



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**Efecto del estrés abiótico en especies mexicanas
de *Salvia***

Tesis que presenta

ANA LAURA SEPÚLVEDA CUELLAR

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias Ambientales

Codirectores de la Tesis:

Dr. JOEL DAVID FLORES RIVAS

Dr. FRANCISCO ELIHÚ BAUTISTA REDONDA

San Luis Potosí, S.L.P., junio de 2024



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Efecto del estrés abiótico en especies mexicanas de *Salvia***” presentada para obtener el Grado de Doctor(a) en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Ana Laura Sepúlveda Cuellar** y aprobada el **29 de junio de 2024** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Joel David Flores Rivas
Dr. Francisco Elihú Bautista Redonda
Director/Codirectores de la tesis

Dra. Laura Yáñez Espinosa
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Ernesto Iván Badano
Miembro del Comité Tutorial

Dr. David Douterlunge Rotsaert
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Ecología Experimental de la División de Ciencias Ambientales, el Laboratorio de Química de Productos Naturales-LIIDZA y el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Medica y Ambiental (LANBAMA) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección del Dr. Joel David Flores Rivas y el Dr. Francisco Elihú Bautista Redonda.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con No. de registro 559504.

Página en Blanco que se va a utilizar para colocar la copia del acta de examen.

Dedicatorias

Para mi Mamá y Papá, por apoyarme en este largo camino, por siempre estar conmigo a pesar de las adversidades, porque este grado es tanto mío como suyo.

A José Carlos por ser mi acompañante en los buenos y malos momentos, por darme ánimos y regaños en cada uno de los días que duro esta etapa.

A mis hermanos y familia por su apoyo incondicional en esta y todas las etapas de mi vida.

Para mis seres queridos que ya están en el cielo, espero que desde donde me estén viendo estén orgullosos.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el apoyo económico otorgado para la realización de este proyecto (FORDECYT 296354 y CONAHCYT CB-A1-S-7705).

Al Dr. Joel Flores por haberme dado la oportunidad de realizar mi doctorado en su equipo de trabajo, por el tiempo y la paciencia a lo largo de todos estos años, por esas largas pláticas, por su amistad y gran apoyo.

Al Dr. Elihú Bautista por darme la oportunidad de trabajar en su equipo de trabajo, por la dedicación, tiempo y mucha paciencia en estos cuatro años, por todo el apoyo, los consejos y por brindarme además de su asesoría su amistad.

A la Doctora Laura Yáñez por todas sus enseñanzas de anatomía, sus consejos y su amistad.

Al Doctor Ernesto Badano y David Douterlunge por ser parte de mi comité tutorial, por todos los consejos que me brindaron para obtener los mejores resultados.

Al Instituto de Investigación de Zonas Desérticas (IIZD) de la UASLP, en cuyas instalaciones realice mis estudios de anatomía.

Al técnico M. en C. Juan Pablo Rodas Ortiz por el apoyo brindado para este proyecto.

Al Dr. José Rivera Chávez del Instituto de Química de la UNAM por la obtención de los espectros de RNM.

Al Dr. Omar Cortezano Arellano del Instituto de Ciencias Básicas de la Universidad Veracruzana por la obtención de espectros de RNM.

Al Dr. Rubén Alfredo Toscano del Instituto de Química de la UNAM por los análisis de cristalografía.

A la Dra. Brenda Y. Bedolla García del Instituto de Ecología, A. Centro Regional Bajío, por la identificación de las especies de *Salvia* utilizadas en esta investigación.

A la Dra. Daniela Joyce Trujillo Silva por su ayuda y consejos en mis experimentos de toxicidad.

A mis amigas del LIIDZA por la compañía en esos largos días y madrugadas.

ÍNDICE

Constancia de aprobación de la tesis.....	ii
Créditos institucionales.....	iii
Acta de examen.....	iv
Dedicatorias.....	v
Agradecimientos.....	vi
Índice.....	viii
Índice de tablas.....	x
Índice de figuras.....	xi
Resumen.....	xvii
Abstract.....	xiii
Introducción	1
1. Capítulo I. Anatomía de núculas y efecto del mucílago, potencial hídrico y temperatura en la germinación de semillas de tres especies mexicanas de <i>Salvia</i>	10
1.1 Introducción.....	10
1.2 Hipótesis.....	15
1.3 Objetivo general.....	15
1.4 Objetivos específicos.....	15
1.5 Materiales y métodos.....	16
1.6 Resultados	21
1.7 Discusión.....	35
1.8 Conclusiones.....	39
1.9 Referencias.....	40
2. Capítulo II. Fitoquímica de dos especies mexicanas de <i>Salvia</i> : <i>Salvia pennellii</i> y <i>Salvia reflexa</i>	46
2.1 Introducción.....	46
2.2 Hipótesis.....	50
2.3 Objetivo general.....	50
2.4 Objeto específico.....	50
2.5 Materiales y métodos.....	51
2.6 Resultados.....	57
2.7 Discusión.....	69
2.8 Conclusiones.....	75
2.9 Referencias.....	76
3. Capítulo III. Estudio fisiológico, anatómico y metabólico en respuesta a sequía en <i>Salvia reflexa</i>	81
3.1 Introducción.....	81
3.2 Hipótesis.....	85
3.3 Objetivo general.....	85
3.4 Objetivos específicos.....	85

3.5 Materiales y métodos.....	86
3.6 Resultados.....	90
3.7 Discusión	105
3.8 Conclusiones.....	111
3.9 Referencias.....	112
4. CAPITULO IV. Análisis filogenético y químico de la planta medicinal	
<i>Salvia circinnata</i> : una aproximación para comprender las diferencias	
metabólicas.....	116
4.1 Introducción.....	116
4.2 Hipótesis.....	121
4.3 Objetivo.....	121
4.4 Objetivos específicos.....	121
4.5 Materiales y métodos.....	122
4.6 Resultados.....	126
4.7 Discusión.....	138
4.8 Conclusiones.....	141
4.9 Referencias.....	142
5. Conclusiones generales.....	147
6.. Apéndices.....	149

Índice de Tablas

Tabla 1	Tipos de latencia en diversas especies de <i>Salvia</i> alrededor del mundo.....	13
Tabla 2	Variables evaluadas en semillas de tres especies de <i>Salvia</i>	24
Tabla 3	Efecto del raspado y corte en la germinación de semillas (%) y tiempo medio de germinación de tres especies de <i>Salvia</i>	24
Tabla 4	Recuperación de la germinación después de tratamientos combinados de potencial hídrico y temperatura en tres especies de <i>Salvia</i>	34
Tabla 5	Datos de los espectros ^1H (400 MHz) y ^{13}C NMR data de las wirikutina/15- <i>epi</i> -wirikutina (1/2) en CDCl_3	59
Tabla 6	Datos de RMN de ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) de reflexdiolida/16- <i>epi</i> -reflexdiolida (7/8) y 6- β -acetiloxisalviarina (9) en CDCl_3	66
Tabla 7	Comparación de variables anatómica entre tratamientos.....	98
Tabla 8	Metabolitos volátiles de <i>S. reflexa</i> detectados por GS-MS.....	100
Tabla 9	Cuantificación de cirsiliol (14) y pedalitina (16) mediante HPLC-PAD en extracto de cada uno de los tratamientos.....	101
Tabla 10	Composición de compuestos volátiles de <i>S. circinnata</i>	129
Tabla 11	Cuantificación de amarisinina A, teotihuacanina y amarisolida A mediante HPLC-PAD.....	133
Tabla 12	Análisis de componentes principales (PCA) indicando el porcentaje de contribución de cada metabolito.....	136

Índice de figuras

Figura 1	Fotomicrografías de la cubierta seminal de <i>Salvia penellii</i> , <i>S. reflexa</i> y <i>S. chamaedryoides</i>	23
Figura 2	Germinación de semillas (%), Tiempo medio de germinación (TMG) y Tiempo mínimo de germinación (T_{min}) en tres especies de <i>Salvia</i> con y sin mucílago.....	28
Figura 3	Efecto de tratamientos combinados de potencial hídrico y temperatura sobre la germinación de semillas (%), TMG y T_{min} en tres especies de <i>Salvia</i>	32
Figura 4	Compuestos aislados de la especie <i>S. penneelii</i> : wirikutina/15-epi-wirikutina, wixarikolide, hidroquinona, arbutina y naringenina.....	58
Figura 5	Correlaciones COSY y HMBC de las wirikutina/15-epi-wirikutina (1/2).....	60
Figura 6	Correlaciones NOESY observadas para las wirikutina/15-epi-wirikutina (1/2).....	60
Figura 7	Diagrama ORTEP de la wixarikolida.....	61
Figura 8	Compuestos aislados de la especie <i>S. reflexa</i>	65
Figura 9	Correlaciones COSY y HMBC de las reflexdiolida/16-epi-reflexdiolida (7/8) y 6 β -acetiloxysalviarina (9).....	67
Figura 10	Correlaciones NOESY observadas para las reflexdiolida/16-epi-reflexdiolida (7/8) y 6 β -acetiloxysalviarina (9).....	67
Figura 11	Diagrama ORTEP 6 β -acetiloxysalviarina. (9).....	68
Figura 12	Eficiencia cuántica efectiva del PSII en plantas de <i>S. reflexa</i> bajo tratamientos de sequía a lo largo de un mes.....	90
Figura 13	Tasa de transporte de electrones en plantas de <i>S. reflexa</i> bajo tratamientos de sequía a lo largo de un mes.	91
Figura 14	Clorofilas totales en plantas de <i>S. reflexa</i> bajo tratamientos de sequía a lo largo de un mes.....	92
Figura 15	Biomasa y peso fresco en plantas de <i>S. reflexa</i> bajo tratamientos de sequía.....	93
Figura 16	Comparación de contenido relativo de agua (RWC) en plantas de <i>S. reflexa</i> bajo tratamientos de sequía en: A) hoja y B) tallo.....	94
Figura 17	Comparación de la anatomía de hojas de <i>S. reflexa</i> ante tratamientos de sequía.....	95
Figura 18	Número de cloroplastos de <i>S. reflexa</i> ante tratamientos de sequía.....	95
Figura 19	Comparación de tallos de <i>S. reflexa</i> entre tratamientos.....	96
Figura 20	Comparación de raíz de <i>S. reflexa</i> entre tratamientos.....	97
Figura 21	Biplot PCA metabolitos secundarios.....	103
Figura 22	Biplot PCA MS y variables anatómicas y fisiológicas.....	104
Figura 23	Mapa de las diferentes poblaciones de <i>S. circinnata</i>	119
Figura 24	Estructuras de los diterpenos identificados en <i>S. circinnata</i>	120

Figura 25	Árbol de consenso de máxima verosimilitud realizado con ITS secuencias marcadoras obtenidas de poblaciones naturales de <i>Salvia circinnata</i>	127
Figura 26	Análisis de componentes principales (PCA) de las diez poblaciones con sus compuestos volátiles y no volátiles.....	135
Figura 27	Análisis de redundancia (RDA) de las poblaciones con sus distintos CT.....	137

Apéndices

Apéndice 1	Espectro ^1H NMR de la wirikutina/15- <i>epi</i> -wirikutina (1/2) (700 MHz, CDCl_3)	149
Apéndice 2	Espectro ^{13}C NMR de la wirikutina/15- <i>epi</i> -wirikutina (1/2) (175 MHz, CDCl_3)	150
Apéndice 3	Espectro DEPT 135 y DEPT 90 de la wirikutina/15- <i>epi</i> -wirikutina (1/2)	151
Apéndice 4	Espectro COSY de la wirikutina/15- <i>epi</i> -wirikutina (1/2) (CDCl_3).	152
Apéndice 5	Espectro HSQC de la wirikutina/15- <i>epi</i> -wirikutina (1/2) (CDCl_3).	153
Apéndice 6	Espectro HMBC de la wirikutina/15- <i>epi</i> -wirikutina (1/2) (CDCl_3).	154
Apéndice 7	Espectro NOESY de la wirikutina/15- <i>epi</i> -wirikutina (1/2) (CDCl_3)	155
Apéndice 8	Espectro ^1H NMR de la mezcla de la wixarikolida (700 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}-d_6$)	156
Apéndice 9	Espectro ^{13}C NMR de la mezcla de la wixarikolida (175 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}-d_6$)	157
Apéndice 10	Espectro ^1H NMR de arbutina 4 (MeOD, 400 MHz)	158
Apéndice 11	Espectro ^{13}C NMR de arbutina 4 (MeOD, 100 MHz).....	159
Apéndice 12	Espectro ^1H NMR de la hidroquinona 5 (CDCl_3 , 400 MHz) ...	160
Apéndice 13	Espectro ^{13}C NMR de la hidroquinona 5 (CDCl_3 , 100 MHz).....	161
Apéndice 14	Espectro ^1H NMR de la naringenina 6 ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$, 400 MHz)	162
Apéndice 15	Espectro ^{13}C NMR de la naringenina 6 ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$, 100 MHz)	163
Apéndice 16	Espectro ^1H NMR de reflexdiolida/16- <i>epi</i> -reflexdiolida (7/8) (DMSO, 400 MHz).....	164
Apéndice 17	Espectro ^{13}C NMR de reflexdiolida/16- <i>epi</i> -reflexdiolida (7/8) (7/8) (DMSO, 400 MHz)	165
Apéndice 18	Espectro DEPT de las reflexdiolida/16- <i>epi</i> -reflexdiolida (7/8) (DMSO, 400 MHz)	166
Apéndice 19	Espectro HSQC de las reflexdiolida/16- <i>epi</i> -reflexdiolida (7/8) (DMSO, 400 MHz).....	167
Apéndice 20	Espectro COSY de las reflexdiolida/16- <i>epi</i> -reflexdiolida (7/8) (DMSO, 400 MHz).....	168
Apéndice 21	Espectro HMBC de las reflexdiolida/16- <i>epi</i> -reflexdiolida (7/8) (DMSO, 400 MHz)	169
Apéndice 22	Espectro ^1H NMR de 6- β -acetiloxisalviarina (9) (DMSO, 500 MHz)	170

Apéndice 23	Espectro ^{13}C NMR de 6- β -acetiloxisalviarina (9) (DMSO, 125 MHz)	171
Apéndice 24	Espectro HSQC de 6- β -acetiloxisalviarina (9) (DMSO, 500 MHz).	172
Apéndice 25	Espectro HMBC de 6- β -acetiloxisalviarina (9) (DMSO, 500 MHz)	173
Apéndice 26	Espectro COSY de 6- β -acetiloxisalviarina (9) (DMSO, 500 MHz)	174
Apéndice 27	Espectro NOESY de 6- β -acetiloxisalviarina (9) (DMSO, 500 MHz)	175
Apéndice 28	Espectro ^1H NMR del 6- β -hydroxysalviarina (10) (DMSO, 500 MHz)	176
Apéndice 29	Espectro ^1H NMR del 6- β -acetoxisalviarina (10) (CDCl_3 , 500 MHz).	177
Apéndice 30	Espectro ^1H NMR de la salviandulina D (11 , CDCl_3 500 MHz)	178
Apéndice 31	Espectro ^{13}C NMR de la salviandulina D (11 , CDCl_3 500 MHz)	179
Apéndice 32	Espectro ^1H NMR del circiliol (14 , CDCl_3 500 MHz)	180
Apéndice 33	Espectro ^1H NMR del circiliol (14 , CDCl_3 500 MHz)	181
Apéndice 34	Espectro ^1H NMR de la 5,6 dihidroxi-7',3'4'trimetilflavona (15 , CDCl_3 500 MHz)	182
Apéndice 35	Espectro ^{13}C NMR de la 5,6 dihidroxi-7',3'4'trimetilflavona (15 , CDCl_3 500 MHz)	183
Apéndice 36	Espectro ^1H NMR de la pedalitina (16 , CDCl_3 500 MHz)	184
Apéndice 37	Espectro ^{13}C NMR de la pedalitina (16 , CDCl_3 500 MHz)	185
Apéndice 38	Tabla de contribución PCA de metabolitos secundarios	186
Apéndice 39	Tabla de contribución PCA de metabolitos secundarios, variables anatómicas y fisiológicas.....	187
Apéndice 40	Perfil de HPLC-PDA de extractos solubles en acetona de los tres tratamientos de sequía de <i>S. reflexa</i> con cromatogramas de referencia de circiliol (14) y pedalitina (16)	188
Apéndice 41	Datos de recolección de las poblaciones naturales de <i>S. circinnata</i> incluidas en este estudio.....	189
Apéndice 42	Variables ambientales de las diez poblaciones de <i>S. circinnata</i>	190
Apéndice 43	Perfil de HPLC-PDA a 240 nm de los extractos solubles en acetona de las diez poblaciones de <i>S. circinnata</i> con los cromatogramas de referencia para amarsolida A (17) y teotihuacanina (27)	191

	Perfil HPLC-PDA a 330 nm extractos solubles en acetona de <i>S. circinnata</i> con el cromatograma de referencia para amarissinina A (23) (330 nm)	192
Apéndice 44	Perfil de HPLC-FLD de extractos solubles en acetona de las diez poblaciones de <i>S. circinnata</i> con los cromatogramas para amarissinina A (17) y teotihuacanina (27)	193

Abreviaturas

CC	Cromatografía en columna
COV	Compuestos orgánicos volátiles
CT	Quimiotipo
ETR	Tasa de transporte de electrones
GC-MS	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría masas
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
LGM	Modelo lineal generalizado
MS	Metabolitos secundarios
PEG	Polietilenglicol
PCA	Análisis de componentes principales
Φ_{PSII}	Eficiencia cuántica efectiva del fotosistema II
RDA	Análisis de redundancia
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RNM	Resonancia magnética nuclear
RWC	Contenido relativo de agua
TLC	Cromatografía en capa fina
TMG	Tiempo medio de germinación
T_{min}	Tiempo mínimo de germinación

Resumen

Efecto del estrés abiótico en especies mexicanas de *Salvia*

El género *Salvia* es el más abundante de la familia Lamiaceae y cuenta con un alto endemismo en México. Las especies mexicanas de *Salvia* han sido foco de atención debido a la diversidad química de sus metabolitos secundarios como flavonas y diterpenos, además de que al año se comercializan cerca de 5 millones y medio de toneladas de semillas de *Salvia* en nuestro país. Sin embargo, poco se sabe sobre su fisiología y anatomía, así como de su tolerancia a ciertos tipos de estrés, siendo este último de vital importancia dada la crisis climática actual. El objetivo del presente trabajo fue estudiar especies de *Salvia* desde diferentes aspectos: germinación bajo condiciones de estrés abiótico, fitoquímica (especie y poblaciones) y tolerancia al estrés abiótico en plantas. Para el estudio de germinación se utilizaron núculas de *S. pennellii*, *S. chamedryoides* y *S. reflexa* y se evaluó la función del mucílago que rodea la semilla, las estructuras anatómicas importantes en la germinación y las variables de germinación (germinabilidad, tiempo medio de germinación (TMG) y tiempo mínimo de germinación (T_{min})) con y sin estrés abiótico (aumento de temperatura y sequía simulada). Se encontró que las núculas de las especies estudiadas no poseen latencia física. Uno de los principales resultados obtenidos fue que el mucílago en *S. pennellii* disminuye considerablemente la germinación, en *S. chamaedryoides* la aumenta significativamente y en *S. reflexa* no tiene ningún efecto. En las núculas de las tres especies se observaron traqueoides, los cuales funcionan como encargados del paso y retención del agua. En presencia de estrés hídrico y térmico disminuyó la germinabilidad y aumentó el TMG y el T_{min} en las tres especies. Se aislaron e identificaron tres compuestos nuevos de *S. pennellii*: wirikutina/15-*epi*-wirikutina y wixarikolida, así como tres compuestos ya conocidos: arbutina, hidroquinona y naringenina; de *S. reflexa* se identificaron dos compuestos nuevos: reflexdiolida/16-*epi*-reflexdiolida, así como nueve compuestos ya conocidos: salviandulina D, 8-hidroxisalviarina, estigmasterol, 6 β -hidroxisalviarina, 6- β -acetoxysalviarina, cirsiolol, 5'6-dihidroxi-7,3',4 timetilflavona y pedalitina. Se utilizaron tres tratamientos de riego (riego una vez por semana, una vez cada quince días y sin riego) para evaluar el estrés hídrico en plantas de *S. reflexa*. Las plantas disminuyeron su eficiencia cuántica efectiva del PSII, tasa de transporte de electrones, contenido de clorofilas, contenido relativo de agua (hoja y tallo), biomasa y peso fresco y tuvieron alteraciones anatómicas como variaciones en el diámetro de ancho de mesófilo, tallo y raíz, número de cloroplastos (hoja), vasos y canales de mucílago por el estrés hídrico. La composición de compuestos volátiles de esta especie fue casi en su totalidad de alcanos, cada tratamiento de riego presentó metabolitos específicos; control: hexadecano, 2,6,10,14-tetrametil, 2,2-dimethiloctadecano y estigmasterol, sequía moderada: ciclodeceno, 1 metil, tetracontano, 3,5,24-trimetil, tridecano-2 metil, 2-pentadecanona, docosano, hexacosano y nanocosano y sequía severa: pentacosano, heptacosano y octacosano. Además, se observó una disminución en la concentración de los alcanos y un aumento de concentración en la α y β amirina con el estrés, así como una tendencia en aumento de las flavonas. Se estudió la relación filogenética de *S. circinnata* (10 poblaciones), así como la composición de metabolitos secundarios (MS) y su relación con variables ambientales. Mediante el árbol filogenético se demostró que las poblaciones sí pertenecen a la misma especie y presentan cuatro quimiotipos (CT): CT amarisolida A, CT amarissinina, CT óxido de cariofileno y CT teotihuacanina. Las variables ambientales altitud, latitud, temperatura mínima y precipitación influyen en la concentración de la amarsolidida, α -amirina, cariofileno, óxido de cariofileno, dodecano; 2,2-dimetiloctaecano y espatulenol. Los resultados obtenidos en este estudio contribuyen al conocimiento sobre la morfología y anatomía de especies de *Salvia*, así como su respuesta ante el estrés abiótico. Además, se identificaron metabolitos presentes en *Salvia*, encontrando diferencias entre especies e incluso entre poblaciones de la misma especie y que la composición de estos MS está relacionada con la respuesta al estrés.

Palabras clave: cloroplastos, diterpenos, ETR, flavonas, *metabolito secundario*, *mucílago*, *quimiotipo*. Wirikutina A/B, reflexiolida. RWC, traqueoides, wixarikolide,

Abstract

Effect of abiotic stress on Mexican *Salvia* species

Salvia is the most abundant genus of the Lamiaceae family and has high endemism in Mexico. Mexican *Salvia* species have been the focus of attention due to the chemical diversity of their secondary metabolites, such as flavones and diterpenes, and about five and a half million tons of *Salvia* seeds are sold each year in our country. However, little is known about their physiology and anatomy, as well as their tolerance to certain types of stress, the latter being vital given the current climate crisis. This work aimed to study *Salvia* species from different aspects: Its germination under conditions of abiotic stress, Its phytochemistry (on species and populations level), and plant tolerance to abiotic stress. For the germination study, nucules of *S. pennellii*, *S. chamaedryoides*, and *S. reflexa* were used, and the function of the mucilage surrounding the seed, the anatomical structures important in germination, and the impact of hydric and thermal stress on three germination variables (germinability, average germination time) were evaluated. germination (TMG) and minimum germination time (Tmin). It was found that the nutlets of the species studied do not have physical dormancy. One of the main results obtained was that mucilage in *S. pennellii* considerably decreases germination; in *S. chamaedryoides*, it increases it significantly, and in *S. reflexa*, it has no effect. Tracheoids were observed in the nuleet of the three species, which function as those responsible for the passage and retention of water. Germinability decreased in the presence of water and thermal stress, and TMG and Tmin increased in the three species. Three new compounds were isolated and identified from *S. pennellii*: wirikutin/15-epi-wirikutin and wixarikolide, as well as three already known compounds: arbutin, hydroquinone and naringenin; From *S. reflexa*, two new compounds were identified: reflexdiolide/16-epi-reflexdiolide, as well as nine already known compounds salviandulin D, 8-hydroxysalviarin, stigmaterol, 6 β -hydroxysalviarin, 6- β -acetoxysalviarin, cirsilinol, 5'6-dihydroxy -7,3',4 thymethylflavone and pedalitin. Three watering treatments were used (watering once a week, once every 15 days, and no watering) to evaluate water stress in *S. reflexa* plants. The plants decreased their effective quantum efficiency of PSII, electron transport rate, chlorophyll content, relative water content (leaf and stem), biomass, and fresh weight. We registered also, anatomical alterations such as variations in the diameter of the mesophyll, stem, and width root, number of chloroplasts (leaf), vessels and mucilage channels due to water stress. The composition of volatile compounds of this species was almost entirely alkanes; each irrigation treatment presented specific metabolites; control: hexadecane, 2,6,10,14-tetramethyl, 2,2-dimethyloctadecane and stigmaterol, moderate drought: cyclodecene, 1-methyl, tetracontane, 3,5,24-trimethyl, tridecane-2-methyl, 2-pentadecanone, docosane, hexacosane and nanocosane, and severe drought: pentacosane, heptacosane and octacosane. In addition, a decrease in the concentration of alkanes, an increase in concentration in α and β amyrin with stress, and an increasing trend in flavones were observed. The phylogenetic relationship of *S. circinnata* (10 populations), the composition of secondary metabolites (SM), and its relationship with environmental variables were studied. Using the phylogenetic tree, it was demonstrated that the populations do belong to the same species presenting four chemotypes (CT): CT amarisolida A, CT amarissinin, CT caryophyllene oxide, and CT teotihuacanina. The environmental variables altitude, latitude, minimum temperature, and precipitation influence the concentration of amarsolid, α -amyrin, caryophyllene, caryophyllene oxide, dodecane, 2,2-dimethyloctaeacane, and spathulenol. The results obtained in this study contribute to the knowledge about the morphology and anatomy of *Salvia* species, as well as their response to abiotic stress. In addition, metabolites present in *Salvia* were identified, indicating that these differ between species and even populations and that changes in the composition of these MS are related to the stress response.

Keywords: *chemotype, diterpenoids, ETR, flavonoids, reflexiolid, secondary metabolites, tracheoids, Wirikutins A/B, wixarikolide*

INTRODUCCIÓN

México ocupa una superficie de aproximadamente 2,000,000 km² en los que están presente cerca de 29,000 especies vegetales (Villaseñor, 2004). Una de las principales familias vegetales es Lamiaceae, considerada una de las más diversas del mundo con 7,173 especies en 236 géneros, entre ellos *Salvia* (Harly y Pastore, 2012).

El género *Salvia* cuenta con cerca de 1,000 especies (Martínez-Gordillo et al., 2017). México es uno de los países con mayor riqueza de salvias en el mundo, siendo el segundo género más diverso del país, con 292 especies y un alto porcentaje de endemismo (77.1%) (Cornejo-Tenorio e Ibarra-Manríquez, 2011; González-Gallegos et al., 2020). Este género presenta problemas en su clasificación debido a circunscripciones taxonómicas sesgadas, homónimos e hibridación, habiéndose propuesto diferentes subgéneros, como *Sclarea* (especies de Asia y Europa), *Leonia* (especies de Europa, Asia y Africa), *Audibertia* (especies de California y Baja California) y *Calosphace* (especies de México) (Epling, 1938; Bentham, 1986). En esta última, se incluyen prácticamente todas las especies mexicanas (90%) (González-Gallegos, 2020). Sin embargo, se ha sugerido que, debido a la presencia de especies de los otros subgéneros en América, la clasificación de las especies mexicanas debería ser dentro del subgénero *Jungia* (Esquivel, 2008). Este género habita en diferentes ecosistemas, como zonas montañosas, bosques tropicales caducifolios, zonas áridas y desérticas, y se pueden encontrar especies anuales o perennes (Cornejo-Tenorio e Ibarra-Manríquez, 2011).

Las salvias tienen importancia ecológica debido a la relación mutualista con polinizadores específicos, como abejorros, abejas y los colibríes, dada la forma zigomorfa de sus flores que poseen un estambre fijo y uno móvil. El estambre fijo (parte estéril) funciona como una palanca que permite al polen adherirse al cuerpo de los polinizadores (Wester y Claßen-Bockhoff, 2007). Algunas especies cuentan con actividad alelopática por su alto contenido de compuestos fenólicos, ejerciendo un papel de herbicida natural, y otras más han sido reportadas como repelentes a

diversas plagas de importancia agrícola debido a su actividad insectistática (inhibición del desarrollo normal de los insectos) e insecticida (Zavala-Sánchez, 2013; Erez, 2015). También cuenta con importancia económica debido a que sus núculas (frutos) son consideradas un superalimento, siendo la fuente vegetal con mayor contenido de ácidos grasos esenciales (85.4%) y aportando muchos beneficios a la salud humana (Xingú et al., 2017). En México al año se comercializan cerca de cinco millones y medio de toneladas de semillas de especies de *Salvia*. Además, se han aislado metabolitos secundarios que cuentan con actividad hepatotóxica, antidiarreica, antitumoral, hipoglucemiante, antiinflamatoria, entre otras, obtenidos de distintas partes de las plantas (raíces, hojas y flores) y que pueden ser utilizados en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria (Bautista et al., 2015, 2016; Bisio et al., 2017).

La producción de metabolitos secundarios (MS) en plantas está involucrada en diversos procesos fisiológicos y bioquímicos. Los MS pueden estar asociados a la defensa contra herbívoros, atracción de polinizadores, comunicación con otras plantas e insectos, así como conferirles olor, color o sabor a las plantas. Además, algunos MS pueden ayudar a las plantas a su supervivencia ya que pueden estar involucrados en su tolerancia al estrés abiótico como la sequía, el aumento de temperatura, la radiación solar alta, etc. (Akula et al., 2011; Jan et al., 2021; Yeshi et al., 2022).

En el caso de las especies mexicanas, han sido utilizadas en la medicina tradicional y recientemente se ha encontrado que esto es debido a su alto número de terpenoides bioactivos que cuentan con esqueletos de *neo-clerodano* y *abietano*, además de que se han logrado aislar diterpenoides con esqueletos carbonados inusuales como los *tilifolanos* (Bautista et al., 2016; Sepúlveda-Cuellar et al., 2023).

Las salvias pueden estar presentes como arbustos, subarbustos o plantas herbáceas y, por lo general, son plantas aromáticas que en su mayoría presentan tricomas simples y glandulares, hojas opuestas o a veces verticiladas, flores generalmente dispuestas en verticilos, con forma zigomorfa y con la presencia de dos estambres (Ramamoorthy, 2001). Producen pequeños frutos llamados núculas

(de aquí en adelante referidas como semillas, por simplicidad), que son frutos simples y secos, que cuando llegan a la madurez no se abren ni se fragmentan. En la mayoría de las especies, la semilla ocupa casi todo el volumen interior del fruto y cuentan con células mucilaginosas en el epicarpio, las cuales secretan geles super absorbentes al entrar en contacto con el agua que rodean todo el fruto, otorgando funciones de anclaje, dispersión o hidratación (Font Quer, 1953; Gutterman, 2012; Di Sapio et al., 2012; Mascot-Gómez et al., 2020). Las semillas pueden ser ovaladas o naviculares y de color amarillo, con el extremo hilar más angosto (Di Sapio et al., 2012). En este género se han reportado resultados contrastantes sobre la presencia de la latencia en semillas debido a que puede estar o no presente, incluso entre especies de diferentes poblaciones, pudiendo servir como estrategia adaptativa en especies que habitan zonas áridas (Jurado y Flores, 2005; Baskin y Baskin, 2014).

La germinación es uno de los procesos esenciales para el establecimiento exitoso de las plantas, pero este proceso se puede ver afectado por variaciones de la temperatura y sequía. Por ejemplo, se ha reportado que cuando aumenta la temperatura y la sequía, el porcentaje de germinación en especies de *Salvia* disminuye y germinan más lento (Weerakoon y Lovett, 1986; Abdollahi et al., 2012; Zare et al., 2022), además de que el estrés térmico puede ocasionar daños irreversibles, como son afectaciones en el embrión, disminución de la síntesis de proteínas y de la actividad enzimática, y la inhibición de la germinación (Corbineau et al., 2002; Essemine et al., 2010).

El estrés hídrico también puede afectar el adecuado desarrollo de las plantas de *Salvia*. Se ha encontrado que en condiciones de sequía se da una disminución de la eficiencia cuántica efectiva del fotosistema II, la tasa de transporte de electrones, el contenido de clorofilas, el contenido relativo de agua, así como el peso seco y fresco de las plantas (Bettaieb et al., 2011; Razi et al., 2021). También se han observado modificaciones anatómicas en plantas en respuesta a estrés hídrico, como disminución en el ancho de la epidermis, el mesófilo, el tallo y aumento en el diámetro de la raíz, pérdida de parénquima en empalizada y esponjoso en la hoja,

así como aumento en el número de vasos del tallo y de la raíz (Bosabalidis et al., 2002; Burnett et al., 2005; Martínez et al., 2006).

En general, en las plantas se da una modificación en la concentración o presencia de MS como respuesta al estrés abiótico, como son terpenos, alcaloides y compuestos fenólicos en respuesta a sequía (Jan et al., 2021). También se ha reportado un aumento de flavonoides y antocianinas en respuesta al estrés hídrico y, actualmente, algunos MS como la prolina, la rafinosa y el galactinol son considerados marcadores de sequía (Yeshi et al., 2022). Sin embargo, la presencia de MS puede diferir entre especies y poblaciones, e incluso entre individuos de una misma población (Sepúlveda-Cuellar et al., 2020).

Con la problemática de la crisis ambiental actual ocasionada por el cambio climático, en el cual está pronosticado un aumento de temperatura que van de los 2 a los 5 °C y alteraciones en los ciclos de precipitación (IPCC, 2021), es esencial conocer las respuestas de las plantas ante escenarios futuros, especialmente las que cuentan con importancia ecológica y económica. Mediante esta tesis se pretende conocer las respuestas de especies de *Salvia* mexicanas mediante evaluaciones en su morfología, anatomía, fisiología y composición de metabolitos y como éstas podrían lograr que las plantas resistan los escenarios adversos futuros. Específicamente, nos enfocaremos en tres especies características del país que son: *S. pennellii*, *S. chamaedryoides*, *S. reflexa* y *S. amarissima*.

HIPOTESIS

Las plantas de las cuatro especies de *Salvia* en las que está enfocado este estudio presentan variaciones en sus estrategias de germinación y desarrollo (anatomía, fisiología) así como diferencias en la presencia y concentración de metabolitos secundarios en función del nivel de estrés al que se encuentran sometidas.

OBJETIVO GENERAL

Determinar cuál es la respuesta de especies de *Salvia* mexicanas ante la presencia de estrés abiótico.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer si las semillas de *S. pennellii*, *S. chamaedryoides* y *S. reflexa* presentan estructuras que les confieran latencia física, si son tolerantes a aumentos de sequía y temperatura, y si producen mucílago. En este último caso, también se busca determinar los efectos del mucílago sobre la germinación de las semillas.
- Determinar si las especies de *Salvia* producen diferentes metabolitos secundarios conforme aumenta el estrés ambiental, identificando su estructura química y variaciones concentración, como también establecer si estos fenómenos se relacionan con las variables ambientales del hábitat en que residen las plantas.
- Establecer si aumentos en el nivel de estrés ambiental provocan cambios en la eficiencia cuántica de los fotosistemas en plantas de *Salvia* y si esto también conduce a variaciones anatómicas.
- Determinar la relación filogenética entre diez poblaciones de *S. circinnata* mediante métodos moleculares (PCR) a lo largo de un gradiente de altitud, analizando la composición de compuestos volátiles y de diterpenos.

Esta investigación consta de cuatro capítulos: El capítulo I describe anatómicamente las semillas de *S. pennellii*, *S. chamaedryoides* y *S. reflexa*, cuál es la ruta de agua del funículo hacia el embrión, cuál la función del mucílago en la germinación y cuál es la respuesta de las semillas ante estrés abiótico, evaluando el porcentaje de germinación (%), la velocidad media de germinación (MGT) y el tiempo mínimo de germinación (T_{min}). El capítulo II se enfoca en la fitoquímica de *S. pennellii*, especie endémica de México, y parte del capítulo fue publicado en la revista *Tetrahedron Letters* (2023), 122, 154491. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2023.154491>. También, se muestra el estudio de la fitoquímica de la especie *S. reflexa*. El capítulo III describe la tolerancia de plantas adultas de *S. reflexa* ante el estrés hídrico mediante tres tratamientos de sequía (baja, moderada y severa), evaluando variables fisiológicas de los individuos,

variables anatómicas y variables metabólicas. Por último, el capítulo IV muestra los resultados de la cuantificación de compuestos volátiles y tres diterpenos entre diez poblaciones de la especie *S. circinnata*, así como un análisis filogenético mediante herramientas moleculares para constatar que pertenecen a la misma especie. Este capítulo fue publicado en la *Revista Brasileira de Farmacognosia* (2021), <https://doi.org/10.1007/s43450-021-00168-z>.

REFERENCIAS

- Akula, R., Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(11), 1720-1731.
- Bautista, E., Fragoso-Serrano, M., Toscano, R.A., García-Peña, M.R., Ortega, A. (2015). Teotihuacanin, a diterpene with an unusual spiro-10/6 system from *Salvia amarissima* with potent modulatory activity of multidrug resistance in cancer cells. *Organic Letter*, 17:3280–3282.
- Bautista, E., Fragoso-Serrano, M., Ortiz-Pastrana, N., Toscano, R. A., Ortega, A. (2016). Structural elucidation and evaluation of multidrug-resistance modulatory capability of amarissinins A–C, diterpenes derived from *Salvia amarissima*. *Fitoterapia*, 114, 1–6.
- Baskin, C.C., Baskin, J.M. (2014). Seeds, Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination. *Elsevier Inc.*
- Bentham, G. (1876). Labiatae. In: Genera Plantarum, vol. 2,
- Bettaieb, I., Hamrouni-Sellami, I., Bourgou, S., Limam, F., Marzouk, B. (2011). Drought effects on polyphenol composition and antioxidant activities in aerial parts of *Salvia officinalis* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 1103-1111
- Bisio, A., Damonte, G., Fraternali, D., Giacomelli, E., Salis, A., Romussi, G., Cafaggi, S., Ricci, D., De Tomassi, N. (2011). Phytotoxic clerodane diterpenes from *Salvia miniata* Fernald (Lamiaceae). *Phytochemistry*, 72, 265–275.
- Bosabalidis, A. M., Kofidis, G. (2002). Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive cultivars. *Plant Science*, 163(2), 375–379.
- Burnett, S. E., Pennisi, S. V., Thomas, P. A., Van Iersel, M. W. (2005). Controlled drought affects morphology and anatomy of *Salvia splendens*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(5), 775-781.
- Corbineau, F., Gay-Mathieu, C., Vinel, D., Come, D. (2002). Decrease in sunflower (*Helianthus annuus*) seed viability caused by high temperature as related to energy metabolism, membrane damage and lipid composition. *Physiologia Plantarum*, 116(4), 489–496.
- Cornejo-Tenorio, G., Ibarra-Manríquez, G. (2011). Diversidad y distribución del género *Salvia* (Lamiaceae) en Michoacán, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82(4), 1279-1296.
- Di Sapio, O., Bueno, M., Busilacchi, H., Quiroga, M., Severin, C. (2012). Caracterización morfoanatómica de hoja, tallo, fruto y semilla de *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11(3), 249-268.
- Epling, C.A. (1939). Revision of *Salvia* subgenus *Calosphace*, Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis: Berlin, 110: 1–383.
- Erez, M. E., Fidan, M. (2015). Allelopathic effects of Sage (*Salvia macrochlamys*) extract on germination of *Portulaca oleracea* seeds. *Allelopathy Journal*, 35(2), 285-296.

