and nutlet shell, one fruiting calyx and four nutlets were selected for observation by scanning electron microscopy (MEB). The sample was cleaned and mounted in a specimen holder. An image of the calyx and the shell of the nutlets of both the internal and external faces was captured with different magnifications.

A scanning microscope (Carl Zeiss EVO-50°, Germany) was used in variable pressure mode without overlay. The description of the nutlets was based on the studies of Scandaliaris and Barboza (2013). Because of their small size, to obtain the average weight of calyxes and nutlets, the weight of 100 nutlets and 100 calyxes per population was measured in an analytical balance (Denver Instrument APX-200°, USA); then the average weight per fruiting calyx and per nutlet was estimated.

Percentage of seed viability in *C. mexicanum*

For viability tests, only seeds from the Magüey Verde population were used due to their availability. In these tests, nutlets were separated by color into two samples: 30 black nutlets and 30 brown nutlets. For the seed viability test, the general protocol proposed by González *et al.* (2019) was followed with modifications. Samples were immersed in distilled water for 48 h; after this time, each nutlet was incised longitudinally with a thin blade and immersed in a 0.5% solution of 2, 3, 5, -triphenyl-tetrazolium chloride (Golden Bell Reagents®) for 24 h at 22 °C. After 24 h, each seed was observed under a dissecting microscope (Leica Zoom 2000°, China) and the staining result was recorded. The viability classification was, embryos stained carmine red were considered viable, while embryos stained in soft red or milky white were considered non-viable.

Optimum temperature for germination of *C. mexicanum*

Review of environmental conditions for germination tests

To define the temperatures to be tested in the study, climatological data from three weather stations in the state of Querétaro, in the municipalities of Cadereyta de Montes, Peñamiller and Pinal de Amoles, from January 2000 to December 2017, were reviewed (TWC, 2018). These municipalities were selected for having wild populations of the species under study and for their proximity to the collection points. The information obtained was considered the basis for defining the environmental conditions of the experimental design.

Experimental design for germination tests

To determine the effect of temperature on the germination of *C. mexicanum* seeds, three temperature treatments (T)

Diseño experimental para pruebas de germinación

Para determinar el efecto de la temperatura sobre la germinación de las semillas de *C. mexicanum* se definieron tres tratamientos de temperatura (T): T1) 28 °C, T2) 21 °C y T3) 15 °C; con base en las temperaturas máximas, mínimas y promedio de las estaciones meteorológicas consultadas (TWC, 2018). Las condiciones ambientales que se mantuvieron constantes en los tres tratamientos fueron fotoperiodo (F), 12:12 h luz/oscuridad; humedad del sustrato (HS), 100% y humedad ambiental (HA), 30%. Aunque en los datos de las estaciones meteorológicas se registró humedad ambiental promedio de 56.8 a 77.2% (TWC, 2018), se decidió establecer en 30% para evitar problemas de contaminación por hongos. Las pruebas de germinación se realizaron dentro de una cámara bioclimática refrigerada (CBRF-20°, México). Las repeticiones por tratamiento fueron cinco cajas de Petri con 30 núculas cada una (el total fue de 150 núculas por tratamiento) las cuales se evaluaron durante 20 d.

Pruebas de germinación

La prueba se realizó en cajas de Petri de vidrio, cuya desinfección se efectuó con una solución de cloro comercial al 2% por 30 min, además de alcohol al 96% (Bueno *et al.*, 2007). Dentro de cada caja de Petri numerada, se colocó una almohadilla de algodón, y sobre ella las núculas acomodadas y numeradas para dar seguimiento a su germinación individual. Las núculas se desinfectaron en una solución de cloro comercial al 2%, se añadió 0.5 mL de Tween 20 (J. T. Baker®) para romper la tensión superficial, debido a su tamaño pequeño; se dejaron 2 min en dicha solución y se enjuagaron con agua destilada. Las núculas se colocaron en la cámara bioclimática (CBRF-20°, México) en cajas de Petri sin tapa, bajo las condiciones establecidas en el diseño experimental y se regaron a saturación cada día con agua destilada. La distribución de cajas y núculas numeradas se dibujó y se registró el número de núcula en filas (1-30) y el número de días a la germinación por núcula en columnas (1-20 d). Cada semilla se revisó en el microscopio de disección (Leica Zoom 2000°, China) cada día, la emergencia de la radícula fue el indicador de la germinación.

Análisis estadístico

Para evaluar diferencias en el tamaño de cálices persistentes y núculas de las dos poblaciones se realizó una prueba de t de Student, con el programa estadístico Past 3.21 (Hammer *et al.*, 2001). Para conocer las diferencias en el porcentaje de germinación entre los tres tratamientos se utilizó un modelo lineal

were defined: T1) 28 °C, T2) 21 °C and T3) 15 °C; based on the maximum, minimum and average temperatures of the meteorological stations consulted (TWC, 2018). The environmental conditions that were kept constant in the three treatments were photoperiod (F), 12:12 h light/dark; substrate water content (HS), 100% and ambient humidity (HA), 30%. Although at the weather stations data recorded average values of ambient humidity from 56.8 to 77.2% (TWC, 2018), it was decided to set this variable at 30% to avoid fungal contamination problems. Germination tests were performed inside a refrigerated bioclimatic chamber (CBRF-20°, Mexico). The replicates per treatment were five petri dishes with 30 nutlets each which were evaluated for 20 d (total was 150 nutlets per treatment).

Germination tests

The test was set in glass Petri dishes, which were disinfected with a 2% commercial chlorine solution for 30 min, in addition to 96% alcohol (Bueno *et al.*, 2007). Inside each numbered Petri dish, a cotton pad was placed, and on top of it the nutlets that were numbered and arranged to monitor their individual germination. Nutlets were disinfected in a 2% commercial chlorine solution, 0.5 mL of Tween 20 (J. T. Baker®) was added to break the surface tension due to their small size; they were left for 2 min in this solution and rinsed with distilled water. Nutlets were placed in the bioclimatic chamber (CBRF-20°, Mexico) in Petri dishes without lids, under the conditions established in the experimental design, with watering up to saturation every day with distilled water. Nutlets distribution within the Petri dish was depicted and a number was assigned to each nutlet. For the records, the number in the nutlets (1-30) was set in rows and the number of days to germination per each nutlet was recorded in columns (1-20 d). Each nutlet was checked under the dissecting microscope (Leica Zoom 2000°, China) every day; radicle emergence was the indicator of germination.

Statistical analysis

To evaluate differences in the size of fruiting calyxes and nutlets of the two populations, a Student t-test was performed with the statistical program Past 3.21 (Hammer *et al.*, 2001). A generalized linear model (binomial error distribution and logit function) was used with SAS® JMP 7.0 (SAS Institute Inc., 2007) to determine the differences in germination percentage between the three treatments. Germination curves were obtained in the Germinator software (Joosen *et al.*, 2010) and germination was also analyzed in that program, when 10% germination (t 10) and the average (t 50) per treatment were established.

generalizado (distribución de error binomial y función de enlace logit) con JMP 7.0 de SAS® (SAS Institute Inc., 2007). Las curvas de germinación se obtuvieron en el programa estadístico Germinator (Joosen *et al.*, 2010) y en ese programa se analizó también la germinación, cuando se estableció 10% de germinación ($t = 10$) y el promedio ($t = 50$) por tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización morfológica del cáliz persistente

Tamaño

Los cáliz persistentes de la población Sombrerete presentaron intervalo de anchura 1.30 - 2.00 mm y longitud 5.30 - 8.40 mm, con tamaño promedio 1.64×6.57 mm (anchura \times longitud). Los cáliz persistentes de la población Maguey Verde tuvieron intervalos de anchura 1.30 - 2.70 mm y longitud 5.30 - 8.50 mm, con tamaño promedio 1.64×6.57 mm (anchura \times longitud).

