



Journal of Pharmacy & Pharmacognosy

Research

E-ISSN: 0719-4250

editor@jppres.com

Asociación de Académicos de Ciencias
Farmacéuticas de Antofagasta
Chile

Manzano, Patricia I.; Miranda, Migdalia; Gutiérrez, Yamilet; Santos, Efren; Scull, Ramón
Estudio morfo-anatómico e identificación genética de Vernonanthura patens (Kunth) H.
Rob.

Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research, vol. 2, núm. 5, septiembre-octubre,
2014, pp. 119-128

Asociación de Académicos de Ciencias Farmacéuticas de Antofagasta
Antofagasta, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=496050270002>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto



Estudio morfo-anatómico e identificación genética de *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob.

[Morpho-anatomical and fingerprinting study of *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob.]

Patricia I. Manzano^{a*}, Migdalia Miranda^{a,b#}, Yamilet Gutiérrez^b, Efren Santos^a, Ramón Scull^b

^aEscuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Campus Gustavo Galindo, Prosperina, Km 30.5, Vía Perimetral, PO: 09-01-586, Guayaquil, Ecuador. [#]Investigador Prometeo.

^bInstituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana, Calle 222 #2317, entre 23 y 27. La Coronela, La Lisa. La Habana. Cuba.

*E-mails: manzanapatricia@hotmail.com; pmanzano@espol.edu.ec

Abstract

Context: The species *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. (Asteraceae) is a South American native wild bush that grows in various provinces of Ecuador and it has been used in traditional medicine for several diseases, highlighting its use in treatment of leishmaniasis, a condition of high incidence in the country. Despite its medicinal use, there are few or none botanic, chemical nor biological studies for this species.

Aims: In this paper it were comprised the morpho-anatomical characterization of leaves and stems and genetic identification of a DNA fraction of the leaves of *V. patens*, in order to provide the elements for proper characterization and contribute to the establishment of quality control.

Methods: The macromorphological description was made in leaves and stems from the fresh plant. The micromorphological evaluation was performed by paraffin inclusion of the material with cross-section that were clarified in sodium hypochlorite for its posterior safranin and cresil's blue stained and its glycerinated gel fixation respectively.

On obtaining the DNA chloroplast it was followed the internal protocol established by Molecular Biology CIBE's laboratory. In order to sequence isolated DNA fragments from leaves of *V. patens*, Macrogen Maryland, USA'S company services were hired.

Results: Leaves and stems of the new species' micro morphological characteristics were described for the first time and new macro morphological characters were described too from stems particularly.

Conclusions: Using molecular and macro-micromorphological assessments is corroborated the identity of the *V. patens* species growing in Ecuador coast.

Keywords: Genetics; morpho-anatomical; *Vernonanthura patens*.

Resumen

Contexto: La especie *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob., (Asteraceae) es un arbusto silvestre originario de Sudamérica que crece en diversas provincias de Ecuador y es utilizada en medicina tradicional para diferentes afecciones, destacándose entre éstas su empleo en el tratamiento de leishmaniasis, afección de alta incidencia en el país. Los estudios botánicos, químicos y biológicos de esta especie son escasos.

Objetivos: En este trabajo se abordan la caracterización morfo-anatómica de hojas y tallos y la identificación genética de una fracción de ADN de las hojas de *V. patens*, con el objetivo de aportar los elementos para su correcta caracterización y contribuir al establecimiento de su control de calidad.

Métodos: La descripción macromorfológica se efectuó en las hojas y tallos de la planta fresca. Para la evaluación micromorfológica se realizó la inclusión en parafina del material empleando cortes transversales, los cuales fueron aclarados en hipoclorito de sodio para su posterior coloreado con safranina y azul de cresil y la correspondiente fijación con gelatina glicerinada.

En la obtención del ADN de cloroplasto se siguió el protocolo interno establecido por el laboratorio de Biología Molecular del CIBE-ESPOL. Para la secuenciación de los fragmentos de ADN aislados de las hojas de *V. patens*, se contrataron los servicios de la empresa Macrogen, Maryland, EE.UU.

Resultados: Se describieron, por primera vez, las características micromorfológicas de las hojas y tallos de la especie y se describieron nuevos caracteres macro-morfológicos particularmente de los tallos.

Conclusiones: Mediante evaluaciones moleculares y macro-micromorfológicas se corroboró la identidad de la especie *V. patens* que crece en la costa ecuatoriana.

Palabras Clave: Genética; morfo-anatómico; *Vernonanthura patens*.

ARTICLE INFO

Received | Recibido: May 25, 2014.

Received in revised form | Recibido en forma corregida: August 4, 2014.

Accepted | Aceptado: August 13, 2014.

Available Online | Publicado en Línea: August 23, 2014.

Declaración de Intereses | Declaration of interests: Los autores declaran no poseer conflicto de interés.

Financiación | Funding: Proyecto Prometeo de la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación y la Escuela Superior Politécnica del Litoral de la República del Ecuador.



INTRODUCCIÓN

La demanda de material vegetal ha inducido al cultivo y recolección de especies silvestres con importancia terapéutica, en diversas zonas geográficas, y esto ha propiciado una variabilidad en la concentración de principios activos, provocada por cambios de medio ambiente diferentes. Es por ello que los países y sus instancias gubernamentales han desarrollado farmacopeas herbolarias, donde se recopila toda la información reglamentaria, los métodos para el control de la calidad y las monografías, para las plantas empleadas como medicinales.