- Esquivel, B. (2008). Rearranged clerodane and abietane derived diterpenoids from American *Salvia* species. *Natural Product Communications*, 3, 989-1001.
- Essemine, J., Ammar, S., Bouzid, S. (2010). Impact of heat stress on germination and growth in higher plants: physiological, biochemical and molecular repercussions and mechanisms of defense. *Journal of Biological Sciences*, 10(6), 565-572.
- Font Quer, P. (1953). Diccionario de Botánica. *Lingua*, 15, 95.
- González Gallegos, J. (2020). Richness and distribution of *Salvia* subg. *Calosphace* (Lamiaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 181, 831-856.
- Gutterman, Y. (2012). Seed germination in desert plants. *Springer Science & Business Media*.
- Harley, R. M., Pastore, J. F. B. (2012). A generic revision and new combinations in the *Hyptidinae* (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence. *Phytotaxa*, 58, 1-55.
- IPCC. 2021. Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Masson-Delmotte, V., Zhai, P., Pirani, A., Connors, S.L., Péan, C., Berger, S., Caud, N., Chen, Y., Goldfarb, L., Gomis, M.I., Huang, M., Leitzell, K., Lonnoy, E., Matthews, J.B.R., Maycock, T.K., Waterfield, T., Yelekçi, O., Yu, R., Zhou, B. (eds.)]. *Cambridge University Press*, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Jan, R., Asaf, S., Numan, M., Lubna, Kim, K. M. (2021). Plant secondary metabolite biosynthesis and transcriptional regulation in response to biotic and abiotic stress conditions. *Agronomy*, 11(5), 968.
- Jurado, E., Flores, J. (2005). Is seed dormancy under environmental control or bound to plant traits? *Journal of Vegetation Science*, 16, 559-564.
- Martínez, J. P., Silva, H. F. L. J., Ledent, J. F., Pinto, M. (2007). Effect of drought stress on the osmotic adjustment, cell wall elasticity and cell volume of six cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *European Journal of Agronomy*, 26(1), 30-38.
- Martínez-Gordillo, M., Bedolla-García, B., Cornejo-Tenorio, G., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M. D. R., González-Gallegos, J. G., Zamudio, S. (2017). Lamiaceae de México. *Botanical Sciences*, 95(4), 780-806.
- Mascot-Gómez, E., Flores, J., López-Lozano, N. E., Yáñez-Espinosa, L. (2020). Seed germination of Southern Chihuahuan desert cacti: Effect of mucilage, light and phytohormones. *Flora*, 263, 151528.
- Ramamoorthy, T. P. (2001). *Salvia* L. In: Flora fanerogámica del Valle de México, Calderón de Rzedowski G., Rzedowski, J. (eds.). *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad/ Instituto de Ecología, Pátzcuaro, Michoacán*, 632-644.

- Razi, K., Muneer, S. (2021). Drought stress-induced physiological mechanisms, signaling pathways and molecular response of chloroplasts in common vegetable crops. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(5), 669–691.
- Sepúlveda-Cuellar, L., Duque-Ortiz, A., Yáñez-Espinosa, L., Calzada, F., Bautista, E., Pastor-Palacios, G., Bedolla-Gracia, B.Y., Flores-Rivas, J., Badano, E.I., Douterlungne, D. (2021). Phylogenetic and chemical analyses of the medicinal plant *Salvia circinnata*: an approach to understand metabolomics differences. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 31(5), 676-688.
- Villaseñor, J. L. 2004. Los géneros de plantas vasculares de la flora de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 75,105–135.
- Weerakoon, W. L., Lovett, J. V. (1986). Studies of *Salvia reflexa* Hornem. IV. Effects of watering frequency, drought and nutrient supply on growth and development. *Weed Research*, 26(4), 277-282.
- Wester, P., Claßen-Bockhoff, R. (2007). Floral diversity and pollen transfer mechanisms in bird-pollinated *Salvia* species. *Annals of Botany*, 100(2), 401-421.
- Xingú López, A., González Huerta, A., Cruz Torrez, E. D. L., Sangerman-Jarquín, D. M., Orozco de Rosas, G., Rubí Arriaga, M. (2017). Chía (*Salvia hispanica* L.) situación actual y tendencias futuras. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(7), 1619-1631.
- Yeshi, K., Crayn, D., Ritmejyrté, E., Wangchuk, P. (2022). Plant secondary metabolites produced in response to abiotic stresses has potential application in pharmaceutical product development. *Molecules*, 27(1), 313.
- Zare, A., Khodaeaei, A., Khezrepor, Z. (2022). Evaluation of germination in chia as a medicinal-oil seed plant under environmental stresses. *Journal of Crops Improvement*, 24(1), 31-40.
- Zavala-Sánchez, M.A., Pérez Gutiérrez, S., Romo-Asunción, D., Cárdenas-Ortega, N.C., Ramos-López, M.A. (2013). Activity of four *Salvia* species against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Southwestern Entomologist*, 38(1):67-73.

1. CAPITULO I. Anatomía de núculas y efecto del mucílago, potencial hídrico y temperatura en la germinación de semillas de tres especies mexicanas de *Salvia*.

1.1 INTRODUCCIÓN

Dentro de las angiospermas, la familia Lamiaceae es la sexta más grande a nivel mundial y *Salvia* es el más abundante de todos sus géneros (Martínez-Gordillo et al., 2017). Este género contiene alrededor de 1,000 especies (Drew, 2020; González-Gallegos et al., 2020) y tiene más de 150 especies de cultivadas con fines culinarios, medicinales y/u ornamentales (Drew, 2020).

La germinación de semillas es un proceso fisiológico que comienza con la absorción de agua por parte de las semillas y finaliza con la emergencia de la radícula (Baskin y Baskin, 2014). Las semillas han desarrollado mecanismos a lo largo del tiempo para adaptarse a su entorno (Baskin y Baskin, 2014). Por ejemplo, la ocurrencia de un sitio específico de entrada de agua en semillas impermeables, como la chalaza, el cristalino, el lent, el hilio y el micrópilo (Gama-Arachchige et al., 2013). Las estructuras involucradas en la entrada de agua en las semillas de *Salvia* son hasta el momento desconocidas.

La temperatura y el agua son los factores más importantes que influyen en la germinación de semillas (Baskin & Baskin, 2014). Sin embargo, estudios sobre la respuesta germinativa de *Salvia* spp. con la combinación de temperatura y estrés hídrico son escasos. Por ejemplo, las semillas de *Salvia reflexa* han logrado germinar más del 50 % con potenciales hídricos de 0, -0.3, -0.6 y -0.9 MPa a 27/18 y 33/24 °C día/noche, pero no logran geminar a -0.6 y -0.9 MPa a 21/12 o 15/6°C (Weerakoon y Lovett, 1986). En experimentos separados, las semillas de *Salvia hispanica* han mostrado una reducción del 50 % en el porcentaje de su germinación con potenciales hídricos de -0.90 y -0.79 MPa y son capaces de germinar en el rango de 10 a 40 °C (Zare et al., 2022). Otro ejemplo es la germinación de semillas de *Salvia iodantha*, la cual se ve favorecida cuando se da un choque térmico (Zuloaga-Aguilar et al., 2011). Se ha encontrado también que las semillas de otras especies de *Salvia* son tolerantes a potenciales hídricos de -0.3 y -0.6 MPa y, bajo

el tratamiento de potenciales hídricos de -0.9 MPa, especies como *S. nemorosa*, *S. verticillata*, *S. spinosa* y *S. sharifii* fueron tolerantes, mientras que *S. virgata*, *S. eremophila*, *S. macrosiphon* y *S. chloroleuca* disminuyeron el porcentaje de germinación (Abdollahi et al., 2012). Estos estudios son importantes porque si se cumplen las predicciones del cambio climático sobre la disminución de la precipitación y el aumento de temperatura (IPCC, 2021), podría ocurrir una reducción de la germinación de diversas especies de *Salvia*.

La latencia de semillas es la incapacidad de germinar en un período específico bajo cualquier combinación de factores ambientales abióticos normales (agua, temperatura, luz/oscuridad, etc.), que de otro modo serían favorables para la germinación (Baskin y Baskin, 2014). Se considera que esta ha sido una estrategia adaptativa muy común en ambientes impredecibles, como los áridos, y semiáridos (Jurado y Flores, 2005). Se ha encontrado que muchas lamiáceas tienen latencia física de semillas, mostrando baja o nula germinación y necesitando de la ruptura de la testa para llevar a cabo su proceso de germinación (Baskin y Baskin, 2004). Sin embargo, para el género *Salvia*, se han encontrado resultados contrastantes dado que algunas especies tienen semilla con latencia y otras no (Tabla 1).

Las macroesclereidas son otra adaptación relacionada con la latencia que han desarrollado las semillas a ambientes adversos. Son células lignificadas y alargadas que confieren dureza y, en algunos casos, impermeabilidad a la semilla al estar impregnadas de sustancias hidrofóbicas como la cutina, la lignina o la suberina, impidiendo el paso de agua al interior de la semilla y confiriéndole mayor dureza a su cubierta (Baskin y Baskin, 2014). El engrosamiento del tegumento de algunas semillas, su forma y la presencia de regiones específicas que permiten la entrada de agua restringen el proceso de imbibición (Robles-Díaz et al., 2016). Se han encontrado macroesclereidas en semillas de *Salvia hedgeana*, *S. huberi* y *S. rosifolia* (Büyükkartal et al., 2011), así como en *S. napifolia* y *S. russellii* (Kahraman et al., 2018). Sin embargo, queda por probar si las macroesclereidas están asociadas con la latencia de las semillas en las especies de *Salvia*.

Tabla 1. Tipo de latencia en semillas de diversas especies de *Salvia* alrededor del mundo (Baskin y Baskin, 2014).

Especies	Tipo de latencia	Autores
<i>Salvia aegyptica</i>	LF	Sen & Chatterji (1968)
<i>Salvia apiana</i>	LF	Keeley (1987)
<i>Salvia argentea</i>	LF	Blanco-Salas et al. (2009)
<i>Salvia azurea</i> var. <i>grandiflora</i>	LF	Coplen (2021)
<i>Salvia canariensis</i>	NL	Pita (1996)
<i>Salvia coccinea</i>	NL	García-Albarado et al. (2013)
<i>Salvia coccinea</i>	LF	Jurado et al. (2000)
<i>Salvia columbariae</i>	LF	Capon & Van Asdall (1967)
<i>Salvia farinacea</i>	NL	Tipton (1992)
<i>Salvia fruticosa</i>	LF	Thanos & Doussi (1995)
<i>Salvia hispanica</i>	ND	Stefanello et al. (2015)
<i>Salvia iodantha</i>	LF	Zuloaga-Aguilar et al. (2011)
<i>Salvia lavandulifolia</i>	LF	Luna et al. (2007)
<i>Salvia lavanduloides</i>	LF	Zuloaga-Aguilar et al. (2011)
<i>Salvia mellifera</i>	LF	Keeley (1986)
<i>Salvia nemorosa</i>	LF	Nikolaeva et al. (1985)
<i>Salvia nilotica</i>	NL	Teketay (1998)
<i>Salvia officinalis</i>	NL	Blanco-Salas et al. (2009)
<i>Salvia pomifera</i>	LF	Thanos & Doussi (1995)
<i>Salvia pratensis</i>	LF	Luna et al. (2007)
<i>Salvia przewalskii</i>	LF	Liu et al. (2011)
<i>Salvia reflexa</i>	LF	Kegode et al. (2010)
<i>Salvia robusta</i>	LF	Liu et al. (2011)
<i>Salvia sclarea</i>	LF	Blanco-Salas et al. (2009)
<i>Salvia sonomensis</i>	LF	Chan & Lambers (1970)
<i>Salvia splendens</i>	NL	de la Vega and Alizaga (1987); Menezes et al. (2004)
<i>Salvia stenophylla</i>	LF	Musarurwa et al. (2010)
<i>Salvia thyrsoiflora</i>	LF	Zuloaga-Aguilar et al. (2011)
<i>Salvia verbenaca</i>	NL	Blanco-Salas et al. (2009), Javaid et al. (2018)
<i>Salvia verbenaca</i>	LF	Luna et al. (2007)
<i>Salvia verticillata</i>	LF	Czarnecka (2004)
NL: no latentes, LF: latencia física		

La mixocarpia es la capacidad de algunas semillas para generar mucílago (gel absorbente) que está compuesto principalmente de pectinas y hemicelulosa (Gorai et al., 2014; Geneve et al., 2017) y su presencia se ha reportado en distintas especies de *Salvia* (Salgado-Cruz et al., 2013; Celep et al., 2014; Güzel et al., 2019). Sin embargo, el papel del mucílago ha recibido nula atención en estas especies. Los estudios sobre el papel del mucílago en semillas de especies de otros géneros sugieren que tienen múltiples funciones ecológicas, como la adherencia al suelo para el anclaje (Guterman, 2012), la promoción de la dispersión de semillas por adherencia a la piel o plumaje de los animales (Lobova et al. 2003), evitar la depredación (Barrios et al., 2015) e incluso mantener hidratadas las semillas cuando el agua escasea (Yang et al., 2010) y con ello mejorar la germinación (Mascot-Gómez et al., 2020).

Dado los pocos estudios que se tienen sobre descripciones anatómicas de las semillas de especies de *Salvia* mexicanas, así como de su tolerancia al estrés abiótico, es importante conocer las adaptaciones que han desarrollado estas especies para su germinación exitosa, además de investigar si serán capaces de adaptarse a situaciones futuras adversas. Para la investigación de este capítulo se seleccionaron tres especies de importancia ecológica que se localizan en México, en zonas áridas de San Luis Potosí: *Salvia chamaedryoides* Cav., *Salvia pennellii* Epling y *Salvia reflexa* Hornem, siendo las dos primeras de importancia económica y la última importante en el sector ganadero debido a que es dañina para el ganado.

1.2 HIPOTESIS

- Las semillas de *Salvia chamaedryoides*, *S. reflexa* y *S. pennellii* poseen adaptaciones anatómicas estructurales que promueven su germinación y que les ayudan a tolerar condiciones adversas como sequía y aumento de la temperatura.
- Las semillas de las tres especies contarán con estructuras anatómicas como macroesclereidas, micropilo y traqueoides para su proceso de imbibición, promoviendo la germinación.
- La remoción del mucílago ocasionará disminución de la germinación y germinación más lenta.
- Las semillas de las tres especies presentarán disminución de la germinación y germinación más lenta bajo de estrés abiótico.
- Al retirar el estrés abiótico de las semillas, mostrarán una recuperación en capacidad germinativa.

1.3 OBJETIVO GENERAL

- Determinar la tolerancia de semillas de *Salvia* (*S. chamaedryoides*, *S. pennellii* y *S. reflexa*) ante dos tipos de estrés abiótico (temperatura alta y disminución de la precipitación).

1.4 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar si las semillas presentan estructuras involucradas en el proceso de latencia física.
- Evaluar si las semillas producen mucílago y si su presencia incrementa el porcentaje de germinación y disminuye el tiempo medio de germinación.
- Determinar si las semillas son tolerantes al aumento de la sequía y la temperatura.

1.5 MATERIALES Y METODOS

1.5.1 Especies de estudio

Salvia chamaedryoides Cav. es una planta herbácea perenne localizada en México y Estados Unidos (González-Gallegos et al., 2020). Habita en pastizales, sabanas y matorrales templados, así como en desiertos y matorrales xéricos (González-Gallegos et al., 2020), a 2300 – 3000 m s.n.m. (Turner, 2013). Esta especie ha sido recomendada para jardinería sostenible (Ablanque et al., 2015) y también tiene importancia médica por su actividad hipoglucemiante, así como potencial para el desarrollo de herbicidas (Ablanque et al., 2015; Bisio et al., 2017).

Salvia reflexa Hornem. es una planta anual localizada en México y Estados Unidos (González-Gallegos et al., 2020). Habita en pastizales templados, sabanas y matorrales, en desiertos y matorrales xéricos, así como en pastizales, sabanas y matorrales tropicales y subtropicales (González-Gallegos et al., 2020). Esta especie tiene una modesta capacidad invasora en los pastos (Weerakoon y Lovett, 1986). El aceite esencial de *S. reflexa* se puede utilizar como un buen antioxidante, un excelente antifúngico para inhibir el crecimiento de hongos y un insecticida muy eficaz para controlar los insectos (Goswami et al., 2019). Esta especie es considerada como invasora en países como Australia, China, Afganistán y Argentina, se han reportado estudios de intoxicación por nitritos y hepatotoxicidad en ganado (Hussain et al., 2019; Panter et al., 2021).

Salvia pennellii Epling es una planta perenne endémica del centro y norte de México (Martínez-Gordillo et al., 2017; González-Gallegos et al., 2020). Habita en pastizales, sabanas y matorrales templados, así como en desiertos y matorrales xéricos (González-Gallegos et al., 2020), a una altura de 1600 a 2870 m (Martínez-Gordillo et al., 2016). Esta especie es usada como ornamental por la belleza de sus flores y su resistencia a los bajos niveles de humedad (Martínez-Gordillo et al., 2016). No se han realizado estudios ecológicos ni fitoquímicos de esta especie.

1.5.2 Recolección de las semillas

Las semillas de *S. pennellii* y *S. chamaedryoides* se recolectaron en la Sierra de Catorce, San Luis Potosí, México, y las semillas de *S. reflexa* se recolectaron en la Sierra de Álvarez, San Luis Potosí, México, se recolectaron de al menos 10 plantas por especie para asegurar la variabilidad genética. Para determinar la calidad de los lotes de semillas se realizó una prueba de viabilidad (100 semillas por especie) mediante una reacción de tetrazolio al 0.5%, tomando como viables los embriones pigmentados de color rojo (Baskin y Baskin, 2014).

1.5.3 Experimentos de germinación

Experimento 1. Estructuras anatómicas relacionadas con la imbibición

Para conocer cuál es la estructura de entrada de agua a las núculas, se colocaron semillas de las tres especies en una solución de toluidina, se realizaron pruebas previas en las tres especies para encontrar el tiempo que tarda el embrión en teñirse completamente, para el caso de *S. chamaedryoides* y *S. reflexa* este fue de tres horas por lo que se realizaron cortes cada tres minutos durante tres horas. Para el caso de *S. pennellii*, fue de 24 horas por lo que se realizaron cortes cada hora durante 24 horas. Se observaron y fotografiaron secciones de las núculas con un microscopio óptico (Leica EZ4D) para buscar las estructuras y vías involucradas.

Para conocer las estructuras anatómicas relacionadas con la imbibición de las semillas de las tres especies (n=10) fueron deshidratadas y fijadas en soluciones de etanol-metacrilato con intercambios de 24 horas y agitación de tres horas, y posteriormente incluidas en resina Technovit 7100. Se realizaron secciones anatómicas de 5 μ con la ayuda de un microtomo (Leica RM215RT), se tiñeron con azul de cresilo y se observaron y fotografiaron en un microscopio óptico. Para realizar las mediciones se utilizó el programa ImageJ. En conjunto, se tomaron fotografías de cinco semillas de cada una de las especies con la ayuda de un microscopio óptico de barrido (SEM) para descubrir las estructuras esenciales en el proceso de germinación.

Experimento 2. *Latencia física de la semilla debido a la estructura del fruto.*

Para corroborar si las núculas de las tres especies de *Salvia* tienen latencia física caracterizada por poseer una cama de macroesclereidas que impiden el paso del agua, se utilizaron tres tratamientos: núculas intactas, núculas raspadas del pericarpio con la ayuda de papel de lija y núculas con un corte en el pericarpio para permitir la hidratación directa de las semillas. Para cada tratamiento se contó con cinco cajas Petri con 20 núculas para cada especie. Cada caja Petri incluyó algodón humedecido con 3 ml de agua desionizada. Posteriormente se pusieron a germinar a 24 °C con fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad.

Experimento 3. Producción de mucílago

Para determinar la presencia o ausencia de mixocarpía, se utilizó una núcula por especie con solución de toluidina, fotografiando el halo generado por cada núcula (siguiendo a Duletiae-Lauseviae y Martin, 1999). También se clasificó la producción de mucílago como débil (0.05 - 0.1 mm), moderada (0.1 - 0.5 mm) o fuerte (> 0.5 mm), dependiendo del ancho del halo de mucílago producido (Duletiae-Lauseviae y Martin, 1999). Se midió el halo que genera el mucílago, así como la tasa de producción de mucílago en horas (tiempo que tarda la núcula en estar completamente cubierta de mucílago). Las mediciones se realizaron utilizando el programa Image J.

Experimento 4. *Función del mucílago del fruto en la germinación de la semilla.*

Para entender la función del mucílago, se realizó una comparación en núculas con y sin mucílago. Para eliminar el mucílago se utilizó ácido sulfúrico, se realizaron pruebas previas para conocer la concentración y el tiempo en el que se podría retirar el pericarpio sin afectar la germinación. Las núculas se sonicaron durante un minuto en ácido sulfúrico concentrado para *S. chamaedryoides* y *S. pennellii*, y durante 7 minutos al 70% en el caso de *S. reflexa*, posteriormente se enjuagaron con agua y se eliminó el pericarpio de toda la núcula. Para cada tratamiento se contó con cinco

cajas de Petri con 20 núculas de cada especie humedecidas con 3 ml de agua desionizada a 24 °C.

El potencial hídrico de las soluciones de PEG a diferentes temperaturas (23 y 40 °C) se determinó siguiendo a Michel (1983). El PEG 8000 se disolvió en agua destilada y se colocó en un agitador durante 16 h a 20 °C. Los potenciales hídricos de las soluciones de PEG 8000 de cada temperatura se verificaron utilizando un microvoltímetro de punto de rocío (WP4). Todas las cajas Petri se sellaron con papel transparente adherente para evitar la evaporación. Las núculas se pusieron a germinar en un ambiente de 12 h de oscuridad/12 h de luz en una cámara de germinación (Lumistel ICP-19 d-c/iv) para cada tratamiento de temperatura. Las repeticiones se realizaron haciendo diferentes lotes de soluciones de PEG 8000 y colocando cajas Petri (repeticiones) en diferentes lugares dentro de las cámaras de germinación. Los cuatro potenciales hídricos se eligieron para simular los diferentes grados de estrés hídrico (0 MPa control, -0.2 MPa sequía baja, -0.6 MPa sequía moderada y -1.0 MPa sequía severa) que enfrentarían las semillas en diferentes escenarios de cambio climático global y están dentro del rango de valores descritos para diferentes tipos de suelo en todo el mundo (Dürr et al., 2015). Se eligió el tratamiento de 23 °C para simular la temperatura óptima de la especie, y se eligió el tratamiento de 40 °C para simular la temperatura reportada para la inhibición de la germinación en otras especies de *Salvia* (Weerakoon, 1986a; Gorai et al., 2011).

Las semillas se consideraron germinadas si una porción de la radícula estaba expuesta. La falta de recuperación de núculas no germinadas después de la exposición al estrés hídrico y térmico indica que éstas perdieron viabilidad o entraron en latencia secundaria (Baskin & Baskin, 2014). Se realizó una prueba de recuperación colocando las núculas no germinadas en condiciones óptimas y evaluando su porcentaje de germinación. La recuperación de núculas se calculó mediante la fórmula: $[(a - b)/(c - b)] \times 100$, donde a es el número total de semillas germinadas después de ser transferidas a agua destilada, b es el número de semillas germinadas después de los tratamientos de sequía y de temperatura y c

es el número total de semillas en la caja Petri al inicio del experimento (Gorai et al., 2014).

Las variables de respuesta evaluadas fueron: (a) $T_{\min}$, que es el tiempo mínimo requerido para que germine la primera semilla; (b) tiempo medio de germinación (TMG) es el tiempo que tarda en aparecer la radícula en el proceso de germinación y c) germinabilidad (%) que se refiere al porcentaje de germinación de semillas al final del experimento (a los 30 días). La TMG se calculó según Ranal et al. (2009) como:

$$TMG = (\sum n_i \times t_i) / \sum n_i$$

donde n_i es el número de semillas germinadas en el tiempo i y t_i es el tiempo desde el inicio del experimento hasta la primera observación. El porcentaje de germinación y el tiempo medio de germinación (MGT) se obtuvieron con el programa GerminaQuant (Lozano-Isla et al., 2019).

1.5.4 Análisis estadísticos

Se utilizó el programa GerminaQuant R para obtener las variables de germinabilidad, tiempo medio de germinación y $T_{\min}$ en los experimentos de latencia física, función del mucílago y tolerancia al aumento de sequía y temperatura para cada una de las especies. La germinabilidad y la recuperación de semillas posterior al estrés se analizaron con modelos lineales generalizados (LGM, por sus siglas en inglés) asumiendo una distribución de Poisson y utilizando la función de log link; para explorar las diferencias entre tratamientos se realizó la prueba post-hoc de Tukey. Se realizó un ANOVA de tres vías para las variables MGT y $T_{\min}$ y un ANOVA de una vía por especie para el grosor de las macroesclereidas. Se realizaron comparaciones múltiples (prueba de Tukey) para distinguir diferencias ($\alpha = 0.05$) entre tratamientos combinados. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa R versión 3.6.3.

1.6 RESULTADOS

Experimento 1. *Estructuras anatómicas relacionadas con la germinación*

Las especies de *Salvia* estudiadas desarrollan cuatro núculas (fruto indehisciente) incluidas en su cáliz. En el caso de *S. chamaedryoides* su núcula mide 3.5 ± 0.09 mm de largo, con forma navicular, de color café obscura, *S. pennellii* mide 2 ± 0.08 mm de largo, con forma ovalada de color grisáceo y *S. reflexa* mide aproximadamente 2.9 ± 0.08 mm de largo, con forma navicular de color marrón. Las tres especies cuentan con una superficie brillante y escrobiculada (pequeñas depresiones planas y poco profundas) con surcos muy suaves, las células epidérmicas son en su mayoría de forma poligonal. En la zona polar basal se localiza la cicatriz del funículo, la cual está cubierta de cristales de oxalato de calcio.

Mediante un corte transversal en las núculas de las tres especies se pueden distinguir tres regiones: 1) exocarpio, donde están presentes las células mucilaginosas; b) mesocarpio, donde se puede observar en la parte basal la calaza acompañada de traqueoides homomorfos, una capa de idioblastos cristalíferos con cristales de oxalato de calcio seguida de una capa en empalizada formada de una capa de macroesclereidas dispuestas perpendicularmente a la superficie de la semilla. No se encontraron diferencias en el ancho de macroesclereidas entre *S. chamaedryoides* y *S. reflexa*, pero sí entre éstas y *S. pennellii* ($F = 5.08$, $p = 0.02$), siendo esta última la más delgada de las tres especies. E. Inmediatamente después de esta capa de macroesclereidas se observó una fila de traqueoides alrededor de la núcula y por último se observó el c) endocarpio.

Las semillas tienen forma navicular para *S. chamaedryoides* y *S. reflexa* y forma ovoide para *S. pennellii*, ocupa prácticamente todo el volumen del fruto, la testa es de color amarillo, brillantes y de superficie reticulada con un extremo más ancho (cotiledonal) y el otro más angosto (radicular), mediante un corte longitudinal se pueden observar residuos de endosperma, un par de cotiledones del mismo tamaño formados por tejidos parenquimáticos y un embrión lineal.

Al estudiar el paso del agua se observó que el agua ingreso por la cicatriz del funículo para llegar a la capa de los traqueoides (Fig. 1), los cuales tendrán la

función de retención de agua y transporte y mediante los traqueoides que están inmediatamente por debajo de las macroesclereidas, se formara una “ruta” hasta llegar al micropilo e ingresar a la zona radicular de la semilla atravesando la testa para hidratar los tejidos del embrión.

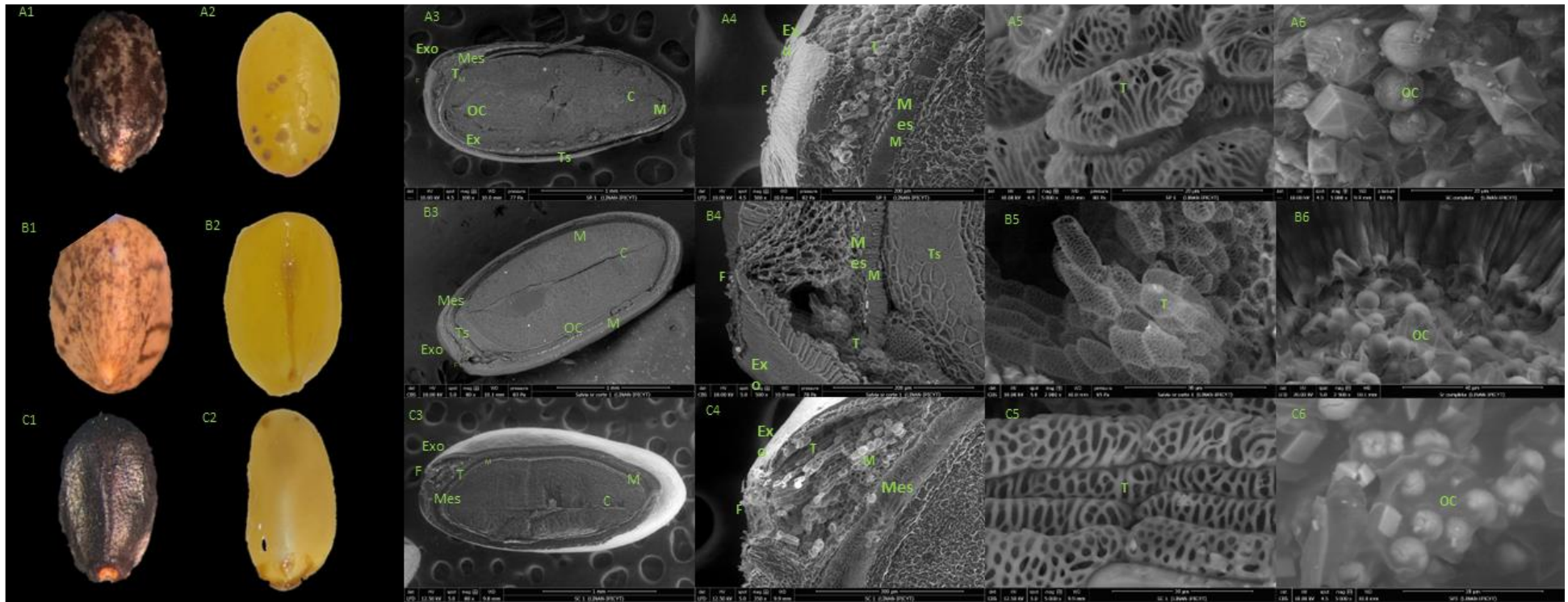


Figura 1. Fotomicrografías de la cubierta seminal de *Salvia penellii* (A), *S. reflexa* (B) y *S. chamaedryoides* (C), obtenidas con un microscopio electrónico de barrido ambiental: 1 núcula, 2) semilla, 3) parte interna del pericarpio 4) presencia de traqueoide homomórfico para almacenar agua en la zona hiliar, 5) de tipo macrotraqueoide (más redonda y corta) y (C2 y C3) de tipo tubular difuso (de forma alargada) y 6) Idioblastos cristalíferos con cristales de oxalato de calcio en la parte hiliar de la núcula. F: cicatriz del funículo, M: macroescleridas, T: traqueoides, TS: testa, Exo: exocarpo, Mes: mesocarpo y OC: cristales de oxalato de calcio.

Se encontró mayor viabilidad de semillas para *S. pennellii* y *S. reflexa* que para *S. chamaedryoides* (Tabla 2).

Tabla 2. Variables evaluadas en semillas de tres especies de *Salvia*. Letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$ (post hoc Tukey test).

Variables							
Especies	Ancho macroesclereidas (μ)	Estructuras paso de agua	Tiempo de paso de agua (h)	Viabilidad de la semilla	Latencia de las semillas	Reacción de mixocarpia (μ)	Tiempo de reacción de mixocarpia (h)
<i>S. pennellii</i>	149.124 $\pm$ 36.41 ^a	Micrópilo	36	80 $\pm$ 0.3	No	0.9	3
<i>S. reflexa</i>	224.92 $\pm$ 59.19 ^b	Micrópilo	3	85 $\pm$ 0.3	No	0.8	1/30
<i>S. chamaedryoides</i>	231.69 $\pm$ 44 ^b	Micrópilo	3	63 $\pm$ 0.3	No	0.5	1

Tabla 3. Efecto del raspado y corte en la germinación de semillas (%) y tiempo medio de germinación y Tiempo mínimo de germinación de tres especies de *Salvia*, letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$ (post hoc Tukey test).

Tratamiento	Especies								
	<i>S. pennellii</i>			<i>S. reflexa</i>			<i>S. chamaedryoides</i>		
	Germinabilidad (%)	TMG	T ^{min}	Germinabilidad (%)	TMG	T ^{min}	Germinabilidad (%)	TMG	T ^{min}
Semillas raspadas	66 $\pm$ 6.9 ^b	4.2 $\pm$ 0.3 ^a	2 $\pm$ 0 ^a	78 $\pm$ 6.2 ^a	2.4 $\pm$ 0.1 ^a	2 $\pm$ 0 ^a	84 $\pm$ 1.8 ^a	3.3 $\pm$ 0.1 ^a	2 $\pm$ 0 ^a
Semillas cortadas	93 $\pm$ 4.3 ^a	3.4 $\pm$ 0.1 ^{ab}	2 $\pm$ 0 ^a	83 $\pm$ 4.8 ^a	2.8 $\pm$ 0.1 ^a	2 $\pm$ 0 ^a	83 $\pm$ 2.5 ^a	3.2 $\pm$ 0.1 ^a	2 $\pm$ 0 ^a
Control	90 $\pm$ 3.5 ^a	2.7 $\pm$ 0.1 ^b	2 $\pm$ 0 ^a	91 $\pm$ 1.8 ^a	3.2 $\pm$ 0.1 ^b	2 $\pm$ 0 ^a	69 $\pm$ 1.8 ^b	3.5 $\pm$ 0.2 ^a	2 $\pm$ 0 ^a

Experimento 2. Prueba de latencia física

Desde esta sección se hará referencia a las núculas como semillas para un mejor entendimiento.

Germinación de semillas (%) o germinabilidad

La germinabilidad se vio afectada por el tratamiento ($F = 4.54$, $p = 0.01$) y por la interacción especie x tratamiento ($F = 6.29$, $p < 0.01$), pero no por el factor especie ($F = 6.295$, $p = 0.19$). Las semillas control de las tres especies de *Salvia* mostraron alta germinación ($\geq 69\%$), lo que indica que no existe latencia (Tabla 3). Se encontró una mayor germinación ($\geq 90\%$) en las semillas del tratamiento control para *S. pennellii* y *S. reflexa* que para *S. chamaedryoides*. La última especie tuvo una menor germinación (%) en las semillas control que en las semillas raspadas y cortadas.

Tiempo medio de germinación (TMG)

El TMG difirió entre especies ($F = 4.41$, $p = 0.019$), tratamientos ($F = 141.86$, $p < 0.01$) y la interacción especie x tratamiento ($F = 15.92$, $p = 0.0016$). El TMG fue similar entre tratamientos para *S. reflexa*, pero fue menor en las semillas control que en las rayadas para *S. pennellii*, así como menor en las semillas control que en las tratadas para *S. chamaedryoides* (Tabla 3). Entre especies, *S. pennellii* tuvo la MGT más corta en las semillas del tratamiento control.

Tiempo mínimo de germinación ($T_{\min}$)

No se observaron diferencias entre especies ($F = 0.98$, $p = 0.38$), tratamientos ($F = 0.96$, $p = 0.39$) ni en la interacción tratamiento x especie ($F = 0.96$, $p = 0.43$), germinando todas las especies al segundo día (Tabla 3).

Experimento 3. Producción de mucílago

Se observó una reacción de mucílago (mixocarpia) en las semillas humedecidas de las especies estudiadas. Las tres especies tuvieron una fuerte reacción de mixocarpia con un halo de 0.9 um para *S. pennellii*, 0.8 um para *S. reflexa* y 0.5 um para *S. chamaedryodes* (Tabla 2). El mucílago de *S. pennellii* y *S. chamaedryodes* es cristalino, lo que crea una formación en forma de estrella cuando se seca; El mucílago de *S. reflexa* tiene un color blanco lechoso el cual forma "hilos" de mucílago. La tasa de producción de mucílago fue diferente para las tres especies; *S. pennellii* tuvo la reacción más lenta (3 horas), seguida de *S. reflexa* con 1 hora y media y *S. chamaedryodes* con 1 hora (Tabla 2).

Experimento 4. Función del mucílago

Germinación de semillas (%) o germinabilidad

La respuesta en el proceso de germinación fue diferente dependiendo de la especie ($F = 12.69$, $p < 0.01$), tratamiento ($F = 10.80$, $p < 0.01$) e interacción especie x tratamiento ($F = 21.36$, $p < 0.01$, Fig. 2). En el caso de *S. pennellii* se encontró disminución de la germinación (%) en semillas sin mucílago. Por el contrario, las semillas de *S. chamaedryodes* tuvieron mayor germinación sin mucílago que con él. Para *S. reflexa* no se encontraron diferencias significativas en la germinabilidad entre tratamientos. De las tres especies *S. reflexa* fue la que tuvo una mayor germinación en semillas sin mucílago germinando el 60% seguido *S. chamaedryodes* con el 40%, siendo *S. pennellii* la especie con menor germinación en semillas sin mucílago (20%).

Tiempo medio de germinación (TMG)

El TMG fue afectado por la especie ($F = 5.56$, $p = 0.01$) y la interacción especie x tratamiento ($F = 8.19$, $p < 0.01$, Fig. 2), pero no por el tratamiento ($F = 0.37$, $p = 0.54$). Las semillas de *S. chamaedryodes* mostraron un TMG más corto en semillas sin mucílago, fue de las tres especies la que logro una germinación más rápida en semillas sin mucílago (3 días) siendo incluso más rápida que su control (4 días) (Fig. 2). Las semillas de *S. reflexa* presentaron un TMG más corto en semillas con

mucílago. (2 días) que sin mucílago (4 días), mostrando influencia en la velocidad de germinación (Fig. 2). Para *S. pennellii* no se observaron diferencias en el TMG entre semillas con y sin mucílago y de las tres especies es la que tiene un TMG más lento (Fig. 2).

Tiempo mínimo de germinación ($T_{\min}$)

Las semillas de las tres especies comenzaron a germinar en pocos días, el $T_{\min}$ difirió por especie ($F = 16.94$, $p < 0.01$), por tratamientos ($F = 10.71$, $p < 0.01$) y la interacción tratamiento x especie ($F=10.94$, $p < 0.01$). Las semillas de *S. pennellii* tuvieron un $T_{\min}$ similar con y sin mucílago. De manera contraria, las semillas de *S. chamaedryoides* y *S. reflexa* mostraron $T_{\min}$ más cortos sin mucílago que con él (Fig. 2). De las tres especies *S. reflexa* es la que muestra un $T_{\min}$ más bajo en el tratamiento de semillas sin mucílago, no hay diferencias en el $T_{\min}$ entre *S. chamaedryoides* y *S. pennellii* en las semillas sin mucílago, siendo este de dos días.