El promedio de los cáliz persistentes de ambas poblaciones fue 1.60×6.70 mm (anchura \times longitud). De acuerdo con la prueba de t , la diferencia en tamaño de cáliz persistentes entre las poblaciones, longitud ($t = 0.8992$, g.l. = 58, $p = 0.372$) y anchura ($t = 0.2826$, g.l. = 58, $p = 0.778$) no fue significativa (Figura 1).

Una característica notable de la familia Lamiaceae respecto al desarrollo de flores y frutos, es la presencia de cáliz persistente (Scandaliaris y Barboza, 2013). Esto significa que una vez que los óvulos han sido fecundados e inicia el desarrollo de las semillas, el cáliz permanece hasta la maduración de las núculas. Como ya se indicó, *C. mexicanum* presenta esta

RESULTS AND DISCUSSION

Morphological characterization of the fruiting calyx

Size

The fruiting calyxes of the Sombrerete population had a width interval of 1.30 - 2.00 mm and length of 5.30 - 8.40 mm, with an average size of 1.64×6.57 mm (width \times length). The fruiting calyxes of the Maguey Verde population had intervals of width of 1.30 - 2.70 mm and length 5.30 - 8.50 mm, with average size 1.64×6.57 mm (width \times length).

The average fruiting calyxes of both populations were 1.60×6.70 mm (width \times length). According to the t -test, the difference in fruiting calyx size between populations, length ($t = 0.8992$, g.l. = 58, $p = 0.372$) and width ($t = 0.2826$, g.l. = 58, $p = 0.778$) was not significant (Figure 1).

A notable characteristic of the Lamiaceae family regarding flower and fruit development is the presence of a fruiting calyx which is persistent in the plants (Scandaliaris and Barboza, 2013). This means that once the ovules have been fertilized and seed development begins, the calyx remains until the maturation of the nutlets. As it was already indicated, *C. mexicanum* shows this characteristic. Calyx size, shape, color and shell are considered relevant characters for cultivation and can be used as morphological and agronomic descriptors (Franco and Hidalgo, 2003). At comparing the average length of the fruiting calyx in this study (6.70 mm), with the taxonomic description of *C. mexicanum*, in

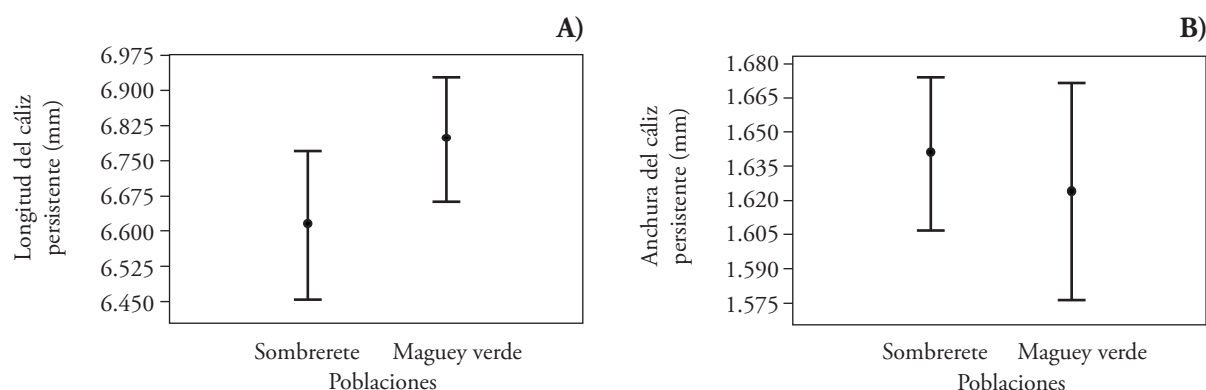


Figura 1. Diferencia de tamaño en cáliz persistente de *C. mexicanum* entre las poblaciones. A, longitud; B, anchura.
Figure 1. Size difference in fruiting calyx of *C. mexicanum* between populations. A, length; B, width.

característica; por lo tanto el tamaño, forma, color y cubierta del cáliz se consideran caracteres relevantes para cultivo y pueden usarse como descriptores morfológicos y agronómicos (Franco e Hidalgo, 2003). Al comparar la longitud promedio del cáliz persistente en este estudio (6.70 mm), con la descripción taxonómica de *C. mexicanum*, en la cual se indicó longitud de cáliz 6 mm (Hanan-Alipi, 2009) se observó que no existen cambios notables en el tamaño del cáliz durante el desarrollo de las núculas, por lo tanto, el tamaño del cáliz persistente no es un indicador de madurez. Aunque sí puede considerarse un descriptor botánico y taxonómico distintivo, pero con poca variabilidad en la especie.

Forma y color

El cáliz persistente tiene forma cilíndrica con cinco puntas (lóbulos o dientes) en el ápice, en forma de estrella. Las siguientes tonalidades de verdes y cafés se observaron: 2.5Y5/2, 2.5Y5/4, 2.5Y5/6 2.5Y6/4, 2.5Y6/6, 2.5Y6/8, 5Y7/4, 5Y7/6, 5Y7/8, 5Y8/4, 5Y8/6, 5Y8/8, 5Y8/12, 2.5GY7/10 y 2.5GY8/10 (Munsell, 2011; Figura 2).

La forma del cáliz persistente es un carácter botánico y taxonómico que se puede usar como descriptor para la especie, porque fue constante entre las muestras de ambas poblaciones. Mientras que el color sí se puede usar como un descriptor morfológico y agronómico. El cáliz persistente con tonos verdes presentó núculas inmaduras, mientras que el cáliz con tonos cafés en estado semi seco presentó núculas maduras, lo cual demuestra que el color es un indicador de madurez.

Cubierta

El cáliz persistente es estriado, pubescente y con glándulas globosas en la pared externa (Figura 2). En la pared interna presenta un anillo de tricomas ubicado en la base de los dientes (lóbulos) hacia el ápice del cáliz. Los dientes presentan tricomas abundantes, distribuidos de manera homogénea en toda su superficie; es decir tanto en las paredes internas como en las externas (Figura 3).

Los estudios morfológicos y anatómicos del género *Clinopodium* se enfocan principalmente en la descripción de las núculas (Wood, 2011; Scandaliaris y Barboza, 2013), con referencias escasas a

which calyx length was 6 mm (Hanan-Alipi, 2009), it was observed that there are no notable changes in the size of the calyx during the development of the nutlets, therefore, the size of the fruiting calyx is not an indicator of maturity. Although it can be considered a distinctive botanical and taxonomic descriptor, but with little variability in the species.

Shape and color

The fruiting calyx is cylindrical shaped with five star-shaped points (lobes or teeth) at the apex. The following shades of green and brown were observed: 2.5Y5/2, 2.5Y5/4, 2.5Y5/6 2.5Y6/4, 2.5Y6/6, 2.5Y6/8, 5Y7/4, 5Y7/6, 5Y7/8, 5Y8/4, 5Y8/6, 5Y8/8, 5Y8/12, 2.5GY7/10, and 2.5GY8/10 (Munsell, 2011; Figure 2).