Vernonanthura patens (Kunth). H Rob. es una especie que crece silvestre en diferentes zonas de Ecuador y que ha sido empleada por la población para el tratamiento de la leishmaniasis, una de las patologías de alta incidencia en el país. Manzano et al. (2013) estudiaron algunos parámetros farmacognósticos de la especie que crece en el Cantón de Marcabelí, provincia del Oro y propusieron los parámetros de calidad de las hojas, tallos y flores de la especie. Estos autores (Manzano et al., 2012; 2013a; 2013b; 2013c y 2013d) informaron la actividad antimicrobiana de una fracción hexánica de las hojas de la especie frente a *Fusarium oxysporum* y *Penicillium notatum*, la composición química de diferentes fracciones de las hojas empleando el método acoplado CG-EM e identificaron triterpenos pentacíclicos y los compuestos grasos presentes en la especie. Como interesante de estos estudios está el hecho de que como componentes fundamentales de la especie informan a los triterpenoides pentacíclicos (lupeol, epilupeol y acetato de lupeol) a diferencia de otras especies del género *Vernonanthura*, donde se ha demostrado la presencia de lactonas sesquiterpénicas. Para la especie ecuatoriana también se ha demostrado la actividad antileishmanial del extracto etanólico de las hojas (Manzano et al., 2014).

Como parte de los estudios realizados a la especie de procedencia ecuatoriana, en el presente trabajo se muestra la caracterización morfo-anatómica y genética de la especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal utilizado fue recolectado en el cantón Marcabelí, de la provincia de El Oro, con las coordenadas siguientes S 3°47'06,14" W 79°54'32,66"; a 316,58 m de altura. Una muestra del material vegetal se tomó para la identificación botánica, la cual fue herborizada en el Herbario Nacional del Ecuador (QCNE), Quito, con la clave CIBE37. Estos estudios se realizaron con la planta en estado fenológico vegetativo.

La descripción macromorfológica de la planta fresca, se realizó a simple vista y con ayuda de un estereoscopio Zeizz LUMAR.V12, Alemania, conectado a un controlador de luz MC 1500 y KL 2500 LCD y a una fuente de poder Zeizz HBo 100, adaptado a una cámara fotográfica AXION MRC5. El programa para visualizar las imágenes fue AXION VISIÓN Rel 4.8, de la misma marca y la misma procedencia, siguiendo la metodología descrita por Miranda y Cuéllar (2001).

En las hojas de la especie se determinaron las características siguientes: forma del limbo, borde, ápice, base, pecíolo, venación, consistencia y color. Se efectuaron, además, las mediciones del largo y ancho en 100 hojas con ayuda de un micrómetro. A los tallos se les analizó: forma, color, superficie externa e interna y fractura, además, se realizaron 100 mediciones de la distancia entre pecíolos, del diámetro medio de la médula y el diámetro de los tallos.

Para la evaluación micromorfológica de las hojas y tallos se llevó a cabo la inclusión en parafina del material vegetal fresco según la técnica descrita por Miranda y Cuéllar (2001). Se realizaron los cortes transversales, para lo cual se empleó un micrótomo marca Reichert modelo T-Jung, EE.UU. Los cortes histológicos fueron aclarados en hipoclorito de sodio y se colorearon en safranina (Sigma Chemical Co., Missouri, EE.UU.) al 1% y azul de cresil (Sigma Chemical Co.) al 1% en agua destilada y se fijaron con gelatina glicerinada (Merck, Darmstadt, Alemania), según los procedimientos descritos por Peacock y Bradbury (1973), y Gattuso y Gattuso (1999). Para visualizar los diferentes caracteres anatómicos internos del vegetal se empleó un

microscopio Zeizz, modelo AXIOS KOPP₂ PLUS, Alemania, con cámara de video a color CANONN modelo PC-1019 EE.UU.

Para la codificación de barras moleculares se utilizaron 123 y 231 mg de hojas frescas de estratos superiores e inferiores de los arbustos. Las muestras, inmediatamente después de colectadas, se introdujeron en envases de polietileno y se sumergieron en nitrógeno líquido para su posterior extracción. Todos los utensilios empleados en la manipulación del material vegetal se enfriaron hasta -4°C para optimizar el proceso. En el pesaje y molienda se emplearon balanza analítica Thomas Scientific modelo TSXB220A, EE.UU. y un molino de bolas marca RESTCH, modelo MM400, Alemania, a 30 Hz por 20 segundos, respectivamente. Se siguió el protocolo interno establecido por el Laboratorio de Biología Molecular del CIBE-ESPOL, empleando incubadora Thermo Scientific B15; centrífuga refrigerada ThermoScientific 5T 16R; estufa Memmer BM-400; concentrador VACUFUGE plus/concentrador plus todos ellos procedentes de EE.UU. En la cuantificación se utilizó un espectrofotómetro Bitek Synergy HT, EE.UU., mediante software para análisis de datos Gen5™, se trabajó con 2 µL de muestra, depositados en pocillos de placa TAKE3 disponibles para su medición. Las lecturas de las absorbancias se realizaron a 260-280 nm.

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizó 1 µL del ADN aislado y cuantificado de cada muestra de hojas estudiadas; 0,25 µL de dos primers seleccionados; 3,5 µL de agua y 5 µL de la polimerasa Green go taqq (2x) en un Termociclador marca Eppendorf, modelo Mastercycler gradients, EE.UU. La separación de las moléculas se realizó a través de una matriz porosa con gel de agarosa al 1,5% en 100 mL de disolución tamponada Tris pH 8.0, en equipo de electroforesis Biorad subcell GT modelo Wide mini sub y fuente de poder Power PAC 300, EE.UU. Las muestras fueron separadas a 120 V durante 20 minutos. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 bp marca Promega # G2101. Los geles fueron visualizados en un sistema de imagen molecular GelDoc XR+S mediante transiluminación UV y el estándar ámbar del

filtro (580/120) y por el programa de lectura de geles Quantity One versión 4.6.8. Se contrataron los servicios de la empresa Macrogen, Maryland, EE.UU., para la secuenciación de los fragmentos de ADN aislados de las hojas de *V. patens*.