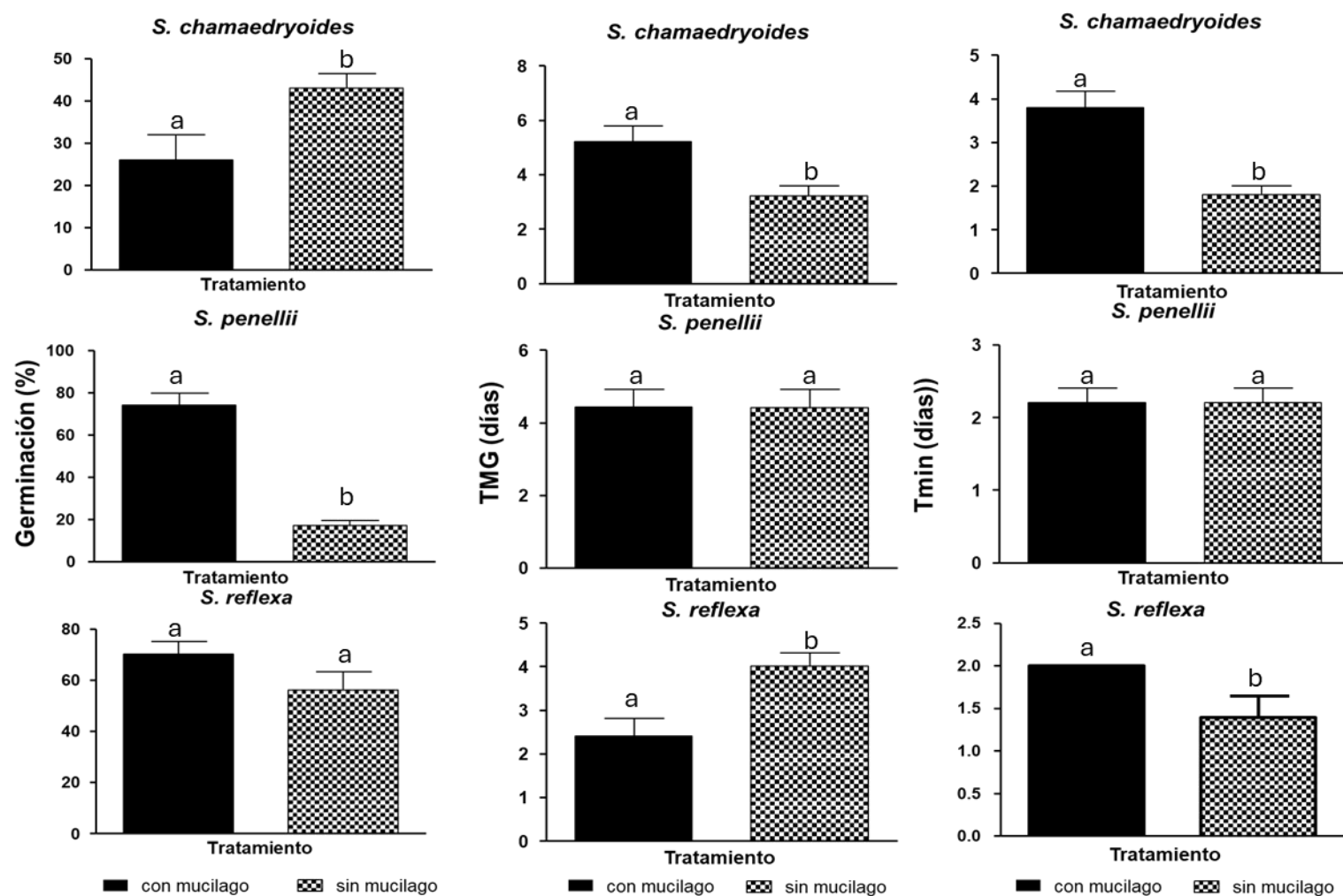


Figura 2. Germinación de semillas (%), Tiempo medio de germinación (TMG) y Tiempo mínimo de germinación ($T_{\min}$) en tres especies de *Salvia* con y sin mucílago. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.5$) (post hoc Tukey test)

Experimento 2. Prueba de latencia física

Desde esta sección se hará referencia a las núculas como semillas para un mejor entendimiento.

Germinación de semillas (%) o germinabilidad

La germinabilidad se vio afectada por el tratamiento ($F = 4.54$, $p = 0.01$) y por la interacción especie x tratamiento ($F = 6.29$, $p < 0.01$), pero no por el factor especie ($F = 6.295$, $p = 0.19$). Las semillas control de las tres especies de *Salvia* mostraron una alta germinación ($\geq 69\%$), lo que indica que no existe latencia (Tabla 3). Se encontró una mayor germinación ($\geq 90\%$) en las semillas del tratamiento control para *S. pennellii* y *S. reflexa* que para *S. chamaedryoides*. La última especie tuvo una menor germinación (%) en las semillas control que en las semillas raspadas y cortadas.

Tiempo medio de germinación (TMG)

El TMG difirió entre especies ($F = 4.41$, $p = 0.019$), tratamientos ($F = 141.86$, $p < 0.01$) y la interacción especie x tratamiento ($F = 15.92$, $p = 0.0016$). El TMG fue similar entre tratamientos para *S. reflexa*, pero fue menor en las semillas control que en las rayadas para *S. pennellii*, así como menor en las semillas control que en las tratadas para *S. chamaedryoides* (Tabla 3). Entre especies, *S. pennellii* tuvo la MGT más corta en las semillas del tratamiento control.

Tiempo mínimo de germinación ($T_{\min}$)

No se observaron diferencias entre especies ($F = 0.98$, $p = 0.38$), tratamientos ($F = 0.96$, $p = 0.39$) ni en la interacción tratamiento x especie ($F = 0.96$, $p = 0.43$), germinando todas las especies al segundo día (Tabla 3).

Experimento 3. Producción de mucílago

Se observó una reacción de mucílago (mixocarpia) en las semillas humedecidas de las especies estudiadas. Las tres especies tuvieron una fuerte reacción de mixocarpia con un halo de 0.9 um para *S. pennellii*, 0.8 um para *S. reflexa* y 0.5 um para *S. chamaedryodes* (Tabla 2). El mucílago de *S. pennellii* y *S. chamaedryodes* es cristalino, lo que crea una formación en forma de estrella cuando se seca; El mucílago de *S. reflexa* tiene un color blanco lechoso el cual forma "hilos" de mucílago. La tasa de producción de mucílago fue diferente para las tres especies; *S. pennellii* tuvo la reacción más lenta (3 horas), seguida de *S. reflexa* con 1 hora y media y *S. chamaedryodes* con 1 hora (Tabla 2).

Experimento 4. Función del mucílago

Germinación de semillas (%) o germinabilidad

La respuesta en el proceso de germinación fue diferente dependiendo de la especie ($F = 12.69$, $p < 0.01$), tratamiento ($F = 10.80$, $p < 0.01$) e interacción especie x tratamiento ($F = 21.36$, $p < 0.01$, Fig. 2). En el caso de *S. pennellii* se encontró disminución de la germinación (%) en semillas sin mucílago. Por el contrario, las semillas de *S. chamaedryodes* tuvieron mayor germinación sin mucílago que con él. Para *S. reflexa* no se encontraron diferencias significativas en la germinabilidad entre tratamientos. De las tres especies *S. reflexa* fue la que tuvo una mayor germinación en semillas sin mucílago germinando el 60% seguido *S. chamaedryodes* con el 40%, siendo *S. pennellii* la especie con menor germinación en semillas sin mucílago (20%).

Tiempo medio de germinación (TMG)

El TMG fue afectado por la especie ($F = 5.56$, $p = 0.01$) y la interacción especie x tratamiento ($F = 8.19$, $p < 0.01$, Fig. 2), pero no por el tratamiento ($F = 0.37$, $p = 0.54$). Las semillas de *S. chamaedryodes* mostraron un TMG más corto en semillas sin mucílago, fue de las tres especies la que logro una germinación más rápida en semillas sin mucílago (3 días) siendo incluso más rápida que su control (4 días) (Fig. 2). Las semillas de *S. reflexa* presentaron un TMG más corto en semillas con

mucílago. (2 días) que sin mucílago (4 días), mostrando influencia en la velocidad de germinación (Fig. 2). Para *S. pennellii* no se observaron diferencias en el TMG entre semillas con y sin mucílago y de las tres especies es la que tiene un TMG más lento (Fig. 2).

Tiempo mínimo de germinación ($T_{\min}$)

Las semillas de las tres especies comenzaron a germinar en pocos días, el $T_{\min}$ difirió por especie ($F = 16.94$, $p < 0.01$), por tratamientos ($F = 10.71$, $p < 0.01$) y la interacción tratamiento x especie ($F=10.94$, $p < 0.01$). Las semillas de *S. pennellii* tuvieron un $T_{\min}$ similar con y sin mucílago. De manera contraria, las semillas de *S. chamaedryoides* y *S. reflexa* mostraron $T_{\min}$ más cortos sin mucílago que con él (Fig. 2). De las tres especies *S. reflexa* es la que muestra un $T_{\min}$ más bajo en el tratamiento de semillas sin mucílago, no hay diferencias en el $T_{\min}$ entre *S. chamaedryoides* y *S. pennellii* en las semillas sin mucílago, siendo este de dos días.

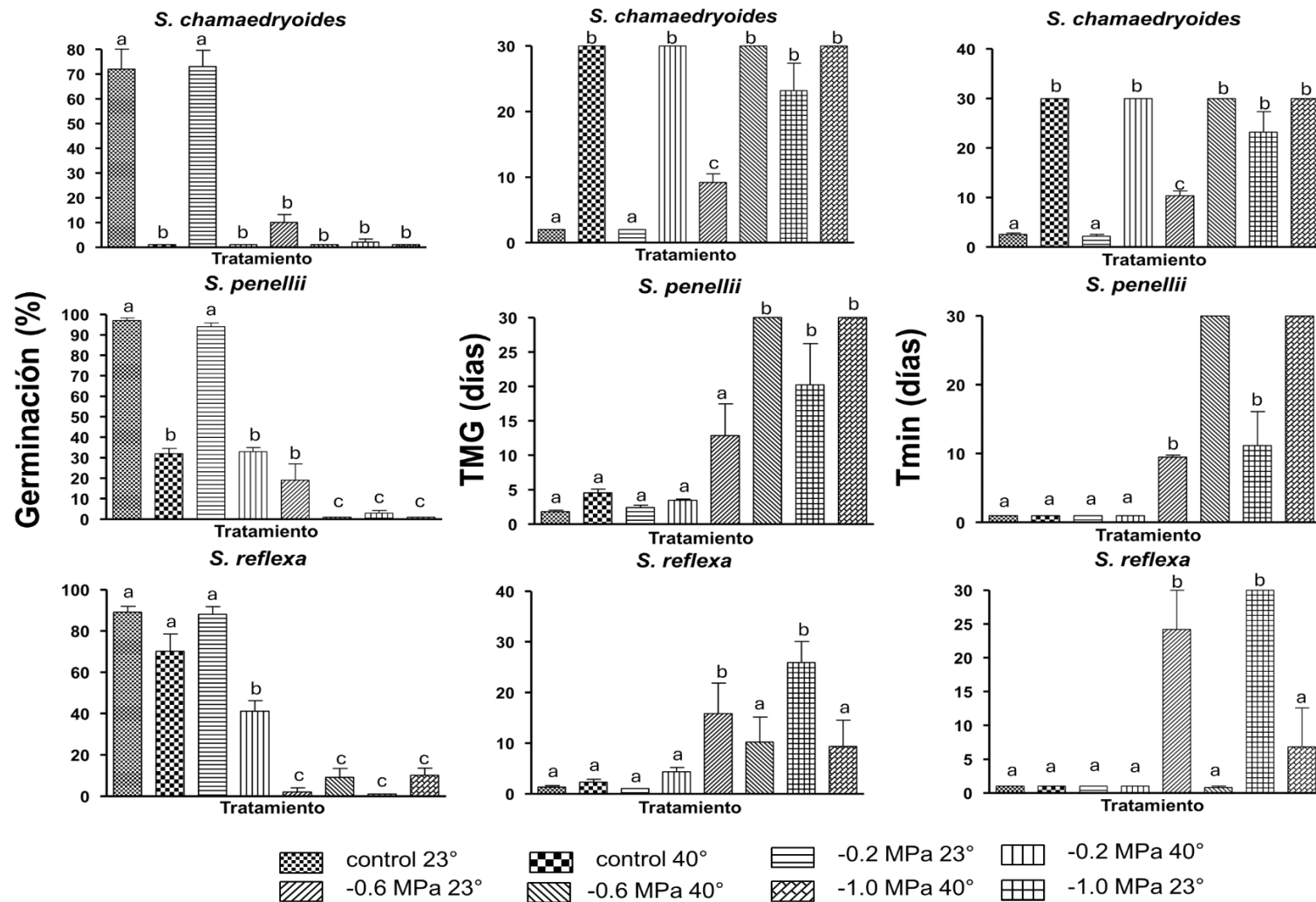


Figura 3. Efecto de tratamientos combinados de potencial hídrico y temperatura sobre la germinación de semillas (%), tiempo medio de germinación (MGT) y T_{min} en tres especies de *Salvia*. Letras diferentes significan diferencias significativas ($p < 0.05$)

Experimento 5b. Recuperación de la germinación después de estrés combinado por sequía y alta temperatura.

Los tratamientos de 0 MPa y -0.2 MPa no fueron considerados en el análisis de recuperación de semillas debido al alto porcentaje de germinación de semillas obtenido en estos tratamientos de potencial hídrico. La recuperación de semillas fue afectada por la temperatura ($F = 7.08$, $p = 0.001$) y la especie ($F = 5.61$, $p = 0.006$), pero no por el potencial hídrico ($F = 1.03$, $p = 0.300$). Tampoco fue afectada por la interacción potencial hídrico x temperatura ($F = 0.38$, $p = 0.53$), potencial hídrico x especie ($F = 1.54$, $p = 0.230$), temperatura x especie ($F = 0.5$, $p = 0.940$) y potencial hídrico x temperatura x especie ($F = 0.07$, $p = 0.090$). Las semillas de *S. pennellii* tuvieron la mayor recuperación, especialmente después de la sequía severa (-1.0 MPa) alcanzando el 80% de germinación a 23 °C y 36% a 40 °C. *S. reflexa* también tuvo una mejor recuperación después del tratamiento de sequía severa (-1.0 MPa) (55 % a 23 °C y 13 % a 40 °C) que con sequía moderada (-0.6 MPa) (27 % a 23 °C y 8 % a 40 °C). *S. chamaedryoides* tuvo la menor recuperación de semillas, especialmente a 40 °C, donde solo germinó el 9% de las semillas inhibidas (Tabla 4).

Tabla 4. Recuperación de la germinación después de tratamientos combinados de potencial hídrico y temperatura en tres especies de Salvia. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.5$) (post hoc Tukey test)

Recuperación en la germinación en las tres especies de Salvia			
Tratamiento	recuperación (%)		
	<i>S. pennellii</i>	<i>S. reflexa</i>	<i>S. chamaedryoides</i>
0 MPa-24 °C	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
-0.2 MPa-24°C	0 ± 0 ^a	0.56 ± 9.3a	1.5 ± 1a
-0.6 MPa-24°C	54 ± 16b	27.8 ± 5.3d	20.96 ± 2.7d
-0.1 MPa-24°C	80 ± 5.3c	55 ± 17.9b	30.15 ± 9.1d
0 MPa- 40°C	0 ± 0a	0 ± 0a	5 ± 1.5a
-0.2 MPa-40°C	1 ± 0.6a	0.56 ± 0.5a	7 ± 3.7a
-0.6 MPa-40°C	34 ± 19.9c	8.05 ± 6.8a	1 ± 1a
-1.0 MPa-40°C	36 ± 18.6c	13 ± 13e	9 ± 6.7a

1.7 DISCUSIÓN

La hipótesis sobre que hay estructuras involucradas en el proceso de germinación fue apoyada. Se encontraron estructuras importantes en el proceso de imbibición de las tres especies, como los traqueoides, que son células que morfológicamente son similares a las traqueidas y que exhiben diversas ornamentaciones en su pared secundaria (Burelo-Ramos et al., 2012), además de otras estructuras como el micrópilo, el cual es una abertura u orificio a modo de conducto para terminar de hidratar al embrión. Los traqueoides suelen ser extensibles después de mojarlos con agua y funcionan como mecanismos de acoplamiento (Barthlott, 1981). Además, Burelo-Ramos et al. (2002) sugirieron que los traqueoides tienen funciones como canalizar el flujo de agua, brindar resistencia contra la presión negativa, dar soporte estructural y proporcionar flexibilidad a las células. Hasta ahora no se habían realizado estudios para determinar el papel de los traqueoides en el paso del agua en las semillas de *Salvia*. En las especies de *Salvia* estudiadas, los traqueoides confieren una ruta de agua más eficiente para esperar condiciones favorables para la germinación de semillas.

En la cicatriz del funículo de las semillas de las tres especies de *Salvia* se encontraron cristales de oxalato de calcio redondeados y cúbicos cubiertos de mucílago. Este tipo de cristales ha sido reportado en otras especies de la familia Lamiaceae en el pericarpio y mesocarpio, y se ha sugerido que su función es proteger de larvas de insectos además de prevenir la germinación prematura (Ryding, 1992). Estos cristales cubiertos de mucílago se reportan aquí por primera vez para semillas de *Salvia*.

En las tres especies de *Salvia* se observó que las macroescleridas funcionan como una pared de control de imbibición de agua y que no provocan latencia. Se encontró una alta germinabilidad en semillas de *S. pennellii* y *S. reflexa* y una germinabilidad media en *S. chamaedryoides* en semillas sin tratamiento, germinando las tres especies por encima del 68%. Por lo tanto, no se consideran con latencia. No hay informes previos sobre la latencia de las semillas de *S. pennellii* y *S. chamaedryoides*, a diferencia de *S. reflexa*, en el que un lote de semillas de

Australia mostró semillas latentes, lo que sugiere diferencias en la adaptación al medio ambiente entre especies e incluso entre poblaciones (Weerakoon y Lovett, 1986a).

Se observó la presencia de mucílago en las tres especies, el cual influyó en el proceso de germinación. La producción de mucílago es un rasgo que se ha encontrado previamente en varias especies de *Salvia* (Hedge, 1970; Büyükkartal et al., 2011). Las tres especies de *Salvia* estudiadas presentaron una alta reacción de mixocarpía pero con características diferentes. Para las plantas perennes *S. pennellii* y *S. chamaedryoides* el mucílago es cristalino y para la planta anual *S. reflexa* el mucílago tiene un color blanco lechoso. Altas reacciones de mixocarpia han sido reportadas en especies de la misma familia, como *Zhumeria majdae* (Ryding, 1995), pero en *Salvia* spp. hay pocos estudios sobre esta reacción. En el estudio realizado por Ifrim (2012), *S. viridis* mostró una reacción rápida (2 minutos) casi diez veces más rápida que las especies en este estudio. Se ha sugerido que la velocidad y producción de mucílago puede estar relacionada con la diversidad del hábitat, existiendo una mayor producción de mucílago en especies de zonas áridas o semiáridas (Yang et al., 2012a). Además, una rápida reacción genera una rápida adherencia al ubicar las semillas debajo de la planta madre, confiriendo condiciones más favorables para la germinación (Yang et al., 2012a). Las semillas de las tres especies de *Salvia* estudiadas presentan células mucilaginosas en toda su epidermis, a diferencia de semillas de especies de la tribu Ocimeae, que presentan una combinación de células mucilaginosas y no mucilaginosas en la epidermis (Ryding, 1995).

La segunda parte de la hipótesis, que las semillas con mucílago germinarán más rápido que las que no tienen mucílago, se confirmó en parte porque el papel del mucílago fue diferente para cada especie. Para las semillas de *S. pennellii*, la eliminación del mucílago disminuyó la retención de agua y redujo el porcentaje de germinación de las semillas, indicando que el mucílago puede ayudar al establecimiento de esta especie. Para las semillas de *S. chamaedryoides*, se encontró el efecto contrario, por lo que es probable que el mucílago sea una barrera

que inhibe la germinación en ausencia de condiciones óptimas. Para semillas de la planta anual *S. reflexa* no se observaron diferencias con y sin mucílago, por lo que su función principal no sería la germinación, pero podría ser de anclaje al suelo. De las tres especies, *S. reflexa* es la que presenta un mucílago más espeso formado además hilos de celulosa y en todas las especies con estos rasgos suele tener el rol central de fortalecer el anclaje de las semillas (Yang et al., 2012). Del mismo modo, Geneve et al. (2017) no observaron diferencias ni en el porcentaje ni en la velocidad de germinación de semillas de *Salvia hispanica* con o sin mucílago. En esta investigación, a diferencia de trabajos anteriores, se eliminó el pericarpio de la núcula en su totalidad ya que se observó que el tratamiento solamente con ácido no fue suficiente para detener la producción de mucílago en las células epidérmicas, que pudiera ser una de las razones por las que se observaron diferencias en estas especies.

La hipótesis de que las semillas no son tolerantes al aumento de la temperatura y la sequía también se confirmó, dado que la germinabilidad, el TMG y el T_{min} de las tres especies se vieron afectados por el estrés por alta temperatura y sequía, aunque hubo diferencias entre las especies de *Salvia*. Se ha observado que cuando la germinación disminuye con el aumento de la temperatura, los embriones pueden verse afectados por ser la parte más sensible de las semillas, induciendo disminución de la actividad enzimática o reducción de la síntesis de proteínas, alteración del metabolismo energético e inhibición (Riley, 1981; Corbineau et al., 2002; Essemine et al., 2010). Sin embargo, se deben realizar más estudios para comprender mejor la inhibición de la germinación. Además, también se ha encontrado que algunas especies de *Salvia* disminuyen la germinación de semillas en condiciones de sequía y otras especies son tolerantes a la sequía (Abdollahi et al., 2012). Las tres especies de estudio tampoco toleraron la sequía severa y *S. chamaedryoides* fue la especie menos tolerante a las altas temperaturas.

Finalmente, la hipótesis de que las semillas no germinadas después de tratamientos combinados de sequía y aumento de la temperatura recuperarán la capacidad de germinación en condiciones óptimas solo fue parcialmente

respaldada. De las tres especies, *S. pennellii* mostró mayor recuperación de semillas que *S. reflexa* y esta especie a su vez, tiene mayor recuperación de semillas que *S. chamaedryoides*. En semillas de *Henophyton deserti* encontraron al igual que en estas especies de Slavia que la recuperación es menor cuando se combina estrés hídrico y térmico y en presencia de estrés hídrico a una temperatura optima las semillas tienen una buena recuperación (Gorai et al., 2014). Así, la especie de *S. chamaedryoides* es la más vulnerables dada su baja viabilidad, germinación y recuperación y la más tolerante de las tres especies es *S. reflexa* debido a su alta viabilidad, germinación y media recuperación.

1.8 CONCLUSIONES

El endocarpio de las núculas de las tres especies cuenta con traqueoides que les confieren una ruta más eficiente de agua al embrión, además de que tienen macroesclereidas en el mesocarpio que no causan latencia en las semillas, un resultado inesperado, así como mucílago con una alta reacción de mixocarpia. El efecto del mucílago en la germinación de las semillas fue específico para cada especie, la consistencia y apariencia son diferentes por lo que quizás su composición es lo que designa su función. Además, las respuestas de germinación también fueron específicas de la especie, siendo *S. chamaedryoides* la menos tolerante y con menor recuperación, *S. pennellii* con baja tolerancia, pero con una buena recuperación y *S. reflexa* la más tolerante de las tres especies. Aunque las especies estudiadas pueden compartir distribución y hábitat similares, no existe un patrón de respuesta de germinación.

1.9 REFERENCIAS

- Abdollahi, J., Tafaraji, S. H., Ebrahimi, M., Ramshini, H. A., Tafti, A. R. D., Mortazavian, M., Eftekhari, M., Dezfoulan, A. H., Bagheri, A. (2012). Effect of drought stress on germination and seedling growth of *Salvia* species. *African Journal of Agricultural Research*, 7(43), 5719-5725.
- Ablanque, M., Vicente, P., Benito, P., Ruiz-Fernández, J. (2015). Use of flowering period if species of sustainable gardening: monitoring and evaluation. *Diversification in the garden projects. 19th International Congress on Project management and Engineering, Granada*, 1269-1282.
- Barrios, D., Flores, J., Sánchez, J. A., González-Torres, L. R. (2021). Combined effect of temperature and water stress on seed germination of four *Leptocereus* spp. (Cactaceae) from Cuban dry forests. *Plant Species Biology*, 36(3), 512-522.
- Barthlott, W. (1981). Epidermal and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects. *Nordic Journal of Botany*, 1(3), 345-355.
- Baskin, J.M., Baskin, C.C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14, 1-16.
- Baskin, C.C., Baskin, J.M. (2014). Seeds, Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination. *Elsevier Inc.*
- Bisio, A., De Mieri, M., Milella, L., Schito, A.M., Parricchi, A., Russo, D., Alfei, S., Lapillo, M., Tuccinardi, T., Hamburger, M., De Tommasi, N. (2017). Antibacterial and hypoglycemic diterpenoids from *Salvia chamaedryoides*. *Journal of Natural Products*, 80, 503-514.
- Blanco-Salas, J., Ruiz-Téllez, T., Vázquez-Pardo, F. M. (2009). Germination trials in mediterranean sages. *Folia Botanica Extremadurensis*, 4, 33-43.
- Burelo-Ramos, M., Lorea Hernandez, F. G., Angeles, G. (2012). Variation in the tracheoids of seeds from the subtribe Pithecocteniinae (Bignoniaceae: Bignoniaceae) and their contribution to the systematics of the group. Sociedad Botanica de Mexico (Mexico). *Botanical Sciences*, 90(1), 13-20.
- Büyükkartal, H. N., Kahraman, A., Çölgeçen, H. A. T. Y. C. E., Doğan, M., Karabacak, E. R. S. Y. N. (2011). Mericarp micromorphology and anatomy of *Salvia hedgeana* Dönmez, *S. huberi* Hedge and *S. rosifolia* Sm. (section *Salvia* Hedge, Lamiaceae). *Acta Botanica Croatica*, 70(1), 65-80.
- Celep, F., Kahraman, A., Atalay, Z., Doğan, M. (2014). Morphology, anatomy, palynology, mericarp and trichome micromorphology of the rediscovered Turkish endemic *Salvia quezelii* (Lamiaceae) and their taxonomic implications. *Plant Systematics and Evolution*, 300(9), 1945-1958.

- Chan, F.J., Lambers, K.H.R. (1970). Influence of gibberellic acid on the germination of seeds of several native California plant species. *Plant Propagator*, 16, 9-12.
- Coplen, S. (2021). Cold Stratification of *Salvia azurea* var. *grandiflora* Benth. (Lamiaceae) seeds to break dormancy. *Oklahoma Native Plant Record*, 21, 53-61.
- Czarnecka, J. (2004). Seed longevity and recruitment of seedlings in xerothermic grassland. *Polish Journal of Ecology*, 52, 505-521.
- Corbineau, F., Gay-Mathieu, C., Vinel, D., Come, D. (2002). Decrease in sunflower (*Helianthus annuus*) seed viability caused by high temperature as related to energy metabolism, membrane damage and lipid composition. *Physiologia Plantarum*, 116(4), 489–496.
- de la Vega, B., Alizaga, R. (1987). Efecto del ácido giberelico y del preenfriamiento sobre la ruptura del reposo en semillas de *Salvia* (*Salvia splendens*). *Agronomía Costarricense*, 11(1), 89-95.
- Drew, B. T. (2020). Evolution, pollination biology, and species richness of *Salvia* (Lamiaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 181(8), 767-769.
- Duletiae-Lauseviae, S., Marin, P.D. (1999). Pericarp structure and mixocarpy in selected genera of *Nepotoideae* (Lamiaceae). *Nordic Journal of Botany*, 19, 435-446.
- Dürr, C., Dickie, J.B., Yang, X.Y., Pritchard, H.W. (2015). Ranges of critical temperature and water potential values for the germination of species worldwide: contribution to a seed trait database. *Agricultural and Forest Meteorology*, 200, 222–232.
- Essemine, J., Ammar, S., Bouzid, S. (2010). Impact of heat stress on germination and growth in higher plants: physiological, biochemical and molecular repercussions and mechanisms of defense. *Journal of Biological Sciences*, 10(6), 565-572.
- Font Quer, P. (2000). Diccionario de Botánica. *Ediciones Península*.
- Gama-Arachchige, N.S., Baskin, J.M., Geneve, R.L., Baskin, C.C. (2013). Identification and characterization of ten new water gaps in seed and fruits with physical dormancy and classification of water-gap complexes. *Annals of Botany*, 112, 69-84.
- García-Albarado, J. C., Gómez-Merino, F. C., Trejo-Téllez, L. I., Sandoval Pérez, I. A., Morales Ramos, V. (2013). Propagación de especies herbáceas silvestres con potencial para paisajismo. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4(SPE5), 1043-1047.
- Geneve, R.L., Hildebrand, D.F., Phillips, T.D., AL-Amery, M., Kester, S.T. (2017). Stress influences seed germination in mucilage-producing chia. *Crop Science Society of America*, 57, 2160-2169.

- González-Gallegos, J.G., Bedolla-Gracia, B.Y., Cornejo-Tenorio, G., Fernandez-Alonso, J.L., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M.R., Harley, R.M., Klitgaard, B., Martínez-Gordillo, M.J., Wood, J.R.I., Zamudio, S., Zona, S., Xifreda, C.C. (2020). Richness and distribution of *Salvia* subg. *Calosphace* (Lamiaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 181(8), 831-856.
- Gorai, M., Aloui, W.E., Yang, X. (2014). Toward understanding the ecological role of mucilage in seed germination of a desert shrub *Henophyton deserti*: interactive effects of temperature, salinity and osmotic stress. *Plant Soil*, 374, 727-738.
- Gorai, M., Gasmi, H., Neffato, M. (2011). Factors influencing seed germination of medicinal plant *Salvia aegyptiaca* L. (Lamiaceae). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18, 255-260.
- Goswami, S., Kanyal, J., Prakash, O., Kumar, R., Rawat, D.S., Srivastava, R.M., Pant, A.K. (2019). Chemical composition, antioxidant, antifungal and antifeedant activity of the *Salvia reflexa* Hornem. *Asian Journal of Applied Sciences*, 12(4), 185-191
- Güzel, S., Kahraman, A., Ulger, M., Ozay, Y., Bozgeyik, I., Sarikaya, O. (2019). Morphology, myxocarpy, mineral content and in vitro antimicrobial and antiproliferative activities of mericarps of the vulnerable Turkish endemic *Salvia pilifera*. *Journal of Research in Pharmacy*, 23(4), 729-739.
- Hedge, I. C. (1970). Observations on the mucilage of *Salvia* fruits. Notes from the *Royal Botanic Garden Edinburgh*, 30, 79–95.
- Ifrim, C. (2012). Morphological peculiarities of the nutlets of some *Salvia* species (Lamiaceae). *Gradina Botanica. Contributii Botanice*, 47, 73-80.
- IPCC. (2021). Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Masson-Delmotte, V., Zhai, P., Pirani, A., Connors, S.L., Péan, C., Berger, S., Caud, N., Chen, Y., Goldfarb, L., Gomis, M.I., Huang, M., Leitzell, K., Lonnoy, E., Matthews, J.B.R., Maycock, T.K., Waterfield, T., Yelekçi, O., Yu, R., Zhou B. (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Javaid, M.M., Florentine, S., Ali, H.H., Weller, S. (2018). Effect of environmental factor on the germination and emerge of *Salvia verbenaca* L. cultivars (verbenaca and vernalis): An invasive species in semi-arid and arid rangeland regions. *PLoS One*, 13(3), e0194319.
- Jurado, E., Aguirre, O., Flores, J., Navar, J., Villalon, H., Wester, D. (2000). Germination in Tamaulipan thornscrub of north-eastern Mexico. *Journal of Arid Environments*, 46, 413-424.
- Jurado, E., Flores J. (2005) Is seed dormancy under environmental control or bound to plant traits? *Journal of Vegetation Science*, 16, 559-564.

- Kahraman, A., Büyükkartal, H. N., Doğan, M. (2018). Pericarp Ultrastructure of *Salvia* Section Hemisphace (Mentheae; Nepetoideae; Lamiaceae). *Commagene Journal of Biology*, 2(1), 1-7.
- Keeley, J.E. (1986). Seed germination patterns of *Salvia mellifera* in fire-prone environments. *Oecologia*, 71, 1-5.
- Keeley, J. E. (1987). Role of fire in seed germination of woody taxa in California chaparral. *Ecology*, 68(2), 434-443.
- Kegode, G.O., Nazre, G., Christoffers, M.J. (2010). Germination ecology of biennial wormwood (*Artemisia biennis*) and lanceleaf sage (*Salvia reflexa*) seeds. *Weed Science*, 58, 61-66.
- Liu, K., Baskin, J.M., Baskin, C.C., Bu, H., Liu, M., Liu, W., et al. (2011). Effect of storage conditions on germination of seeds of 489 species from high elevation grasslands of the eastern Tibet Plateau and some implications for climate change. *American Journal of Botany*, 98, 12-19.
- Lozano-Isla, F., Benites-Alfaro, O. E., Pompelli, M. F. (2019). GerminaR: An R package for germination analysis with the interactive web application "GerminaQuant for R". *Ecological*, 34(2), 339-346.
- Luna, B., Moreno, J. M., Cruz, A., Fernández-González, F. (2007). Heat-shock and seed germination of a group of Mediterranean plant species growing in a burned area: an approach based on plant functional types. *Environmental and Experimental Botany*, 60(3), 324-333.
- Martínez-Gordillo, M., Fragoso-Martínez, I., Salas-Morales, S. H. (2016). *Salvia robertoana* (Lamiaceae), a new species from Oaxaca, Mexico. *Phytotaxa*, 269(4), 271-278.
- Martínez-Gordillo, M., Bedolla-García, B., Cornejo-Tenorio, G., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M.R., González-Gallegos, J.G., Lara-Cabrera, S., Zamudio, S. (2017). Lamiaceae de México. *Botanical Sciences*, 95(4), 780-806.
- Mascot-Gómez, E., Flores, J., López-Lozano, N. E., Yáñez-Espinosa, L. (2020). Seed germination of Southern Chihuahuan desert cacti: Effect of mucilage, light and phytohormones. *Flora*, 263, 151528.
- Menezes, N.L., Franzin, S.M., Roversi, T., Nunes, E.P. (2004). Germinacao de sementes de *Salvia splendens* Sellow em diferentes temperaturas e qualidades de luz. *Revista Brasileira de Sementes*, 26, 32-37.
- Michel, B.E. (1983). Evaluation of the water potentials of solutions of polyethylene glycol 8000 both in the absence and presence of other solutes. *Plant Physiology*, 72, 66-70.
- Musarurwa, H.T., Van Staden, J., Makunga, N.P. (2010). In vitro seed germination and cultivation of the aromatic medicinal *Salvia stenophylla* (Burch. ex Benth.) provides an alternative source of α -bisabolol. *Plant Growth Reg*, 61, 287-295.

- Nikolaeva, M.G., Rasumova, M.V., Gladkova, V.N. (1985). In: Danilova, M.F. (Ed.), Reference Book on Dormant Seed Germination. "Nauka" Publishers, Leningrad Branch, Leningrad.
- Pita, J. M. (1989). Requerimientos de luz para la germinación de algunas especies macaronésicas. *Botánica Macaronésica*, 17, 37-46.
- Ranal, M. A., Santana, D. G. D., Ferreira, W. R., Mendes-Rodrigues, C. (2009). Calculating germination measurements and organizing spreadsheets. *Brazilian Journal of Botany*, 32, 849–855.
- Riley, G.J.P. (1981). Effects of high temperature on the germination of Maize (*Zea mays* L.). *Planta*, 151, 68-74.
- Robles-Díaz, E., Flores, J., Yañez-Espinosa, L. (2016). Paths of water entry and structures involved in the breaking of seed dormancy of *Lupinus*. *Journal of Plant Physiology*, 192, 75-80.
- Ryding, O. (1992). Pericarp structure and phylogeny within Lamiaceae subfamilia Nepetoideae tribe Ocimeae. *Nordic Journal of Botany*, 12, 273-298.
- Ryding, O.m(1995). Pericarp structure and phylogeny of the Lamiaceae-Verbenaceae. *Plant Systematics and Evolution*, 198, 101-141.
- Salgado-Cruz, M. P., Calderón-Domínguez, G., Chanona-Pérez, J., Farrera-Rebollo, R. R., Méndez-Méndez, J. V., Díaz-Ramírez, M. (2013). Chia (*Salvia hispanica* L.) seed mucilage release characterization. A microstructural and image analysis study. *Industrial Crops and Products*, 51, 453-462.
- Sen, D.N., Chatterji, U.N. (1968). Ecology of desert plants and observations on their seedlings. I. Germination behavior of seeds. *Bulletin of the Botanical Society of Bengal*, 22, 251-258.
- Stefanello, R., Neves, L. A. S., Abbad, M. A. B., Viana, B. B. (2015). Germinação e vigor de sementes de chia (*Salvia hispanica* L.-Lamiaceae) sob diferentes temperaturas e condições de luz. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 17, 1182-1186.
- Teketay, D. (1998). The role of light and temperature in the germination of twenty herbaceous species from the highlands of Ethiopia. *Flora*, 193(4), 411-423.
- Thanos, C.A., Doussi, M.A. (1995). Ecophysiology of seed germination in endemic labiates of Crete. *Israel Journal of Plant Science*, 43, 227-237.
- Tipton, J.L. (1992). Requirements for seed germination of Mexican redbud, evergreen sumac, and mealy sage. *HortScience*, 27, 313-316.
- Turner, B. L. (2013). Taxonomic overview of the Mexican species of *Salvia* sect. Flocculosae (Lamiaceae). *Phyton*, 36, 1-11.
- Weerakoon, W.L., Lovett, J.V. (1986a). Studies of *Salvia reflexa* Hornem. III. Factors controlling germination. *Weed Research*, 26, 269-276.
- Weerakoon, W. L., Lovett, J. V. (1986b). Studies of *Salvia reflexa* Hornem. V. Competition from crop and pasture species. *Weed Research*, 26(4), 283-290.

- Yang, X., Baskin, C.C., Baskin, J.M., Liu, G., Huang, Z. (2012a). Seed mucilage improves seedling emerge of a sand desert shrub. *PLoS ONE*, 74(4), e34597.
- Yang, X., Baskin, J.M., Baskin, CC., Huang, Z. (2012b). More than just a coating; Ecological importance, taxonomic occurrence and phylogenetic relationship of seed coat mucilage. *Perspective in Planta Ecology, Evolution and Systematic*, 14, 434-442.
- Yang, X., Dong, M., Huang, Z.O. (2010). Role of mucilage in the germination of *Artemisia sphaerocephala* (Asteraceae) achenes exposed to osmotic stress and salinity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 131-135.
- Zare, A., Khodaeaei, A., Khezrepor, Z. (2022). Evaluation of germination in chia as a medicinal-oil seed plant under environmental stresses. *Journal of Crops Improvement*, 24(1), 31-40.
- Zuloaga-Aguilar, S., Briones, O., Orozco-Segovia, A. (2011). Seed germination of montane forest species in response to ash, smoke and heat shock in Mexico. *Acta Oecologica*, 37(3), 256-262.