The shape of the fruiting calyx is a botanical and taxonomic character that may be used as descriptor for the species, because it was constant among samples from both populations. Whereas color can be used as a morphological and agronomic descriptor. The fruiting calyx with green shades presented immature nutlets, while the calyx with brown shades in semi-dry state presented mature nutlets, which shows that color is an indicator of maturity.

Shell

The fruiting calyx is striated, pubescent and with globose glands on the external wall (Figure 2). On the inner wall there is a ring of trichomes located at the



Figura 2. Forma y variación en los colores del cáliz persistente de *C. mexicanum*.

Figure 2. Shape and variation in the colors of the fruiting calyx of *C. mexicanum*.

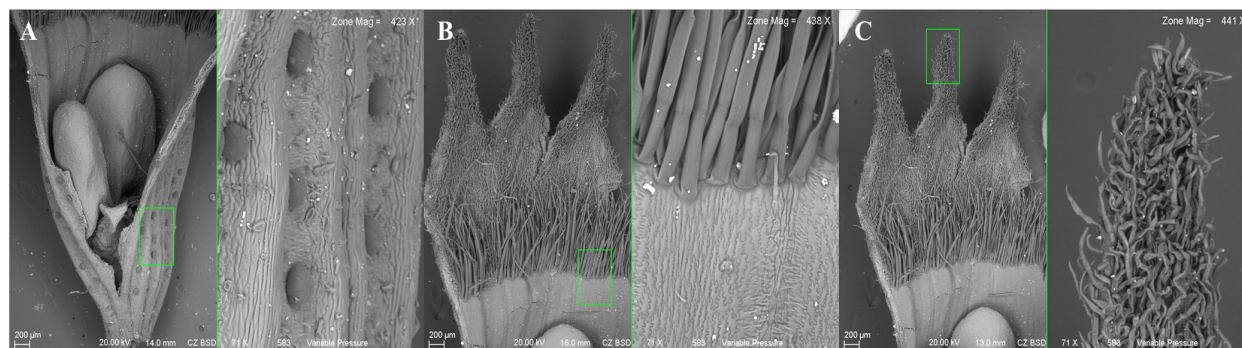


Figura 3. Cubierta del cáliz persistente de *C. mexicanum*. A. Glándulas globosas en la pared externa. B. Anillo de tricomas en la base de los dientes C. Tricomas abundantes y homogéneos en los dientes.

Figure 3. Fruiting calyx shell of *C. mexicanum*. A. Globose glands on the outer wall. B. Ring of trichomes at the base of the teeth C. Abundant and homogeneous trichomes on the teeth.

las características del cáliz persistente. Este estudio aporta información relevante de dicho carácter para *C. mexicanum*, y sirve como base para su aprovechamiento y manejo en cultivo. En referencia a la presencia del anillo de tricomas en la base de los dientes (lóbulos) del cáliz, no se trata de un carácter diagnóstico del género *Clinopodium* (Harley *et al.*, 2004), pero puede usarse como un descriptor botánico y taxonómico distintivo y constante en la especie.

Respecto a la presencia de glándulas en las paredes externas del cáliz, estas glándulas que contienen aceites esenciales en hojas y tallos son un carácter común de la familia Lamiaceae (Harley *et al.*, 2004), incluido el género *Clinopodium* (González-Gallegos *et al.*, 2017; Tapia *et al.*, 2017). Debido a que en este estudio no se hicieron pruebas específicas sobre presencia o función de aceites esenciales, solo puede inferirse que cumplen funciones de defensa contra herbívoros o microorganismos, así como atracción de polinizadores (Pichersky y Raguso, 2016).

Peso

Los 100 cálices persistentes de la población Sombrerete presentaron peso de 0.245 g, lo cual equivale a un peso promedio de 0.245×10^{-2} g; es decir, 408 cálices persistentes por gramo. Los 100 cálices persistentes de la población Maguey Verde pesaron 0.215 g, lo cual equivale a un peso promedio de 0.465×10^{-2} y a 465 cálices persistentes por gramo. El peso de los cálices persistentes y sus características puede resultar un carácter útil para el diseño de herramientas y maquinaria, para definir técnicas que faciliten procesar

base of the teeth (lobes) towards the apex of the calyx. Teeth have abundant trichomes, homogeneously distributed over their entire surface, that is, on both the internal and external walls (Figure 3).

Morphological and anatomical studies of the genus *Clinopodium* focus mainly on the description of nutlets (Wood, 2011; Scandaliaris and Barboza, 2013), with few references to the characteristics of the fruiting calyx. This study provides relevant information on that character for *C. mexicanum* that may serve as a basis for use and management in cultivation. Regarding the presence of the trichome ring at the base of the calyx teeth (lobes), this is not a diagnostic character of the genus *Clinopodium* (Harley *et al.*, 2004), but it can be used as a distinctive and constant botanical and taxonomic descriptor for the species.

Regarding the presence of glands on the outer walls of the calyx, these glands containing essential oils in leaves and stems are a common character of the family Lamiaceae (Harley *et al.*, 2004), including the genus *Clinopodium* (González-Gallegos *et al.*, 2017; Tapia *et al.*, 2017). Because no specific tests on the presence or function of essential oils were performed in this study. Thus, it can only be inferred that they may function as defense against herbivores or microorganisms, as well as pollinators attraction (Pichersky and Raguso, 2016).

Weight

The 100 fruiting calyxes of the Sombrerete population weighed 0.245 g, which is equivalent

los cálices y obtener las núculas; y en el futuro desarrollar estándares de calidad para su comercialización.

Caracterización morfológica de las núculas

Tamaño

Las núculas de la población Sombrerete presentaron intervalo de anchura 0.50 - 1.00 mm y longitud 1.00 - 1.90 mm, con promedio de 0.86×1.57 mm (anchura \times longitud). Las núculas de la población Maguey Verde mostraron intervalos de anchura 0.50 - 1.00 mm y longitud 1.30 - 2.00 mm, y en promedio midieron 1.10×1.72 mm (anchura \times longitud). De acuerdo con la prueba de t, la diferencia en longitud de las semillas entre poblaciones fue significativa ($t = 2.8324$; $p = 0.0063$). En el caso de la anchura de las semillas entre las poblaciones la diferencia no fue significativa ($t = 0.6145$; $p = 0.5413$) (Figura 4).

La descripción del tamaño de las unidades de dispersión de cualquier especie (núculas en el caso de *C. mexicanum*) es información importante, desde el punto de vista taxonómico y agronómico. En la longitud de núcula entre las poblaciones colectadas existió diferencia significativa, lo cual indica que factores extrínsecos pueden afectar este carácter descriptor. Sin embargo, el estudio no tuvo como objetivo correlacionar el tamaño de las núculas con los factores ambientales ni con las características del suelo, por lo tanto, no es posible aseverar dicha correlación.

Forma y color

En ambas poblaciones, la forma de las núculas fue elipsoidea y simétrica. El color de las núculas

to an average weight of 0.245×10^{-2} g; that is, 408 fruiting calyxes per gram. The 100 fruiting calyxes of the Maguey Verde population weighed 0.215 g, which is equivalent to an average weight of 0.465×10^{-2} and 465 fruiting calyxes per gram. The weight of the fruiting calyxes and their characteristics can be a useful character for the design of tools or equipment; and to define techniques that facilitate processing the calyxes to obtain the nutlets; and further also to develop quality standards for their commercialization.