Para obtener el árbol filogenético se utilizó el programa BLASTN (Zheng et al., 2009) por comparación de las secuenciaciones obtenidas para las hojas de la especie *V. patens* con otras especies de la tribu Vernoniae existentes en las bases de datos y con los parámetros establecidos por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (Blair y Madrigal, 2005).

Análisis estadístico

En la evaluación macromorfológica de las hojas (largo y ancho) y de los tallos (diámetro medio de médula, tallos y la distancia entre peciolos), se determinaron las medias, el intervalo de confianza, la curtosis y la asimetría; se confeccionaron los histogramas de frecuencia y se emplearon los test de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov para determinar la distribución normal de los datos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación morfológica

La lámina foliar de *V. patens* exhibió un color verde claro más brillante por la haz, con superficie glabra; el envés pubescente de color verde intenso, forma lanceolada, penninervia, peciolada con presencia de tricomas, aserrada en los bordes, de base redondeada y ápice acuminado (Fig. 1). Los resultados obtenidos se corresponden con lo informado por (Blair y Madrigal, 2005).

Respecto a las dimensiones de las hojas, en la población estudiada, éstas variaron en un rango de 7,0 a 17,6 cm para el largo y de 2,2 a 5,8 cm para el ancho (Tabla 1). Los valores de curtosis y asimetría y las pruebas de normalidad, confirmaron la existencia de una distribución normal.

En la observación de las características macro morfológicas, de los tallos que conforman las ramas del arbusto, se observa una consistencia

semileñosa y coloraciones en dependencia del grado de desarrollo de las ramas. Pueden presentar también coloración verde y café, la forma es cilíndrica con superficie estriada, y exhiben cicatrices, yemas, nudos y vellosidades (Fig. 2A-C). El corte longitudinal presenta una superficie interna de color blanco y aspecto grumoso, mientras que en el transversal se aprecia la corteza, la madera, constituida por xilema y floema y la médula (Fig. 2D y E). La fractura es flexible e incompleta.

Se realizaron mediciones del diámetro de los tallos y de la médula, así como de la distancia entre pecíolos (Tabla 2). Los valores de curtosis, asimetría, así como las pruebas de normalidad indicaron que los valores obtenidos no mostraron una distribución normal, lo cual es explicable debido a que los tallos en los arbustos varían en su diámetro de acuerdo con el grado de desarrollo que alcancen.

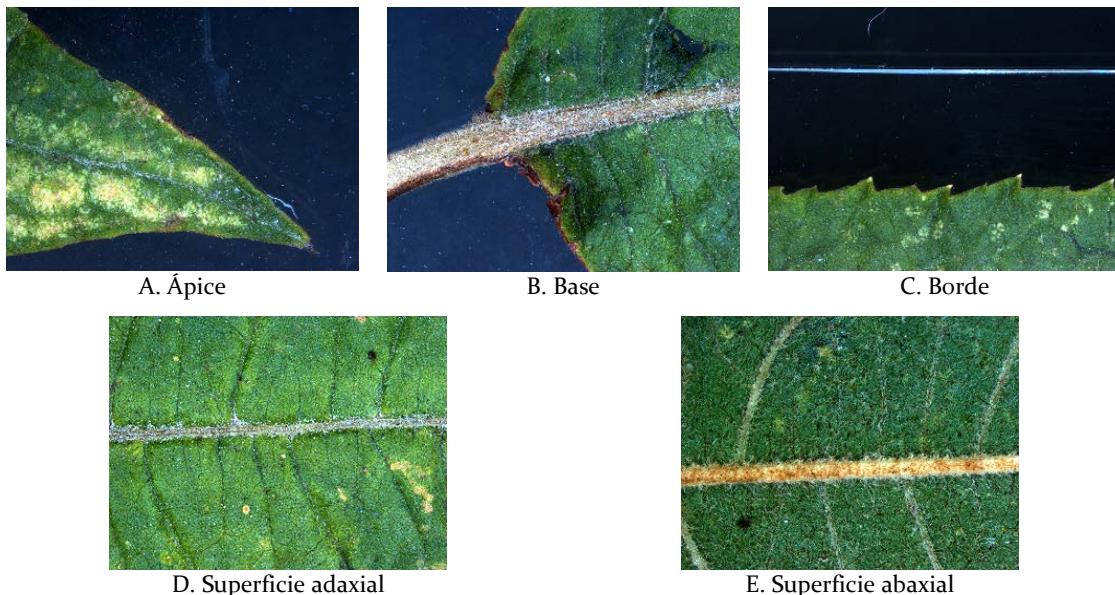
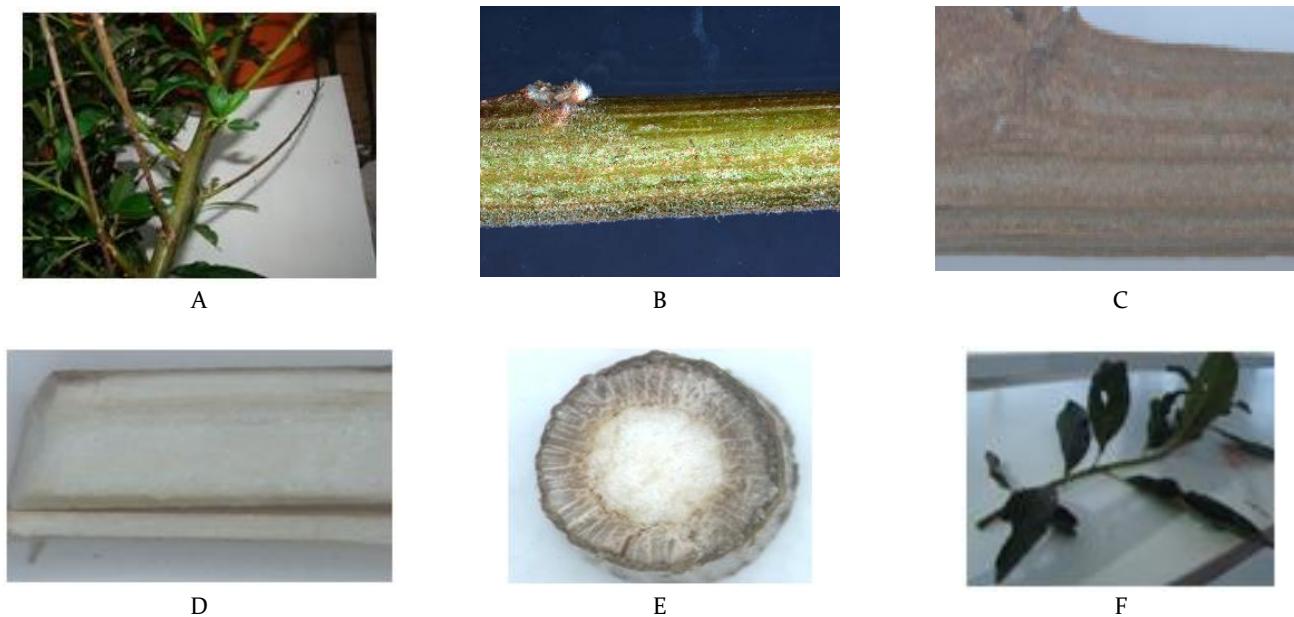