2. CAPITULO II. Fitoquímica de dos especies mexicanas de *Salvia*: *Salvia pennellii* y *Salvia reflexa*.

2.1 INTRODUCCION

Las plantas terrestres cuentan con tres rutas metabólicas conocidas como C3 (producto inicial, molécula de tres átomos carbonos), C4 (producto inicial, molécula de cuatro átomos de carbonos) y CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas). Las plantas estudiadas en esta investigación presentan una ruta metabólica C4, esta ruta es una modificación bioquímica y morfológica de la ruta C3 donde reduce al mínimo la fotorrespiración separando el proceso de fijación inicial del CO₂ y el ciclo de Calvin en células diferentes, el proceso de carboxilación en el mesófilo y descarboxilación en la vaina (Ehleringer y Cerling, 2002).

Los compuestos que son producidos por las plantas están clasificados como metabolitos primarios (MP) y secundarios (MS). Los MP son esenciales para el funcionamiento y desarrollo de las plantas (carbohidratos, lípidos y proteínas) (Jan et al., 2021). En cambio, los MS que son derivados de los MP, realizan funciones que, si bien no son vitales para las plantas, son importantes porque pueden influir en su crecimiento, les otorgan color, sabor y olor, ayudan a la atracción de polinizadores, como también otorgan tolerancia a ambientes adversos (temperaturas altas, sequía, concentraciones elevadas de CO₂, salinidad entre otras) (Ashraf, 2018; Ramakrishna et al., 2011). Se han descrito aproximadamente 200 mil metabolitos secundarios en las plantas superiores la mayoría perteneces a tres grandes grupos: terpenoides, alcaloides y compuestos fenólicos (Yeshi et al., 2022; Kabera et al., 2014). Sin embargo, también se pueden encontrar betalainas, glucosinolatos, glucósidos cianogénicos, aminoácidos no proteicos, poliacetilenos y policétidos, entre otros (Gershenson y Mabry, 1983).

Los compuestos fenólicos se encuentran en casi todas las plantas y son uno de los grupos más abundantes de MS, aproximadamente se conocen 8,000 compuestos fenólicos. Se pueden producir por la ruta del ácido shikimico y/o del acetato-malonato (Ashraf et al., 2018; Kabera et al., 2014). Los compuestos fenólicos pueden contar con estructuras muy simples hasta estructuras muy

complejas como la lignina (Yeshe et al., 2022). Entre los compuestos fenólicos se incluye las arilpironas, stilipironas, estibenos, taninos, coumarinas, flavonoides, ligninas y liganos. Los flavonoides son los compuestos más abundantes de este grupo, siendo pigmentos parcialmente solubles en agua que se localizan en las vacuolas y están ampliamente presentes en las plantas, que a su vez se dividen en: flavonas, flavonoles, flavonones, isoflavonas, catequinas y antocianinas (Ashraf et al., 2018). Los flavonoides son los encargados de conferirles un color a las flores y con ello poder atraer polinizadores y frugívoros, promoviendo así la dispersión de las semillas, son atenuadores de rayos UV, evitando que estos sean menos dañinos para las plantas y pueden ayudar a ajustar el calor y frío extremo incrementando su concentración (Yeshe et al., 2022; Ashraf et al., 2018; Kabera et al., 2014).

Los alcaloides son un grupo de metabolitos secundarios que contienen en su estructura átomos de nitrógeno, derivados de la descarboxilación de aminoácidos de las plantas, se conocen más de 20,000 alcaloides y cerca de 600 son bioactivos. Se encuentran en el 20% de las plantas, particularmente en angiospermas y son considerados uno de los grupos principales encargados en la defensa de las plantas (Yeshe et al., 2022). A diferencia de otros grupos de MS, los alcaloides cuentan con una gran diversidad estructural por lo que no existe una clasificación uniforme de ella (Kabera et al., 2014). Sin embargo, una manera para clasificarlos es a partir de sus aminoácidos precursores y pueden ser de tipo tropano, pirrolidina y pirrolizidina (precursor: ornitina); bencilsoquinolina (precursor: tirosina); indol y quinolina (precursor: tipófano); y quinolizidina (precursor: lisina) (Yeshe et al., 2022). Por lo general, cada familia producirá un tipo de alcaloide, aunque pueden existir excepciones como las plantas de la familia Solanaceae. Se ha reportado actividad contra herbívoros (nomocrotalina), actividad antimicrobiana (mimosina), protección contra los rayos UV (vinblastina) y sequía (codeína) (Jan et al., 2021).

En México, se encuentran distribuidas cerca de 30,000 especies de plantas vasculares, de las cuales 23,314 son nativas y 11,578 endémicas. La familia Lamiaceae se posiciona como la octava familia más diversa del país, con 601 especies, y aproximadamente la mitad pertenecen al género *Salvia*, el cual cuenta

con un alto porcentaje de endemismo (Villaseñor, 2016; Martínez-Gordillo et al., 2013 y 2017). Las especies del género *Salvia* son una fuente rica de MS, especialmente monoterpenos, diterpenos, ácidos fenólicos y flavonoides; y desempeñan un papel fundamental en el desarrollo y en las interacciones biológicas de estas plantas (Bisio et al., 2019).

Los diterpenos constituyen uno de los grupos más diversos de los MS y en la familia Lamiaceae pueden llegar a presentar alrededor de 50 esqueletos y en especies de *Salvia* estos se pueden presentar, principalmente, con esqueleto de tipo abietano o *neo-clerodano*. Recientemente, de este género se han caracterizado nuevos diterpenoides que se presentan como mezclas epímericas y diastereoisómericas que cuentan con esqueleto de *neo-clerodano* (Toscano et al., 2020; Bautista et al., 2017). También se pueden encontrar di y triterpenoides con esqueletos carbonados inusuales, pero estos generalmente están restringidos a unas cuantas especies de *Salvia*, por lo que pueden servir de marcadores quimiotaxonómicos. Aun no se han realizado estudios sobre cuáles son las funciones ecológicas de estos MS, ni en qué condiciones estas pocas especies de *Salvia* producen compuestos con esqueletos carbonados inusuales. Algunos ejemplos son los amarisanos aislados de *Salvia amarissima* (Bautista et al., 2015), los hidrangenanos de *Salvia hydragea* (Farimani et al., 2012), los microfilanos aislados de *Salvia microphylla* (Bautista et al., 2013) y *Salvia hirsuta* (Toscano et al., 2020), entre otros.

Los flavonoides son los principales constituyentes de tipo fenólico en el género *Salvia*, su producción está altamente relacionada con los factores ambientales como la temperatura, la luz o la disponibilidad de agua (Tavakoli et al., 2022). Los flavonoides pueden servir también como marcadores quimio taxonómicos ya que hay una correlación entre el tipo de flavonoide presente en la planta y el hábitat donde la planta crece (Kharazian, 2014). Los MS pueden tener diferentes funciones en las especies de *Salvia*, por ejemplo, el canfeno y borneol pueden ayudar contra las infecciones por hongos e insectos; los ácidos carnosico,

romarinico y salvionico, y las tanshinonas I y IA pueden ayudar a la planta a tolerar la sequía por tener actividad antioxidante.

En México, *Salvia pennellii* Epling. es una planta herbácea perenne distribuida en el noreste del país, en los estados de Nuevo León, San Luis Potosí, Coahuila y Tamaulipas (Epling, 1939; Martinez-Gordillo et al., 2016). Esta especie se agrupa en la sección Pennellia-Farinaceae junto con *S. richarsonii*, *S. jaimenhintoniana* y *S. farinácea*. Hasta la fecha no tiene nombres comunes, usos tradicionales descritos o estudios sobre su fitoquímica. Otra especie originaria de México y Estados Unidos es *Salvia reflexa* Hornem., una planta herbácea anual que pertenece a la sección Glareosae que actualmente está distribuida en Australia, Nueva Zelanda, Afganistán, Pakistán, China y África del Sur y Argentina (Hussain et al., 2019; Shao et al., 2019). Es reportada como una especie de importancia en el gremio ganadero debido a la toxicidad asociada con altos niveles de nitrato y alta hepatotoxicidad en ganado (Gardner et al., 2021; Hussain et al., 2019; Nieto et al., 1996). El estudio sobre su fitoquímica tomo importancia, debido a un caso de intoxicación y muerte de ganado en Utah, Estados Unidos, causado por la contaminación del alimento con esta planta; ocasionando en los animales daño hepático y muerte, inducida por los compuestos salviarina, rhyacophylina, salviandulina D (**11**) y 8-hidroxisalviarina (**12**) (Fig. 1) (Gardner et al., 2021; Panter et al., 2021; Nieto et al., 1996). se seleccionaron estas dos especies para incrementar el conocimiento sobre los metabolitos secundarios que se expresan en especies de *Salvia* mexicanas, las poblaciones de ambas especies se encuentran ubicadas en el estado de San Luis Potosí, el realizar el aislamiento y caracterización de sus componentes, ampliara el conocimiento de la fitoquímica en especies de *Salvia* mexicanas de zonas áridas.

2.2 HIPÓTESIS

Las especies *S. reflexa* y *S. pennellii* contienen metabolitos especializados con potencial uso como marcadores quimiotaxonómicos, y que pueden estar involucrados en funciones ecológicas y muy probablemente el estudio de los extractos de ambas plantas permita el aislamiento y la elucidación estructural de entidades químicas novedosas.

2.3 OBJETIVO GENERAL

Aislar, purificar y caracterizar metabolitos secundarios presentes en extractos solubles en acetona de las especies *S. pennellii* y *S. reflexa*.

2.4 OBJETIVO ESPECÍFICO

Aislar y purificar compuestos presentes en los extractos de *S. pennellii* y *S. reflexa* mediante cromatografía en columna.

Determinar las estructuras de los metabolitos secundarios aislados de ambas especies mediante métodos espectroscópicos y espectométricos.

2.5 MATERIALES Y METODOS

2.5.1 Métodos de separación

El aislamiento de los metabolitos secundarios se realizó mediante cromatografía en columna (CC) de gel de sílice (Merck 60G), cromatografía en columna rápida del gel de sílice (Macherey-Nagel). El proceso de monitoreo de fracciones fue realizado mediante cromatografía de capa fina (CCF) de gel de sílice G/UV254 (Macherey-Nagel) con observación por exposición a la luz UV (254 nm) y un posterior revelado con sulfato cérico 2N y H₂SO₄.

2.5.2 Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns. Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro Perkin-Elmer 343. Los espectros de UV se registraron en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160U. Los espectros IR se obtuvieron en un espectrómetro Bruker Tensor 27. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RNM) se realizaron en un Bruker Avance III 400 MHz o en un Bruker Avance III HD 700 MHz. Los desplazamientos químicos fueron relativos a TMS y los valores de *J* se dan en Hz. Los análisis de difracción de rayos X fueron obtenidos con un difractómetro de κ -geometría, Bruker D8 Venture con una fuente de radiación de Mo K α λ = 0.71073 Å o una fuente de radiación de Cu (λ = 1.54178 Å). Los datos HR-DART-MS se adquirieron en un espectrómetro de masas Jeol AccuTOF JMS-T100LC y en un espectrómetro Waters Xevo G2 XS.

2.5.3 Material vegetal

Las hojas y flores de *S. pennellii* y *S. reflexa* fueron colectadas en Real de Catorce, San Luis Potosí, México en agosto de 2017 e identificadas por la Dra. Brenda Yudith Bedolla García. Un ejemplar de *S. pennellii* fue depositado (IEB-258981) en el Herbario del Centro Regional Bajío, Instituto de Ecología A.C.

2.5.4 Aislamiento de los metabolitos secundarios de *S. pennellii*

Las partes aéreas secas y molidas (500 g) fueron extraídas por maceración con acetona (4 L, 24 h x 3), para obtener un extracto (46.4 g). El extracto total de acetona

se sometió a partición con una mezcla MeOH/H₂O 4:1 (250 mL) y hexanos (3 x 250 mL). Se colectó la fase hidroalcohólica y se evaporó el metanol por destilación a presión reducida (~ca. un tercio de su volumen), se adicionó agua a la mezcla resultante (250 mL) y se extrajo con AcOEt (3 x 500 mL). La fase orgánica se separó y el AcOEt se recuperó por destilación a presión reducida para dar un residuo de 35.2 g. La fracción de AcOEt dejó un sólido insoluble en acetona, mismo que fue retirado por filtración, para obtener 1.27 g de arbutina (**5**).

La fracción de EtOAc se sometió a CC de gel de sílice (5.0 x 8.0 cm, frs. 125 mL) utilizando mezclas de hexanos-EtOAc en polaridad creciente. Las fracciones obtenidas de esta columna fueron analizadas por TLC y reunidas acorde a su similitud en 14 fracciones: fracción B (frs. 1-9, 0.16 g), fracción C (frs. 13-16, 0.50 g), Fracción D (frs. 17-20, 0.52 g), fracción E (frs. 21-25, 0.84 g), fracción G (frs. 34-37, 1.03 g), fracción H (frs. 38-45, 0.71 g), fracción I (frs. 46-47, 2.48 g) y fracción J (frs. 48-51, 1.17 g).

La fracción B (166.9 mg) se sometió a CC de gel de sílice (1.5 x 10 cm, frs. 15 mL) eluyendo con mezclas hexano-AcOEt 80:20 (frs. 1-10) y hexano-AcOEt 75:25 (frs. 11-18). De las fracciones 9-14 se aislaron 32.9 mg de hidroquinona (**4**).

La fracción C (0.54 g) se sometió a CC (1.8 x 9.5 cm, frs. 25 mL) eluyendo con una mezcla de hexano-acetona 75:25 (frs. 1-11) y hexano-acetona 70:30 (frs. 12-20). De las fracciones 7-10 se obtuvieron 80 mg de naringenina (**6**).

De la fracción D (0.5274 g) se sometió a CC de sílice (2.8 x 9.0 cm, frs. 25 mL) eluyendo con mezclas de cloroformo-AcOEt 97:3 (frs. 1-10), cloroformo- AcOEt 95:5 (frs. 11-17) y cloroformo- AcOEt 90:10 (frs. 18-25). De las fracciones 11-15 se aislaron 4.1 mg de naringenina (**6**).

La fracción E (0.841 g) se sometió a CC (2.6 x 8 cm, frs. 25 mL) y se eluyó de la siguiente manera: cloroformo-AcOEt 95:5 (frs. 1-11), cloroformo-AcOEt 90:10 (frs. 12-22), cloroformo-AcOEt 80:20 (frs. 23-30) y cloroformo-AcOEt 70:30 (frs. 31-40).

La fracción E-(31-36) (108.4 mg) se sometió a CC (2.2 x 7.5, frs. 25 mL) y se eluyó con mezclas de hexano-AcOEt 70:30 (frs. 1-8), hexano-AcOEt 60:40 (frs. 9-14), hexano-AcOEt 50:50 (frs. 15-19), y hexano-AcOEt 30:70 (frs. 20-27). De las fracciones 22-27 se obtuvieron 11.1 mg de la mezcla epimerica de wirikutina/15-*epi*-wirikutina (**1/2**).

De la fracción G (1.03 g) se sometió a CC de sílica gel (2.8 x 7.0 cm, frs. 25 mL) eluyendo de la siguiente manera: hexano-AcOEt 70:30 (frs. 1-7), hexano-AcOEt 60:40 (frs. 8-14) y hexano-AcOEt 50:50 (frs. 15-26). De las fracciones 22-25 se obtuvieron 9.2 mg de una mezcla compleja de tiliifolanos que condujo a la obtención de material cristalino de wixarikolida (**3**).

wirikutina/15-*epi*-wirikutina (**1/2**): polvo amorfo blanco, $[\alpha]_D^{25} + 10$ (c 0.14, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 213 (3.73); IR (ATR) $\nu_{\max}$ 1750 cm^{-1} ; datos de RMN de ^1H y ^{13}C (CDCl_3) (Tabla 5); HRESIMS m/z 389.12468 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{O}_8$, 389.12364).

Wixarikolide (**3**): polvo amorfo de color marrón rojizo; HRESIMS m/z 335.09122 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{O}_5$, 335.09195).

2.5.5 Determinación de la estructura monocristalina por rayos X de la wixarikolida (**3**).

Fórmula molecular: $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_5$, MW = 334,31, ortorrómbico, grupo espacial $\text{P2}_1 \times \text{2}_1 \times \text{2}_1$, dimensiones de celda unitaria $a = 7.4715(8) \text{ \AA}$, $b = 11.8459(13) \text{ \AA}$, $c = 17.391(2) \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$, $V = 1539.2(3) \text{ \AA}^3$, $Z = 4$, $D_c = 1.443 \text{ g/cm}^3$, $F(000) = 696$. Se recolectó un total de 4,505 reflejos únicos, con 2220 reflejos mayores que $I \geq 2\sigma(I)$ ($R_{\text{int}} = 0,0514$). La estructura se resolvió mediante métodos directos y se refinó mediante mínimos cuadrados de matriz completa en F^2 , con parámetros de desplazamiento anisotrópico para átomos que no son de hidrógeno en índices R finales [$I > 2\sigma(I)$], $R_1 = 0,0952$, $wR_2 = 0,2230$; Índices R (todos los datos), $R_1 = 0,0938$, $wR_2 = 0,1819$. Centro de datos cristalográficos de Cambridge (número de depósito: CCDC 2240711). Los datos se pueden obtener de forma gratuita a través de http://www.ccdc.ac.uk/data_request/cif.

2.5.6 Aislamiento de los metabolitos secundarios de *Salvia reflexa* Hornem.

Las hojas y flores secas y molidas (427 g), se sometieron a extracción por maceración con acetona (2 x 3 L) durante dos días. Para obtener un extracto (49.02 g); posteriormente se sometió a extracción con MeOH (3 L x 1) por 24 h. El extracto de acetona se sometió a CC (5.5 x 12 cm, frs. 125 mL) y se eluyó de la siguiente manera: hexanos (frs. 1-7), hexanos-AcOEt 90:10 (frs. 15-21), hexanos-AcOEt 80:20 (frs. 22-30), hexanos-AcOEt 70:30 (frs. 31-36), hexanos-AcOEt 60:40 (frs. 37-48), hexanos-AcOEt 30:70 (frs. 44-50), y AcOEt (frs. 51-57). Las frs. obtenidas se reunieron por su similitud en TLC: fracción A (frs. 1-8), fracción B (frs. 9-12), fracción C (13-19), fracción D (frs. 20-25), fracción E (frs. 26-29), fracción F (frs. 30-35), fracción G (frs. 36-37), fracción H (frs. 38-40), fracción I (frs. 42-46), fracción J (frs. 47-50), fracción K (51-60) y fracción L (frs. AcOEt).

De la fracción 27 se obtuvieron por cristalización de AcOEt-hexanos, 22 mg de salviandulina D (**11**).

De la fracción 47 se obtuvo un sólido cristalino incoloro, el cual fue lavado con AcOEt y se obtuvieron 122 mg de 8-hydroxysalviarina (**12**).

La fracción B (950 mg) se sometió a CC de gel de sílice (2.7 x 7 cm, frs. 25 mL) eluyendo con mezclas de hexanos-AcOEt 90:10 (frs. 1-7), hexanos-AcOEt 80:20 (frs. 8-14) y hexanos-AcOEt 70:30 (frs. 15-28). De las fracciones 5-11 se obtuvieron 97 mg de estigmasterol (**13**).

La fracción G (1.065 g) se sometió a CC de gel de sílice (3.0 x 9.8 cm, frs. 25 mL), eluyendo con una mezcla de cloroformo-acetona 99:1 (frs. 1-6), cloroformo-acetona 97:3 (frs. 7-14), cloroformo-acetona 95:5 (frs. 15-21), cloroformo-acetona 90:10 (frs. 22-27) y cloroformo-acetona 80:20 (frs. 28-32). De las fracciones 23-25 se obtuvieron 59 mg de 6 β -acetiloxi-salviarina (**9**).

La fracción I (3.153 g) se sometió a CC de gel de sílice (4.0 x 9.5 cm, frs. 50 mL), eluyendo de la siguiente manera: cloroformo-AcOEt 99:1 (frs. 1-5), cloroformo-AcOEt 97:3 (frs. 7-13), cloroformo-AcOEt 95:5 (frs. 14-18) y cloroformo-AcOEt 90:10 (frs. 19-25). De las fracciones 11-17 se aislaron 198 mg de 6- β -hydroxisalviarina (**9**).

La fracción L se sometió a CC de gel de sílice (4.7 x 9.5 cm, frs. 50 mL), eluyendo de la siguiente manera: cloroformo-MeOH 97:3 (frs. 1-6), cloroformo-MeOH 95:5 (frs. 7-16), cloroformo-MeOH 90:10 (frs. 17-26), cloroformo-MeOH 80:20 (frs. 27-34) y cloroformo-MeOH 70:30 (frs. 35-39). De las fracciones 13-20 se obtuvieron por filtración 190 mg de cirsiol (14).

La fracción L-(3-8) (1.0 g) se sometió a CC de gel de sílice (4.0 x 9.5 cm, frs. 50 mL) y se eluyó con CH₂Cl₂ (frs. 1-5), CH₂Cl₂-acetona 99:1 (frs. 6-12), CH₂Cl₂-acetona 97:3 (frs. 13-20), CH₂Cl₂-acetona 95:5 (frs. 21-25) y CH₂Cl₂-acetona 90:10 (frs. 26-32). De las fracciones 13-24, se aislaron 253 mg de 6 β -acetiloxi-salviarina (9).

La fracción L-(9-12) (1.828 g) se sometió a CC de silica gel (3.0 x 9.5 cm, frs. 25 mL) y se eluyó con mezclas de cloroformo-AcOEt 97:3 (frs. 1-5), cloroformo-AcOEt 95:5 (frs. 6-12), cloroformo-AcOEt 90:10 (frs. 13-23), y cloroformo-AcOEt 80:20 (frs. 24-34). De las fracciones 12-18 se aislaron 25 mg de 5,6-dihidroxy-7,3',4'-trimetilflavona (15).

De la fracción L-(21-22) (0.926 g) se sometió a CC de silica gel (3.0 x 9.5 cm, frs. 25 mL), eluyendo de la siguiente manera: CH₂Cl₂-acetona 97:3 (frs. 1-5), CH₂Cl₂-acetona 95:5 (frs. 6-13), CH₂Cl₂-acetona 90:10 (frs. 14-24), CH₂Cl₂-acetona 80:20 (frs. 25-30) y CH₂Cl₂-acetona 70:30 (frs. 31-37). De las frs. 28-33 se obtuvieron 70 mg de reflexiolida/16-*epi*-reflexdiolida (7/8).

De la fracción L-(23-27) se obtuvieron por filtración 102 mg de pedalitina (16).

De la fracción 28-30 L se obtuvo un sólido cristalino. Este sólido se lavó con AcOEt y filtró para obtener 14 mg de pedalitina (16).

2.5.7 Determinación de la estructura monocristalina por difracción de rayos X de 6- β -acetiloxi-salviarina (9).

Formula de fracción C₂₂H₂₄O₇, MW= 400.41, grupo espacial P2₁ 2₁ 2₁, dimensiones de celdas unitaria *a*= 11.6030 (3) Å, *b*= 12.1275 (3) Å, *c*= 14.0299 (3) Å, α = β = γ = 90°, *V*= 1974.22 (8) Å³, *Z*= 4, *D*_c= 1.347 g/cm³, *F* (000) = 848. Se recolectó un total

de 3742 reflejos únicos. La estructura se resolvió mediante métodos directos y se refinó mediante mínimos cuadrados de matriz completa en F^2 , con parámetros de desplazamiento anisotrópico para átomos que no son de hidrógeno en índices R finales [$I > 2\sigma(I)$], $R_1 = 0,0244$; Índices R (todos los datos), $wR_2 = 0.1792$. Los datos se pueden obtener de forma gratuita a través de http://www.ccdc.ac.uk/data_request/cif.

2.6 RESULTADOS

Salvia pennellii

La mezcla wirikutina/15-*epi*-wirikutina (**1/2**) se aisló como un polvo amorfo incoloro. Su espectro HRMS (DART-TOF+) mostro un ión pseudomolecular a m/z 389.12468 $[M + H]^+$ (calculada para 389.12364), indicando la fórmula molecular $C_{20}H_{20}O_8$. El espectro de RMN de ^{13}C mostro un par de 20 señales, lo que sugiere una relación epimérica entre ellas y una estructura diterpenoide. Estas señales se resolvieron en el espectro DEPT como un par de metilos, tres pares de metilenos, 10 pares de metinos y seis pares de carbonos no protonados (Tabla 5). Los espectros de RMN de 1H y ^{13}C mostraron señales de una γ -lactona (δ_C 169.43, C-18; 79.77/79.72, C-19; δ_H 4.88, dd, $J = 7.9, 5.2$ Hz, H-19_{pro-R}; 4.01, d, $J = 7.9$ Hz, H-19_{pro-S}), un acetal bicyclico (δ_C 110.77/110.60, C-20; 87.61/87.54, C-7; 75.07, C-12; δ_H 5.38 s/5.41, s, H-20; 5.11, dd, $J = 8.4, 7.6$ Hz, H-12; 4.49, d, $J = 4.0$ Hz, H-7) y una 5-hidroxifuran-2(5*H*)-ona ((δ_C 169.30/169.39, C-16; 137.71/137.65, C-13; 96.70, C-15; δ_H 7.02, d, $J = 4.6$ Hz/7.13, br d, $J = 3.8$ Hz, H-14; 6.16, d, $J = 4.6$ Hz/6.12, br s, H-15). Se pueden encontrar similitudes entre diversas estructuras de diterpenos presentando diferencias distintivas como la presencia o ausencia de dobles enlaces, grupos metilos o hidroxilos. Tal es el caso de la wirikutina/15-*epi*-wirikutina, que están relacionadas con la polistaquina G y la 15-*epi*-polistaquina G, dos epímeros en C-15 con esqueleto carbonado de *neo*-clerodano que difieren de los compuestos **1/2** por la presencia de un doble enlace en C-3 ((δ_C 137.67, C-4; 130.13, C-3, δ_H 7.08, d, $J = 7.5$ Hz, H-3). Esta información fue respaldada por las correlaciones observadas en el espectro COSY de H-3 con H-2 (δ_H 3.54, br dd, $J = 7.5, 3.8$ Hz), y en el espectro HMBC del protón H-3 con C-2 (δ_C 46.26) y C-18 (δ_C 169.43) (Fig. 4). Como es habitual en los diterpenoides de tipo *neo*-clerodano derivados de especies de *Salvia*, la configuración relativa de los compuestos **1/2** se estableció considerando las orientaciones de los grupos metilo en C-17 y metileno en C-19 como α , y mediante un análisis detallado del espectro NOESY (Fig. 6). Los contornos NOE de H₃-17 con H-12 (δ_H 5,11, dd, $J = 8,4, 7,6$ Hz) y H-11 β (δ_H 2,83, dd, $J = 13,3, 8,4$ Hz)

indicaron que la 5-hidroxifuran-2(5*H*)-ona tiene una orientación α . Las correlaciones NOE de H-19_{pro-S} (δ_H 4.01, d, $J = 7,9$ Hz) con H-10 (δ_H 2,24, d, $J = 7,1$ Hz) establecieron un anillo de decalina *cis*-fusionado, y las correlaciones de H₂-19 y H-10 con H-20 (δ_H 5,38 s/5,41 s) establecieron un dioximetino con disposición α . Por último, el pico cruzado de H-10 con H-1 (δ_H 3.51, br dd, $J = 5.0, 4.2$ Hz) indicó que la orientación del anillo de oxirano es β (Fig. 7).

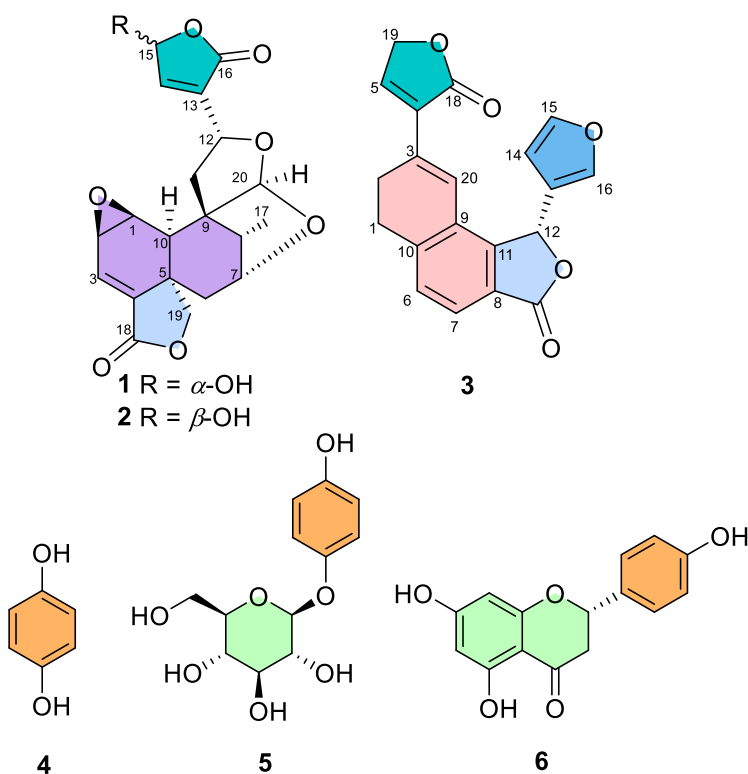


Figura 4. Compuestos aislados de la especie *S. penneelii*: wirikutina/15-*epi*-wirikutina (**1/2**), wixarikolide (**3**), hidroquinona (**4**), arbutina (**5**) y naringenina (**6**).

Tabla 5. Datos de RMN de ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) de los compuestos **1/2** en CDCl_3 .

Posición	1/2	
	δ_{H} mult. (J in Hz)	δ_{C}
1	3.51 br dd (5.0, 4.2)	58.65/58.60, CH
2	3.54 br dd (7.5, 3.8)	46.26, CH
3	7.08 d (7.5)	130.13, CH
4		137.67, C
5		44.0, C
6 α	2.14 dd (13.8, 4.3)	40.63, CH ₂
6 β	1.44 br d (13.8)	
7	4.49 d (4.0)	87.61/87.54, CH
8	2.66 m/2.64 m	39.05, CH
9		53.74, C
10	2.24 d (7.1)	44.78, CH
11 α	2.06 dd (13.3, 7.6)	35.58, CH ₂
11 β	2.83 dd (13.3, 8.4)	
12	5.11 dd (8.4, 7.6)	75.07, CH
13		137.71/137.65, C
14	7.02 d (4.6)/7.13 br d (3.8)	144.5/144.3, CH
15	6.16 d (4.6)/6.12 br s	96.70, CH
16		169.30/169.39, C
17	1.32 d (7.2)/1.26 br s	14.52, CH ₃
18		169.43, C
19 _{pro-R}	4.88 d (7.8)/4.87 d (7.9)	79.77 CH ₂
19 _{pro-S}	4.01 d (7.9)	
20	5.38 s/5.41 s	110.77/110.60, CH

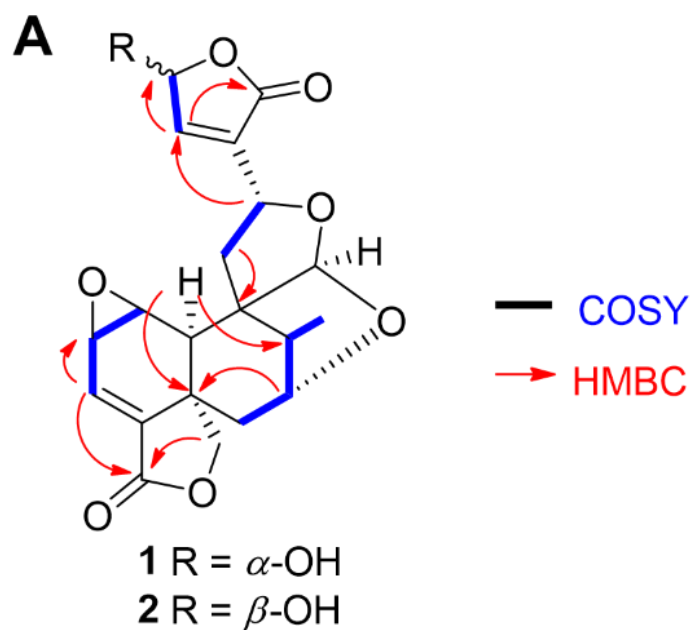


Figura 5. Correlaciones COSY y HMBC de los compuestos **1/2**.

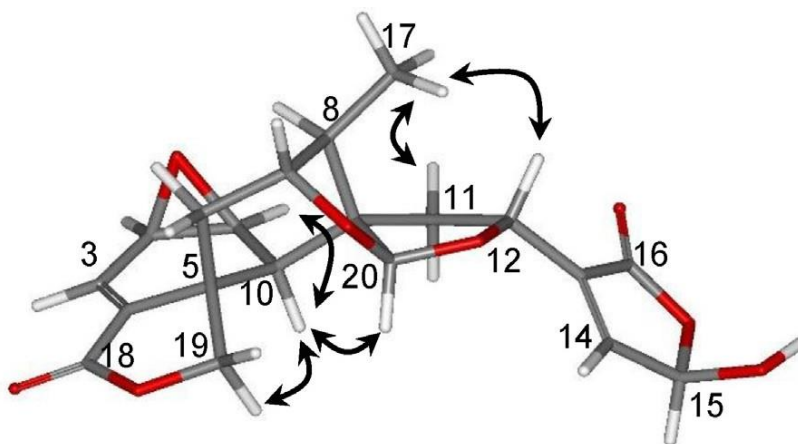


Figura 6. Principales correlaciones NOESY observadas para los compuestos **1/2**.

La wixaricolida (**3**) (0,5 mg) se aisló en forma de cristales café pardo, a partir de una mezcla compleja de diterpenoides de tipo tilifolano (9,2 mg) (Fig. 9), de la cual no fue posible obtener todos los constituyentes individuales. La asignación de las señales de RMN ^1H y ^{13}C tampoco fue posible debido a: 1) la superposición de

varias señales en ambos espectros; 2) la presencia de al menos cuatro carbonos no protonados en cada compuesto, de un total de tres compuestos distintos con esqueleto de tilifolano en la mezcla; y 3) a pesar de que se adquirieron los espectros de RMN de 2D de esta mezcla, los contornos mostrados en el espectro HMBC eran demasiado anchos para realizar una asignación inequívoca de los carbonos no protonados.

Por lo tanto, la estructura de **3** se estableció directamente mediante difracción de rayos X de monocristal como el derivado $\Delta^{3(20)}$ de la tilifodiolida (Fig. 7).

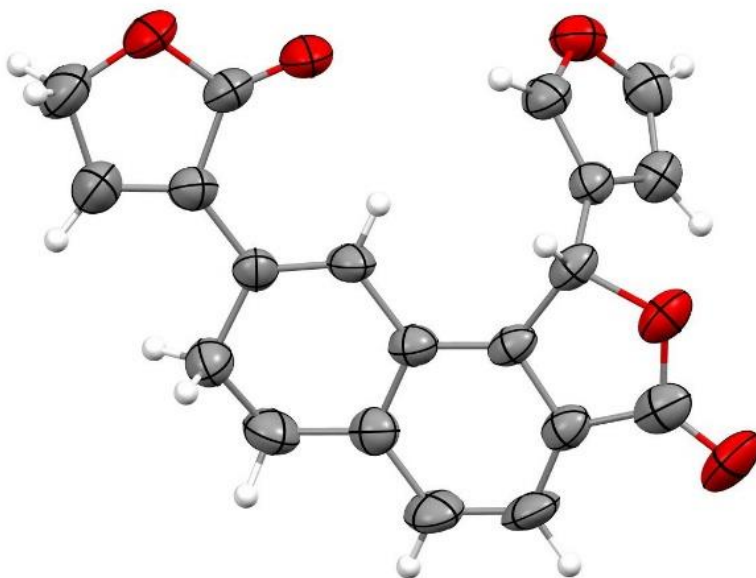


Figura 7. Diagrama ORTEP del compuesto **3**.

Los compuestos conocidos **4-6** se identificaron mediante la comparación de sus espectros de RMN de ^1H y ^{13}C con los previamente reportados en la literatura para hidroquinona (**4**) (Jeyanthi et al., 2016), β -arbutina (**5**) (Avonto et al., 2016) y naringenina (**6**) (Zhou et al., 2019).

Salvia reflexa

El diterpenoide 6- β -acetoxisalviarina se obtuvo como cristales incoloros. Su estructura se dedujo por medio del análisis de sus datos de RMN de 1D y 2D; y por comparación de sus datos de RMN con los de otros *neo*-clerodanos obtenidos de especies de *Salvia* con distribución en México. Después de este análisis y comparación, se determinó su estructura como la ilustrada para el compuesto **9** (Fig. 8). Este compuesto, previamente se aisló y caracterizó como una mezcla de *neo*-clerodanos aislados de las partes aéreas de *S. rhyacophila* (Fernández et al. 1988), por lo que carece de una asignación completa de sus señales de RMN de ^1H y ^{13}C , y falta información acerca de su estereoquímica. En el presente estudio se cubrieron ambos aspectos. Su espectro de HRMS (TOF-MS) mostro un pico de iones en m/z 423.13952 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calculada para 423.14142), indicando su fórmula molecular como $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_7$. El espectro de RNM de ^{13}C mostro 22 señales y mediante el espectro HSQC, las señales se resolvieron como dos metilos, cuatro metilenos, diez metinos y seis carbonos no protonados (Tabla 6, Apéndice 8). Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C muestran señales de una γ -lactona (δ_{C} 174.38, C-18; 68.98, C-19; δ_{H} 4.22, d, $J = 9.8$ Hz, H-19_{pro-R}, 4.33, d $J = 9.8$ Hz, H-19_{pro-S}), una δ -lactona (δ_{C} 169.88, C-17; 70.10, C-12; δ_{H} 5.46, dd, $J = 12.7, 3.2$ Hz, H-12), un anillo de furano (δ_{C} 124.57, C-13, 108.13, C-14, 143.76, C-15, 139.65, C-16; δ_{H} 6.42, dd, $J = 1.8, 0.8$ Hz, H-14; 7.42, t, $J = 1.8$ Hz, H-15; 7.49, t, $J = 0.8$ Hz, H-16), un grupo acetiloxi en el C-6 (δ_{C} 69.15, C-6, δ_{H} 4.85, dd, $J = 2.7, 2.7$ Hz, H-6; OAc δ_{H} 2.03, s, -CH₃, δ_{C} 170.84, C-1', 20.97, C-2'); y un doble enlace en C-2 (δ_{H} 6.02, dddd, $J = 10.1, 5.1, 2.3, 2.3$ Hz, H-2; 5.73, dddd, $J = 10.1, 2.9, 2.9, 1.4$ Hz, H-3; δ_{C} 128.27, C-2; 121.22, C-3). Esta información fue respaldada por las correlaciones del espectro COSY de H-2 con H-3, y en el espectro HMBC la correlación H-3 con C-2 y C-18 (Fig. 9). La configuración relativa del compuesto **9** se estableció considerando las orientaciones de los grupos H₃-17 y H₂-19 como α , con base en la biosíntesis y la estereoquímica previamente reportada para *neo*-clerodanos obtenidos de especies mexicanas de *Salvia*. Así, la orientación del grupo acetato en C-6 se estableció como β , por las correlaciones observadas en el espectro NOESY de H-6 con H-19_{pro-R} (Fig. 10). El pico del

espectro NOESY, de H-8 (δ_H 2.40, dd, $J = 6.0, 2.1$ Hz) con H₃-20 (δ_H 1.03, s) indican una orientación β para la δ -lactona y una fusión *cis*. El pico del diagrama NOESY de H₂-19 con H₃-20, y de H-10 (δ_H 2.57, dd, $J = 12.2, 5.4$ Hz) con H-4 ($\delta_{H_{3,23}}$, m) indicó que tanto el anillo de decalina, como la γ -lactona tienen una fusión *trans*, con una estereoquímica como se indica para la estructura del compuesto **9** (Fig. 10). Debido a que se obtuvo material cristalino de buena calidad y tamaño; la configuración absoluta del compuesto **9** se determinó por medio de un estudio de difracción de rayos X de monocristal, seguido de la determinación del parámetro de Flack (0.19 (4)) (Fig. 11), lo que permitió confirmar la estructura y estereoquímica propuesta para el compuesto **9** con base en el análisis de los datos de RMN de 1D/2D.