Morphological characterization of the nutlets

Size

The nutlets of the Sombrerete population showed a width interval of 0.50 - 1.00 mm and length of 1.00 - 1.90 mm, with an average of 0.86×1.57 mm (width \times length). Nutlets from the Maguey Verde population showed intervals of width, 0.50-1.00 mm and length, 1.30 - 2.00 mm; their average size was 1.10×1.72 mm (width \times length). According to the t-test, the difference in seed length between populations was significant ($t = 2.8324$; $p = 0.0063$). In the case of seed width between populations the difference was not significant ($t = 0.6145$; $p = 0.5413$) (Figure 4).

The description of the size of the dispersal units of any species (nutlets in the case of *C. mexicanum*) is important information, from a taxonomic and agronomic point of view. There was a significant difference in nutlet length among the populations collected, which indicates that extrinsic factors may affect this descriptor character. However, the study

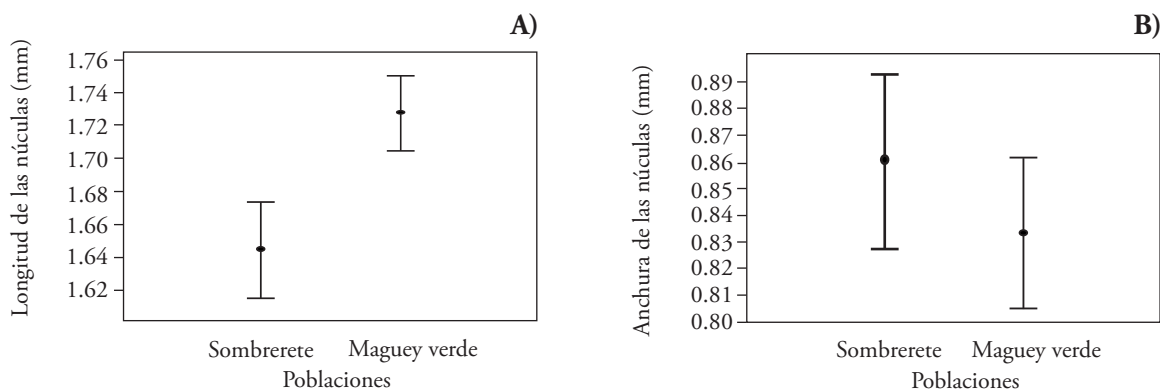


Figura 4. Diferencia de tamaño en núculas de *C. mexicanum* entre las poblaciones. A, longitud; B, anchura.
Figure 4. Difference in size of *C. mexicanum* nutlets between populations. A, length, B, width.

se observó de café a negro con las tonalidades siguientes: 5YR3/2, 2.5Y5/4, 5YR3/4, 7.5YR4/2 y 2.5YR3/4 (Munsell, 2011). Al comparar los resultados con reportes preliminares sobre la fenología de la especie³ se confirmó la presencia de núculas maduras e inmaduras en la misma época. La forma y el color son caracteres relevantes ya que son descriptores morfológicos y agronómicos de esta especie, útiles para propagación y cultivo.

Cubierta

La cubierta de las núculas presentó ornamentación reticulada redondeada-radiada y estrías cuticulares concéntricas. El hilo cárpico se ubicó en la cara ventral hacia la base de la núcula. La areola o zona perihilar presenta ceras epicuticulares de tipo cristalóide esférico y prismáticas, estas últimas muy escasas. Las ceras epicuticulares le confieren un color blanquecino en esa zona a las núculas (Figura 5).

En la familia Lamiaceae, las características en la cubierta de las núculas se asocian con su dispersión. Los estudios llevados a cabo en algunas especies de *Mentha*, muestran que las ornamentaciones de tipo reticulada y estriada permiten que las superficies de las núculas acumulen aire y esto le confiere la capacidad de flotar en agua corriente. Estas características en la ornamentación se relacionan con dispersión por nautocoria (Bonzani *et al.*, 2011). Los resultados de este estudio indicaron que las núculas *C. mexicanum* se dispersan por nautocoria, debido a que la cubierta

did not aim to correlate the size of the nutlets with environmental factors or soil characteristics, therefore it is not possible to assert such correlation.

Shape and color

In both populations, the shape of the nutlets was ellipsoid and symmetrical. The color of the nutlets was observed to be brown to black with the following shades: 5YR3/2, 2.5Y5/4, 5YR3/4, 7.5YR4/2 and 2.5YR3/4 (Munsell, 2011). Comparing the results with the preliminary report on the phenology of the species³ confirmed the presence of mature and immature nutlets at the same time. Shape and color are relevant characters since they are useful as morphological and agronomic descriptors of this species for propagation and cultivation.

Shell

The shell of the nutlets presented rounded-radiate reticulate ornamentation and concentric cuticular striations. The abscission scar was located on the ventral side towards the base of the nutlet. The areola or perihilar zone presents epicuticular waxes of spherical and prismatic crystalloid type, the latter very scarce. The epicuticular waxes give a whitish color to the nutlets in that area (Figure 5).

In the family Lamiaceae, the characteristics of the shell of the nutlets are associated with their dispersion. Studies carried out in some species of *Mentha* show

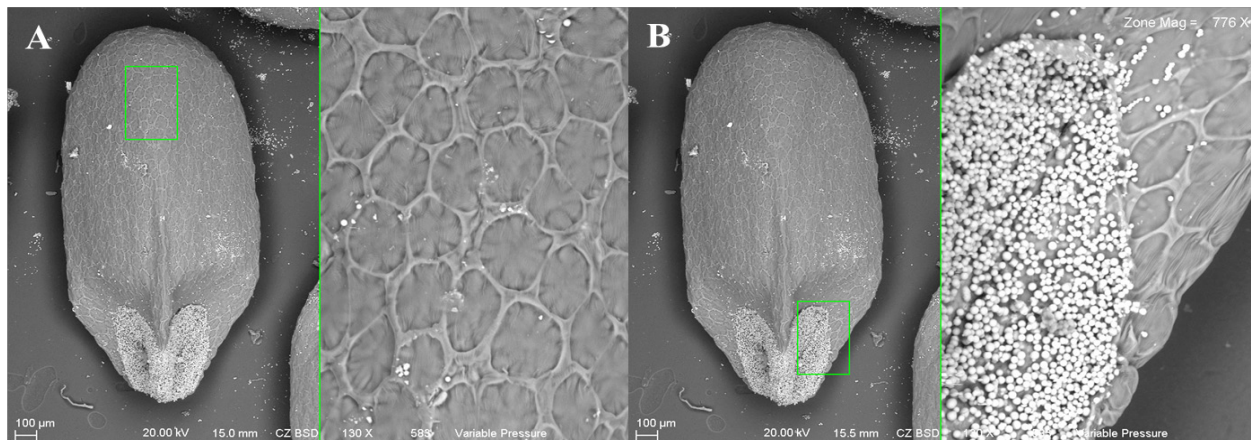


Figura 5. Cubierta de las núculas de *C. mexicanum*. A. Cubierta reticulada redondeada-radiada, estrías cuticulares concéntricas. B. Ceras epicuticulares en la zona perihilar.