Figura 1. Características macromorfológicas de las hojas de *V. patens*.

Tabla 1. Estudio de las dimensiones de las hojas de *V. patens*.

Parámetros (cm)	Observado						Referenciado	
	<i>V. patens</i>						<i>Colombia</i>	<i>Costa Rica</i>
	<i>Ecuador</i>							
Largo	$12,85 \pm 0,76$	7,00	17,60	-0,567	-0,116		Blair y Madrigal, 2005	Rodríguez, 2005
Ancho	$4,21 \pm 0,23$	2,20	5,80	-0,312	-0,059	7 - 15	1 - 22	0,3 - 7,5

IC: intervalo de confianza.

**Figura 2.** Características macromorfológicas del tallo de *V. patens*.

(A) Rama del arbusto (hojas y tallos); (B) tallo de poco desarrollo; (C) tallo desarrollado; (D) corte longitudinal; (E) corte transversal; (F) rama (distancia entre nudos).

Tabla 2. Estudio de las dimensiones de los tallos de *V. patens*.

Parámetros (cm)	Media ± IC	Mínimo	Máximo	Curtosis	Asimetría
Diámetro del tallo	0,38 ± 0,03	0,10	0,90	0,15	0,64
Diámetro de la médula	0,17 ± 0,01	0,04	0,36	0,07	0,63
Distancia entre nudos	2,76 ± 0,19	1,20	6,20	1,82	1,08

IC: intervalo de confianza.

Evaluación anatómica

La sección transversal de la hoja a nivel de nervio central (Fig. 3A) permitió observar una epidermis formada por una capa de células maduras, cuyas formas, en todo el perímetro de su nervio central, se apartan de la tubular típica de este tejido, adquieren algo más en profundidad que en extensión longitudinal, para acercarse a la isodiamétrica. Lo contrario sucede con la epidermis adaxial (ED), cuya superficie, cuando comienzan a alejarse del nervio central hacia los laterales, se alarga y puede clasificar como tubular. Se pudieron observar también los

apéndices en forma de tricomas (Fig. 3E) o pelos tectores pluricelulares (PL), formados por cinco o seis células. Algunos de estos apéndices tienen su célula apical redondeada y otros con un extremo afilado, ligeramente inclinada hacia la capa epidérmica donde se presentan en número más reducido las aperturas estomáticas (Fig. 3D).

A continuación de la epidermis, y en todo el nervio central, se aprecia un área formada por tres o cuatro estratos de células pequeñas y muy unidas, correspondientes al tejido colénquimatoso o colénquima (C), con engrosamientos desiguales, que se amplían en la parte central superior (Fig. 3A), a continuación está el parénquima fundamental (PF), con células

grandes aunque muy desiguales en tamaño (Fig. 3A). Hacia la parte más central se encuentran los haces vasculares del tipo bicolonial, los cuales se hallan formados, de adentro hacia fuera, por un floema interno (F), una zona de cambium difusa (ZC), seguido del xilema (X), delimitado en su parte superior por otra franja de cambium con semejante característica al anterior, hasta ver

después, el floema externo. En la Fig. 3B se muestra una ampliación de los haces conductores. Hacia los colaterales del nervio central (Fig. 3A y C) se puede apreciar, además de la epidermis adaxial y abaxial, un parénquima clorofílico en empalizada (PP) seguido por un parénquima esponjoso (PE) muy bien definido, que se extiende hasta la epidermis abaxial (EA).