Las reflexdiolida/16-*epi*-reflexdiolida (**7/8**) se aislaron como un polvo blanquecino. Su espectro HRMS (ESI-Q-TOF+) mostro un pico con m/z 471.10414 $[M + K]^+$ (calculada para 471.10519), indicando una fórmula molecular $C_{22}H_{24}O_9K$ (Fig. 8). El espectro de RMN de ^{13}C mostro 22 señales, lo que sugiere que los dos compuestos tienen una estructura diterpenoide muy similar. Mediante los espectros DEPT y HSQC estas señales se resolvieron como dos metilos, cuatro metilenos, siete metinos y siete carbonos no protonados (tabla 6 y Apéndice). Los espectros de RMN de 1H y ^{13}C mostraron señales para una γ -lactona (δ_C 174.69, C-18; δ_C 68.64, C-19; δ_H 4.52, d $J = 10.1$ Hz, H-19-*pro-R*; 4.31, d $J = 10.1$ Hz, H-19-*pro-S*), una δ -lactona (δ_C 170.84, C-17; 71.31, C-12, δ_H 5.33, br d, $J = 10.3$ Hz, H-12), una hidroxifuranona (δ_C 169.69, C-15; 117.52, C-14, 169.72, C-13; 98.05, C-16; δ_H 6.16, br s, H-14; 6.24, br s; δ_H 8.29-8.08, OH-16); un grupo acetiloxi en C-6 (δ_C 69.26, C-6, δ_H 4.61, br s, H-6; OAc δ_H 1.92, s, δ_C 169.69, C-1'; 20.64, C-2'). La comparación de los espectros de RMN de 1D entre los compuestos **7/8** con el compuesto **9**, mostro que sus estructuras son muy similares, difiriendo por la presencia de una hidroxifuranona unida al C-12 en lugar de un anillo de furano. Se ha descrito que las hidroxifuranonas en los *neo*-clerodanos, puede ser de dos tipos: 16,15 y 15,16; y se suelen encontrar como mezclas epiméricas en C-15 y C-16, respectivamente. En el espectro HSQC de los compuestos **7/8**, las señales con δ_H 6.25 (br s, H-16) y 6.18 (br s, H-14) mostraron correlación con señales de ^{13}C en δ_C 117.52 (CH, C-14) y 98.05 (CH, C-

16), y son distintivas de una 15,16-hidroxifuranona. Esta inferencia, se apoyó por medio de la correlación HMBC de H-14 con C-13 (δ 169.71, C). Considerando la ocurrencia concomitante de los compuestos **7-9**, y que la mezcla de **7/8** se produce en la planta por medio de la oxidación del anillo de furano en el compuesto **9**, la configuración absoluta en **7/8** es la misma que la establecida para **9**.

Las estructuras de los compuestos salviandulina D (**10**) (Gardner et al., 2021), 8-hidroxisalviarina (**11**) (Nieto et al. 1996), 6 β -hidroxisalviarina (**12**) (Fernández et al., 1991), estigmasterol (**13**) (Yinusa et al., 2012), cirsiol (**14**) (Bautista et al., 2020), 5'-6-dihidroxi-7,3',4 trimetilflavona (**15**) (Calzada et al., 2020) y pedalitina (**16**) (Moreno-Pérez et al., 2019) se determinaron comparando sus datos de RNM de ^1H y ^{13}C con espectros y descripciones previamente reportadas para estos compuestos (Fig. 10).

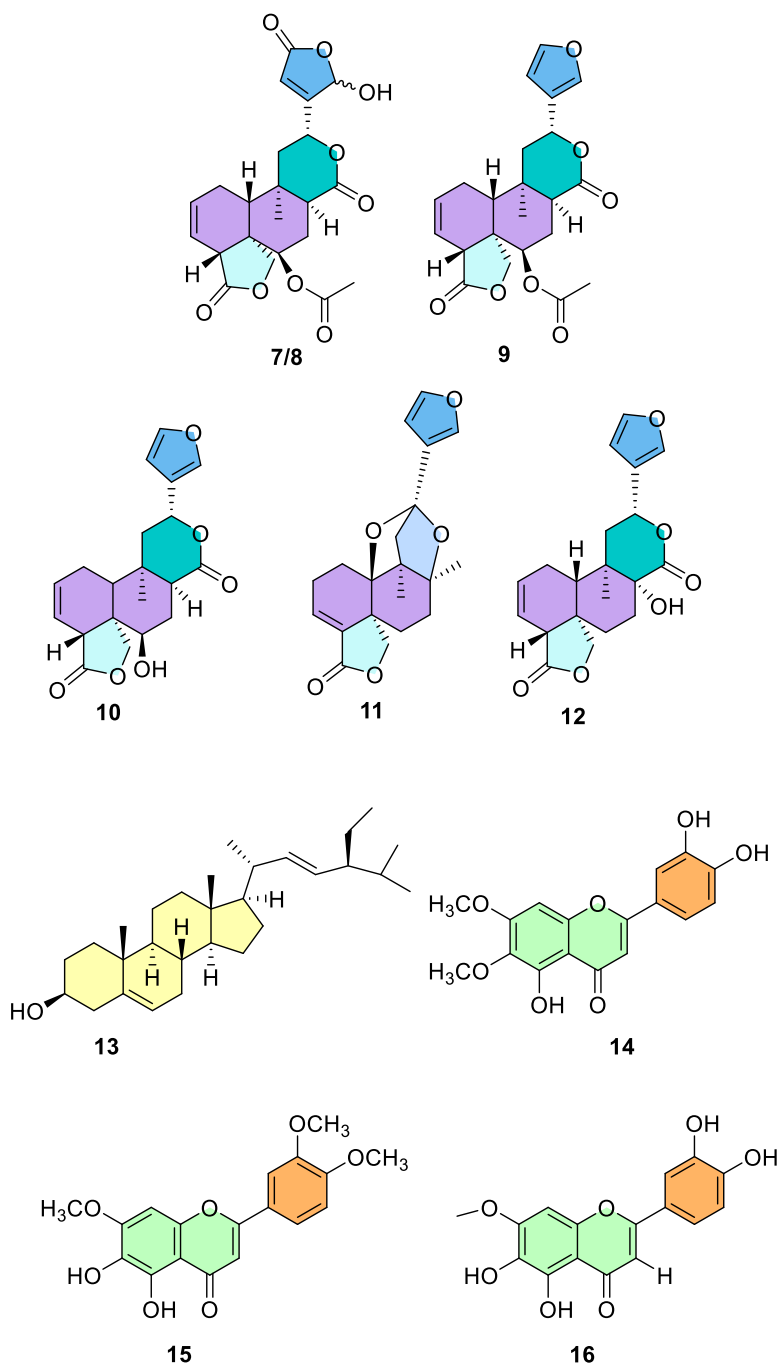


Figura 8. Compuestos asilados de la especie *S. reflexa*: reflexdiolida/16-*epi*-reflexdiolida (**7/8**), 6- β -acetoxysalviarina (**9**), 6 β -hidroxisalviarina (**10**), salviandulina D (**11**), 8-hidroxisalviarina (**12**), estigmasterol (**13**), cirsiol (**14**), 5'6-dihidroxi-7,3',4 timetilflavona (**15**) y pedalitina (**16**).

Tabla 6. Datos de RMN de ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) de reflexdiolida/16-*epi*-reflexdiolida (**7/8**) y 6- β -acetiloxisalviarina (**9**) en CDCl_3 .

Posición	reflexdiolida/16- <i>epi</i> -reflexdiolida (7/8)		6- β -acetiloxisalviarina (9)	
	d_{H} mult. (J in Hz)	d_{C}	d_{H} mult. (J in Hz)	d_{C}
1a	2.32 m ^b	21.35, CH ₂ ^b	2.20 m	21.58, CH ₂
1b	2.14 br s		2.14 ddd (15.7, 6.2, 2.4) ^b	
2	6.03 br d (6.7)	130.12, CH	6.02 dddd (10.1, 5.1, 2.3, 2.3)	128.27, CH
3	5.54 br d (9.7)	120.51, CH	5.71 dddd (10.1, 2.9, 2.9, 1.4)	121.22, CH
4	3.17 br s	46.02, CH	3.23 m	45.88, CH
5		44.84, C		44.68, C
6	4.61 br s	69.73, CH	4.85 dd (2.7, 2.7)	69.15, CH
7a	2.39 dd (15.4, 6.0)	22.57, CH ₂	2.13 m ^b	22.29, CH ₂
7b	2.56 m ^b		3.00 ddd (20.9, 11.7, 5.0)	
8	2.55 m ^b	44.71, CH	2.40 dd (6.0, 2.1)	45.34, CH
9		34.28, C		34.20, C
10	2.32 m ^b	32.89, CH	2.57 dd (12.2, 5.4)	32.07, CH
11a	1.69 br s	37.77, CH ₂	1.73 dd (14.9, 12.7)	40.91, CH ₂
11b	2.22 m		2.25 dd (14.9, 3.2)	
12	5.36 br s	72.44, CH	5.46 dd (12.7, 3.2)	70.10, CH
13		170.05, C		124.57, C
14	6.18 br s	117.52, CH ^d	6.42 dd (1.8, 0.8)	108.13, CH
15		170.17, C ^{b,e}	7.42 t (1.8)	143.76, CH
16	6.25 br s	98.05, CH ^d	7.49 t (0.8)	139.65, CH
17		171.02, C		170.84, C
18		175.19, C		174.38, C
19 _{pro-R}	4.54 d (10.0)	69.11, CH ₂	4.22 d (9.8)	68.98, CH ₂
19 _{pro-S}	4.33 d (10.0)		4.33 d (9.8)	
20	0.95 s	22.95, CH ₃	1.03 s	23.61, CH ₃

a OAc señal d_{H} 1.92, s, CH₃ 21.35, C170.17, señal del OH 16 d_{H} 8.29-8.08, br s; b señal superpuesta, c OAc señal d_{H} 2.03, s, CH₃ 170.84, C 20.97, C; d asignado mediante señales de HSQC, e señales asignadas mediante picos de HMBC

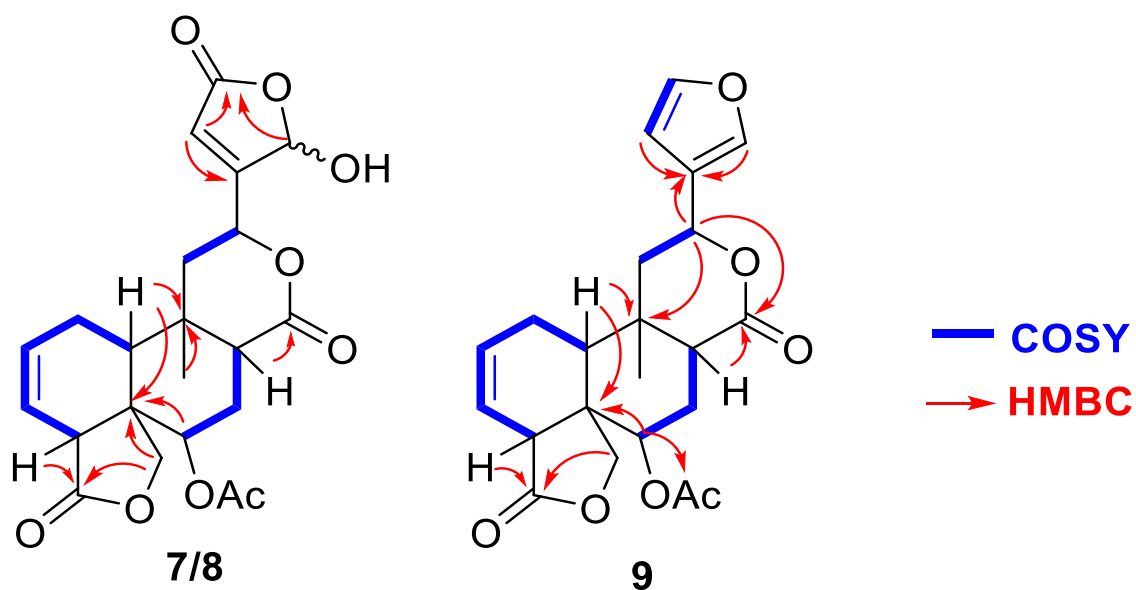


Figura 9. Correlaciones COSY y HMBC de las reflexdiolida/16-*epi*-reflexdiolida (7/8) y la 6 β -acetiloxysalviarina (9)..

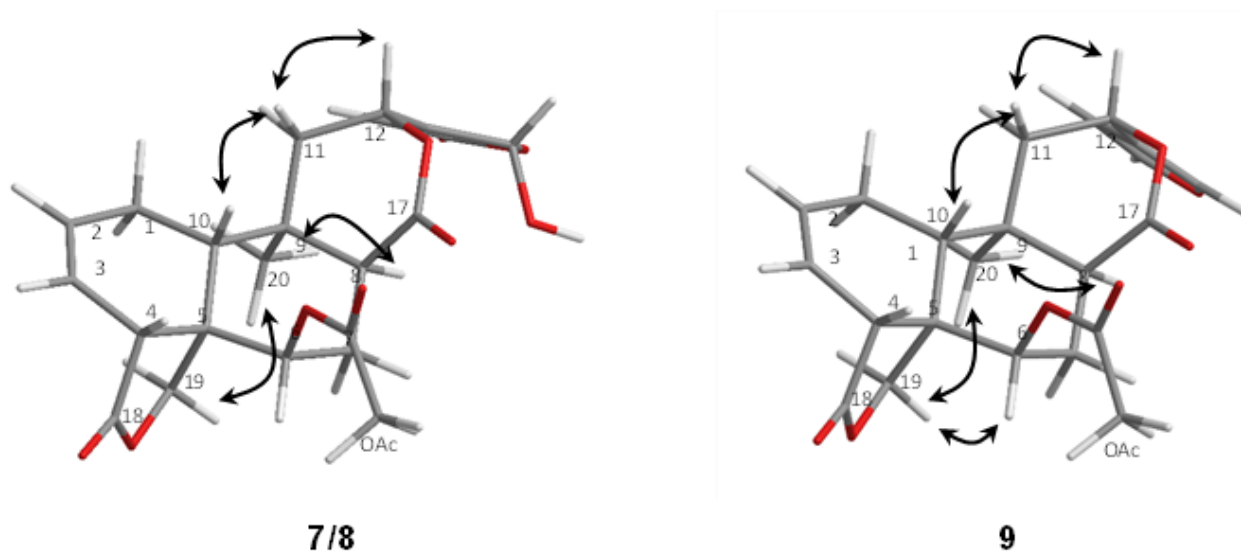


Figura 10. Correlaciones NOESY observadas para las *reflexdiolida*/16-*epi*-reflexdiolida y la 6 β -acetiloxysalviarina (9).

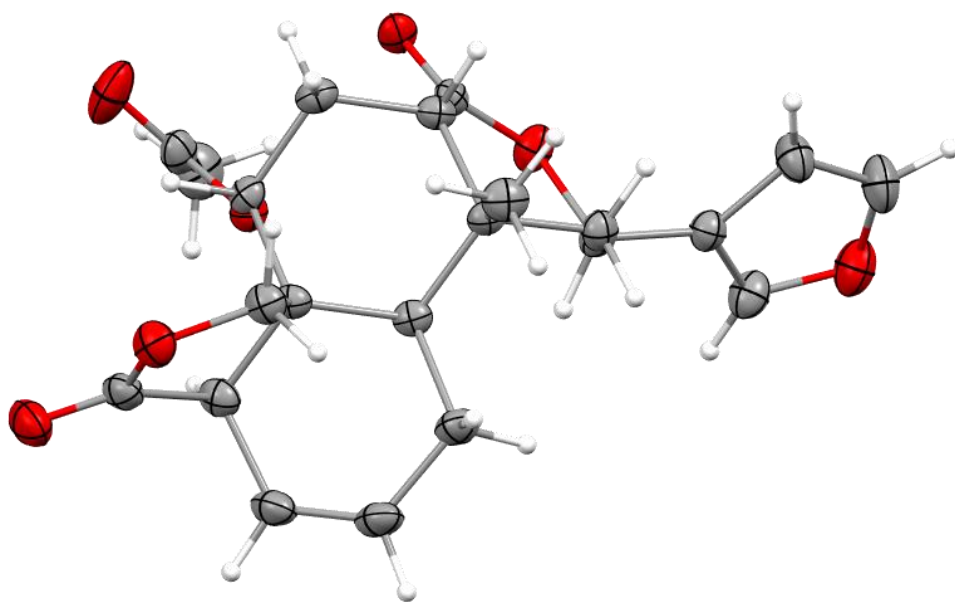


Figura 11. Diagrama ORTEP de la 6β-acetiloxysalviarina (**9**).

2.7 DISCUSIÓN

A partir del extracto de *Salvia pennellii* se asilaron tres compuestos previamente descritos: arbutina (**4**), hidroquinona (**5**) y naringenina (**6**), y se aislaron e identificaron tres compuestos novedosos a los que se les dio el nombre de wirikutina/15-*epi*-wirikutina (**1/2**) y wixarikolida (**3**). El nombre asignado a estos metabolitos especializados hace alusión a la cultura wixarika (huichol), que considera que wirikuta es el extremo oriente de su territorio, y corresponde al lugar de colecta de la planta. El valle wirikuta, es un lugar sagrado para los wixarikas y representa el lugar donde inicio la vida.

Las wirikutina (**1**) y 15-*epi*-wirikutina (**2**) se obtuvieron como una mezcla de epímeros en C-15 del esqueleto carbonado de *neo*-clerodano, uno de los principales tipos de diterpenos aislados de especies Americanas de *Salvia*. Los compuestos **1/2** contienen en su estructura un residuo de 2,8-dioxabicyclo [3.3.0]octano y una unidad de 5-hidroxifuran-2(5*H*)-ona en la cadena lateral en C-12 del esqueleto de *neo*-clerodano (Bautista et al., 2017; Maldonado et al., 2016). Recientemente, se ha reportado que los *neo*-clerodanos que contienen en su estructura este tipo de furanonas, se aíslan como mezclas epiméricas en C-15 y/o en C-16, y son irresolubles por métodos cromatográficos debido a la apertura en disolución de la hidroxifuranona. Algunos epímeros aislados en forma enantioméricamente pura, sólo se han obtenido como éteres metílicos y son considerados como artefactos generados durante el proceso de extracción y/o purificación cuando se emplea metanol (Peng et al., 2023; Maldonado et al., 2016). Este comportamiento también se ha observado en diterpenoides de tipo labdano (Li et al., 2012), microfilano (Toscano et al., 2020) y glucósidos de *neo*-clerodano (Flores-Bocanegra et al., 2017; Salinas-Arellano et al., 2020; García-Nava et al., 2022), entre otros, obtenidos a partir de plantas de la familia Lamiaceae. Los epímeros **1/2** están estructuralmente relacionados con la polistaquina G y la 15-*epi*-polistaquina G, aisladas previamente de *S. polystachya* (Bautista et al., 2017), la diferencia de **1/2** con estas polistaquinas radica en que los primeros poseen un doble enlace en C-3 conjugado con la 18,19- γ -lactona (Fig. 8).

El género *Salvia* ha destacado por la diversidad de esqueletos diterpenicos presentes en sus partes aéreas de los cuales la mayoría tienen como precursores esqueletos de tipo abietano y *neo-clerodano*, sin embargo, en especies presentes en América se han descrito esqueletos inusuales como son los de tipo tilifolano (Esquivel, 2008). Se ha sugerido que la salvigenolida A es el precursor biogenético de este tipo de andamiaje (Rodríguez-Hahn et al., 1990). Los tilifolanos presentan un anillo de seis miembros compuesto por los carbonos C-1, C-2, C-3 C-20, C-9 y C-10, el cual esta trisustituido con una γ -lactona α,β -insaturada, una hidrobenczofuranona y un furano mostrando un arreglo de media silla, este último está perpendicular al anillo aromático (Rodríguez-Hahn et al., 1990). La wixarikolida (**3**) es el cuatro reporte de un diterpenoide con esqueleto tilifolano descrito hasta el momento, este tipo de esqueleto solo se han asilado en especies como *S. tiliifolia* (Rodríguez- Hahn et al., 1990), *Salvia dugesii* (Xu et al., 2004; Gang et al., 2011) y *S. leucantha* (Jiang et al., 2016). A pesar de que estas especies, junto con *S. pennellii*, no pertenecen a la misma sección taxonómica, estudios filogenéticos recientes utilizando marcadores moleculares de ADN no codificante de núcleos y cloroplastos sugieren que están estrechamente relacionadas (Fragoso-Martínez et al., 2018; González-Gallegos et al., 2020; Lara-Cabrera et al., 2021; Sepúlveda et al., 2021), por los que las estructuras de diterpenos que presenten un esqueleto de este tipo podrían considerarse como marcadores quimiotaxonómicos, ayudando a resolver la problemática en las clasificaciones taxonómicas y filogenéticas de este subgénero a través de enfoques metabólicos.

La hidroquinona (**4**) (1-4 dihidroxibenceno) es un compuesto aromático del grupo de los fenoles, se compone de dos grupos hidroxilos que están unidos a un anillo de benceno (Fig. 8). Se puede encontrar en las hojas de algunas especies en su forma libre y también en su forma glucosilada (arbutina). Se ha reportado su actividad alelopática ya que puede inhibir la germinación y provocar alteraciones en las relaciones hídricas de las plantas generando un menor crecimiento, así como el cierre de estomas y reducir la fotosíntesis (Keller et al., 2008; Jurica et al., 2015; Barkosky et al., 1999). En el caso de *S. pennellii* se aisló hidroquinona en su forma

libre y en su forma glucosilada (arbutina), estos compuestos podrían servir como indicadores de competencia en su medio natural contra otras especies o contra condiciones adversas.

La arbutina (**5**) (4-hidroxifenol β -D-glucopiranosido) es un derivado de la hidroquinona y pertenece al grupo de los fenoles simples (Fig. 8) (Xu et al., 2022). Se aisló por primera vez en hojas de gayuba (*Arctostaphylos una-ucaceae*) y se ha aislado en grandes cantidades en plantas de las familias Lamiaceae, Ericaceae, Saxifragaceae y Rosaceae (Xu et al., 2015). La arbutina se ha encontrado en diversas partes de las plantas como son las hojas, los tallos y las raíces, y siempre en mayores concentraciones, en especies que habitan condiciones desfavorables como bajas temperaturas o sequía. Se ha reportado la acumulación de distintos MS para tolerar el estrés por sequía como la prolina, trehalosa o galactinol. Sin embargo, la arbutina se encuentra en concentraciones superiores en plantas consideradas tolerantes a la sequía (Sprenger et al., 2016). La arbutina es considerada como una fuente de hidroquinona y gracias a su estructura hidroxilada de dos anillos podría conferir protección a la planta bajo condiciones de estrés, ya que se ha propuesto que puede reducir la tasa de peroxidación de los lípidos insaturados de la membrana vegetal que muchas veces son los causantes del deterioro de las células durante la exposición al estrés (Suau et al., 1991; Argumedo-Delira et al., 2003). En el caso de *S. pennellii* la arbutina fue el compuesto mayoritario de esta población (1.27 g), a diferencia de otras especies reportadas como *S. mexicana* (563 mg) y *S. rhyacophila* (200 mg) (Argumedo-Delira et al., 2003). La arbutina es ampliamente utilizada en la industria cosmética debido a su actividad aclarante.

La naringenina (**6**) es un flavonoide perteneciente a las flavononas que comúnmente se encuentra en las frutas cítricas. Sin embargo, se ha reportado su presencia en otras especies de *Salvia* como *S. argentea*, *S. aegyptiaca* y *S. verbenaca* (Ben Farhat et al., 2013). Se ha reportado que los flavonoides tienen actividad antioxidante, ya que pueden inhibir enzimas generadoras de ROS. Además, este tipo de compuestos pueden acumularse en las vacuolas o

cloroplastos estabilizando la membrana de los cloroplastos ante la presencia de estrés (Yildiztugay et al., 2020). La naringenina (**6**) tiene diversos efectos bioactivos beneficiosos en la salud humana como actividad antiinflamatoria, antidiabética y antitumoral, entre otras (Venkateswara et al., 2017).

El estudio de la composición fitoquímica de *S. pennellii* ayudo a comprender cuales son los MS presentes en la planta que pueden contribuir a adaptarse a las condiciones ambientales adversas presentes en las zonas áridas donde habita. Este análisis también contribuyo al entendimiento de la fitoquímica del género *Salvia*, y permitió continuar con el descubrimiento de MS con esqueletos poco usuales.

La especie *S. reflexa* ha llamado la atención por diversos reportes sobre su alta toxicidad. En el año de 1932 se dio el primer reporte de la muerte de 324 bueyes en Queensland, Australia por el consumo de *S. reflexa* debido al contenido de nitrato de potasio, provocando la muerte del ganado por metahemoglobinemia (Williams y Hines, 1940). En Venezuela, se han reportado intoxicación por sus altos niveles de nitritos al consumirla las vacas, caballos y ovejas (Hussain et al., 2018) y en Estados Unidos un caso de intoxicación en 500 vacas, de las cuales 165 murieron por necrosis en el hígado en menos de 72 h (Panter et al., 2021). De la población del presente estudio, colectada en la Sierra de Catorce, se aislaron ocho compuestos conocidos: 6- β -acetoxysalviarina (**9**), hidroxisalviarina (**10**), salviandulina D (**11**), 8-hidroxisalviarina (**12**), estigmasterol (**13**), circsiliol (**14**), 5,6-dihidroxi-7,3',4'-trimetilflavona (**15**), y pedalitina (**16**), así como un compuesto no descrito previamente el cual fue nombrado como reflexdiolida/16-*epi*-reflexdiolida (**7/8**).

La 6- β -acetiloxisalviarina (**9**) es un diterpeno de tipo *neo*-clerodano, aislado por primera vez de *Salvia rhyacophila* como una mezcla (6- β - acetiloxisalviarina y 10 β -acetiloxisalviarina) que los autores no lograron purificar (Fernandez et al., 1991). En la población estudiada de *S. reflexa*, se logró aislar como un compuesto puro además de ser un compuesto mayoritario, hasta ahora no se tenían reportes de la presencia de este metabolito en esta especie. Este compuesto genera una alta toxicidad y mortalidad provocando zonas focales de necrosis en hígado (datos no publicados).

El 6- β -hidroxisalviarina (**10**) es un diterpeno con esqueleto *neo*-clerodano, y también fue aislado por primera vez en *Salvia rhyacophila* (Fernandez et al., 1991). Sin embargo, se ha reportado su presencia en bajas cantidades (43 mg) en una población de *S. reflexa* (Nieto et al., 1999), a diferencia de la población de San Luis Potosí, en donde es el segundo componente mayoritario (110 mg). Este compuesto genera una alta toxicidad y mortalidad, generando áreas extensas de necrosis en hígado (datos no publicados).

La salviandulina D (**11**) es un diterpenoide de tipo *neo*-clerodano, aislado por primera vez de *Salvia lavanduloides* como un compuesto minoritario (Maldonado et al., 1994). También se ha encontrado su presencia en otras poblaciones de *S. reflexa* y se ha reportado como un compuesto con actividad hepatotóxica moderada (Gardner et al., 2021). En la población de San Luis Potosí se aisló como un compuesto minoritario (16 mg).

La 8-hidroxisalviarina (**12**) es un diterpeno de tipo *neo*-clerodano, aislado por primera vez en la especie de *S. reflexa*, de una población de Argentina (Nieto et al., 1996) y se ha encontrado en otras especies como *S. shannoni*. Se ha reportado su actividad antiprotozoaria contra *Entamoeba histolítica* y *Giardia lamblia* (Bautista et al., 2013). Este compuesto presenta una alta toxicidad y mortalidad provocando zonas focales de necrosis en hígado (datos no publicados).

El estigmasterol (**13**) es un esteroles insaturado que cuenta con un doble enlace en la estructura del anillo del esteroles y un doble enlace en la cadena lateral, es el segundo esteroles más común identificados en plantas (Ashraf y Bhatti, 2021; Moazzami Farida y Radjabian, 2019). Se produce mediante la vía del mevalonato, produciendo el 2-3-oxidoscualeno (Ashraf y Bhatti, 2021). Se ha aislado de partes aéreas de plantas, tallos leñosos, raíces y semillas, y su presencia se ha reportado en diversas especies de *Salvia* (Moazzami Farida y Radjabian, 2019). Los esteroides son esenciales en el desarrollo y crecimiento de las plantas ya que están involucrados en los procesos de división celular, la morfogénesis o la permeabilidad de las membranas además de ser precursores de otros tipos de esteroides como los brasinoesteroides (Moazzami Farida y Radjabian, 2019; Kaur et al., 2011).

El cirsilinol (**14**) es una flavona que fue aislada por primera vez de *Achillea fragrantissima* y se ha reportado en diversas especies de la familia Lamiaceae tales como *Salvia connivens*, *S. officinalis* y *S. x jamensis*. Al igual que la naringenina (**6**), esta flavona también tiene actividad antioxidante y su acumulación está relacionada con la defensa de las plantas ante el estrés abiótico como la intensidad de la luz o la fertilidad de los suelos. Debido a su potencial farmacológico se han realizado diversos estudios, reportando actividad antiprotozoaria, sedante, antiinflamatoria, antitumoral, hipnótica y citotóxica (de Oliveira et al., 2018; Bautista et al., 2020; Carlini et al., 2022). De las tres flavonas aisladas de *S. reflexa*, esta fue la más abundante (167 mg).

La 5,6-dihydroxy-7'3'4-trimetoxi flavona (**15**) pertenece al grupo de las flavonas metiladas, este tipo de flavonas son características de la familia Lamiaceae y se ha sugerido que su presencia puede ser útil en la clasificación taxonómica de los géneros y especies dependiendo la presencia de estas (Tomás-Barberán et al., 1988), también se ha reportado su presencia en *S. amarissima* (García et al., 2022; Calzada et al., 2020). Este compuesto tiene importancia farmacológica debido a su alta actividad antiprotozoaria (Calzada et al., 2020). De las tres flavonas aisladas en *S. reflexa*, esta fue la menos abundante (25 mg) y hasta ahora no se había reportado su presencia en esta especie.

La pedalitina (**16**) es una flavona que se ha aislado de diversas especies de plantas incluidas las *Salvias*. Se ha reportado en especies como *S. amarissima* (Maldonado et al., 1996; Moreno-Perez et al., 2019) y *S. splendens* (Moharran et al., 2012). Los flavonoides como la pedalitina tienen actividad antioxidante que pueden actuar extinguiendo los ROS, inhibiendo enzimas como la xantinaoxidasa o quelando iones metálicos (Fe y Cu). Además, puede ayudar en la regeneración de otros antioxidantes unidos a las membranas como es el α -tocoferol (Masuoka et al., 2016). Se ha reportado que esta flavona tiene actividad antinociceptiva (Moreno-Perez et al., 2019), además de ser inhibidora contra de la tirosinasa y la α -glucosidasa (Lin et al., 2011). No se había reportado la presencia de esta flavona en la especie de *S. reflexa*.

2.8 CONCLUSIONES

En el presente estudio se aislaron seis compuestos a partir del extracto de *S. pennellii*, tres conocidos (hidroquinona (**4**), arbutina (**5**) y naringenina (**6**)) y tres compuestos no descritos previamente [wirikutina/15-*epi*-wirikutina (**1/2**) y wixarikolida (**3**)]. Este último es la cuarta descripción de un diterpenos con esqueleto de tilifolano. Al ser un compuesto con un esqueleto inusual, puede ayudar en la quimiotaxonomía de salvias mexicanas.

De la especie *S. reflexa* se aislaron 10 compuestos, ocho compuestos conocidos (6 β -acetiloxisalviarina (**9**), 6 β -hidroxisalviarina (**10**), salviandulina D (**11**), 8-hidroxisalviarina (**12**), estigmasterol (**13**), cirsiol (**14**), 5'-6-dihidroxi-7,3',4-timetilflavona (**15**) y pedalitina (**16**)) y dos compuestos no descritos anteriormente (reflexiolida/16-*epi*-reflexdiolida (**7/8**)). De los compuestos aislados de esta población, la salviandulina D (**11**) es el único que ha sido reportado con actividad hepatotóxica. Hasta ahora, la 6- β -acetoxysalviarina (**9**) solo había sido aislada como una mezcla. En el presente trabajo se logró aislar como un compuesto puro además de ser el compuesto aislado mayoritario de esta población, se completó su caracterización espectroscópica, espectrométrica y se determinó su configuración absoluta por difracción de rayos-X de monocristal.

Conocer cuáles son los MS presentes en especies de *Salvia*, ayuda a entender cuáles podrían ser los MS involucrados en su adaptación y tolerancia a distintos factores adversos, característicos de las zonas áridas. El estudio de la hepatotoxicidad de los MS presentes en *S. reflexa* puede ayudar a comprender si todas las poblaciones de esta especie cuentan con la misma toxicidad o difiere debido a su composición, y con ello aumentar el conocimiento sobre la toxicidad de esta planta y sus afectaciones al gremio ganadero.

2.9 REFERENCIAS

- Argumedo-Delira, R., Parra-Delgado, H., Ramirez-apan, M.T., Nieto-Camacho, A., Martínez-Vázquez, M. (2003). Isolation and chemical transformations of some anti-inflammatory triterpenes from *Salvia mexicana* L. minor Benth. *Revista de la Sociedad Química de México*, 47(2), 167-172.
- Ashraf, R., Bhatti, H. N. (2021). Stigmasterol. In *A Centum of Valuable Plant Bioactives*, 213-232.
- Barkosky, R. R., Butler, J. L., Einhellig, F. A. (1999). Mechanisms of hydroquinone-induced growth reduction in leafy spurge. *Journal of Chemical Ecology*, 25, 1611-1621.
- Bautista, E., Calzada, F., Yépez-Mulia, L., Bedolla-García, B.I., Fragoso-Serrano, M., Pastor-Palacios, G., González-Juárez, D.E. (2020). *Sallavia connivens*, a source of a bioactive flavones with amoebicidal amoebicidal and giardicidal activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 30, 729-732.
- Bautista, E., Fragoso-Serrano, M., Ortiz-Pastrana, N., Toscano, R. A., Ortega, A. (2016). Structural elucidation and evaluation of multidrug-resistance modulatory capability of amarissinins A–C, diterpenes derived from *Salvia amarissima*. *Fitoterapia*, 114, 1-6.
- Bautista, E., Fragoso-Serrano, M., Toscano, R. A., García-Peña, M. D. R., Ortega, A. (2015). Teotihuacanin, a diterpene with an unusual spiro-10/6 system from *Salvia amarissima* with potent modulatory activity of multidrug resistance in cancer cells. *Organic Letters*, 17(13), 3280-3282.
- Bautista, E., Ortiz-Pastrana, N., Pastor-Palacios, G., Montoya-Contreras, A., Toscano, R. A., Morales-Jiménez, J., Salazar-Olivo, L.A., Ortega, A. (2017). Neo-clerodane diterpenoids from *Salvia polystachya* stimulate the expression of extracellular matrix components in human dermal fibroblasts. *Journal of natural Natural Products*, 80(11), 3003-3009.
- Bautista, E., Toscano, A., Calzada, F., Díaz, E., Yépez-Mulia, L., Ortega, A. (2013). Hydroxyclerodanes from *Salvia shannoni*. *Journal of Natural Products*, 76(10), 1970-1975.
- Bautista, E., Toscano, R. A., Ortega, A. (2014). 5, 10-seco-neo-Clerodanes and neo-Clerodanes from *Salvia microphylla*. *Journal of Natural Products*, 77(4), 1088-1092.
- Calzada, F., Bautista, E., Barbosa, E., Salazar-Olivo, L., Alvidrez-Armendáriz, E., Yépez-Mulia, L. 2020. Antiprotozoal activity of secondary metabolites from *Salvia circinata*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 30, 593-596.
- Carlini, L., Tancreda, G., Iobbi, V., Caicci, F., Bruno, S., Esposito, A., Calzia, D., Benini, S., Bisio, A., Manni, L., Schito, A, Traverso, C.E., Ravera, S., Panfoli,

- I. (2022). The Flavone Cirsiol from *Salvia x jamensis* Binds the F1 Moiety of ATP Synthase, Modulating Free Radical Production. *Cells*, 11, 3169.
- Keller, C.P., Barkosky, R. R., Seil, J. E., Mazurek, S. A., Grundstad, M. L. (2008). The electrical response of *Phaseolus vulgaris* roots to abrupt exposure to hydroquinone, *Plant Signaling & Behavior*, 3(9), 633-640.
- de Oliveira, A.P., Borges, I.V., Pereira, E.C.V., Feitosa, T.A., Dos Santos, R.F., de Oliveira-Junior, R.G., ... da Silva Almeida, J.R.G. (2019). Influence of light intensity, fertilizing and season on the cirsiol content, a chemical marker of *Leonotis nepetifolia* (Lamiaceae). *PeerJ*, 7, e6187.
- Ehleringer, J.R., Cerling, T.E. (2002). C3 and C4 photosynthesis. *Encyclopedia of global environmental change*, 2(4), 186-190.
- Epling, C.A. (1939). Revision of *Salvia* subgenus Calosphace, *Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis*: Berlin, 110, 1–383.
- Farimani, M. M., Taheri, S., Ebrahimi, S. N., Bahadori, M. B., Khavasi, H. R., Zimmermann, S., Brun, R., Hamburger, M. (2012). Hydrangenone, a new isoprenoid with an unprecedented skeleton from *Salvia hydrangea*. *Organic Letters*, 14(1), 166-169.
- Flores-Bocanegra, L., González-Andrade, M., Bye, R., Linares, E., Mata, R. (2017). α -glucosidase inhibitors from *Salvia circinata*. *Journal of Natural Products*, 80(5), 1584-1593.
- Gang, X., Fang, Z., Xian-Wen, Y., Juan, Z., Li-Xin, Y., Shen, X. L., Hu, Y.J., Zhao, Q. S. (2011). neo-Clerodane diterpenoids from *Salvia dugesii* and their bioactive studies. *Natural Products and Bioprospecting*, 1, 81-86.
- García-Nava, X., Fragoso-Serrano, M., Bautista, E., de Loera, D., Cortezano-Arellano, O., Calzada, F., Bedolla-García, B. Y. (2022). Amarisolide H and 15-epi-Amarisolide H, Two Diterpenoid Glucosides from *Salvia circinnata*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 32(6), 993-999.
- García-Nava, X., Fragoso-Serrano, M., Bautista, E., De Loera, D., Cortezano-Arellano, O., Calzada, F., Bedolla-García, B. (2022). Amarisolide H and 15-epi-Amarisolide H, Two Diterpenoid Glucosides from *Salvia circinnata*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 32, 993–999.
- González-Gallegos, J. G., Bedolla-García, B. Y., Cornejo-Tenorio, G., Fernández-Alonso, J. L., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M. D. R., Xifreda, C. C. (2020). Richness and distribution of *Salvia* subg. *Calosphace* (Lamiaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 181(8), 831-856.
- Jiang, Y. J., Su, J., Shi, X., Wu, X. D., Chen, X. Q., He, J., Li-Dong, S., Xiao-Nian, L., Li-Yan, P., Rong-Tao, L., Zhao, Q. S. (2016). neo-Clerodanes from the aerial parts of *Salvia leucantha*. *Tetrahedron*, 72(35), 5507-5514.
- Jurica, K., Karaconji, I. B., Šegan, S., Milojković-Opsenica, D., Kremer, D. (2015). Quantitative analysis of arbutin and hydroquinone in strawberry tree (*Arbutus*

- unedo L., Ericaceae) leaves by gas chromatography-mass spectrometry. *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju-Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 66(3), 197-202.
- Kaur, N., Chaudhary, J., Jain, A., Kishore, L. (2011). Stigmasterol: a comprehensive review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(9), 2259.
- Kiran, S.D.V.S., Rohini, P., Bhagyasree, P. (2017). Flavonoid: A review on Naringenin. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(5), 2778-2783.
- Lara-Cabrera, S. I., Pérez-García, M. D. L. L., Maya-Lastra, C. A., Montero-Castro, J. C., Godden, G. T., Cibrián-Jaramillo, A., Fisher, A.E., Porter, J. M. (2021). Phylogenomics of *Salvia* L. subgenus *Calosphace* (Lamiaceae). *Frontiers in plant science*, 2152.
- Li, J., Fronczek, F. R., Ferreira, D., Burandt Jr, C. L., Setola, V., Roth, B. L., & Zjawiony, J. K. (2012). Bis-spirolabdane diterpenoids from *Leonotis nepetaefolia*. *Journal of Natural Products*, 75(4), 728-734.
- Lin, L., Dong, Y., Zhao, H., Wen, L., Yang, B., Zhao, M. (2011). Comparative evaluation of rosmarinic acid, methyl rosmarinate and pedaltin isolated from *Rabdosia serra* (MAXIM.) HARA as inhibitors of tyrosinase and α -glucosidase. *Food chemistry*, 129(3), 884-889.
- Maldonado, E., Cárdenas, J., Bojórquez, H., Escamilla, E. M., Ortega, A. (1996). Amarisolide, a neo-clerodane diterpene glycoside from *Salvia amarissima*. *Phytochemistry*, 42(4), 1105–1108.
- Maldonado, E., Galicia, L., Chávez, M. I., Hernandez-Ortega, S. (2016). Neo-clerodane diterpenoids and other constituents of *Salvia filipes*. *Journal of Natural Products*, 79(10), 2667-2673.
- Martínez-Gordillo, M., Bedolla-García, B., Cornejo-Tenorio, G., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M. R., González-Gallegos, J. G., Lara-Cabrera, S., Zamudio, S. I. (2017). Lamiaceae de México. *Botanical Sciences*, 95(4), 780-806.
- Martínez-Gordillo, M., Fragoso-Martínez, I., del Rosario García-Peña, M., Montiel, O. (2013). Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Revista mexicana de biodiversidad*, 84(1), 30-86.
- Martínez-Gordillo, M., Fragoso-Martínez, I., Salas-Morales, S. H. (2016). *Salvia robertoana* (Lamiaceae), a new species from Oaxaca, Mexico. *Phytotaxa*, 269(4), 271-278.
- Masuoka, N., Isobe, T., Kubo, I. (2006). Antioxidants from *Rabdosia japonica*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 20(3), 206-213.