Figure 5. Shell of *C. mexicanum* nutlets. A. Rounded-radiate reticulate sheath, concentric cuticular striae. B. Epicuticular waxes in the perihilar zone.

reticulada les permite flotar sobre el agua. En referencia a la presencia de ceras epicuticulares en la base de las núculas de *C. mexicanum*, es posible que su función sea proteger la zona de emergencia radicular, como lo inferido por Bonzani *et al.* (2011) en su estudio de algunas especies de *Mentha*.

Peso

En la recolecta de la población de Sombrerete en 100 núculas se obtuvo un peso de 0.039 g, lo cual equivale a un peso promedio de 0.390×10^{-2} g y a 2507 núculas por gramo. En la población de Maguey Verde, 100 núculas registraron un peso de 0.033 g, lo cual equivale a 0.330×10^{-2} g y a 2866 núculas por gramo. El registro del peso y la cantidad de núculas por gramo es información importante para su comercialización. Los resultados de este estudio mostraron una diferencia aproximada de 300 semillas por gramo entre poblaciones. Las diferencias ambientales y de suelo es probable que afecten el peso de las núculas. Sin embargo, no se llevaron a cabo estudios específicos que permitan aseverar dicha correlación.

Pruebas de viabilidad de *C. mexicanum*

Las núculas de color negro presentaron 100% de tinción en la prueba de tetrazolio y las núculas de color café 33% de tinción. Esto muestra que el cambio de coloración de café a negro es un indicador de madurez, ya que 100% de núculas teñidas equivale a 100% de viabilidad. También se observó que las núculas de color negro se obtuvieron de cáliz persistentes color café, lo cual indica que existe una relación entre el color del cáliz persistente y la madurez de la núcula. Hernández-Gómez y Miranda-Colín (2008) registraron esta relación en *Salvia hispanica* (chía). El color del cáliz persistente como indicador de madurez y el porcentaje de viabilidad de las semillas en las núculas son caracteres útiles para la germinación de poleo verde, porque facilitan a los productores la distinción entre núculas maduras e inmaduras (Figura 6) y podrán servir para determinar estándares de calidad para su comercio.

Pruebas de germinación

Los resultados mostraron que el tratamiento de temperatura con el cual se obtuvo el porcentaje de

that the reticulate and striated ornamentations allow the surfaces of the nutlets to accumulate air, and this confers them the ability to float in running water. These features in the ornamentation are related to dispersal by nautochory (Bonzani *et al.*, 2011). The results of this study indicated that *C. mexicanum* nutlets are dispersed by nautocory, because the reticulate shell allows them to float on water. In reference to the presence of epicuticular waxes at the base of *C. mexicanum* nutlets, it is possible that their function is to protect the root emergence zone, as inferred by Bonzani *et al.* (2011) in their study of some *Ment*

Weight

In the collection of the Sombrerete population, 100 nutlets had a weight of 0.039 g, which is equivalent to an average weight of 0.390×10^{-2} g and 2507 nutlets per gram. In the population of Maguey Verde, 100 nutlets had a weight of 0.033 g, which is equivalent to 0.330×10^{-2} g and 2866 nutlets per gram. Records of the weights and number of nutlets per gram is important information for marketing. Results of this study showed a difference of approximately 300 seeds per gram between populations. It is likely that the weight of the nutlets is affected by environmental and soil differences. However, no specific studies were carried out that would allow this correlation to be asserted.



Figura 6. Núculas de *C. mexicanum*. El color café (izquierda) indica núculas inmaduras, mientras que el color negro (derecha) indica núculas maduras.

Figure 6. Nutlets of *C. mexicanum*. The brown color (left) indicates immature nutlets, whereas the black color (right) indicates mature nutlets.

germinación mayor (93%) fue 28 °C; seguido del tratamiento a 21 °C (89%). El tratamiento con porcentaje de germinación menor (83%) fue el de 15 °C (Cuadro 2). De acuerdo con el modelo lineal generalizado, no se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento a 28 y 21 °C, ni tampoco entre 21 y 15 °C. Sin embargo, sí hubo diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los porcentajes de germinación a 28 y 15 °C (Figura 7).

El tiempo de germinación fue 12 d en promedio para los tres tratamientos. La germinación inició en 4 d y terminó 16 d después del inicio de la prueba. El porcentaje de germinación mayor se observó entre 4 y 7 d (Figura 8).

Las unidades de dispersión (núculas) de *C. mexicanum* son quiescentes ya que germinaron con las condiciones ambientales adecuadas, sin necesidad de algún tratamiento pre germinativo (Hartmann *et al.*, 2011). Las tres temperaturas probadas estuvieron dentro del intervalo térmico específico, ya que en las tres fue posible la germinación. Las temperaturas probadas no pueden considerarse como cardinales, porque no se evaluó la temperatura mínima para la germinación. Aún así, en este estudio se observó una relación directa entre el incremento de la temperatura y el porcentaje de germinación; similar a lo indicado por Hartmann *et al.* (2011).

Los resultados mostraron las condiciones para el mayor porcentaje de germinación, lo cual favorece el aprovechamiento de las núculas para implementar propagación, producción de plántulas y optimizar tiempo en la cadena productiva. No obstante, estos resultados sólo son válidos en sistemas de producción con condiciones ambientales controladas, y deberán validarse en sistemas de producción tradicional en campo. Las unidades de dispersión (núculas) registraron

Viability tests of *C. mexicanum*

The black colored nutlets showed 100% staining in the tetrazolium test and the brown colored nutlets showed 33% staining. This shows that the change in coloration from brown to black is an indicator of maturity, since 100% of stained nutlets is equivalent to 100% viability. It was also observed that black colored nutlets were obtained from brown fruiting calyxes, which indicates that there is a relationship between the color of the calyx and the maturity of the nutlet. Hernández-Gómez and Miranda-Colín (2008) recorded this relationship in *Salvia hispanica* (or chia, in Spanish). The color of the fruiting calyx as an indicator of maturity and the seed viability percentage of the nutlets are useful characters for the germination of *C. mexicanum*, because they make it easier for producers to distinguish between mature and immature nutlets (Figure 6) and may be further used to determine quality standards for trade.

Germination tests

Results showed that the temperature treatment with the highest germination percentage (93%) was 28 °C, followed by the 21 °C treatment (89%). The treatment with the lowest germination percentage (83%) was 15 °C (Table 2). According to the generalized linear model, no significant differences were found between the treatment at 28 and 21 °C, nor between 21 and 15 °C. However, there was a significant difference ($p \leq 0.05$) between germination percentages at 28 and 15 °C (Figure 7).

Germination time averaged 12 d for the three treatments. Germination started at 4 d and ended 16 d after starting the test. The highest germination

Cuadro 2. Germinación (%) y tiempo (d) en que las núculas de *C. mexicanum* alcanzaron 10 (t 10) y 50% (t 50) de germinación por tratamientos.
Table 2. Germination (%) and time (d) in which *C. mexicanum* nutlets reached 10 (t 10) and 50% (t 50) germination per treatment.