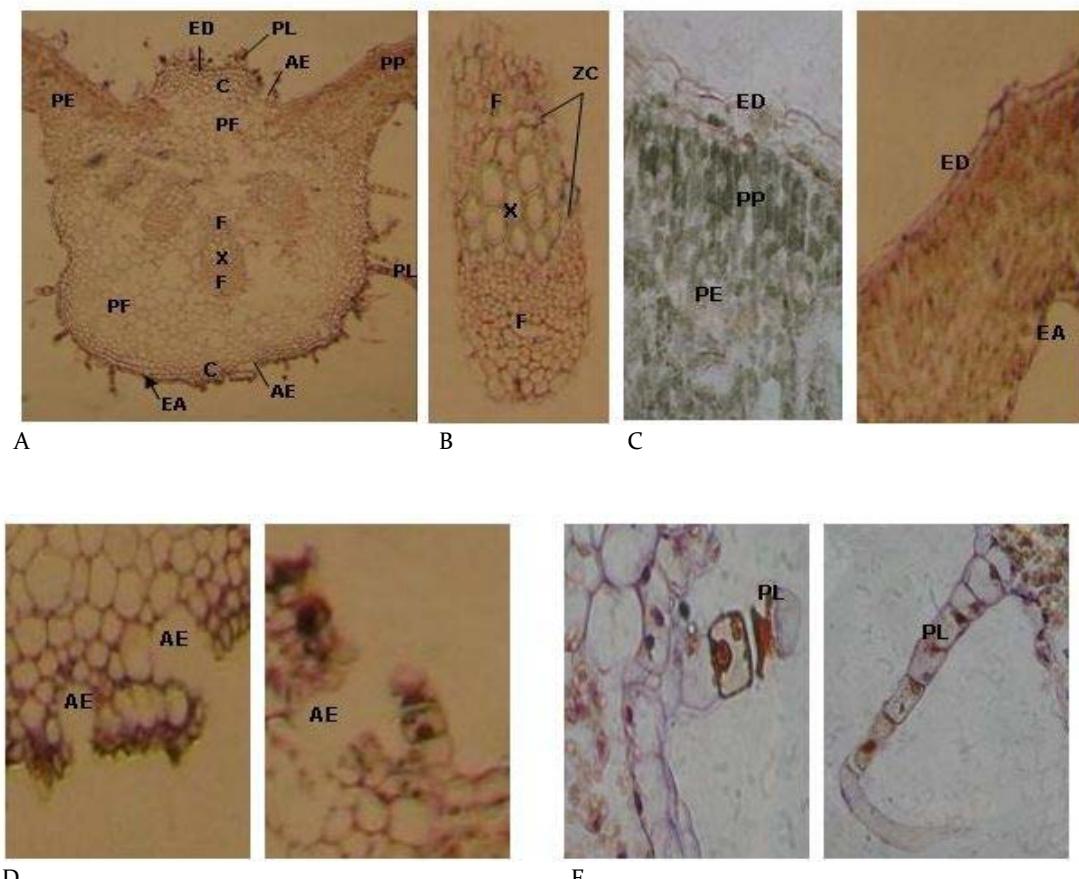


Figura 3. Secciones transversales de la hoja de *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob.

(A) Sección transversal de la hoja a nivel de nervio central; (B) ampliación de los haces conductores; (C) epidermis abaxial y adaxial y células de parénquima; (D) estomas; (E) pelos pluricelulares.

Leyenda: AE: Apertura estomática, C: Colénquima, EA: Epidermis abaxial, ED: Epidermis adaxial, F: Floema, PE: Parénquima esponjoso, PF: Parénquima fundamental, PL: Pelos textores pluricelulares, PP: Parénquima en empalizada, X: Xilema, ZC: Zona de cambium.

En las secciones transversales del tallo (Fig. 4A y B), se observa la epidermis conformada por una capa de células más o menos cuadrangulares, recubierta por una cutícula suave, así como también, apéndices correspondientes a pelos tectores pluricelulares. A continuación, se visualiza una zona de células muy unidas, alargadas, estrechas y de tamaño variable, correspondientes al colénquima. Posteriormente, aparecen unas estructuras dispuestas en forma de cordón que responden a las fibras esclerénquimas (Fig. 4A) que, al igual que el colénquima, son las

responsables de las funciones de sostén y resistencia del tallo. Se hace visible (Fig. 4A y C) el tejido vascular formado por xilema (X) y floema (F), rodeados por un parénquima interfascicular relacionado con los radios medulares (RM). De forma intercalada se presentan campos más claros correspondientes a células esféricas que son los vasos del leño (V). Finalmente, en el centro del tallo se observa la médula (M) o parénquima medular integrado por células compactas de tamaño variable (Fig. 4A y D).