- Moazzami Farida, S. H., Radjabian, T. (2019). Phytosterols in *Salvia* seeds: content and composition and correlation with environmental parameters. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 43, 2129-2140.
- Moharram, F. A. E., Marzouk, M. S., El-Shenawy, S. M., Gaara, A. H., El Kady, W. M. (2012). Polyphenolic profile and biological activity of *Salvia splendens* leaves. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64(11), 1678-1687.
- Moreno-Pérez, G.F., González-Trujano, M.E., Martínez-Gordillo, M.J., San Miguel-Chávez, R., Basurto-Peña, F.A., Dorazco-González, A., Aguirre-Hernández, E. (2019). Amarisolide A and pedalitin as bioactive compounds in the antinociceptive effects of *Salvia circinata* (Lamiaceae). *Botanical Sciences*, 97(3).
- Ortega, A. Malodnado-Maldonado, E. (1994). 7-epi-rhyacopilane, a 5,6-secoclerodane diterpeneoerpene from *Salvia thyacophila*. *Phytochemistry*, 35 (4):1063-1064.
- Peng, X., Tan, Q., Zhang, Z., Wu, D., Xu, J., Zhou, H., Gu, Q. (2023). Discovery of neo-Clerodane Diterpenoids from *Ajuga campylantha* as Neuroprotective Agents against Ferroptosis and Neuroinflammation. *Journal of Natural Products*, 86(8), 2006-2021.
- Prisinzano, T. E., Rothman, R. B. (2008). Salvinorin A analogs as probes in opioid pharmacology. *Chemical Reviews*, 108(5), 1732-1743.
- Rivera-Chávez, J., Bustos-Brito, C., Aguilar-Ramírez, E., Martínez-Otero, D., Rosales-Vázquez, L. D., Dorazco-González, A., Cano-Sánchez, P. (2020). Hydroxy-neo-Clerodanes and 5, 10-seco-neo-Clerodanes from *Salvia decora*. *Journal of Natural Products*, 83(7), 2212-2220.
- Salinas-Arellano, E., Pérez-Vásquez, A., Rivero-Cruz, I., Torres-Colin, R., González-Andrade, M., Rangel-Grimaldo, M., Mata, R. (2020). Flavonoids and terpenoids with PTP-1B inhibitory properties from the infusion of *Salvia amarissima* Ortega. *Molecules*, 25(15), 3530.
- Sepúlveda-Cuellar, L., Duque-Ortiz, A., Yáñez-Espinosa, L., Calzada, F., Bautista, E., Pastor-Palacios, G., Bedolla-García, B.Y., Flores-Rivas, J., Badano. E.I., Douterlungne, D. (2021). Phylogenetic and chemical analyses of the medicinal plant *Salvia circinnata*: an approach to understand metabolomics differences. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 31(5), 676-688.
- Solares-Pascasio, J. I., Ceballos, G., Calzada, F., Barbosa, E., Velazquez, C. (2021). Antihyperglycemic and lipid profile effects of *Salvia amarissima* Ortega on streptozocin-induced type 2 diabetic mice. *Molecules*, 26(4), 947.
- Sprenger, H., Kurowsky, C., Horn, R., Erban, A., Seddig, S., Rudack, K., Fischer, A., Walther, D., Zuther, E., Köhl, K., Hinch, D. K., Kopka, J. (2016). The drought response of potato reference cultivars with contrasting tolerance. *Plant, Cell & Environment*, 39, 2370–2389.

- Suau, R., Cuevas, A., Valpuesta, V., Reid, M. (1991). Arbutin and ducrose in the leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*. *Phytochemistry*, 30 (8), 2555-2556.
- Tomás-Barberán, F.A., Husain, S.Z., Gil, M.I. (1988). The distribution of methylated flavones in the Lamiaceae. *Biochemical systematics Systematics and Ecology*, 16 (1): 43-48.
- Toscano, R. A., Cárdenas, J., Ortiz-Pastrana, N., Fragoso-Serrano, M., Ortega, A., Pérez-Vázquez, F. J., García-Peña, M.R., Bautista, E. (2020). NMR and SC-XRD analyses of a solid solution of diastereomers of microphyllane diterpenoids from *Salvia hirsuta*. *Journal of Molecular Structure*, 1203, 127409.
- Velázquez-Domínguez, J. A., Hernández-Ramírez, V. I., Calzada, F., Varela-Rodríguez, L., Pichardo-Hernández, D. L., Bautista, E., Herrera-Martínez, M., Castellano-Mijangos, R.D., Matus-Meza, A.S., Chavez-Munguia, B., Talamás-Rohana, P. (2020). Linearolactone and kaempferol disrupt the actin cytoskeleton in *Entamoeba histolytica*: Inhibition of amoebic liver abscess development. *Journal of Natural Products*, 83(12), 3671-3680.
- Villaseñor, J. L. (2016). Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista mexicana de biodiversidad*, 87(3), 559-902.
- Xu, G., Peng, L., Niu, X., Zhao, Q., Li, R., Sun, H. (2004). Novel diterpenoids from *Salvia dugesii*. *Helvetica chimica acta*, 87(4), 949-955.
- Xu, K.X., Xue, M.G., Li, Z., Ye, B.C., Zhang, B. (2022). Recent progress on feasible strategies for arbutin production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 914280.
- Xu, W. H., Liang, Q., Zhang, Y. J., Zhao, P. (2015). Naturally occurring arbutin derivatives and their bioactivities. *Chemistry & biodiversity*, 12(1), 54-81.
- Yildiztugay, E., Ozfidan-Konakci, C., Kucukoduk, M., Turkan, I. (2020). Flavonoid naringenin alleviates short-term osmotic and salinity stresses through regulating photosynthetic machinery and chloroplastic antioxidant metabolism in *Phaseolus vulgaris*. *Frontiers in Plant Science*, 11, 682.

3. CAPITULO III. Estudio fisiológico, anatómico y metabólico en respuesta a sequía en *Salvia reflexa*

3.1 INTRODUCCIÓN

En diferentes partes del mundo incluido México se ha encontrado una tendencia al calentamiento, especialmente en zonas áridas, mostrando un aumento en el número de días cálidos y reduciendo el número de días fríos, disminuyendo además la magnitud e intensidad de las olas de frío. En el período de 1948-2010, las precipitaciones en México se vieron afectadas con disminuciones significativas, y entre 1910 y 2010 la duración de los períodos extremadamente secos aumentó. Diversos modelos en los próximos 100 años proyectan aumentos de temperatura de 1.5 hasta 5 °C y, a pesar de que las proyecciones sobre las precipitaciones en México aún son inciertas, es posible que continúen con su disminución aumentando la sequía en las zonas áridas del país (IPCC, 2021). La sequía es considerada como uno de los tipos de estrés abiótico más severos para las plantas, ya que puede reducir su supervivencia provocando cambios o alteraciones morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, afectando su crecimiento y productividad (Caser et al., 2019).

Se considera que las plantas presentan estrés cuando no están en sus condiciones óptimas de temperatura, luz, agua y nutrientes, y su susceptibilidad puede ser diferente, dependiendo del género, de la especie e incluso de la población. El estrés puede ser provocado por factores ambientales que inducen una deformación o alteración en los organismos y, si el estrés es severo y persistente, podría provocar un daño permanente en la planta, comprometiendo su supervivencia (Valladares et al., 2004).

El estrés en plantas se clasifica de dos maneras: reversible e irreversible (Valladares et al., 2004; Feller et al., 2016). El estrés reversible puede presentarse como una respuesta de modulación, esto es que puede mostrarse como una modificación a corto plazo (cierre en las estomas, variaciones en la eficiencia cuántica efectiva del PSII o como un enrollamiento de hojas), recuperando su forma inicial cuando el estrés desaparece (Benavides et al., 2002; Valladares et al., 2004).

El estrés irreversible se presenta cuando la planta exhibe una modificación plástica que persistirá aun cuando el estrés ya no esté presente (cambios morfológicos, senescencia, cambios osmóticos), generando una respuesta de aclimatación y endurecimiento para condiciones adversas futuras (Benavides, 2002; Valladares et al., 2004; Feller et al., 2016).

En general, las plantas pueden presentar una de tres estrategias para lograr adaptarse a medios con restricciones hídricas: a) “escapar” de la sequía completando su ciclo productivo antes de que las condiciones sean más severas; b) “evitar” la sequía modificando algunos de sus procesos, como reducir la transpiración o aumentar la absorción de agua; y c) “tolerancia” a la sequía (tolerancia protoplasmática: resistencia de la membrana, limitación de las hidrolasas, efectos sobre la síntesis de proteínas) (Cávate et al., 2012). Además, han desarrollado mecanismos para su adaptación y aclimatación en respuesta al estrés hídrico a nivel anatómico y morfológico, como son el aumento de grosor de la cutícula, parénquima perivascular o presencia de tricomas (Bosabalidis et al., 2002; Moreno, 2009), con hojas más pequeñas, raíces más largas, así como también adaptaciones a nivel metabólico (plantas C₄ y CAM) (Ehleringer y Cerling, 2002).

Con el aumento de sequías severas se ha comenzado a estudiar cual será la respuesta y tolerancia de especies vegetales ante escenarios futuros. Una manera de poder estudiar estas respuestas es a través de variables fisiológicas, como la evaluación de la fluorescencia de la clorofila, la cual se ha convertido en una de las técnicas principales para evaluar aspectos fisiológicos en plantas (Bilger y Schreiber, 1990; Maxwell y Johnson, 2000). El principio de este análisis se basa en la ruta que tomará la energía absorbida: 1) fotosíntesis, 2) disipación de calor o 3) emitirlo como fluorescencia de la clorofila. Estos procesos están en continua competencia, por lo que el aumento en alguno de ellos resulta en la disminución de los otros dos, por lo que al medir la fluorescencia de la clorofila se puede obtener información sobre cambios en la eficiencia fotosintética y, entre los parámetros que se pueden utilizar para evaluarla, están la eficiencia cuántica efectiva del PSII (Φ_{PSII}),

la tasa de transporte de electrones (ETR, por sus siglas en inglés) y la disipación no fotoquímica de energía (NPQ, por sus siglas en inglés) (Bilger y Schreiber, 1990; Maxwell y Johnson, 2000; Bussotti et al., 2020). La sequía, al afectar el proceso de fotosíntesis, también puede afectar a los cloroplastos y, con ello, la concentración de las clorofilas (Razi y Muner, 2021). Las clorofilas son los pigmentos característicos de las plantas y su concentración se puede ver influenciada por factores abióticos. La cantidad de clorofila por unidad de superficie es un indicador de la capacidad fotosintética de la planta, por lo que cuantificarla puede servir como un marcador de estrés, algunos parámetros para evaluarlo son la cuantificación de las clorofilas *a* y *b*, la relación clorofila *a/b* o las clorofilas totales (Palta, 1990).

Existen otras variables fisiológicas para estudiar el estrés como son el peso seco, peso fresco y el contenido relativo de agua (RWC, por sus siglas en inglés), que indican el equilibrio hídrico de las plantas (González y González-Vilar, 2001). El RWC expresa cuál es la cantidad absoluta de agua que necesita la planta para alcanzar su saturación total y la diferencia de su porcentaje puede estar relacionado con otras variables. Cuando se tienen porcentajes de 90 a 100% puede estar relacionado con el cierre de estomas, mientras que una disminución a 90-80% se relaciona con cambios en los tejidos de la planta y alteraciones en las tasas de la fotosíntesis, y a niveles inferiores al 80% se relaciona con inhibición de la fotosíntesis y cambios en el metabolismo de la planta (González y González-Vilar, 2001).

La anatomía de los diferentes tejidos de plantas, tales como hojas, tallos y raíces, pueden servir también como una herramienta para evaluar alteraciones en las plantas por la sequía. Por ejemplo, en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y de olivo (*Olea europaea*) se ha encontrado una disminución en el parénquima de empalizada y esponjoso del mesófilo en presencia de sequía (Bosabalidis et al., 2002; Martínez et al., 2006), mientras que en plantas de *Salvia spendens* se ha observado una disminución en el grosor de los tallos, así como disminución de su floema y raíces más largas (Burnett et al., 2005).

Con el aumento de instrumentos para la cuantificación de metabolitos secundarios (MS) mediante técnicas de separación con dispositivos de detección, como son la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se ha dado un crecimiento en las investigaciones enfocadas en la respuesta de las plantas ante diferentes tipos de estrés abiótico con el comportamiento de sus MS (Arbona et al., 2013; Razi et al., 2021). La concentración de metabolitos secundarios puede variar dependiendo de la especie, la población e incluso puede variar entre individuos, además de que pueden estar presentes como mezclas complejas (Sepúlveda-Cuellar et al., 2020). En algunos estudios de estrés por sequía en plantas se ha reportado un aumento en la concentración de arbutina, betaina y prolina, pero en el caso de terpenos se ha encontrado que su concentración diferirá dependiendo de la especie (Niinemets, 2016).

El género *Salvia* tiene importancia ecológica debido a la relación mutualista específica entre sus flores y sus polinizadores, como colibríes y abejorros, debido a su forma zigomorfa (un solo plano de simetría) (Wester y Claßen-Bockhoff, 2007; Benites-Vieyra et al., 2014). Además, este género es de alta importancia económica porque posee una gran cantidad de metabolitos secundarios que cuentan con actividad benéfica para los seres humanos (farmacológica, cosmética y alimentaria) y, en México, varias especies del género han sido ampliamente utilizados desde tiempos precolombinos en la medicina tradicional (Bautista et al., 2016).

Salvia reflexa Hornem es una planta herbácea nativa de México y del sureste de Estados Unidos, y ha sido introducida al estar mezclada con productos alimenticios, actualmente está presente en Argentina, Australia, Canadá, Japón, Europa y Nueva Zelanda. Cuenta con actividad alelopática y es capaz de colonizar suelos infértiles. Esta especie cuenta con un alto contenido de compuestos tóxicos para los animales (Nieto et al., 1996; Shao et al., 2019; Gardner et al., 2021). En este capítulo se utilizarán las flavonas pedalitina y cirsiol debido a que son las flavonas aisladas más abundantes de esta población. Se eligió una población de *S. reflexa* ubicada en el estado de San Luis Potosí para realizar una simulación de estrés por sequía y evaluar su respuesta mediante variables anatómicas,

fisiológicas y metabólicas y, con ello, conocer su grado de tolerancia ante escenarios venideros futuros.

3.2 HIPÓTESIS

Plantas de *S. reflexa* estresadas por déficit hídrico presentarán alteraciones fisiológicas, así como modificaciones anatómicas y metabólicas, algunas de las cuales ayudarán a tolerar el estrés.

3.3 OBJETIVO GENERAL

Determinar la tolerancia de *S. reflexa* ante estrés hídrico a niveles ecofisiológico, anatómico y metabólico.

3.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de la condición de humedad del suelo en la respuesta fisiológica (tasa de transporte de electrones, eficiencia cuántica efectiva del PSII, clorofilas totales, biomasa y peso fresco, contenido relativo de agua) de *S. reflexa*.
- Determinar si existen diferencias anatómicas (ancho de hoja, tallo y raíz, número de vasos, número de canales de mucílago, número de cloroplastos, ancho de células colapsadas) entre las plantas de *S. reflexa* con diferentes condiciones de humedad.
- Evaluar el efecto de diferentes condiciones de humedad en la composición de metabolitos secundarios volátiles y en la concentración de las flavonas cirsilinol (**14**) y pedalitina (**16**) aisladas de las hojas de *S. reflexa*.

3.5 MATERIALES Y METODOS

3.5.1 Diseño experimental

Se germinaron semillas de *S. reflexa* en el invernadero de la División de Ciencias Ambientales del IPICYT. Se seleccionaron 45 plantas de un mes y medio de edad de aproximadamente 30 cm de altura. Se eligieron tres tratamientos para simular estrés hídrico: a) control (n = 15) con riego una vez por semana, b) sequía moderada (n = 15) con riego una vez cada 15 días y c) sequía severa (n = 15) con riego a los 30 días.

3.5.2 Evaluación del efecto del estrés hídrico en la fisiología de *S. reflexa*

Se evaluó la eficiencia cuántica efectiva del PSII (ϕ_{PSII}), la cual representa la eficiencia alcanzada por el PSII en condiciones de iluminación fotosintética (Genty 1989). Se realizaron mediciones semanales durante un mes utilizando un fluorómetro modulado (opti-sciences) en 15 plantas por tratamiento, tomando tres hojas de cada una de las plantas y promediando los valores. La eficiencia cuántica efectiva del PSII se estimó como $(\phi_{PSII}) = (F_m' - F_s) / F_m'$, donde F_m es el rendimiento máximo de la fluorescencia y F_s es el rendimiento de fluorescencia en estado estacionario. Esta variable es indicadora de pérdida de función a nivel del aparato fotosintético y sus valores óptimos suelen oscilar entre 0.80 y 0.83 (Maxwell y Johnson, 2000). La tasa de transporte de electrones (ETR, por sus siglas en inglés) también fue medida semanalmente y fue calculada mediante la ecuación $ETR = \phi_{PSII} \times PAR \times (0.84) \times (0.5)$, en donde ϕ_{PSII} es el rendimiento de PSII, PAR es la radiación fotosintética activa de la hoja, 0.84 es la proporción media estimada de la luz incidente absorbida por los fotosistemas y 0.5 considera la distribución de los fotones absorbidos por los dos fotosistemas (Ehleringer, 1981). El ETR está directamente relacionado con la generación de energía química (ATP y NADPH/H⁺), por lo que la disminución de sus valores sirve como un indicador de afectaciones de la eficiencia fotosintética (Ehleringer, 1981).

También se realizaron evaluaciones semanales del contenido de clorofilas totales con un medidor de clorofilas SPAD-502. Debido a que los datos

proporcionados por el equipo son unidades relativas de clorofilas, los datos fueron convertidos a valores de clorofilas netas (mg/cm^2) utilizando la ecuación propuesta por Coste et al. (2010) $chl = (117.10 \times \text{SPAD}) / (148.84 - \text{SPAD})$ donde SPAD son las lecturas tomadas del equipo,. se toma como clorofilas totales a la suma de la clorofila a (pigmento que transforma energía lumínica en química) y de la clorofila b (pigmento accesorio de captación de energía) (Reol, 2003).

Para obtener el contenido relativo de agua (RWC, por sus siglas en inglés), al final de experimento se tomaron hojas de aproximadamente el mismo tamaño y 3 cm de tallo de todos los tratamientos, a las cuáles se les tomó el peso fresco, el peso seco y el peso turgente (rehidratación de hojas y tallos después de 24 h de agitación en agua destilada). El RWC fue calculado mediante la fórmula $\text{RWC} = (\text{FW} - \text{DW}) / (\text{SW} - \text{DW}) \times 100$, donde FW es el peso fresco, DW es el peso seco y SW es el peso turgente (González-Salvatierra y Flores, 2019).

3.5.3 Evaluación del efecto del estrés hídrico en la anatomía de *S. reflexa*

Se recolectaron muestras de hojas, tallos y raíces de siete plantas por tratamiento, las cuales fueron fijadas en una solución de FAA para posteriormente ser deshidratadas en una serie etanólica 30-100 % con recambios de 24 horas, posteriormente se infiltraron en una serie de etanol-metacrilato 30-100% en periodos de 24 horas a vacío. Las muestras fueron incluidas en resina Technovit 7100 y cortadas mediante un microtomo rotatorio (Leica RM2125RT) a $5 \mu\text{m}$ de grosor y teñidas con azul de cresilo brillante para posteriormente ser observadas en un microscopio óptico (Leica EZ4D). Se realizaron mediciones de ancho de mesófilo, de epidermis en hoja, de tallo, de raíz y de floema secundario, así como conteos de número de cloroplastos, de canales del tallo y de vasos del tallo y de la raíz mediante el programa de ImageJ.

3.5.4 Evaluación del efecto del estrés hídrico en la presencia de metabolitos secundarios cirsiol y pedalitina

Sustancias químicas y reactivos

Para los análisis de HPLC los disolventes fueron de grado HPLC (JT Baker) y se utilizó agua desionizada (MilliQ). Los compuestos de referencia para los análisis en este estudio fueron las flavonas cirsiol (**14**) y pedalitina (**16**), previamente aisladas, de acuerdo con la metodología del Capítulo II. La pureza de las flavonas se determinó por HPLC-PDA y RMN de ^1H . En todos los casos la pureza estaba por encima del 95%.

Análisis GC-MS

Se colectaron hojas de *S. reflexa* de cada tratamiento al final del experimento, se dejaron secar a temperatura ambiente para posteriormente ser molidas y maceradas en acetona (3 x 50 mL) durante 48 h para obtener un residuo. Muestras independientes de 10 mg de cada extracto fueron disueltas en 2 mL de una mezcla de hexano-acetona-MeOH (1:2:1). Volúmenes de 0.2 μL de esta disolución del extracto fueron inyectados en un cromatógrafo de gases Agilent GC-7890b, acoplado a un espectrómetro de masas Agilent EM-5877A utilizando una columna capilar GC DB 5ht (30 m $\times$ 0,320 mm d.i. $\times$ 0,1 μm , Agilent). La temperatura del puerto de inyección se mantuvo a 220 $^{\circ}\text{C}$ y la temperatura del horno se mantuvo a 80 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 min y luego se aumentó en una proporción de 3, 5 y 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta llegar a 100, 150 y 330 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. La temperatura final se mantuvo durante 9 min. El análisis de cada extracto se realizó por triplicado y los compuestos volátiles fueron identificados por desconvolución utilizando la base de datos W10N11 (Wiley10Nist11).

Análisis por HPLC-PDA

Las curvas de calibración de cirsiol (330 nm) y pedalitina (330 nm) se realizaron utilizando concentraciones que oscilaban entre 0.0039 mg/mL (0,0390 μg) y 0.1250 mg/mL (1.25 μg). Las muestras de cada extracto de acetona se disolvieron en MeOH a una concentración de 10 mg/mL y se analizaron con un cromatógrafo Agilent 1200

HPLC equipado con detector PDA Agilent G1315D y detector de fluorescencia Agilent G1321A. La separación por HPLC se realizó en una columna Synergi Polar RP (Phenomenex, 5 μ m, 4,6 $\times$ 250 mm) con un gradiente de elución de ácido acético al 1 % (A) y acetonitrilo (B) en los siguientes tiempos: 0 min, 80 % A; 1 min, 80% A; 31 min, 40% A, 33 min, 20% A; 43 min, 20% A, siempre utilizando un caudal de 0.8 mL/min con un volumen de inyección de 5 μ L para los estándares y 10 μ L para los extractos. Los cromatogramas se midieron a 240 y 330 nm utilizando el detector PDA. Cada extracto se analizó por triplicado.

4.5.5 Análisis estadísticos

Se realizó un análisis de regresión lineal de modelos mixtos para evaluar el impacto de los tratamientos de riego sobre las variables eficiencia cuántica efectiva del PSII, tasa de transporte de electrones y clorofilas totales. Las variables ecofisiológicas restantes (peso fresco, pesos seco y RWC), las variables anatómicas y la cuantificación de flavonas se realizaron mediante ANOVAs de una vía. En los casos en que se encontraron efectos significativos, se realizaron pruebas de Tukey para encontrar diferencias entre los tratamientos. Debido al alto número de compuestos volátiles, se realizó un PCA de los MS de los tres tratamientos de riego y mediante la contribución de variables se eligieron los de mayor contribución. Para encontrar la relación entre las variables fisiológicas, anatómicas y metabolómicas evaluadas, se realizó otro análisis de componentes principales (PCA). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa R versión 3.6.3.

3.6 RESULTADOS

3.6.1 Evaluación del efecto del estrés hídrico en la fisiología de *S. reflexa*.

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en la eficiencia cuántica efectiva del PSII (ϕ_{PSII}) ($p < 0.01$), se dio una disminución del 10% de la eficiencia en el tratamiento de sequía severa respecto al control. El efecto negativo de la sequía, tanto moderada como severa, se mostró a partir de la tercera semana después de inducir estrés en la cual disminuyó el ϕ_{PSII} en ambos tratamientos. En la cuarta semana la disminución del ϕ_{PSII} fue mayor en el tratamiento de sequía severa (Fig. 12).

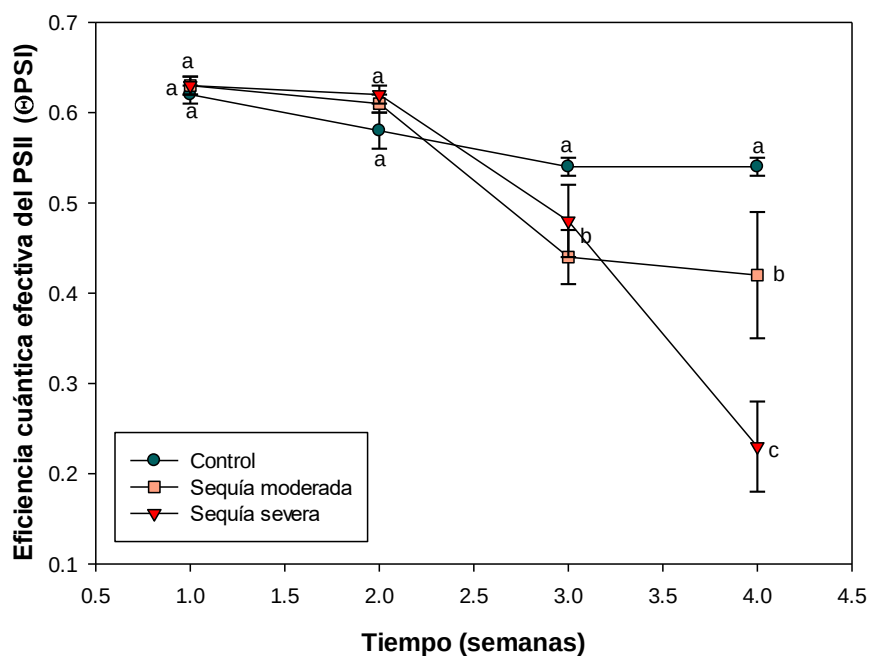


Figura 12. Eficiencia cuántica efectiva del PSII en plantas de *S. reflexa* bajo tratamientos de sequía a lo largo de un mes.

También se encontraron diferencias en la tasa de transporte de electrones entre tratamientos ($p < 0.01$), en el caso de la sequía moderada esta disminuye en un 25% y en el caso de la sequía severa esta disminuye un 29% respecto al control. El efecto negativo de la sequía, tanto moderada como severa, se mostró a partir de la segunda semana, en la cual disminuyó de manera similar en ambos tratamientos. En la cuarta semana se da una mejoría en el tratamiento de sequía moderada (después del riego) sin embargo, la sequía severa continuó disminuyendo (Fig. 13).

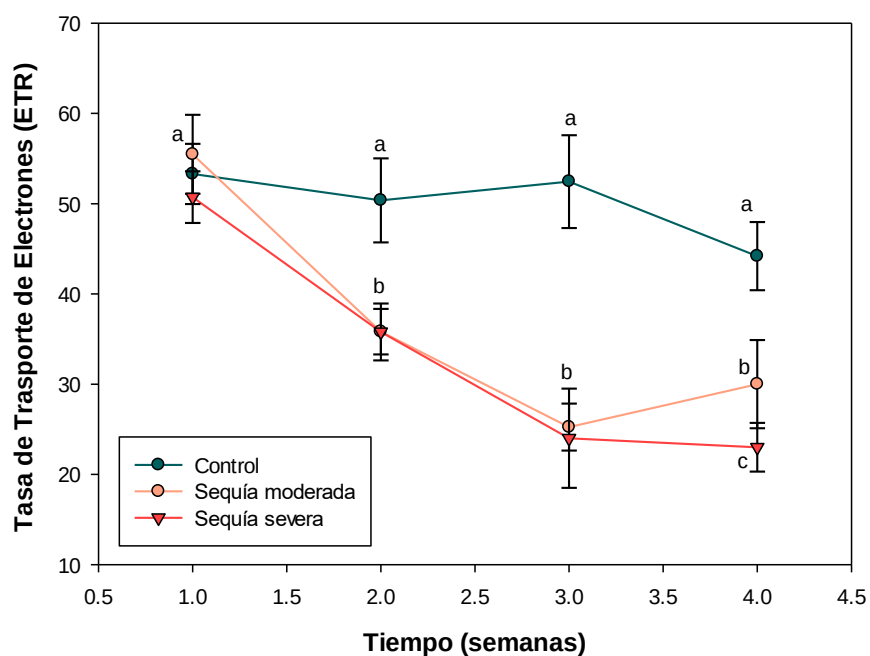


Figura 13. Tasa de transporte de electrones en plantas de *S. reflexa* bajo tratamientos de sequía a lo largo de un mes.

En el caso de la cuantificación de clorofilas totales, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.01$), se da una disminución de 10 mg cm^2 en el tratamiento de sequía moderada y de 12 mg cm^2 en la sequía severa respecto al control. El efecto negativo de los tratamientos de sequía moderada y severa se mostró a partir de la tercera semana, en la cual disminuyeron las clorofilas en ambos tratamientos. En la cuarta semana se da una mejoría en la cantidad de clorofilas en la sequía moderada (después de riego), sin embargo, en la sequía severa continúa descendiendo (Fig. 14).

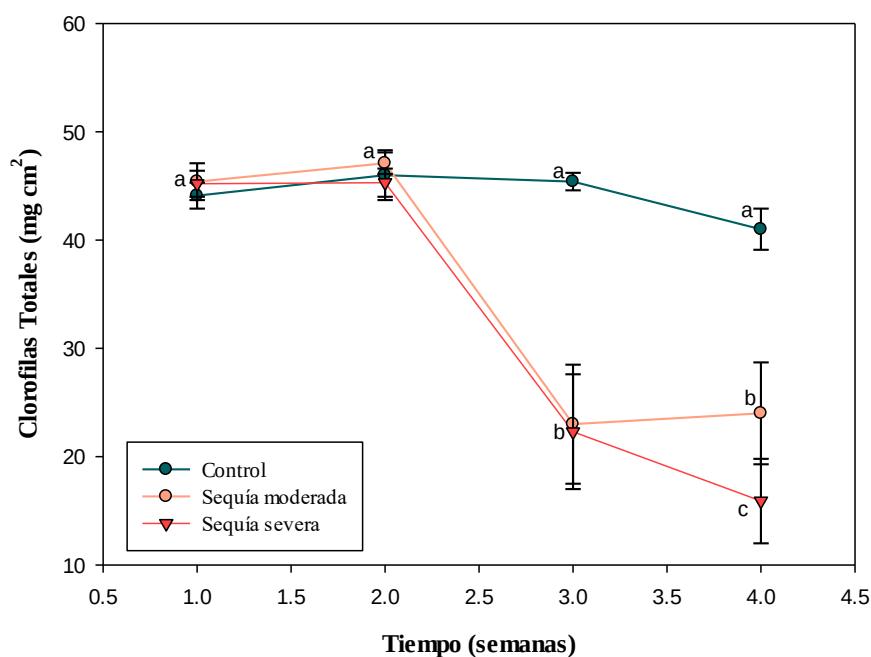


Figura 14. Clorofilas totales en plantas de *S. reflexa* bajo tratamientos de sequía a lo largo de un mes.

Se encontraron diferencias en la cantidad de biomasa entre tratamientos ($F = 3.75$, $p = 0.04$), con una disminución significativa en ambos tratamientos de sequía con respecto al control (Fig. 15). También se encontraron diferencias en el peso fresco entre tratamientos, siendo también mayor en el control que en los dos tratamientos de sequía ($F = 15.76$, $p < 0.01$), los cuales fueron similares entre ellos (Fig. 15).

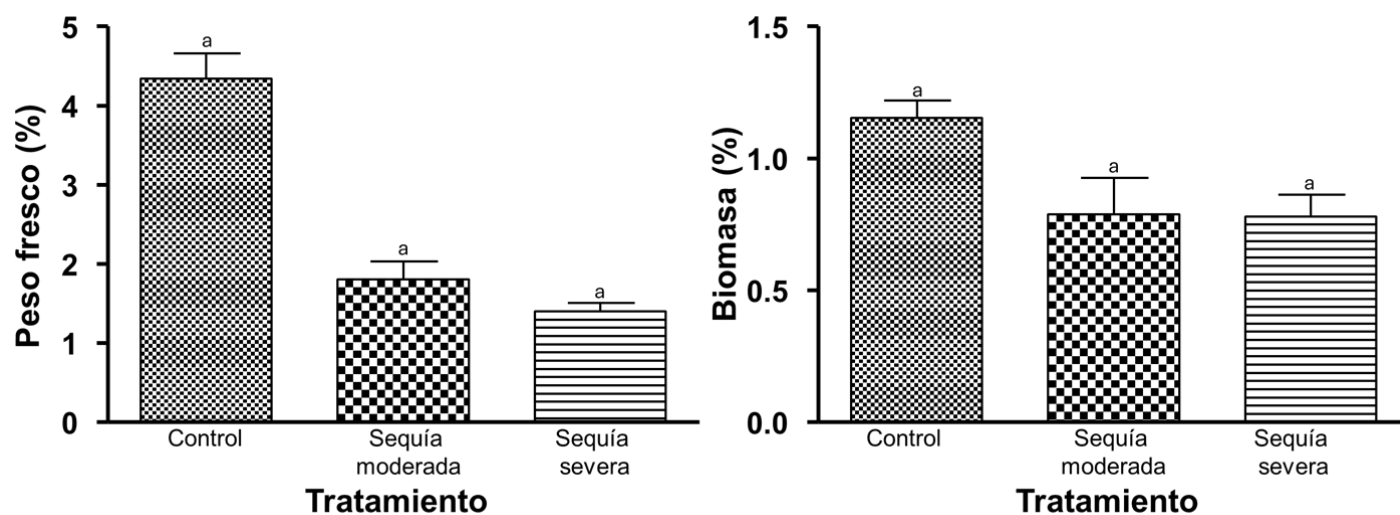


Figura 15. Biomasa (peso seco) y peso fresco en plantas de *S. reflexa* bajo tratamientos de sequía.

Por último, se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en el RWC de la hoja ($F = 7.26$, $p = 0.013$), siendo en la sequía severa en donde hubo menor RWC (Fig. 16). En el caso del RWC de tallo tampoco se observan diferencias entre el tratamiento control y el tratamiento de sequía moderada ($F = 10.84$, $p < 0.01$), sin embargo, al igual que en la hoja, con una sequía severa el RWC disminuyó significativamente (Fig. 16).

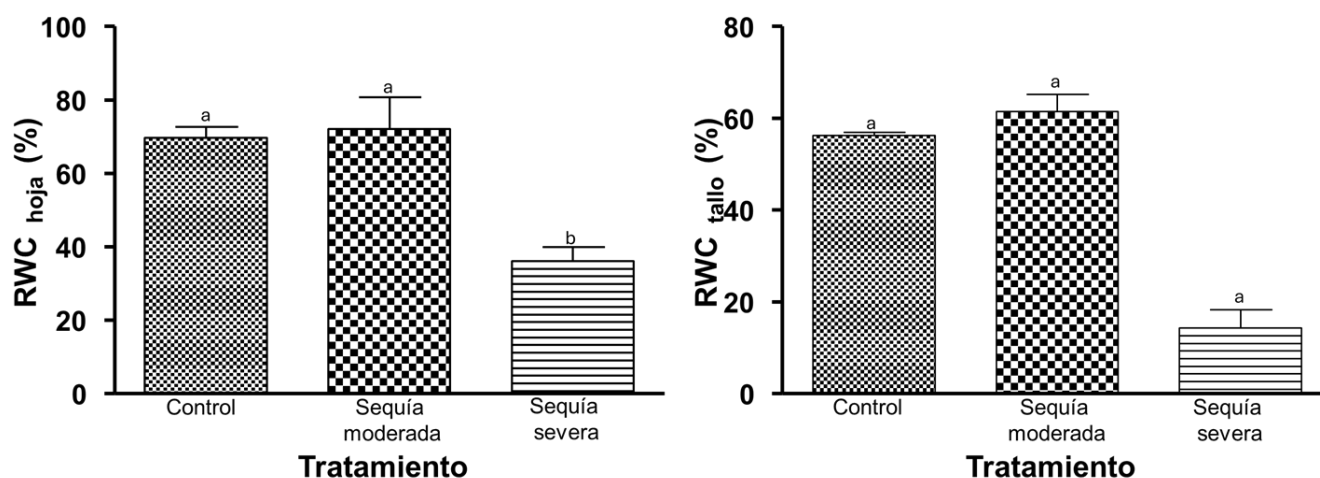


Figura 16. Comparación de contenido relativo de agua (RWC) en plantas de *S. reflexa* bajo tratamientos de sequía en: A) hoja y B) tallo.