Tratamiento T	Germinación (%)	Tiempo de germinación (d)	
		t (10)	t (50)
28 °C	93 a	4.2 a	6.2 a
21 °C	89 ab	4.0 a	5.1 b
15 °C	83 b	5.3 b	7.4 c

Medias con literal distinta indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$). ♦ Means with different literals indicate significant difference ($p \leq 0.05$)

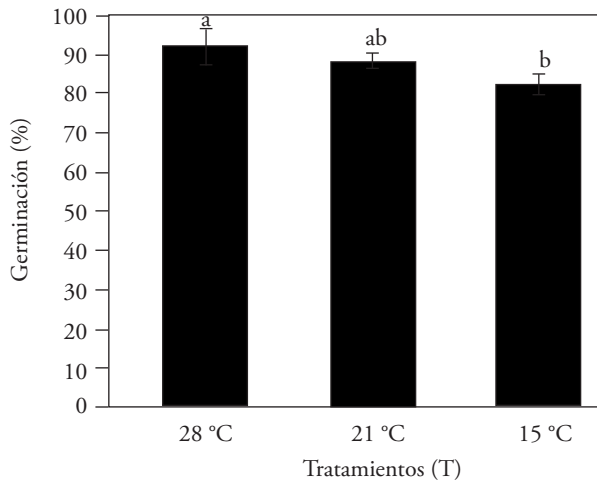


Figura 7. Germinación (%) de *C. mexicanum* en los tratamientos de temperatura.

Figure 7. Germination (%) of *C. mexicanum* in temperature treatments.

germinación >80% en los tres tratamientos en presencia de fotoperiodo 12:12 h (luz/oscuridad). Esta información podría servir para adaptar técnicas en campo a pequeña escala, como cubrir los semilleros o charolas de germinación con coberturas de color oscuro, para simular el fotoperiodo en campo y obtener porcentajes de germinación similares.

Los objetivos de este estudio no incluyeron comprobar la presencia de mixocarpia. Sin embargo, se observó la presencia de mucilagos en las núculas de *C. mexicanum* al entrar en contacto con el agua (imbibición de las núculas) durante las pruebas de viabilidad antes de la germinación. Por lo cual es posible

percentage was observed between 4 and 7 d (Figure 8).

The dispersal units (nutlets) of *C. mexicanum* are quiescent since they germinated under the appropriate environmental conditions, without the need of any pre-germinative treatment (Hartmann *et al.*, 2011). The three temperatures tested were within the specific thermal range, as germination was possible at all three. The temperatures tested cannot be considered as cardinal, because the minimum temperature for germination was not evaluated. Even so, in this study a direct relationship between temperature increase and germination percentage was observed; similar to what was indicated by Hartmann *et al.* (2011).

The results showed the conditions for the highest germination percentage, which favors the use of the nutlets to implement propagation, seedling production and optimize time in the production chain. However, these results are only valid in production systems with controlled environmental conditions and should be validated in traditional field production systems. The dispersal units (nutlets) showed >80% germination in the treatments exposed to a 12:12 h photoperiod (light/dark). This information may be used to adapt small-scale field techniques, such as covering the seedbeds with shade cloth or germination trays with dark lids to simulate the photoperiod in the field, in order to obtain similar germination percentages.

The objectives of this study did not include testing for the presence of myxocarpia. However, the presence of mucilage was observed in *C. mexicanum* nutlets upon contact with water (nutlets imbibition)

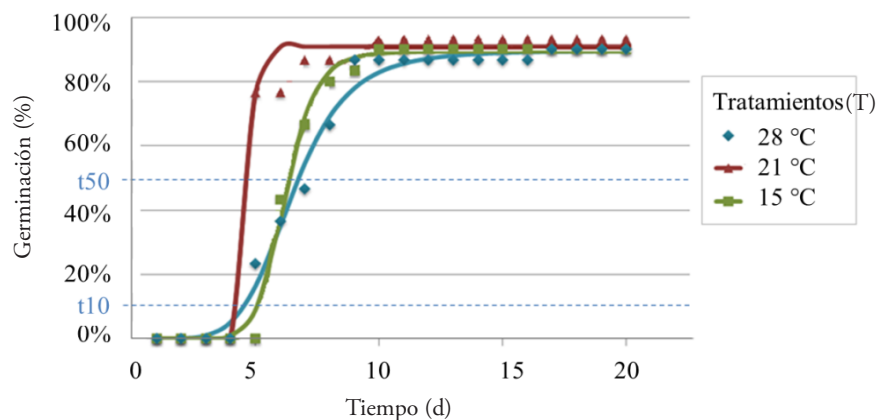


Figura 8. Tiempo transcurrido hasta 10 y 50% germinación (t 10 y t 50) con núculas de *C. mexicanum*.

Figure 8. Elapsed time to 10 and 50% germination (t 10 and t 50) with *C. mexicanum* nutlets.

inferir que *C. mexicanum* es una especie mixocárpica. La observación es relevante, debido a que la mixocarpia es común en la subfamilia Nepetoideae, pero no se presenta en todas las especies del género *Clinopodium* (Scandaliaris y Barboza, 2013).

La función del mucílago en las núculas de la familia Lamiaceae aún no se determina completamente. Algunos autores indicaron la tendencia entre las especies que viven en ambientes húmedos a no presentar mucílago, mientras que otros autores sugirieron que el mucílago protege a las semillas de la desecación y forma un microclima que incrementa el porcentaje de germinación (Bonzani *et al.*, 2011). Si estas inferencias en relación con la humedad se consideraran en el proceso de propagación y cultivo de *C. mexicanum*, los riegos deberían mantenerse a saturación para una germinación óptima.

Protocolo de propagación

Las condiciones óptimas para la germinación de las semillas de *C. mexicanum* se incluyen a continuación a manera de ficha técnica, con base en este estudio. El método de germinación se ajustó para utilizarse en invernadero o casa sombra, con las siguientes recomendaciones: 1) sustrato de germinación sugerido en recomendaciones preliminares³, 50% arena + 50% lombricomposta, para facilitar buen drenaje, 2) agua corriente, con los valores permitidos por la FAO para agua de uso agrícola (Carrazón-Alocén, 2007) y 3) en charolas de germinación o semilleros. Además, cubrir los semilleros con tapas para incrementar la temperatura; sembrar en los meses más cálidos del año porque las semillas en las núculas mostraron el mayor porcentaje de germinación a 28 °C. También, mantener el riego diario a saturación y de ser necesario regar dos veces al día en temporada de calor; utilizar sistemas de riego por aspersión fina para evitar la pérdida de las núculas, debido a su tamaño.

Información de la especie

Nombre científico: *Clinopodium mexicanum* (Benth.) Govaerts. Algunos nombres comunes: poleo, poleo verde, hierba del borracho, toronjil de monte y toronjil de menta. Familia: Lamiaceae. Origen: México. Usos: aperitivo, digestivo y medicinal; sedativo, analgésico, ansiolítico, antinociceptivo.

during viability tests prior to germination. Therefore, it is possible to infer that *C. mexicanum* is a myxocarpic species. This observation is relevant, because myxocarpy is common in the subfamily Nepetoideae, but does not occur in all species of the genus *Clinopodium* (Scandaliaris and Barboza, 2013).

The function of mucilage in the nutlets of the family Lamiaceae is not yet fully determined. Some authors indicated a trend among species living in humid environments to lack mucilage, while other authors suggested that mucilage protects seeds from desiccation and forms a microclimate that increases the germination percentage (Bonzani *et al.*, 2011). If these inferences regarding moisture were to be considered in the propagation and cultivation process of *C. mexicanum*, irrigations should be maintained at saturation for optimal germination.