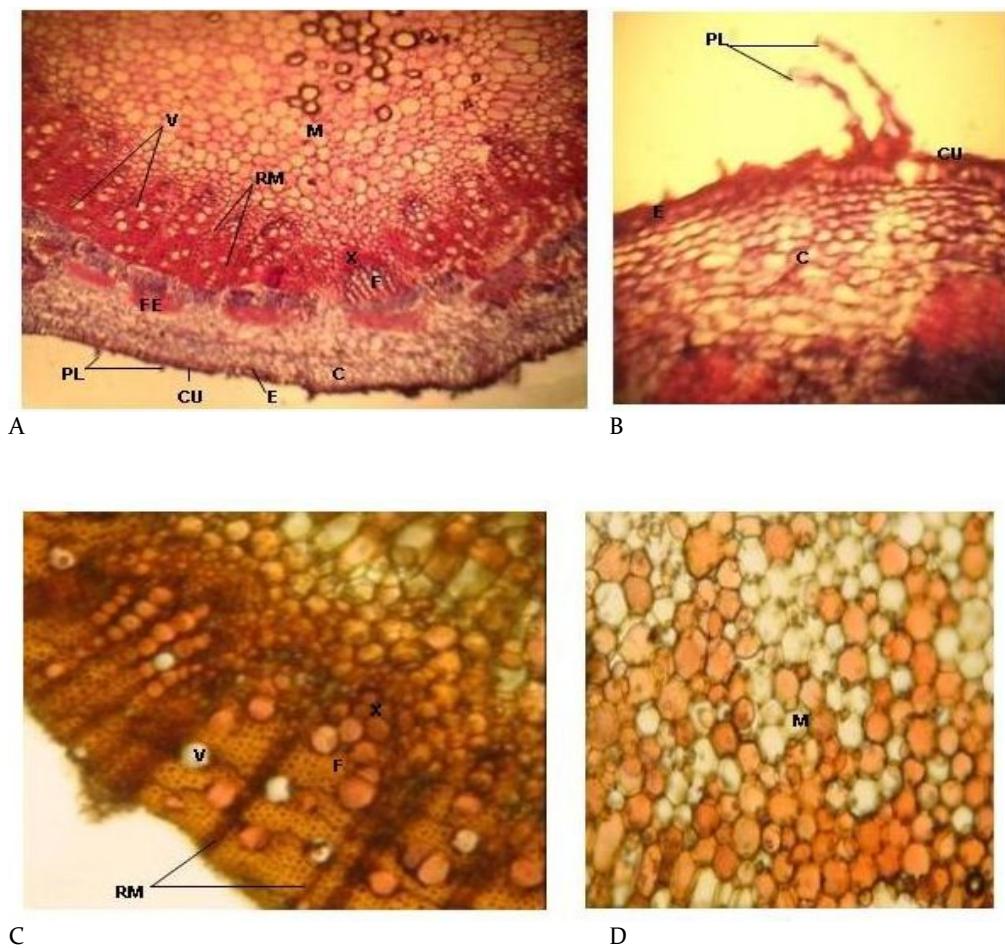


Figura 4. Secciones transversales del tallo de *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob.

(A) y (B) Corte transversal del tallo, epidermis y pelos tectores oluricelulares; (C) tejido vascular formado por xilema y floema; (D) parénquima medular.

Leyenda: C: Colénquima, CU: Cutícula, E: Epidermis, F: Floema, FE: Fibras esclerénquima, M: Médula; PL: Pelos pluricelulares, RM: Radios medulares, V: vasos, X: Xilema.

Codificación de barras moleculares

En la actualidad, algunas de las herramientas de la biología molecular representan una alternativa viable para complementar y sustentar las normas de control de calidad, exigidas para desarrollar nuevos fitomedicamentos, mediante el conocimiento genético de la especie (Feria-Romero, 2007). Por esta razón se llevó a cabo la secuenciación del ADN de *V. patens*, con el objetivo de contribuir a un mayor conocimiento de la especie y al establecimiento de sus parámetros de calidad bajo una óptica moderna.

Se realizó la secuenciación de los loci *matK* y *rbcL* a fin de complementar las investigaciones botánicas, cuya información no está aún referenciada para la especie que crece en el Ecuador. Los loci *matK* y *rbcL* son las regiones establecidas por el Consortium for the Barcode of Life (CBOL, 2009) para ser utilizados como un código de barras molecular de plantas terrestres.

Se extrajo ADN total a partir de hojas frescas de estratos superiores e inferiores de los arbustos de *V. patens*. Se obtuvieron los amplicones de las regiones correspondientes a los loci *matK* y *rbcL* (Fig. 5), donde se evaluaron diferentes concentra-

ciones de ADN molde para la reacción de PCR. Los amplicones obtenidos se secuenciaron (Figs. 6 y 7) y se corroboró que tanto las hojas de los estratos superiores como de los inferiores presentaban el mismo patrón de secuenciación. Los resultados obtenidos en este estudio se publicaron en la base de datos GenBank (Santos et al., 2012a; 2012b; 2012c; 2012d).

Al realizar un análisis del árbol filogenético de la especie se pudo observar que existe total coincidencia con la especie *V. patens* que crece en Costa Rica (100%); además, las especies *Centratherum punctatum* y *Eirmocephala brachiata* resultaron las más cercanas a *V. patens* (99%). Según se reporta en el árbol de la base de datos del GenBank para el gen *matK* y para el gen *rbcL* resultaron más cercanas *Vernonia gigantea*, *E. brachiata* y *C. punctatum* (<http://www.ars-grin.gov/npgs/>; Robinson, 1987).

La similitud de secuenciación molecular puede estar dada porque las especies pertenecen a las Asteraceae y a la tribu y género *Vernonia*, según los datos reportados por la National Plant Germplasm System (<http://www.ars-grin.gov/npgs/>) y por Robinson (1987).

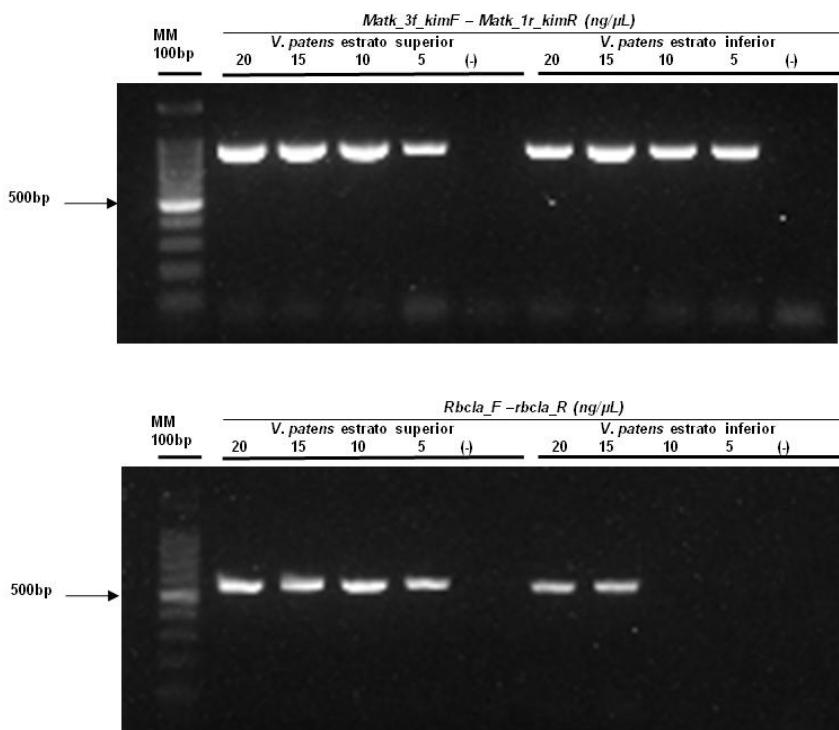


Figura 5. Amplicones generados de los loci *matK* y *rbcL* de los genes de cloroplastos de muestras de hojas de *V. patens*.
MM: marcador de peso molecular 100 bp.