3.6.2 Evaluación del efecto del estrés hídrico en la anatomía de *S. reflexa*

Hoja

Se encontraron diferencias entre tratamientos en el ancho del mesófilo ($F = 80.86$, $p < 0.01$), pero no hubo diferencias entre el tratamiento de sequía moderada y el control. Sin embargo, si hubo una disminución considerable en presencia de sequía severa (Fig. 17, Tabla 7). Al realizar la cuantificación de cloroplastos tampoco se encontraron diferencias entre el tratamiento control y la sequía moderada, pero si con el tratamiento de sequía severa, observando una disminución de estos en presencia de estrés severo ($F = 11.8$, $p < 0.01$) (Fig. 18, Tabla 7). Hubo una pequeña disminución en el ancho de epidermis bajo sequía severa. Sin embargo, no se

encontraron diferencias significativas con los demás tratamientos ($F = 3.005$, $p = 0.051$). Se observó un mayor número de compuestos de reserva, así como deshidratación de las células de parénquima esponjoso y de empalizada, en el tratamiento de sequía severa, pero no fueron cuantificados.

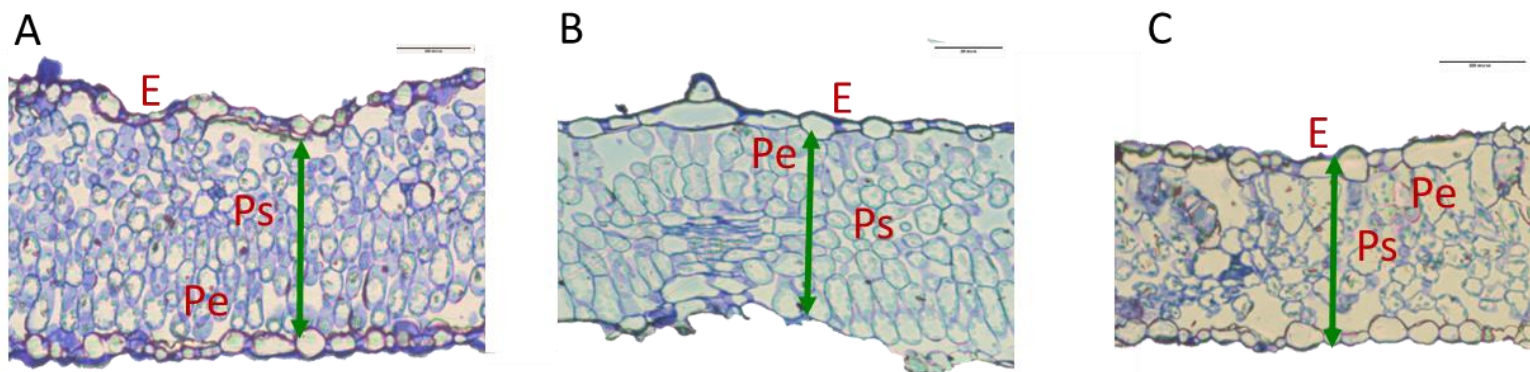


Figura 17. Comparación de la anatomía de hojas de *S. reflexa* ante tratamientos de sequía: A) control, B) sequía moderada y C) sequía severa. Ps: parénquima esponjoso, Pe: parénquima en empalizada y e: epidermis.

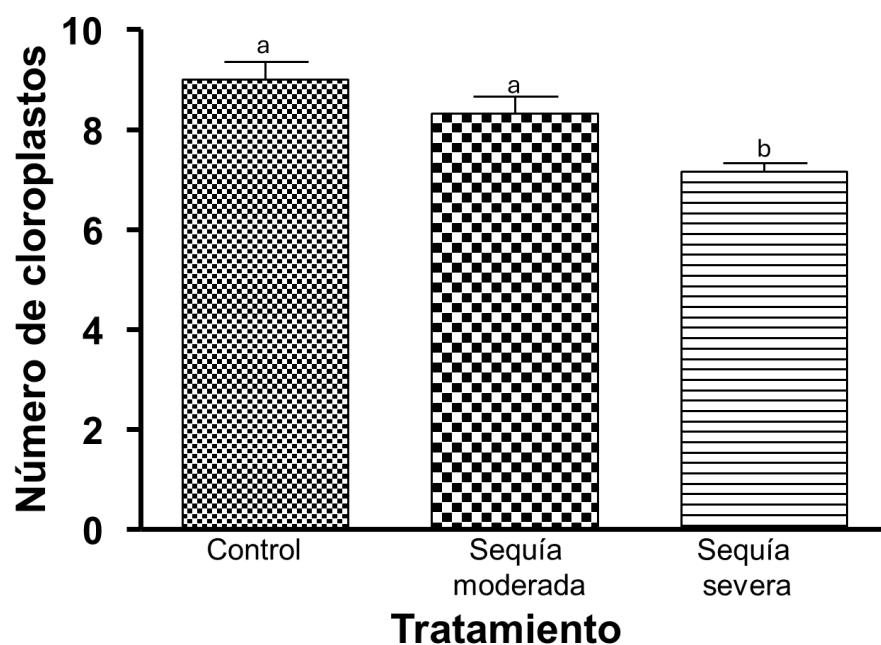


Figura 18. Número de cloroplastos de *S. reflexa* ante tratamientos de sequía.

Tallo

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en el ancho del tallo ($F = 4.47$, $p = 0.015$), pero no hay una diferencia considerable entre el tratamiento control con el tratamiento de sequía moderada. Sin embargo, en el tratamiento de sequía severa hubo una disminución significativa debido al colapso de las células de parénquima clorofílico y parénquima esponjoso (Fig. 19 y Tabla 7). También se observaron diferencias significativas entre tratamientos en el número de vasos del sistema vascular ($F = 30.53$, $p < 0.01$) y en presencia de estrés se dio una disminución de vasos respecto al control. No obstante, no se encontraron diferencias entre ambos tratamientos de sequía (Tabla 7). Se encontraron diferencias entre tratamientos en el número de canales de mucílago ($F = 4.86$, $p = 0.015$), con un aumento en el número de canales en los tratamientos de sequía severa y sequía moderada con respecto al control. Sin embargo, no hubo diferencias entre los tratamientos de sequía. Al final del experimento, casi en su totalidad, los tallos de sequía moderada y severa tenían un aspecto mucilaginoso.

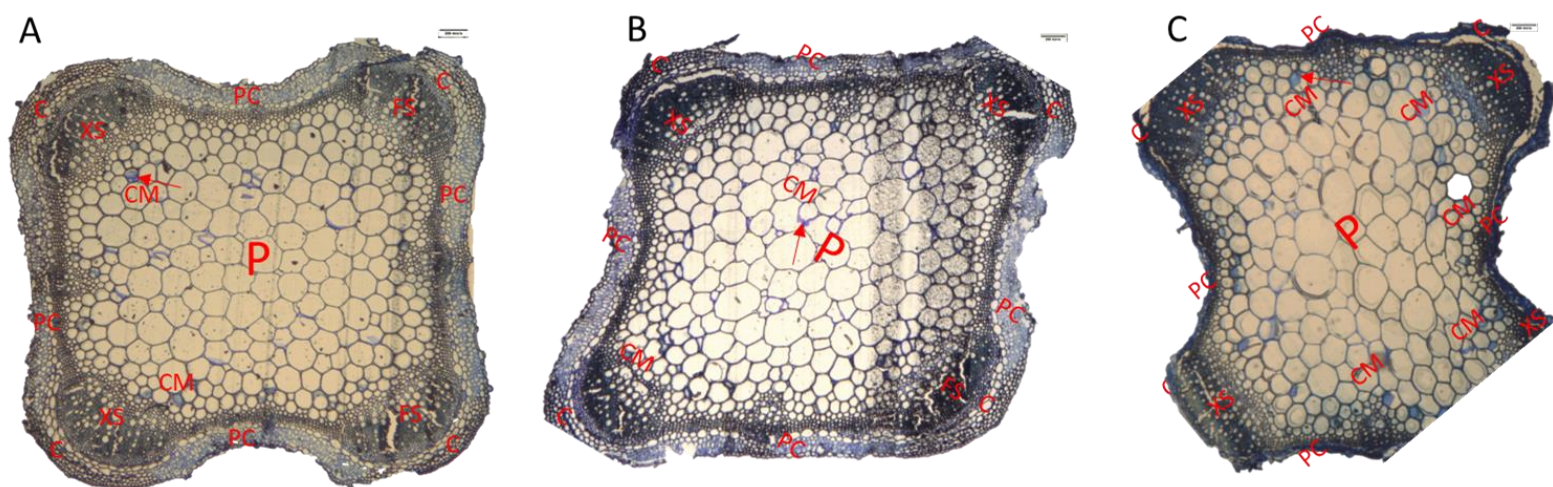


Figura 19. Comparación de tallos de *S. reflexa* entre tratamientos: A) control, B) sequía moderada y C) sequía severa. P: parénquima, CM: canal mucilaginoso, XS: xilema secundario, C: colénquima, FS: floema secundario. Parénquima clorofílico.

Raíz

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en el grosor de la raíz ($F = 10.67$, $p < 0.01$). No se encontraron diferencias entre el tratamiento control y el tratamiento de sequía moderada. Sin embargo, en el tratamiento de sequía severa se encontró un aumento en el grosor en respuesta al estrés (Fig. 20, Tabla 7). Se observó un menor número en el control que en ambos tratamientos de sequía; sin embargo, las diferencias no fueron significativas ($F = 1.30$, $p = 0.29$) (Fig. 20, Tabla 7). Por último, se encontraron diferencias entre tratamientos en el grosor del floema secundarios ($F = 9.32$, $p < 0.01$). No hubo diferencias entre el tratamiento control y el tratamiento de sequía moderada. Sin embargo, en el tratamiento de sequía severa hubo una disminución considerable debido al colapso de las células por la baja disponibilidad de agua (Fig. 20, Tabla 7).

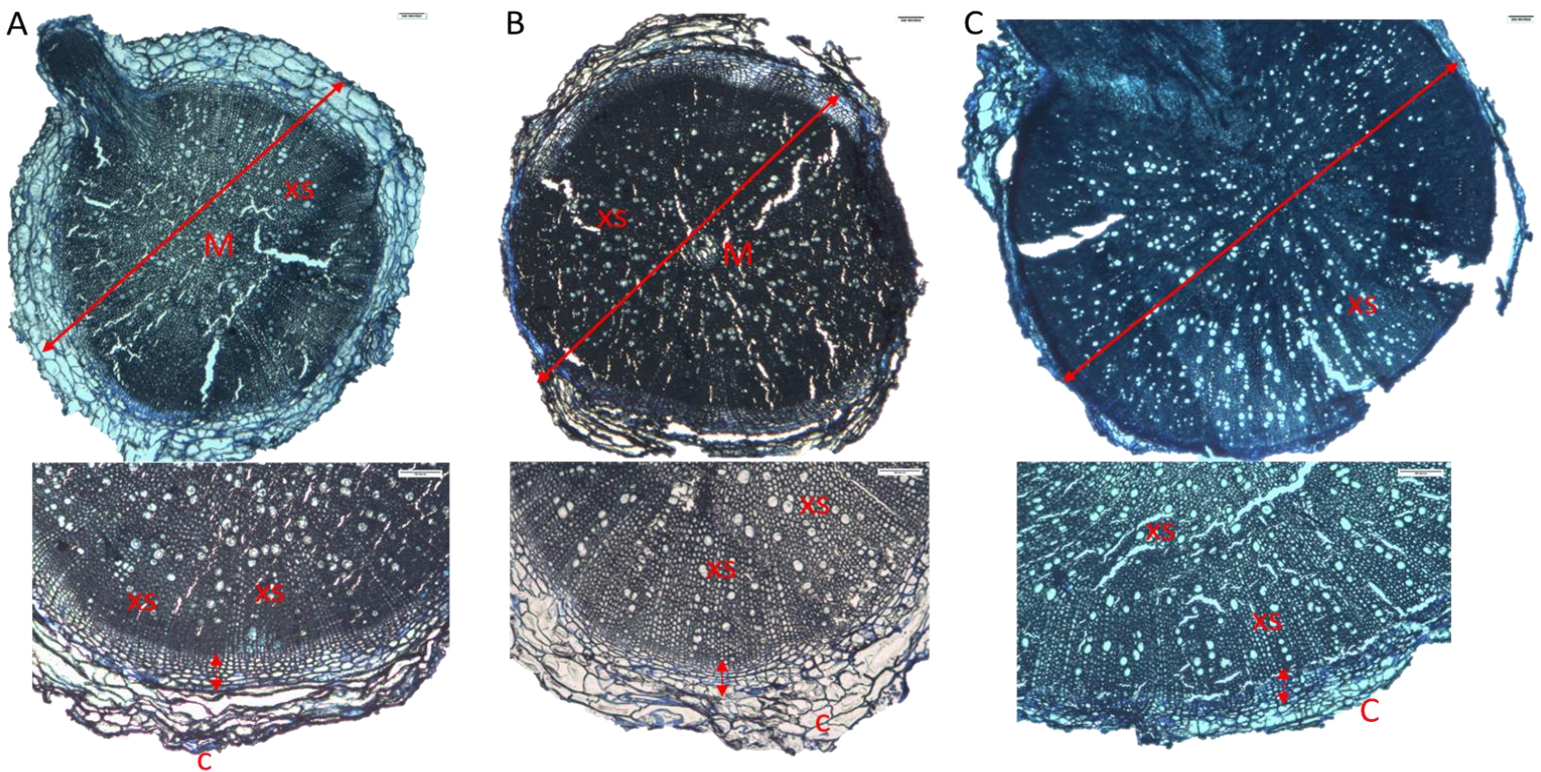


Figura 20. Comparación de cortes anatómicos de *S. reflexa* entre tratamientos: A) control, B) sequía moderada y C) sequía severa. M: medula, xs: xilemasecundario, c: residuos de córtex.

Tabla 7. Comparación de variables anatómicas de *S. reflexa* entre tratamientos de sequía.

Variable	Tratamientos		
	Control	Sequía moderada	Sequía severa
Ancho de hoja	477.8 ± 9.3 ^a	491.08 ± 11.7 ^a	310.4 ± 10.8 ^b
Ancho de epidermis	34.46 ± 1.6 ^a	35.5 ± 1.9 ^a	29.9 ± 1.4 ^a
Ancho de tallo (μ)	4350.97 ± 155.9 ^a	4043.3 ± 200 ^{a,b}	3602.08 ± 174 ^b
Número de vasos (tallo)	27 ± 0.5 ^a	21 ± 0.4 ^b	22 ± 0.6 ^b
Número de canales	21 ± 0.8 ^a	25 ± 1.5 ^b	25 ± 1.1 ^b
Ancho de raíz (μ)	742.14 ± 39.08 ^a	692.77 ± 53.90 ^a	1000.06 ± 56.7 ^b
Ancho de floema secundario	178.15 ± 9.3 ^a	172.31 ± 12.2 ^a	125.91 ± 5.1 ^b
Número de vasos (raíz)	44.5 ± 1.7 ^a	47.8 ± 2.19 ^a	48.5 ± 1.6 ^a
Letras diferentes implican diferencias significativas (p<0.5)			

3.6.3 Diferencias en la composición de metabolitos secundarios en *S. reflexa* ante presencia de estrés hídrico.

Se analizaron extractos obtenidos de cada uno de los tratamientos mediante GM-MS y HPLC-PDA. En el análisis de los constituyentes volátiles, se empleó GC-MS. Los resultados indicaron la presencia de 33 metabolitos, de los cuales 27 son alcanos, dos cicloalcanos, dos ácidos grasos, un fitoesterol y dos triterpenoides. Los metabolitos undecano, dodecano, 2,6-dimetil undecano, tridecano, tetradecano, 2,2-dimetil eicosano, metil palmitato, eicosano, α - amirina y β - amirina son los compuestos que se encontraron tanto en el grupo control como en ambos tratamientos de sequía. Conforme aumentó la sequía se dio una disminución en la concentración de los compuestos de tipo alcano y un aumento en la concentración de la α y β amirina. En el tratamiento control se encontraron 25 metabolitos de los cuales el hexadecano, 2,6,10,14-tetrametil, 2,2-dimetil octadecano y γ -sitosterol son los compuestos que están presentes solo en este tratamiento (condiciones óptimas), los cuales desaparecieron en presencia de estrés incluso moderado. El tratamiento de sequía moderada fue el que mostró mayor número de metabolitos presentes (29 metabolitos) y mayor número de metabolitos específicos entre los que se encuentran el 1 metil-ciclododeceno, 3,5,24-trimetil-tetracontano, 2 metil tridecano, 2-pentadecanona, docosano, hexacosano y nanocosano. En el tratamiento de sequía severa se encontró el menor número de metabolitos (22 metabolitos). Sin embargo, se encontraron tres compuestos específicos para este tratamiento: pentacosano, heptacosano y octacosano. También se encontraron cuatro metabolitos característicos que estuvieron presentes en ambos tratamientos de sequía: iso-undecano, dodecano, 2,6,10-trimetil-isopropil-14-metil-pentadecanoato y tricosano (Tabla 8).

Tabla 8. Metabolitos volátiles de hojas de *S. reflexa* detectados por GS-MS. Los valores de la tabla indican los promedios de las cantidades normalizadas de los compuestos volátiles (% $\pm$ e.e), detectados en el extracto de las partes aéreas de los tratamientos.

No. Compuesto	tr(min)	Clase	Nombre del compuesto	Tratamientos		
				Control	Sequía moderada	Sequía severa
1	3.245	alcano	undecano	5.69 $\pm$ 0.87	4.3 $\pm$ 0.5	3.2 $\pm$ 0.9
2	3.382	cicloalcano	2-methyldecalin	1.77 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.2	0
3	3.638	cicloalcano	metilcyclodeceno	0	0.9 $\pm$ 0.1	0
4	5.048	alcano	dodecano	10.90 $\pm$ 0.4	7.8 $\pm$ 1.3	6.6 $\pm$ 1.3
5	5.371	alcano	2,6-dimetilundecano	3.3 $\pm$ 1.9	3.1 $\pm$ 0.3	2.7 $\pm$ 1.1
6	6.86	alcano	iso-undecano	0	4.09 $\pm$ 1.1	3.6 $\pm$ 1.8
7	7.635	alcano	tridecano	15.73 $\pm$ 1.1	11.4 $\pm$ 1.5	9.7 $\pm$ 1.7
8	8.149	alcano	tetracontano, 3,5,24-trimetil	0	2.2 $\pm$ 0.3	0
9	8.154	alcano	fitano	1.8 $\pm$ 0.9	0	0
10	8.713	alcano	heptylcyclohexano	0.56 $\pm$ 0.2	0.67 $\pm$ 0.1	0
11	9.559	alcano	tridecano, 2 metil	0	1 $\pm$ 0.1	0
12	9.937	alcano	dodecano, 2,6,10-trimetil	0	1.8 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.3
13	10.634	alcano	tetradecano	4.5 $\pm$ 0.5	3.3 $\pm$ 0.9	2.7 $\pm$ 0.4
14	20.128	alcano	octadecano	0.5 $\pm$ 0.2	0.41 $\pm$ 0.1	0
15	20.807	alcano	pentadecanona	1.5 $\pm$ 0.1	0	1.2 $\pm$ 0.09
16	20.81	alcano	2-pentadecanona	0	1.3 $\pm$ 0.09	0
17	21.818	alcano	2,2-dimetiloctadecano	1.03 $\pm$ 0.5	0	0
18	21.821	alcano	2,2-dimetileicosano	1.6 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.1	0.99 $\pm$ 0.1
19	21.948	ácido graso	palmitato metilico	1.2 $\pm$ 0.07	1.06 $\pm$ 0.1	0.55 $\pm$ 0.1
20	23.134	ácido graso	i-propil 14 metil-pentadecanoato	0	0.6 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.06
21	24.89	alcano	docosano	0	0.45 $\pm$ 0.1	0
22	25.787	alcano	tricosano	0	0.45 $\pm$ 0.1	0.58 $\pm$ 0.03
23	27.434	alcano	pentacosano	0	0	1.2 $\pm$ 0.1
24	28.929	alcano	tetracosano	1.7 $\pm$ 0.9	0	7.5 $\pm$ 0.9
25	28.934	alcano	heptacosano	0	0	2.5 $\pm$ 0.3
26	29.448	alcano	eicosano	1.17 $\pm$ 0.1	0.48 $\pm$ 0.25	2.1 $\pm$ 0.1
27	29.452	alcano	hexacosano	0	0.8 $\pm$ 0.2	0
28	30.324	alcano	nanocosano	0	3.2 $\pm$ 1.06	0
29	31.622	alcano	heneicosano	0.9 $\pm$ 0.3	4.1 $\pm$ 2.7	0
30	31.623	alcano	octacosano	0	0	19.9 $\pm$ 2.08
31	32.836	fitoesterol	γ sitosterol	14.71 $\pm$ 2.5	0	0
32	32.988	triterpenoide	β amirina	3.1 $\pm$ 0.5	2.06 $\pm$ 0.6	3.31 $\pm$ 0.2
33	32.252	triterpenoide	α amirina	4.9 $\pm$ 0.6	3.1 $\pm$ 0.7	5.9 $\pm$ 0.4

Para el caso de la evaluación de las flavonas (metabolitos no volátiles), se encontró una disminución en la cantidad de extracto en el tratamiento de sequía severa ($F=38.61$, $p < 0.01$). Por medio del análisis de HPLC-PDA se encontraron concentraciones de cirsiol (**14**, 1.4 ± 0.7 mg/g) y de pedalitina (**16**, 0.79 ± 0.4 mg/g). La presencia de estos compuestos fue confirmada por el tiempo de retención en comparación con los compuestos de referencia mediante el uso de un detector de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 250 nm y una longitud de onda de emisión de 410 nm. Las diferencias de concentración no fueron significativas entre tratamientos para el cirsiol (**14**) ($F = 1.3$, $p = 0.3$), pero hubo una tendencia a incrementar conforme incrementa el estrés. En el caso de la pedalitina (**16**), hubo una tendencia de mayor concentración en el control que en los dos tratamientos de sequía, aunque las diferencias no fueron significativas ($F= 0.26$, $p = 0.77$) (Tabla 9).

Tabla 9. Cuantificación de cirsiol (**14**) y pedalitina (**16**) mediante HPLC-PAD en extracto de cada uno de los tratamientos.

Entrada	Control	Sequía moderada	Sequía severa
% extracto m/m	66.33 ± 12.6^a	66.33 ± 11.89^a	54.4 ± 6.5^b
Cirsiol (mg/g extracto)	1.4 ± 0.7^a	1.93 ± 0.6^a	2.03 ± 0.1^a
Pedalitina (mg/extracto)	0.79 ± 0.4^a	0.94 ± 0.2^a	0.93 ± 0.5^a
Medidas a 330 nm			
Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.5$).			

A partir del análisis de componentes principales de los compuestos volátiles y no volátiles se eligieron los MS con mayor contribución: tetracosano, octacosano, heptacosano, pentacosano, 2-metildecilina, 2-pentadecanona, tridecano, fitano, dodecano, 2,6,10 trimetil y 2,2-dimetiloctadecano (Fig. 21, Apéndice 38). En la Figura 22 se puede observar la relación de los metabolitos únicos de cada uno de los tratamientos agrupados en cada uno de los ejes de la gráfica, así como la relación de los metabolitos que coinciden en ambos tratamientos de sequía.

Para saber si existe una relación de los MS y los cambios fisiológicos y anatómicos se llevó a cabo un PCA. Las dos primeras funciones del análisis explican el 61.3% del total de la variación de los datos (primera función 39.3% y segunda función 22%). En la primera función se encontró una relación entre las variables peso fresco y mayor número de vasos en tallo con los metabolitos únicos del grupo control fitano y 2,2-dimetiloctadecano. En el caso de la sequía severa, se observó una relación entre sus metabolitos únicos heptacosano, octacosano y pentacosano, con el aumento en el número de vasos y ensanchamiento de la raíz (Fig. 22). En la segunda función, se observa la relación de los metabolitos tridecano (presente en los tres tratamientos) y 2,6,10-trimetil dodecano (presente en sequía moderada y severa) y el aumento en el número de canales de mucílago con los tratamientos de sequía.(Fig. 22)

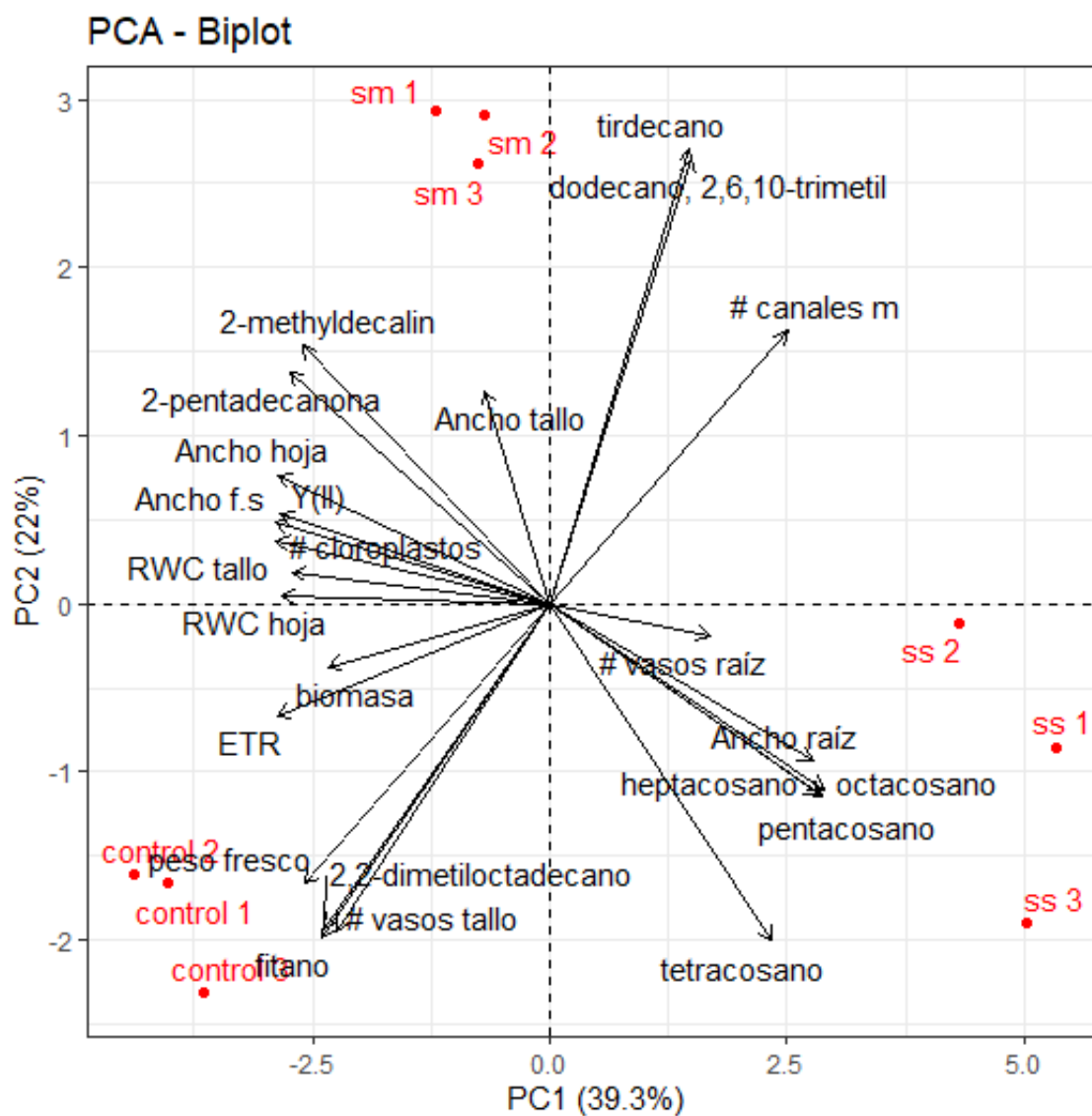


Figura 22. Análisis de componentes principales de los metabolitos secundarios de mayor contribución con las variables fisiológicas y anatómicas. Sm: sequía moderada, ss: sequía severa.

3.7 DISCUSIÓN

La hipótesis sobre que las plantas de *S. reflexa* mostrarán alteraciones fisiológicas en los tratamientos de sequía en relación con el control fue sustentada. Los estudios sobre fisiología en plantas nos ayudan a comprender los factores que pueden determinar o influir en la distribución, supervivencia y crecimiento de las especies (Valladares et al., 2004). En estudios realizados en diversas especies de *Salvia*, tales como *S. sinaloensis*, *S. mylthioriza*, *S. dolomitica* y *S. officinalis* se ha observado que, en presencia de sequía moderada o severa, se da una disminución en la eficiencia cuántica efectiva del PSII, en la concentración de clorofilas y en la cantidad de biomasa (Bettaieb et al., 2011; Savi et al., 2016; Caser et al., 2018; 2019). Estos resultados coinciden con las respuestas encontradas en *S. reflexa*, disminuyendo la eficiencia cuántica efectiva del PSII desde una sequía moderada, llegando a valores más bajos con una sequía severa. junto con la disminución en la concentración de clorofilas, especialmente bajo sequía severa, y disminución en la biomasa conforme aumenta la sequía.

En un estudio realizado en una población de *S. reflexa* en Australia, se encontró que, a pesar de que se da una disminución en su eficiencia fotosintética y en su biomasa, las plantas logran tolerar la sequía y mostraron además una recuperación cuando el estrés fue retirado (Weerakoon y Lovett, 1986). Esto contrasta con la población de San Luis Potosí, que no resistió la sequía severa y por tanto no logró recuperarse. En cuanto al RWC, se ha encontrado que algunas especies son más susceptibles a la sequía que otras. Por ejemplo *S. officinalis* se ve afectada desde una sequía moderada por lo que su RWC disminuye (Bettaieb et al., 2011). En cambio, *S. sinaloensis* a pesar del estrés hídrico mantiene sus valores constantes (Caser et al., 2019). En nuestro caso, se encontró que *S. reflexa* es una especie susceptible ya que, si bien no se observaron cambios en el RWC de hoja y tallo bajo sequía moderada, sus valores disminuyeron significativamente bajo sequía severa.

Asimismo, otros autores han encontrado que bajo estrés hídrico las hojas disminuyen más su eficiencia hidráulica en comparación con los tallos, actuando como un “fusible hidráulico” y evitando una deficiencia severa del tallo (Munne-

Bosch y Alegre, 2004; Bucci et al., 2012; Savi et al., 2016). Aparentemente, una de las maneras de sobrevivir al estrés hídrico es manteniendo la funcionalidad del sistema hidráulico del tallo para especies que habitan en condiciones adversas (Savi et al., 2016). Sin embargo, estos estudios no contemplan las alteraciones anatómicas que se pueden generar por la presencia de estrés, como en el caso de *S. reflexa*, que para mantener la funcionalidad de su tallo aumenta su número de canales de mucílago y disminuye su número de vasos para lidiar con la disminución de disponibilidad de agua, además de que se da una contracción de los tallos conforme va aumentando la sequía debido al colapso del parénquima clorofílico.

A pesar de que muchas especies de zonas áridas han desarrollado adaptaciones anatómicas para medios adversos, como presencia de tricomas, cutículas más gruesas o enrollamiento de las hojas, en presencia de estrés hídrico se han encontrado otras alteraciones especialmente en las hojas que son los órganos encargados de la transpiración. En especies como *Olea europea* o *Glycine max* se ha observado disminución de células de parénquima en empalizada y esponjoso ocasionando una disminución en el ancho del mesófilo, así como una disminución del ancho de la epidermis, siendo el efecto contrario (ensanchamiento) un indicador de tolerancia a estrés (Boughallebb et al., 2014). En el caso de *S. reflexa* ocurre una pequeña disminución del grosor de su epidermis en el tratamiento de sequía severa, que podría estar ayudando a resistir el colapso de sus células (Bosabalidis y Kofidis, 2002; Kulkarni et al., 2009; Makbul et al., 2011). Además, se observó una disminución en el ancho del mesófilo con una sequía severa y una disminución de parénquima en empalizada y esponjoso, así como una disminución en el número de cloroplastos.

Las plantas son sistemas complejos, en donde están conectadas las respuestas anatómicas y fisiológicas, por lo que existe una relación entre la disminución de la eficiencia cuántica efectiva del PSII, el ETR y la concentración de clorofilas con la pérdida de parénquima en empalizada y esponjoso, así como con la disminución del número de cloroplastos. El parénquima en empalizada es el mayor tejido fotosintético de las plantas, ya que es donde se encuentra la mayor

cantidad de cloroplastos (Outlaw et al., 1976; Nagy-Deri et al., 2011), por lo que al verse disminuido por el estrés la eficiencia cuántica efectiva del PSII, el número de cloroplastos y la concentración de clorofilas se vieron afectadas. Otra de las respuestas al estrés hídrico es la destrucción de membranas intracelulares, por lo que cuando la membrana de los cloroplastos se llega a perder o se ve afectada por la sequía, afecta la organización estructural del cloroplasto, alterando también los niveles de ETR, siendo este dependiente de la membrana (Alberte y Thornber, 1977; Batra et al., 2014).

La hipótesis sobre que las plantas de *S. reflexa* mostrarían mayores alteraciones anatómicas bajo sequía fue respaldada, se observó una disminución en el ancho de su tallo debido al colapso de sus células de parénquima clorofílico, una disminución en el número de vasos y un aumento en el número de canales de mucílago en el tratamiento de sequía severa. La acumulación de mucílago es un medio de adaptación ante ambientes secos gracias a su capacidad de hidratar (Clifford et al. 2002, Bosabalidis y Kofidis, 2002). Se han encontrado canales de mucílago en otras especies como *Ziziphus mauritiana* y *Z. rotundifolia*, los cuales al igual que *S. reflexa* se encuentran localizados en la parte central del córtex y cercanos al floema; sin embargo, contrario a este estudio en ambas especies no se encontraron diferencias en los números de canales en tratamientos de sequía (Clifford et al., 2002). Al igual que *S. reflexa*, en otras especies como *G. max* y *S. splendens* (Burnett et al., 2005; Makbul et al., 2011) se ha reportado una disminución en el ancho de los tallos, así como en el número de vasos como respuesta para tolerar la sequía.

También se observó un aumento en el ancho de raíz en respuesta a una sequía severa. Se han sugerido diferentes roles para esta respuesta como el aumentar el radio de contacto con el suelo esperando que con ello aumente el volumen de agua disponible (Huang y Fry, 1998), así como la retención de agua en el parénquima radial en presencia de estrés (Boughalleb et al., 2014). Esta respuesta se ha encontrado en especies como *G. max* y *Astragalus gombiformis*. En esta última, y al igual que *S. reflexa*, también se encontró un aumento en el número de vasos bajo

sequía, indicando que este aumento puede ayudar a evitar la cavitación a causa de la sequía (Makbul et al., 2011; Boughalleb et al., 2014).

La hipótesis sobre la presencia de metabolitos únicos en cada uno de los tratamientos de sequía fue comprobada. Diversos autores mencionan que cualquier estrés puede alterar la concentración de los metabolitos secundarios (Caser et al., 2018, 2019; Zhang et al., 2018). El tratamiento de sequía moderada fue donde se observó un mayor número de compuestos volátiles a diferencia de otros estudios donde el grupo control es el mayoritario. Además, el tratamiento de sequía severa fue el que registró un menor número, este mismo comportamiento también se encontró en *S. sinaloensis* (Caser, 2018).

En estudios sobre el efecto de la sequía en diferentes especies de *Salvia* se ha reportado que la concentración de los metabolitos secundarios puede variar según la especie. En *S. officinalis* y *S. sinaloensis* se encontró una disminución en la concentración de sus MS en presencia de sequía (Caser et al., 2018; Munné-Bosch et al., 2001), mientras que en *S. miltiorhiza*, *S. nuemorosa* y *S. dominica* se encontró el efecto contrario, aumentando la concentración de sus MS (Liu et al., 2011; Caser et al., 2019; Bayat y Moghadam, 2019). En el caso de *S. reflexa* se encontró una disminución en todos los MS presentes en los tratamientos de sequía moderada y sequía severa con excepción de la α y β amirina. En plantas de *Plectranthus amboinicus* y *Glycine max* también se ha observado un aumento en la concentración de amirinas en presencia de sequía (Kim et al., 2007; Hiba et al., 2021).

Las clases de metabolitos secundarios también pueden variar dependiendo del género y la especie. Por ejemplo, en el caso de *S. dolomitica* encontraron que se compone en su mayoría de mono y sesqui terpenos (Caser et al., 2019). En el caso de *S. amarissima* su composición fue de sesquiterpenos en su mayoría, seguido de compuestos de tipo alcano (Sepúlveda-Cuellar et al., 2020) y, para el caso de *S. reflexa*, se encontró que la mayoría de los compuestos volátiles fueron alcanos. Los alcanos son MS resistentes a la degradación, la presencia y número de alcanos presentes en las plantas depende de su etapa de crecimiento y de

variables ambientales como la sequía (Bondada et al., 1996; Liu et al., 2017; Srivastava y Wiesenverg, 2018), los alcanos están presentes en la composición de las ceras cuticulares y la producción de alcanos de cadena larga, estando directamente relacionada la longitud de la cadena con la hidrofobicidad, por lo que bajo condiciones de sequía hay una mayor cantidad de cera cuticular. Estos compuestos son más efectivos para disminuir la transpiración de las hojas en comparación por ejemplo con los triterpenos (Kolatuukudy, 1970; Liu et al., 2017; Srivastava y Wiesenverg, 2018). En este estudio se encontró que casi todos los alcanos están ausentes en el tratamiento control y que los alcanos de cadena larga comienzan a aparecer en presencia de estrés hídrico, coincidiendo con estudios realizados en plantas de avena y arroz (Srivastava y Wiesenverg, 2018).

Los triterpenos como la α -amirina y la β -amirina son compuestos de 30 átomos de carbono con un arreglo pentacíclico, y frecuentemente son aislados juntos, han sido identificados como uno de los componentes de la cutícula de muchas de plantas superiores y que tienen la función de actuar como rellenos que disminuyen la movilidad de la cutina, confiriéndole una resistencia mecánica (Gómez-Pulido et al., 2022). Además, tienen un papel contra la deshidratación, aunque también se ha sugerido que pueden tener un papel importante en el crecimiento de las plantas (Kemen et al., 2014). Para *S. reflexa* se encontró que, a diferencia de los alcanos, se da un aumento en la concentración de la α -amirina y β -amirina en los tratamientos de sequía, y es probable que este aumento ayude a la resistencia mecánica de la cutícula para lidiar con la sequía, especialmente cuando ésta es más severa.