Propagation protocol

The optimal conditions for germination of *C. mexicanum* seeds are included below as a technical data sheet, based on this study. The germination method was adjusted for use in a greenhouse or shade house, with the following recommendations: 1) germination substrate preliminary tested by the author³, 50% sand + 50% vermicompost, to facilitate good drainage, 2) tap water, with the values allowed by FAO (Carrazón-Alocén, 2007) and 3) in germination trays or seedbeds. In addition, cover the seedbeds with shade cloth to increase temperature; sow in the warmest months of the year because the seeds in the nutlets showed the highest germination percentage at 28 °C. Also, maintaining daily irrigation at saturation and if necessary, irrigate twice a day during the hot season, using sprinkler light irrigation systems to avoid the loss of the nutlets, due to their size.

Species information

Scientific name: *Clinopodium mexicanum* (Benth.) Govaerts. Some common names (in Spanish) poleo verde, hierba del borracho, toronjil del monte and toronjil de menta. Family: Lamiaceae. Origin: Mexico. Uses: aperitif, digestive and medicinal, sedative, analgesic, anxiolytic, antinociceptive.

Caracteres diagnósticos y procedimiento para recolecta

Arbusto con tallos pubescentes, hojas opuestas, ovaladas, glabras, con margen aserrado; flores solitarias, de cáliz tubular y corola anaranjada dividida en dos labios con cuatro estambres sobresalientes. Cortar con tijeras de poda, sólo las ramas que presenten cálices persistentes, almacenar el material en bolsas de papel y separar las núculas en tamiz metálico 2mm. La época de recolecta puede ser durante todo el año. Como material de propagación, cortar sólo cálices persistentes cafés (semi-secos) para obtener núculas negras (maduras).

Descripción de cálices persistentes y núculas

Cálices persistentes. Forma cilíndrica, con cinco o lóbulos o dientes en el ápice; tonalidad verde en fresco y café en seco; tamaño promedio, 1.6 × 6.7 mm (anchura × longitud); peso, 436.5 cálices persistentes por gramo.

Núculas. Elipsoideas y simétricas, café (inmaduras) a negro (maduras); cuña blanquecina en la base; tamaño promedio, 0.8 × 1.6 mm (anchura × longitud); peso: 2686.5 núculas por gramo.

Almacenamiento y tratamiento pre germinativo

Los cálices persistentes y núculas se deben colocar en frascos pequeños (100 mL) con tapa. Recomendaciones: agregar un sobre de sílica gel al interior para reducir la humedad y conservar en buen estado las muestras; mantener los frascos en condiciones de sombra a temperatura y humedad ambiental. No es necesario ningún tratamiento pre germinativo. La viabilidad observada (en porcentaje, %) de las unidades de dispersión fue 33% en núculas color café y 100% en núculas color negro.

Método y condiciones controladas para germinación (laboratorio)

Contenedor: cajas Petri de vidrio, desinfectadas, sin tapa. Sustrato: algodón. Humedad ambiental: 30%. Fotoperiodo: 12:12 h luz/oscuridad. Riego: diario a saturación, con agua destilada. Temperatura: 28 °C.

Diagnostic characters and collection procedure

Shrub with pubescent stems, opposite leaves, oval, glabrous, with serrated margin; solitary flowers, tubular persistent fruiting calyx and orange corolla divided into two lips with four protruding stamens. Cut with pruning shears only the branches with fruiting calyxes, store the material in paper bags and separate the nutlets in a metal sieving mesh (2mm). Nutlets can be collected season can be throughout the year. As propagation material, cut only brown (semi-dry) fruiting calyxes to obtain black (mature) nutlets.

Description of fruiting calyxes and nutlets

Fruiting calyxes. Cylindrical shape, with five lobes or teeth at the apex; shade green when fresh and brown when dry; average size, 1.6 × 6.7 mm (width × length); weight, 436.5 fruiting calyxes per gram.

Nutlet. Ellipsoid and symmetrical, brown (immature) to black (mature); whitish wedge at base; average size, 0.8 × 1.6 mm (width × length); weight: 2686.5 nutlets per gram.

Storage and pre-germination treatment

Fruiting calyxes and nutlets should be placed in small vials (100 mL) with lids. Recommendations: add an envelope of silica gel in the interior to reduce humidity and preserve the samples in good condition; keep the vials in shaded conditions at room temperature and humidity. No pre-germinative treatment is necessary. The observed viability (percentage, %) of the dispersion units was, 33% in brown nutlets and 100% in black nutlets.

Method and controlled conditions for germination (laboratory)

Container: glass Petri dishes, disinfected, without lid. Substrate: cotton. Ambient humidity: 30%. Photoperiod: 12:12 h light/dark. Irrigation: daily at saturation, with distilled water. Temperature: 28 °C.

Método operativo y condiciones de germinación (en invernadero o casa sombra)

Contenedor: charolas de germinación o semilleros. Sustrato: 50% arena + 50% lombricomposta o *Peat moss*. Riego: a saturación, por aspersión con agua corriente. Época de siembra: a partir de abril y mayo (según la región de la recolecta) para aprovechar las temperaturas más altas. El uso de recubrimientos o domos es aconsejable para incrementar la temperatura del semillero; así como mantener la humedad y dar seguimiento constante para prevenir la deshidratación.

Germinación

Inicio: 4 d después de la siembra. Promedio (50% germinación): 6 d después de la siembra. Término: 16 d después de la siembra. Porcentaje máximo de germinación: 93%. El tiempo y porcentaje de germinación están sujetos al manejo de las condiciones ambientales y a la viabilidad de las núculas colectadas.

CONCLUSIONES

El estudio destacó algunos caracteres botánicos relevantes de la familia Lamiaceae en los órganos y estructuras reproductivos de *Clinopodium mexicanum* para usarlos con un enfoque agronómico. Durante las etapas fenológicas floración y fructificación, el cáliz permanece en la planta. Las núculas son las unidades de dispersión, pues aparentan y cumplen la función de semillas, aunque por su anatomía son frutos.

Este es el primer reporte detallado de los caracteres botánicos, tamaño, forma, color, cubierta y peso de cálices persistentes y núculas de *C. mexicanum*. Además, se aportó evidencia de la relación entre el color de cálices persistentes y núculas respecto a estado de madurez. También se recabó información ecológica sobre dispersión y germinación, como inferir la presencia de nautocoria y mixocarpia. Las unidades de dispersión (núculas) no necesitan tratamiento pre germinativo. El aumento en la temperatura durante la germinación causó incremento directo en el porcentaje de germinación.

Por último, se diseñó un protocolo de germinación completo, el cual incluye la identificación de la especie en campo, métodos de colecta, almacenamiento y recomendaciones prácticas para iniciar la propagación de la especie en invernadero o casa

Propagation method and germination conditions (greenhouse or shade house)

Container: germination trays or seedbeds. Substrate: 50% sand + 50% vermicompost or *Peat moss*. Irrigation: saturation, by aspersion with tap water. Sowing time: from April and May (depending on the collection site) to take advantage of highest temperatures. The use of covers or domes is advisable to increase the temperature of the seedbed; as well as maintaining humidity and monitoring to prevent dehydration.

Germination

Start: 4 d after sowing. Average (50% germination): 6 d after sowing. Term: 16 d after sowing. Maximum germination percentage: 93%. The time and percentage of germination depend on environmental conditions, management and the viability of the collected nutlets.