AGGCTTCGCTATTGGATAAAAGATGCTCCTCTTGCATTATAAGATTCTTCCATGAGTGTATAATTGGG
 ATAGTCTTATTACTCAAATTCAAAGAAGCCAGTTCTCTTTCAAAAAGAAATCACAGACTATTCTCTTCCTAT
 ATACTCTTATGTATGTGAATATGAATCTGTCTCCTCTTCTCGTAACCAATCTCTCACTTCCGATCAACATCTC
 TGGAGCCCTTATTGAACGAATCTATTCTATGGAAAATAGAGCATCTGCAAAAGTCTTGCCAGGGCTTCAAG
 CGAATTATGGTTGTTCAAAGATCCTTCATGCATTATGTAGGTATCAAGGAAAATCAATTCTGCTTCAAAAGGGA
 CGTTCTTAAATGAATAATGGAAATATTACTTGTAAATTCTGGAAATCCTATTCTGCTTACCTGTGGTCTCAACCAG
 GAAGGATTCTATAAACCAATTATCCAATCATTCCCTTACTTCTCGGTATCGTTCAAGTGTCCGGCTAAAGCCTT
 CAATGGTACGCAGTCAAATGCTAGAAAATGCATTCTAATCGATAATGCTATTAGAAGAGTTGATACTATTGTTCCA
 ATTATGCCTTGATTGGATTATTGTCTAAATCGAAATTCTGTAAACGCATTGGGCCATCCTATTGTAAGGCGATTGG
 GCCGATTATCGGATTCTGATATTATTGACCGCTTGGCGTATATACAGAAAGATTCTCATTATCATAGTGGATCT
 TCAAAAAAAAGAGTTGTATCGAGTAAAGTATATACTCGACTTCTTGCTAGAACCTTAG

V. patens matK, parcial cds, GenBank: JX276535.1 (hojas estrato superior) (Santos et al., 2012b)

AGGCTTCGCTATTGGATAAAAGATGCTCCTCTTGCATTATAAGATTCTTCCATGAGTGTATAATTGGG
 ATAGTCTTATTACTCAAATTCAAAGAAGCCAGTTCTCTTTCAAAAAGAAATCACAGACTATTCTCTTCCTAT
 ATACTCTTATGTATGTGAATATGAATCTGTCTCCTCTTCTCGTAACCAATCTCTCACTTCCGATCAACATCTC
 TGGAGCCCTTATTGAACGAATCTATTCTATGGAAAATAGAGCATCTGCAAAAGTCTTGCCAGGGCTTCAAG
 CGAATTATGGTTGTTCAAAGATCCTTCATGCATTATGTAGGTATCAAGGAAAATCAATTCTGCTTCAAAAGGGA
 CGTTCTTAAATGAATAATGGAAATATTACTTGTAAATTCTGGAAATCCTATTCTGCTTACCTGTGGTCTCAACCAG
 GAAGGATTCTATAAACCAATTATCCAATCATTCCCTTACTTCTCGGTATCGTTCAAGTGTCCGGCTAAAGCCTT
 CAATGGTACGCAGTCAAATGCTAGAAAATGCATTCTAATCGATAATGCTATTAGAAGAGTTGATACTATTGTTCCA
 ATTATGCCTTGATTGGATTATTGTCTAAATCGAAATTCTGTAAACGCATTGGGCCATCCTATTGTAAGGCGATTGG
 GCCGATTATCGGATTCTGATATTATTGACCGCTTGGCGTATATACAGAAAGATTCTCATTATCATAGTGGATCT
 TCAAAAAAAAGAGTTGTATCGAGTAAAGTATATACTCGACTTCTTGCTAGAACCTTAGCTCGTAAAC

V. patens matK, parcial cds, GenBank: JX286589.1 (hojas estrato inferior) (Santos et al., 2012a).

Figura 6. Secuencia de la zona codificante parcial del gen *matK* de la especie *V. patens*.

ATATCAAGTCCACCAGGAAGGCATTCATAAACAGATTACCGTAGTTTNAAGCGATAACCCAAATTAGGTTAAT
 AGTACATCCAAACAGGGGACGACCATAATTGTTCAATTCTCTTCAACTTGGATGCCGTAGGGCGACCTTGG
 AAGTTTCACATACGAAATAGGGATTGCAAATCTTCCAGACGTAGAGCACGCAGGGCTTGAACCCAAATACATTA
 CCTACAATGGAAGTAAACATGTTAGTAACAGAACCTCTTCAAAAAGGTCTAATGGTAAGCTACATAAGCAATAAA
 TTGACTTCTTCTCCAGGAACAGGCTGATTCCATAGCATGCCCTTGTAAACGATCAAGGCTCGTAAGTCCATCGT
 CCACACAGTTGTCATGTACCAAGTAGAAGATTGGCAGCTACTGCGGCCCTGCTTCAAGGCGGAACCTCAGGTT
 GAGGAGTTACTCGAAATGCTGCCAAGATATCAGTATCCTGGTTCATATTCAAGGAGTATAATAAGTCAATTATAA
 TCTTAAACACCAGCTTGAATCCAACACTT

V. patens rbcL, parcial cds, GenBank: JX276536.1 (hojas estrato superior) (Santos et al., 2012c).

CCACGAAGACATTCTAAACAGCTTACCGTAGTTTNAAGCGATAACCCAAATTAGGTTAATAGTACATCCAA
 CAGGGGACGACCATCTTGTCAATTCTTCAACTTGGATGCCGTAGGGCGACCTTGGAAACTTTACAT
 ACGAAATAGGGATTGCAAATCTTCCAGACGTAGAGCACGCAGGGCTTGAACCCAAATACATTACATGGAA
 GTAAACATGTTAGTAACAGAACCTCTTCAAAAAGGTCTAATGGTAAGCTACATAAGCAATAAAATTGACTTCTC
 TCCAGGAACAGGCTGATTCCATAGCATGCCCTTGTAAACGATCAAGGCTCGTAAGTCCATCGGTACACAGTTG
 TCCATGTACCAAGTAGAAGATTGGCAGCTACTGCGGCCCTGCTTCAAGGCGGAACCTCAGGTTGAGGAGTTACT
 CGAAATGCTGCCAAGATATCAGTATCCTGGTTCATATTCAAGGAGTATAATAAGTCAATTATAATCTTAAACACCA
 GCTTGAATCCAACACTT

V. patens rbcL, parcial cds, GenBank: JX286590.1 (hojas estrato inferior) (Santos et al., 2012d).

Figura 7. Secuencia de la zona codificante parcial del gen *rbcL* de la especie *V. patens*.

CONCLUSIONES

Se describieron por primera vez las características micro morfológicas de las hojas y tallos de *V. patens* y se establecieron nuevos elementos en el estudio de los caracteres macro morfológicos particularmente de los tallos, lo cual constituye un aporte novedoso a la caracterización botánica de la especie.

Mediante las evaluaciones micromorfológicas y moleculares se corroboró la identidad de la especie de origen ecuatoriano la cual fue caracterizada como *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no poseer conflicto de interés.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue patrocinado por el Proyecto Prometeo de la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación y la Escuela Superior Politécnica del Litoral de la República del Ecuador.

REFERENCIAS

- Blair S, Madrigal B (2005) Plantas antimaláricas de Tumaco: Costa Pacífica Colombiana. Universidad de Antioquia, 1a ed. Antioquia-Colombia: 84-871.
- CBOL Plant Working Group (2009) A DNA barcode for land plants. PNAS 106(31): 12794-12797.
- Feria-Romero I (2007) Nuevas herramientas de biología molecular para el control de calidad de las drogas vegetales. Rev Fitoterapia 7(1): 49-52.
- Gattuso M, Gattuso S (1999) Manual de procedimientos para el análisis de drogas en polvo. Urquiza. Argentina. Editorial de la Universidad Nacional de Rosario.
- Manzano Santana P, Miranda M, Abreu Payrol J, Silva M, Hernández V, Peralta E (2013b) Gas chromatography-mass spectrometry study from the leaves fractions obtained of *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. Intern J Org Chem 3: 105-109.
- Manzano Santana P, Miranda Martínez M, Abreu Payrol J, Silva M, Olov Sterner, Peralta E (2013c) Pentacyclic triterpenoids with antimicrobial activity from the leaves of *Vernonanthura patens* (Asteraceae). Emir J Food Agric 25(7): 539-543.
- Manzano Santana P, Miranda Martínez M, Montes de Oca R, Orellana T, Abreu Payrol J, Peralta E (2013d) Estudio químico de los compuestos lipídicos de las hojas, tallos y

flores de *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. (Asteraceae). Rev Cubana Plant Med 18(4): 575-585.

Manzano Santana P, Miranda Martínez M, Paz Robles C, Abreu Payrol J, Silva Osorio M, Hernández Santander V (2012) Aislamiento y caracterización de la fracción hexánica de las hojas de *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. con actividad antifúngica. Rev Cubana Farm 46(3): 352-358.

Manzano Santana P, Orellana León T, Miranda Martínez M, Abreu Payrol J, Ruiz O, Peralta García E (2013a) Algunos parámetros farmacognósticos de *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. (Asteraceae) endémica de Ecuador. Rev Cubana Plant Med 18(1): 131-139.

Manzano Santana PI, García G, Mendiola J, Fernández-Caliénnes A, Orellana T, Miranda M, Peralta E, Monzote L (2014) In vitro anti-protozoal assessment of *Vernonanthura patens* extracts. PharmacologyOnline 1: 1-6.

Miranda M, Cuéllar A (2001) Manual de Prácticas de Laboratorio. Farmacognosia y Productos Naturales. Habana: Editorial Félix Varela: 25-49, 74-79.

Peacock H, Bradbury S (1973) Peacock's Elementary Microtechnique 4thed. London, Edwar Arnol: 33-37.

Robinson H (1987) Studies in the Lepidaploa complex (Vernonieae: Asteraceae). III. Two new genera, Cyrtocymura and Eirmocephala. Proceedings of the Biological Society of Washington 100(4): 844-855.

Santos E, Manzano P, Navarrete O, Hidalgo L, Miranda M, Peralta E (2012a) *Vernonanthura patens* isolate CIBE037A maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast. GenBank: JX286589.1. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JX286589.1> [Consultado: Julio de 2013].

Santos E, Manzano P, Navarrete O, Hidalgo L, Miranda M, Peralta E (2012b) *Vernonanthura patens* maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast. GenBank: JX276535.1. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JX276535.1> [Consultado: Julio de 2013].

Santos E, Manzano P, Navarrete O, Hidalgo L, Miranda M, Peralta E (2012c) *Vernonanthura patens* ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplast. GenBank: JX276536.1. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JX276536.1> [Consultado: Julio de 2013].

Santos E, Manzano P, Navarrete O, Hidalgo L, Miranda M, Peralta E (2012d) *Vernonanthura patens* isolate CIBE037A ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplast. GenBank: JX286590.1. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JX286590.1> [Consultado: Julio de 2013].

Zheng Zhang, Schwartz S, Wagner L, Miller W (2009) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. J Comput Biol 7(12): 203-214.