CONCLUSIONS

The study focused on some botanical characters of the Lamiaceae family in the reproductive organs and structures of *Clinopodium mexicanum* aiming at an agronomic approach. During the phenological stages of flowering and fruiting, the calyx remains on the plant. The nutlets are the dispersal units, since they look like seeds and function as propagation units, although anatomically they are fruits.

This is the first detailed report on the botanical characters, size, shape, color, shell and weight of fruiting calyxes and nutlets of *C. mexicanum*. Evidence was also provided on the relationship between the color of the fruiting calyxes and nutlets in regard to maturity stage. Ecological information on dispersal and germination was also collected, such as inferring the presence of nautochory and myxocarpia. The dispersal units (nutlets) do not require pre-germinative treatment. The increase in temperature during germination caused direct increase in germination percentage.

Finally, a complete germination protocol was designed. It includes the identification of the species in the field, collection methods, storage and practical recommendations to initiate the propagation of the species in a greenhouse or shade house. This

sombra. Esta información es relevante para la conservación de la especie porque en la actualidad se extrae de poblaciones silvestres sin plan de manejo y sin registros de propagación ni cultivo.

LITERATURA CITADA

- Alvarado, A. M., F. García-Trejo, A. Cardador-Martínez, F. Magallán-Hernández. 2020. *Clinopodium mexicanum*: potential and difficulties for the sustainable use of a Mexican medicinal plant. Bol. Latinoam. y del Caribe Plant. Medic. y Arom. 19: 149-160.
- Bonzani, N. E., V. S. Bravi, y G. E. Barboza. 2011. Estudios morfo-anatómicos de gineceo y fruto en especies de *Mentha* (Lamiaceae) de Argentina. Caldasia. 33: 349 - 366.
- Bueno, M. S., S. R. Feldman, y J. P. Ortiz. 2007. Desinfección de cariopses y regeneración de plantas de *Spartina argentinensis*. Cien. Inv. Agr. 34: 231-236.
- Carrazón-Alocén, J. 2007. Manual práctico para el diseño de sistemas de mini riego. Programa Especial para la Seguridad Alimentaria - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (PESA-FAO). 39 p.
- Cassani, J., A. G. Escalona-Araujo, M. Martínez-Vázquez, N. Manjarrez, J. Moreno, y R. Estrada-Reyes. 2013. Anxiolytic-like and antinociceptive effects of 2(S)-Neoponcirin in mice. Molecules. 18: 7584 - 7599.
- Estrada-Reyes, R., M. Martínez-Vázquez, A. Gallegos-Solís, G. Heinze, J. Moreno. 2010. Depressant effects of *Clinopodium mexicanum* Benth. Govaerts (Lamiaceae) on the central nervous system. J. Ethnopharmacol. 130: 1-8.
- FSC-GEF-UNEP (Forest Stewardship Council- Global Environment Facility-United Nations Environment Programme). 2016. Guía para la recolección de plantas medicinales. 2ª. Ed. ForCES. República de Chile. 70 p.
- Franco, T. L., y R. Hidalgo. 2003. Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. Boletín técnico no. 8. 89 p.
- González-Gallegos, J. G., H. A. Castillo-Gómez y J. L. Fernández-Alonso. 2017. Discovery of naturalized *Clinopodium nepeta* (Lamiaceae) in Oaxaca and San Luis Potosí, México. Phytotaxa 312: 279-286.
- González, V. M. J., T. Zanatta A., G. E. Meneghello., A. B. Noguez M., Y. Lezcano A. y P. Peña. 2019. Protocolo de análisis de viabilidad de semillas de chía mediante test de tetrazolio. Rev. Mex. Cienc. Agríc. 10: 1481-1489.
- Hammer, Ø., A. T. Harper D., y P. D. Ryan. 2001. Past: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. Paleontol. Electron. 4: 9 p.
- Hanan-Alipi, A. M. 2009. Ficha *Clinopodium mexicanum* (Benth.) Govaerts. Malezas de México. CONABIO. http://www.conabio.gob.mx/malezasde_mexico/lamiaceae/clinopodium-mexicanum/fichas/ficha.htm (Consultado: mayo 2018).
- Harley, R. M., S. Atkins., A. L. Budantsev., P. D. Cantino., B. J. Conn., R. Grayer., M. M. Harley., R. the Kok., T. Krestovskaya., R. Morales., A. J. Paton., O. Ryding. and T. Upson. 2004. Labiatae. In: Kubitzki, J.W. (ed.) The Families and Genera of Vascular Plants. Flowering Plants. Dicotyledons. Lamiales (except Acanthaceae, including Avicenniaceae). Springer. New York, USA. pp:167-275.
- Hartmann, H. T., D. E. Kester, F. T. Davies-Jr., and R. L. Geneve. 2011. Plant Propagation: Principles and Practices. 8th Ed. Prentice Hall. Hoboken, NJ. USA. 915 p.
- Hernández-Gómez, J. A., y S. Miranda-Colín. 2008. Caracterización morfológica de chía (*Salvia hispanica*). Rev. Fitotec. Mex. 31: 105-113.
- Joosen, R. V., J. Kodde, L. A. Willems, W. Ligterink, van der Plas, L. H., y H. W. Hilhorst. 2010. Germinator: a software package for high throughput scoring and curve fitting of Arabidopsis seed germination. Plant J. 62: 148 - 159.
- Martínez-Gordillo, M., Frago-Martínez, I., García-Peña, M. R. y Montiel, O. 2013. Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. Rev. Mex. Biodiv. 84: 30-86.
- Martínez-Gordillo, M., B. Bedolla-García, G. Cornejo-Tenorio, I. Frago-Martínez, M. García-Peña., J. González-Gallegos, S. Lara-Cabrera y S. Zamudio. 2017. Lamiaceae de México. Bot. Sci. 95: 780-806.
- Moré, E., Fanlo, M., Melero R. y Cristóbal R. 2010. Guía para la producción sostenible de plantas aromáticas y medicinales. Centro Tecnol. For. Cataluña. 10 p.
- Palma-Tenango, M., R. San Miguel-Chávez y R. M. Soto-Hernández. 2017. Aromatic and Medicinal Plants in Mexico. Intech OS chapter. DOI: 10.5772/66507.
- Pichersky, E. y R. A. Raguso. 2016. Why do plants produce so many terpenoid compounds? New Phytol 220: 692-702.
- SAS Institute Inc. 2007. New features for JMP 7.0. What's new in JMP Integration. https://www.jmp.com/support/notes/41/adddl/fusion_41004_1_newfeatures7_0.pdf (Consultado: mayo 2018).
- Scandaliaris, M. y G. E. Barboza. 2013. Differentiation of Argentine species of *Clinopodium* (Lamiaceae: Nepetoideae) through morphological and anatomical characteristics of its fruits. J. Bot. Res. Inst. Texas. 7: 203-215.
- TWC (The Weather Company). 2018. Weather Underground. Product and Technology 2014-2018. <https://www.wunderground.com/> (Consultado: junio 2018).
- Tapia M., E. R., F. E. Acaro C. y A. J. Castro L. 2017. Actividad antioxidante del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunt) Govaerts "panizara". Ágora 4: 1-6.
- Wood, J. R. I. 2011. *Clinopodium* L. (Lamiaceae) in Bolivia. Kew Bull. 66: 199-226.

—End of the English version—