Los fitoesteroles son importantes reguladores de las membranas lipídicas y pueden influenciar las propiedades, las funciones y la estructura de las membranas, su composición es característica para cada planta (Kumar et al., 2015). En un estudio realizado en plantas de arroz encontraron la presencia del β -sitoesterol, campesterol y estigmasterol, además de un aumento en su concentración bajo sequía (Kumar et al., 2015). En el caso de *S. reflexa* se identificó el estigmasterol, uno de los esteroides más abundantes en las plantas y que forma parte de las

membranas celulares (Avalo-García y Pérez Urria, 2009). En esta investigación solo fue encontrado en el grupo control, ya que las plantas de los tratamientos de sequía inhibieron su producción en presencia de estrés, indicándonos que este MS es sensible al estrés hídrico, funcionando como un marcador de condiciones óptimas.

La sequía induce la producción de especies reactivas de oxígeno de las plantas, las cuales pueden dañar las proteínas, los ácidos nucleicos y las membranas lipídicas mediante el proceso de peroxidación (Khodadadi et al., 2022). Sin embargo, las plantas como medio de respuesta incrementan la concentración de sus compuestos antioxidantes como las flavonas y ácidos fenólicos. Estos compuestos, actúan como estabilizadores de las membranas, previniendo la peroxidación de los lípidos (Bayat et al., 2019). Los flavonoides se encuentran entre los metabolitos secundarios más ampliamente distribuidos en las plantas (Betttaieb et al., 2011). En otros estudios de *Salvia* se ha encontrado un aumento en la concentración de flavonas en respuesta al estrés hídrico (Bayat et al., 2019; Caser et al., 2019). En *S. reflexa*, se dio un aumento en la cantidad de cirsiliol (**14**) y pedalitina (**16**) conforme aumentó la sequía; sin embargo, el aumento con respecto al control no fue significativo. Es probable que tanto cirsiliol como pedalitina estén fungiendo un papel antioxidante, ayudando a las plantas a resistir la sequía.

3.8 CONCLUSIONES

Se encontraron modificaciones en las plantas de *S. reflexa*, dependiendo de la severidad del estrés hídrico en sus variables fisiológicas, anatómicas y metabólicas.

Se encontraron modificaciones anatómicas no reportadas en tallos de *Salvia*, como son el aumento de canales de mucílago para dar tolerancia contra la sequía, así como modificaciones previamente reportadas en otras especies en la parte de la raíz como el ensanchamiento de ésta y el aumento de vasos para evitar la cavitación de la planta por el estrés.

Los resultados muestran que *S. reflexa* puede llegar a ser una especie tolerante frente a una sequía moderada, ya que si bien tienen afectaciones en su fisiología también cuenta con la capacidad de una recuperación de su ϕ_{PSII} y concentración de clorofilas. Sin embargo, frente a una sequía severa estas son vulnerables, ya que las afectaciones fisiológicas son mayores e irreversibles. En este tratamiento es donde se encontraron las mayores afectaciones anatómicas (pérdida de parénquima, disminución de cloroplastos, colapso de células), influenciando variables fisiológicas como se encontró con la disminución en la ϕ_{PSII} , ETR y concentración de clorofilas.

A diferencia de otras especies de *Salvia*, *S. reflexa* mostró casi en su totalidad una composición de alcanos en sus compuestos volátiles y una disminución de su concentración conforme la sequía aumenta, con excepción de la α y β amirina donde su concentración aumentó. Además, cada uno de los tratamientos cuenta con metabolitos específicos que podrían servir como marcadores de estrés hídrico. También se observó una tendencia a incrementar la concentración de flavonas conforme aumenta el estrés, especialmente de cirsilinol (**14**), siendo la flavona más abundante de esta población.

3.9 REFERENCIAS

- Alberte, R. S., Thornber, J. P., Fiscus, E. L. (1977). Water stress effects on the content and organization of chlorophyll in mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize. *Plant Physiology*, 59(3), 351-353
- Ashraf, M. A., Iqbal, M., Rasheed, R., Hussain, I., Riaz, M., Arif, M. S. (2018). Environmental stress and secondary metabolites in plants: an overview. *Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress*, 153-167.
- Batra, N. G., Sharma, V., Kumari, N. (2014). Drought-induced changes in chlorophyll fluorescence, photosynthetic pigments, and thylakoid membrane proteins of *Vigna radiata*. *Journal of Plant Interactions*, 9(1), 712-721.
- Bautista, E., Fragoso-Serrano, M., Ortiz-Pastrana, N., Toscano, R. A., Ortega, A. (2016). Structural elucidation and evaluation of multidrug-resistance modulatory capability of amarissinins A–C, diterpenes derived from *Salvia amarissima*. *Fitoterapia*, 114, 1-6.
- Bayat, H., Moghadam, A. N. (2019). Drought effects on growth, water status, proline content and antioxidant system in three *Salvia nemorosa* L. cultivars. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41, 1-8.
- Bettaieb, I., Hamrouni-Sellami, I., Bourgou, S., Limam, F., Marzouk, B. (2011). Drought effects on polyphenol composition and antioxidant activities in aerial parts of *Salvia officinalis* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 1103-1111.
- Bilger, W., Schreiber, U. (1990). Chlorophyll luminescence as an indicator of stress-induced damage to the photosynthetic apparatus. Effects of heat-stress in isolated chloroplasts. *Photosynthesis Research*, 25, 161-171.
- Bondada, B. R., Oosterhuis, D. M., Murphy, J. B., Kim, K. S. (1996). Effect of water stress on the epicuticular wax composition and ultrastructure of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaf, bract, and boll. *Environmental and Experimental Botany*, 36(1), 61-69.
- Bosabalidis, A. M., Kofidis, G. (2002). Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive cultivars. *Plant Science*, 163(2), 375–379.
- Boughalleb, F., Abdellaoui, R., Ben-Brahim, N., Neffati, M. (2014). Anatomical adaptations of *Astragalus gombiformis* Pomel. under drought stress. *Open Life Sciences*, 9(12), 1215-1225.
- Bucci, S.J., Scholz, F.G., Campanello, P.I., Montti, L., Jimenez-Castillo, M., Rockwell, F.A., Manna, L.L., Guerra, P., Lopez Bernal, P., Troncoso, O., Enricci, J., Holbrook, M.N., Goldstein, G. (2012) Hydraulic differences along the water transport system of South American *Nothofagus* species: do leaves protect the stem functionality? *Tree Physiology* 32, 880–893.

- Burnett, S. E., Pennisi, S. V., Thomas, P. A., van Iersel, M. W. (2005). Controlled drought affects morphology and anatomy of *Salvia splendens*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(5), 775-781.
- Caser, M., Chitarra, W., D'Angiolillo, F., Perrone, I., Demasi, S., Lovisolo, C., ... Scariot, V. (2019). Drought stress adaptation modulates plant secondary metabolite production in *Salvia dolomitica* Codd. *Industrial Crops and Products*, 129, 85-96.
- Caser, M., D'Angiolillo, F., Chitarra, W., Lovisolo, C., Ruffoni, B., Pistelli, L., ... Scariot, V. (2018). Ecophysiological and phytochemical responses of *Salvia sinoensis* Fern. to drought stress. *Plant Growth Regulation*, 84, 383-394.
- Cavatte, P. C., Martins, S. C., Morais, L. E., Silva, P. E., DaMatta, F. M. (2012). The physiology of abiotic stresses. *Plant Breeding for Abiotic Stress Tolerance*, 21-51.
- Clifford, S. C., Arndt, S. K., Popp, M., Jones, H. G. (2002). Mucilages and polysaccharides in *Ziziphus* species (Rhamnaceae): localization, composition, and physiological roles during drought-stress. *Journal of experimental Botany*, 53(366), 131-138.
- Feller, U. (2016). Drought stress and carbon assimilation in a warming climate: Reversible and irreversible impacts. *Journal of Plant Physiology*, 203, 84-94.
- Gardner, D. R., Panter, K. E., Stegelmeier, B. L., Stonecipher, C. A. (2021). Hepatotoxicity in cattle associated with *Salvia reflexa* diterpenes, including 7-hydroxyrhyacophilin, a new seco-clerodane diterpene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(4), 1251-1258.
- Gómez-Pulido, L. D., González-Cano, R. C., Benítez, J. J., Domínguez, E., Heredia, A. (2022). Structural analysis of mixed α - and β -amyrin samples. *Royal Society Open Science*, 9(4), 211787.
- González, L., González-Vilar, M. (2001). Determination of relative water content. In *Handbook of plant ecophysiology techniques*, Dordrecht Springer Netherlands, 207-212.
- Hiba, H., Janeeshma, E., Puthur, J. T. (2021). Dynamic alterations of metabolites in *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. to encounter drought and Zn toxicity. *Brazilian Journal of Botany*, 44(3), 587-599.
- Huang, B., Fry, J. D. (1998). Root anatomical, physiological, and morphological responses to drought stress for tall fescue cultivars. *Crop Science*, 38(4), 1017-1022.
- Kemen, A. C., Honkanen, S., Melton, R. E., Findlay, K. C., Mugford, S. T., Hayashi, K., ... Osbourn, A. (2014). Investigation of triterpene synthesis and regulation in oats reveals a role for β -amyrin in determining root epidermal cell patterning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(23), 8679-8684.

- Kim, K. S., Park, S. H., Kim, D. K., Jenks, M. A. (2007). Influence of water deficit on leaf cuticular waxes of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *International journal of plant sciences*, 168(3), 307-316.
- Kolattukudy, P.E. (1970). Plant waxes, *Lipids* 5, 259-275.
- Kulkarni, M., Schneider, B., Raveh, E., Tel-Zur, N. (2010). Leaf anatomical characteristics and physiological responses to short-term drought in *Ziziphus mauritiana* (Lamk.). *Scientia Horticulturae*, 124(3), 316-322.
- Kumar, M. S., Ali, K., Dahuja, A., Tyagi, A. (2015). Role of phytosterols in drought stress tolerance in rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, 96, 83-89.
- Liu, H., Wang, X., Wang, D., Zou, Z., Liang, Z. (2011). Effect of drought stress on growth and accumulation of active constituents in *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Industrial Crops and Products*, 33(1), 84-88.
- Makbul, S., Güler, N. S., Durmuş, N., Güven, S. (2011). Changes in anatomical and physiological parameters of soybean under drought stress. *Turkish Journal of Botany*, 35(4), 369-377.
- Martínez, J. P., Silva, H. F. L. J., Ledent, J. F., Pinto, M. (2007). Effect of drought stress on the osmotic adjustment, cell wall elasticity and cell volume of six cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *European journal of agronomy*, 26(1), 30-38.
- Havaux, M. Stress Tolerance of Photosystem II in Vivo: Antagonistic Effects of Water, Heat, and Photoinhibition Stresses. *Plant Physiology*, 100(1), 424-432.
- Moreno, F., Patricia, L. (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revision. *Agronomía Colombiana*, 27(2), 179-191.
- Munné-Bosch, S., Alegre, L. (2004). Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology*, 31, 203–216.
- Nagy-Déri, H., Péli, E. R., Georgieva, K., Tuba, Z. (2011). Changes in chloroplast morphology of different parenchyma cells in leaves of *Haberlea rhodopensis* Friv. during desiccation and following rehydration. *Photosynthetica*, 49, 119-126.
- Nieto, M., Gallardo, V.O., Rossomando, P. C., Tonn, C.E. (1996). 8-Hydroxysalviarin and 7, 8-didehydrothyacophiline, two new diterpenes from *Salvia reflexa*. *Journal of Natural Products*, 59(9), 880-882.
- Nilsen, E.T., Orcutt, D.M. (1996). Physiology of plants under stress. Abiotic factors. John Wiley and Sons.
- Nishioka, I., Ikekawa, N., Yagi, A., Kawasaki, T., Tsukamoto, T. (1965). Studies on the Plant Sterols and Triterpenes. II. Separation of Stigmasterol, β -Sitosterol and Campesterol, and about So-called " γ -Sitosterol". *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 13(3), 379-384.
- Outlaw Jr, W. H., Schmuck, C.L., Tolbert, N.E. (1976). Photosynthetic carbon metabolism in the palisade parenchyma and spongy parenchyma of *Vicia faba* L. *Plant Physiology*, 58(2), 186-189.

- Ramamoorthy, T.P., R. Bye., A. Lot & J. Fa. comp. Diversidad Biológica de México: Razi, K., Muneer, S. (2021). Drought stress-induced physiological mechanisms, signaling pathways and molecular response of chloroplasts in common vegetable crops. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(5), 669–691.
- Reol, E.M. (2003). Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz para la fotosíntesis. *Ecosistemas*, 12(1).
- Rzedowski, R. (1998). Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. En: *Orígenes y Distribución*, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 129-145.
- Savi, T., Marin, M., Luglio, J., Petruzzellis, F., Mayr, S., Nardini, A. (2016). Leaf hydraulic vulnerability protects stem functionality under drought stress in *Salvia officinalis*. *Functional Plant Biology*, 43(4), 370-379.
- Sepúlveda-Cuellar, L., Duque-Ortiz, A., Yáñez-Espinosa, L., Calzada, F., Bautista, E., Pastor-Palacios, G., Flores, J., Badano, E.I., y Douterlungne, D. (2021). Phylogenetic and chemical analyses of the medicinal plant *Salvia circinnata*: an approach to understand metabolomics differences. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 31(5), 676-688.
- Shao, M. N., Qu, B., Drew, B.T., Xiang, C.L., Miao, Q., Luo, S.H. (2019). Outbreak of a new alien invasive plant *Salvia reflexa* in north-east China. *Weed Research*, 59(3), 201-208.
- Silva, D.V., Cabral, C.M., Ferreira, E.A., Carvalho, F.P.D., Santos, J.B.D., Dombroski, J.L.D. (2018). Anatomical adaptations to different soil moisture contents in palisade grass and smooth pigweed. *Revista Ceres*, 65, 306-313.
- Valladares, F., Vilagrosa, A., Peñuelas, J., Ogaya, R., Camarero, J. J., Corcuera, L., Sisó, S., Gil-Pelegrín, E. (2004). Estrés hídrico: ecofisiología y escalas de la sequía. Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante, *Ministerio: Medio Ambiente Madrid*, 2, 165-192.
- Weerakoon, W. L., Lovett, J. V. (1986). Studies of *Salvia reflexa* Hornem. IV. Effects of watering frequency, drought and nutrient supply on growth and development. *Weed research*, 26(4), 277-282.
- Wester, P., Claßen-Bockhoff, R. (2007). Floral diversity and pollen transfer mechanisms in bird-pollinated *Salvia* species. *Annals of Botany*, 100(2), 401-421.

4. CAPITULO IV. Análisis filogenéticos y químicos de la planta medicinal *Salvia circinnata*: una aproximación para comprender las diferencias metabolómicas.

4.1 INTRODUCCIÓN

El género *Salvia* cuenta con aproximadamente 1000 especies (Fragoso-Martínez et al., 2017, 2018; Olvera-Mendoza et al., 2020), una gran variedad de ellas ha sido utilizada en la medicina tradicional, constituyendo una importante fuente de terpenoides y flavonoides bioactivos (Wu et al., 2012; Jenks y Kim, 2013). Debido a su gran potencial farmacológico, en los últimos 40 años los estudios químicos de este género han incrementado, permitiendo identificar una gran variedad de terpenoides, incluidos varios diterpenos con relevancia farmacológica como la salvinorina A y la tanshinona A (Prisinzano y Rothman, 2008; Wu et al., 2012; Li et al., 2016). Por lo anterior, realizar estudios sobre metabolitos especializados en especies de *Salvia* han brindado apoyo basado en la evidencia sobre sus usos etnofarmacológicos, además del descubrimiento de agentes farmacológicos con aplicaciones médicas (Hernández-Alvarado et al., 2020; Velázquez-Domínguez et al., 2020).

México cuenta con un tercio de las especies de *Salvia* descritas en todo el mundo y, además, cuenta con un alto porcentaje de endemismo (75%) (Martínez-Gordillo et al., 2017). Desde la época precolombina, este género ha sido utilizado como fuente de alimentos y medicina (Cahill, 2003), incluso en la actualidad se siguen utilizando para tratamientos dermatológicos, gastrointestinales, ginecológicos y neurológicos (Bautista et al. 2014, 2017; Calzada et al., 2015). Entre las especies que han sido estudiadas se encuentra *S. circinnata* Cav. (sinónimos: *S. amara* y *S. amarissima* Ortega), que es una planta herbácea perenne endémica de México, localizada desde los estados de San Luis Potosí hasta Oaxaca (González-Martín et al. 2015), y está agrupada en el complejo de plantas medicinales conocidas típicamente como “chía” (Jenks y Kim, 2013).

Salvia circinnata es conocida bajo diferentes nombres comunes: “chupona”, “diabetina”, “hierba azul”, “hierba del cáncer”, “insulina”, “pega ropa”, “peludito”, “prodigiosa” y “ñadri”. Es utilizada en medicina tradicional como tratamiento para la diabetes, diarreas, reumatismo, helminitiasis y cáncer (Fragoso-Serrano et al., 2019; Moreno-Pérez et al., 2019; Solares-Pascasio et al., 2021). También, se han realizado diversos estudios sobre su potencial farmacológico debido a sus metabolitos secundarios según sus usos tradicionales (Maldonado et al., 1996). Sus metabolitos han sido probados como antinociceptivos (Moreno-Pérez et al., 2019), inhibidores de la α -glucosidasa y PTP-1B (Flores-Bocanegra et al., 2017; Solares-Pascasio et al., 2021), antiprotozoarios (Calzada et al., 2020) y agentes citotóxicos, así como agentes moduladores de la resistencia a múltiples fármacos (Fragoso-Serrano et al., 2019).

Los flavonoides y diterpenoides detectados en fracciones no volátiles de *S. circinnata* han sido propuestos como los agentes activos responsables de los efectos farmacológicos de esta especie (Bautista et al., 2015, 2016; Flores-Bocanegra et al., 2017; Salinas-Arellano et al., 2020; Solares-Pascasio et al., 2021). Por ejemplo, algunos ensayos *in vitro* han sugerido aplicaciones prometedoras para el tratamiento del cáncer, como el caso de la teotihuacanina (**27**) (Bautista et al., 2015). Debido a estas aplicaciones es de gran interés identificar poblaciones productoras de estos metabolitos (amarisolida A, amarisinina A y teotihuacanina).

Hasta el momento se han reportado dos perfiles de metabolitos secundarios de *S. circinnata* en México, el primero incluyen a los 3-O-glucosidos de *neo*-clerodano, conocidos como amarisolidas A-E (**17-21**) y G (**22**) en poblaciones localizadas en Puebla y Oaxaca (Flores-Bocanegra et al. 2017; Salinas-Arellano et al. 2020) (Fig. 24). El segundo perfil de metabolitos está constituido por una mezcla de *neo*-clerodanos 9,10-*seco*-*neo*-clerodanos y diterpenoides de tipo amarisano conocidos como amarissininas A–D (**23-26**), teotihuacanina (**27**) y el 17-O-glucósido de *neo*-clerodano, conocido como amarisolide F (**28**), determinado en poblaciones del Valle de Teotihuacan, Estado de México (Bautista et al. 2015, 2016; Fragoso-

Serrano et al. 2019) (Fig. 24). Así, la composición de los metabolitos secundarios de *S. circinnata* pueden diferir entre poblaciones. Además, en otros estudios se han identificado mono y sesquiterpenos en esta especie (Fragoso-Serrano et al. 2019; Salinas-Arellano et al. 2020), por lo que la caracterización de compuestos volátiles podría contribuir a elucidar diferencias en los perfiles químicos de esta especie.

Los ADN barcoding son secuencias cortas de regiones estándar del genoma que se utilizan para identificar especies y pueden ayudar a responder preguntas sobre su evolución, ecología y conservación, o incluso para identificar nuevas especies (Hollingsworth et al., 2009,2011; Kress et al., 2015). En las plantas, se han recomendado varias regiones de ADN, incluidas matK, rbcL, rpoB, rpoC1, psbK-psbI, psbA, trnLF e ITS, así como sus combinaciones, para proporcionar barcoding de plantas estándar (Soltis et al., 2001; Kress et al., 2005; Gesto-Borroto et al., 2021). Para el género *Salvia*, se ha propuesto la nrITS como la mejor opción para diferenciar entre especies (Wang et al. 2013; Fragoso-Martínez et al., 2018).

El presente estudio está enfocado en la identificación mediante herramientas moleculares de esta especie en diez diferentes localidades (Pátzcuaro, Michoacán; Yuriria y San José de Iturbide, Guanajuato; Tehuacán y Aquixtla, Puebla; Zimapán, Pachuca y Parque Nacional los Mármoles, Hidalgo; Teotihuacan y Jilotepec, Estado de México) (Fig. 23) y en conocer las causas de la variabilidad de los perfiles químicos mediante una comparación de sus metabolitos secundarios con diferentes variables ambientales. La amarisolida A (**17**) y la amarisinina A (**23**) fueron seleccionados para realizar su comparación por ser los principales constituyentes de las poblaciones previamente estudiadas, la teotihuacanina (**27**) fue elegida por su alto interés para identificar el mecanismo de acción molecular detrás de su capacidad moduladora de la resistencia a múltiples fármacos y obtener derivados semisintéticos. La identificación certera de la especie, así como de los perfiles químicos de cada una de las poblaciones puede ayudar en la bioprospección de la especie para aplicaciones terapéuticas.

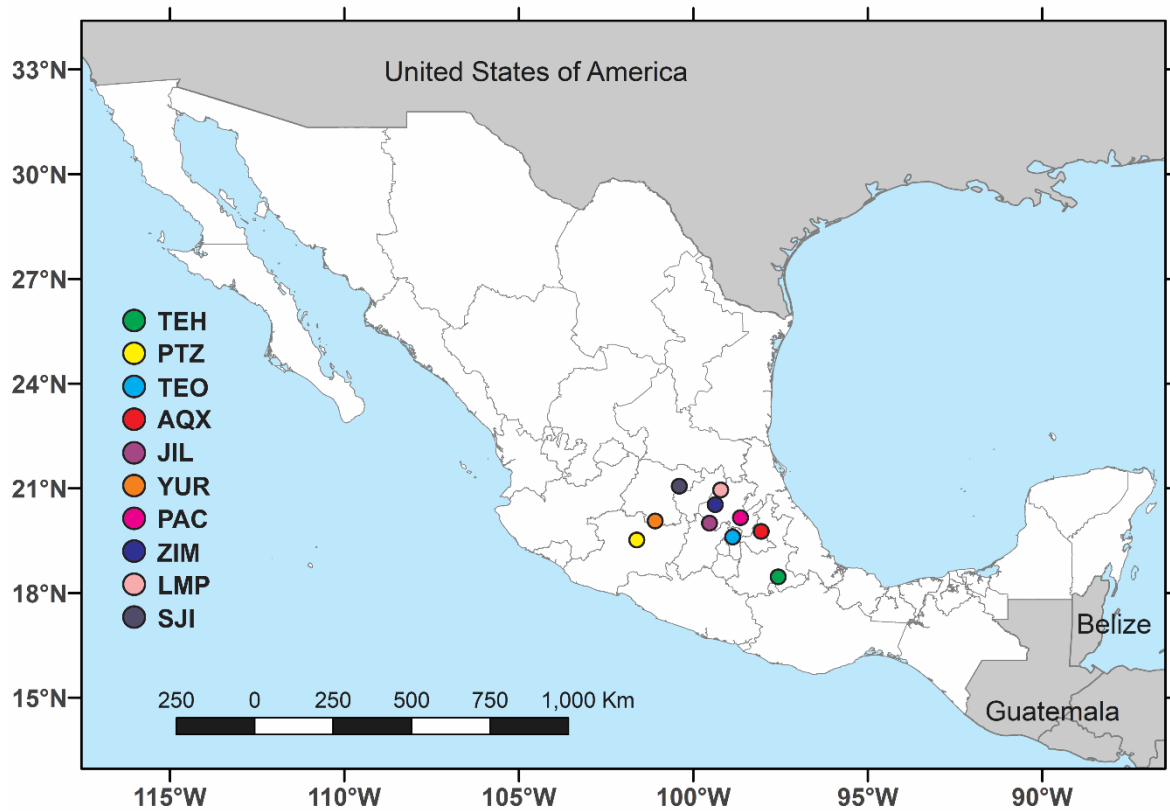


Figura 23. Poblaciones de *S. amarissima* recolectadas y estudiadas. TEH: Tehuacán, PTZ: Pátzcuaro, TEO: Teotihuacán, AQX: Aquixtla, JIL: Jilotepec, YUR: Yuriria, PAC: Pachuca, ZIM: Zimapán, LMP: Parque Nacional los Mármoles y SJI: San José de Iturbide.

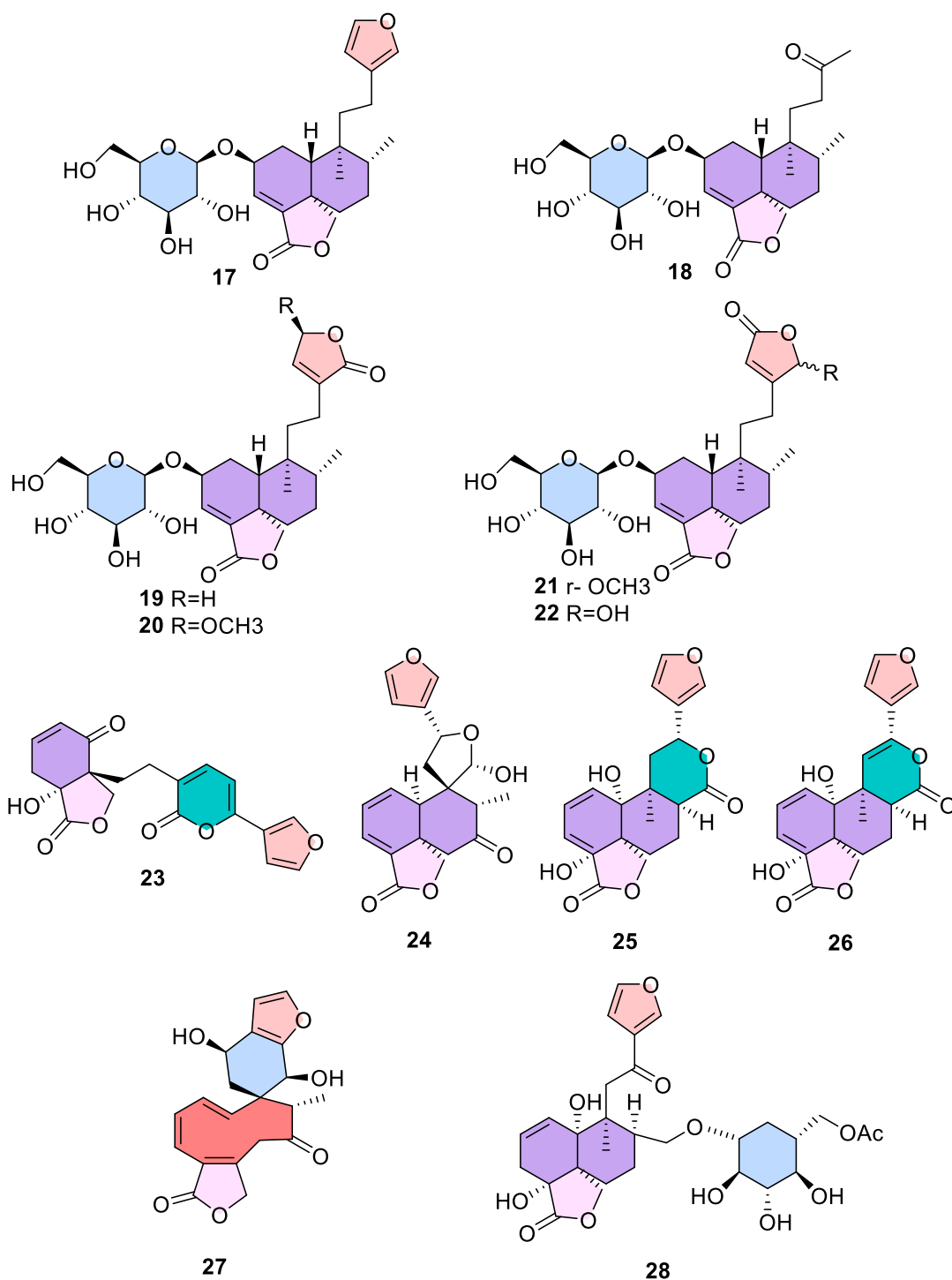


Figura 24. Estructuras de los MS encontrados en otros quimotipos de *S. circinata*, amarisolida A (17), amarisolida B (18), amarisolida C (19), amarisolida D (20), amarisolida E (21), amarisolida G (22), amarisinina A (23), 8 amarisinina B (24), amarisinina C (25), amarisinina D (26), teotihuacanina (27) y amarisolida F (28).

4.2 HIPÓTESIS

La composición de los metabolitos secundarios puede diferir entre poblaciones debido a condiciones ambientales locales y/o coincidir en su composición al tener la misma clasificación taxonómica ya que pueden tener los mismos acervos genéticos

4.3 OBJETIVO

Identificar la relación filogenética entre las poblaciones de *S. circinnata* colectadas para analizar su similitud, con el fin de encontrar diferencias en la composición de metabolitos secundarios derivado de diversas variables ambientales.

4.4 OBJETIVO ESPECÍFICO

Determinar la relación filogenética entre las diez poblaciones de *S. circinnata* mediante métodos moleculares (PCR).

Analizar la composición de compuestos volátiles de las diez poblaciones de *S. circinnata* y determinar si existen diferencias entre ellas.

Analizar la presencia y/o ausencia de la amarasilode A (**17**), amarisinina A (**23**) y teotihuacanina (**27**) en las diez poblaciones de *S. circinnata*

Evaluar la relación que existe entre las variables ambientales con la composición de metabolitos secundarios de cada una de las poblaciones de *S. circinnata*.

4.5 MATERIALES Y METODOS

4.5.1 Sustancias químicas y reactivos

Para los análisis de HPLC los disolventes fueron de grado HPLC (JT Baker) y fue utilizada agua desionizada (MilliQ). Los compuestos de referencia para los análisis en este estudio fueron amarisolida A (**17**), amarisinina (**23**) y teotihuacanina (**27**). La amarisolida A (**17**) fue proporcionada por el Dr. Alfredo Ortega (Maldonado et al. 1996), la amarisinina A (**23**) y teotihuacanina (**27**) fueron aisladas de acuerdo con la metodología previamente descrita por Bautista et al. (2015,2016). La pureza de los diterpenos se determinó por HPLC-PDA y RMN de ^1H , en todos los casos la pureza estaba por encima del 95%.

4.5.2 Material vegetal

Hojas de *S. circinnata* fueron recolectadas en el verano de año 2019 y otoño del 2020 de diez poblaciones localizadas en Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Michoacán y Puebla (Apéndice 41). Todas las plantas utilizadas en este estudio fueron adultas y en etapa de floración. Un espécimen de cada población fue depositado en el Herbario del Instituto de Ecología A.C y en el Herbario Nacional MEXU (UNAM). Todos los especímenes recolectados fueron identificados por dos taxonomistas, especialistas en *Salvias* mexicanas: Dra. Brenda Y. Bedolla-García (Instituto de Ecología A.C) y M.C. Rosario García Peña (UNAM). A pesar de que las colectas de especímenes se realizaron durante el estadio de floración, recolectando siete de las poblaciones en la misma semana para minimizar posibles errores asociados a las etapas ontogenéticas de las plantas, no se consideró la importancia de la variación intrapoblacional, además de otros factores como el estrés hídrico y térmico, ni condiciones edáficas en las que el crecimiento de la planta también podrían influenciar en los perfiles metabólicos (Mehdi-Talebi et al., 2021), como la producción de amarissinina A (**23**) y teotihuacanina (**27**).

4.5.3 DNA Barcoding

Extracción de ADN

Se utilizaron seis hojas de cada población para obtener muestras de ADN. La extracción de ADN genómico se realizó de acuerdo con el método CTAB de Doyle y Doyle (1987). El ADN genómico se suspendió en agua libre de nucleasas y se almacenó a -20 °C. El ADN se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific™) midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm. La calidad del ADN se examinó con electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Amplificación y secuenciación por PCR

La región del ADN del espaciador transcrito interno ribosomal nuclear (nrITS) se utilizó como marcador molecular. Las secuencias de oligonucleótidos para *S. circinnata* se diseñaron de acuerdo con la secuencia depositada en GenBank por Fragoso-Martínez et al. (2017, 2018), que incluía ITSfw (5' ATA CCT GCA AAG CAG ACA GCG3') e ITSrv (5' GGT CGA AGG TGC GGA GCC GCG3'). La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo en un volumen de reacción de 50 μ l usando ADN polimerasa Dream Taq (Thermo Scientific) y Applied Biosystems Veriti 96-Well Thermal Cycler. Cada reacción contenía 1,25 U de ADN polimerasa Dream Taq, dNTP 0,2 mM, MgCl₂ 2 mM, 100 ng de ADN genómico y 0,5 μ M de cada oligonucleótido. Los ciclos de PCR consistieron en un paso inicial de desnaturalización de 3 min a 95 °C seguido de 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 55 °C, 1 min a 72 °C y una extensión final de 5 min a 72 °C. Los productos de PCR se resolvieron con electroforesis en gel de agarosa al 1 % para confirmar la amplificación específica y se purificaron con PCR Purification Kit (Jena Bioscience) según las instrucciones del fabricante. La concentración de los productos de PCR purificados se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific™) y se secuenciaron en ambas direcciones con el analizador genético 3130 (Applied Biosystems). Con seis secuencias directas y seis inversas, se obtuvo una secuencia consenso para cada población. Las secuencias de ADN superpuestas se ensamblaron con el software DNASTar (DNASTar Inc., Madison, WI, EE. UU.).

Análisis filogenético

Las secuencias de consenso de análisis filogenético se compararon con las de la base de datos NCBI utilizando la herramienta de búsqueda de alineación local básica de nucleótidos (BLASTn). Las secuencias reportadas del género *Salvia* para el marcador ITS depositado en GenBank se alinearon usando MEGA 7 con Clustal W usando parámetros predeterminados (Kumar et al. 2016). La selección de especies para este análisis se realizó de acuerdo con la clasificación propuesta por Fragoso-Martínez et al. (2018). La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo Tamura-Nei (Tamura y Nei 1993). Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando algoritmos de unión de vecinos y BioNJ en una matriz de distancias por pares estimadas con el enfoque de máxima verosimilitud compuesta (MCL) y luego seleccionando la topología con mayor valor de verosimilitud. Se utilizó una distribución gamma discreta para modelar las diferencias de tasas evolutivas entre sitios (5 categorías; + G, parámetro = 0,4960). El modelo de variación de la tasa permitió que algunos sitios fueran evolutivamente invariables ([+ I], 39,53% de los sitios). El árbol se dibujó a escala, con las longitudes de las ramas medidas en el número de sustituciones por sitio. Este análisis involucró 33 secuencias de nucleótidos.

4.5.4 Análisis GC-MS

Partes aéreas de las plantas de *S. circinnata* fueron colectadas de al menos 10 individuos por población, las cuales fueron molidas y maceradas en acetona (3 x 50 mL) durante 48 horas para obtener un residuo entre 60.5 ± 0.95 a 123.13 ± 1.4 mg (6.05 ± 0.95 to $12.31 \pm 1.4\%$ de extracto seco). Muestras de 10 mg fueron disueltas en 2 mL de una mezcla de hexano-acetona-MeOH (1:2:1). Volúmenes de 0.2 μ L fueron analizados con un cromatógrafo de gases Agilent GC-7890b acoplado a un espectrómetro de masas Agilent EM-5877^a utilizando una columna capilar GC DB 5ht (30 m $\times$ 0,320 mm d.i. $\times$ 0,1 μ m, Agilent). La temperatura del puerto de inyección se mantuvo a 220 °C, y la temperatura del horno se mantuvo a 80 °C durante 2 min y luego se aumentó en una proporción de 3, 5 y 10 °C/min hasta llegar a 100, 150 y 330. °C, respectivamente. La temperatura final se mantuvo durante 9 min. El análisis

de cada extracto se realizó por triplicado y los compuestos volátiles fueron identificados por desconvolución utilizando la base de datos W10N11 (Wiley10Nist11).

4.5.5 Análisis de HPLC

Las curvas de calibración de la amarisolida A (**17**, 240 nm), amarisinina A (**23**, 330 nm) y teotihuacanina (**27**, 240 nm) se realizaron utilizando concentraciones que oscilaban entre 0.0625 mg/ml (0.3125 µg) y 0.5 mg/ml (2.5 µg). Las muestras de cada extracto de acetona se disolvieron en MeOH a una concentración de 10 mg/mL y se analizaron con un cromatógrafo Agilent 1200 HPLC equipado con detector PDA Agilent G1315D y detector de fluorescencia Agilent G1321A. La separación por HPLC se realizó en una columna Synergi Polar RP (Phenomenex, 5 µm, 4,6 × 250 mm) con un gradiente de elución de ácido acético al 1 % (A) y acetonitrilo (B) en los siguientes tiempos: 0 min, 80 % A; 1 min, 80% A; 31 min, 40% A, 33 min, 20% A; 43 min, 20% A, siempre utilizando un caudal de 0,8 mL/min con un volumen de inyección de 5 µL para los estándares y 10 µL para los extractos. Los cromatogramas se midieron a 240 y 330 nm utilizando el detector PDA, con 250 nm de longitud de onda de excitación y 410 nm de longitud de onda de emisión para el detector FL. Cada extracto se analizó por triplicado.

4.5.6 Análisis estadísticos

Los datos de GC-MS y HPLC-PDA correspondientes a compuestos volátiles y no volátiles de los extractos de las diez poblaciones. Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) y un posterior análisis de redundancia (RDA) tomando en cuenta la concentración de los compuestos volátiles y no volátiles de las diez poblaciones, así como las siguientes variables ambientales: temperatura media anual, la temperatura mínima anual, la temperatura máxima anual, la precipitación anual total, la elevación y la latitud (Tabla 11, Apéndice 42). Los análisis fueron realizados mediante el programa XLSTAT (McGarigal et al. 2000). Las variables seleccionadas para el PCA fueron analizadas con la prueba Kruskal-Wallis. Diferencias entre los rangos de los tratamientos fueron comparados utilizando el procedimiento de Dunn.

4.6 RESULTADOS

El análisis filogenético con secuencias consenso indicó que la identidad de los individuos muestreados dentro de las poblaciones de *S. circinnata* coincidió en un 99,9 %, mientras que hubo un 100 % de concurrencia entre los individuos de las diferentes poblaciones (Fig. 24). Además, el análisis BLASTn indicó que nuestras secuencias de consenso coinciden al 100% con la secuencia de *S. circinnata* depositada en el GenBank (código de acceso MF664544), mientras que el análisis filogenético agrupó las regiones ITS de las poblaciones muestreadas dentro del mismo clado para la secuencia depositada en el GenBank (Fig. 25).

El análisis BLASTn indicó que la secuencia consenso de las poblaciones de *S. circinnata* coincidía en un 98% con las secuencias GenBank de *Salvia ozolotepecensis*, *Salvia perlonga* y *Salvia praestans*, mientras que la concurrencia con secuencias de otras especies de *Salvia* estuvo por debajo del 96%. Estos resultados están respaldados por la relación filogenética observada entre la secuencia ITS de las poblaciones muestreadas y las de otras especies de *Salvia* (Fig. 25).

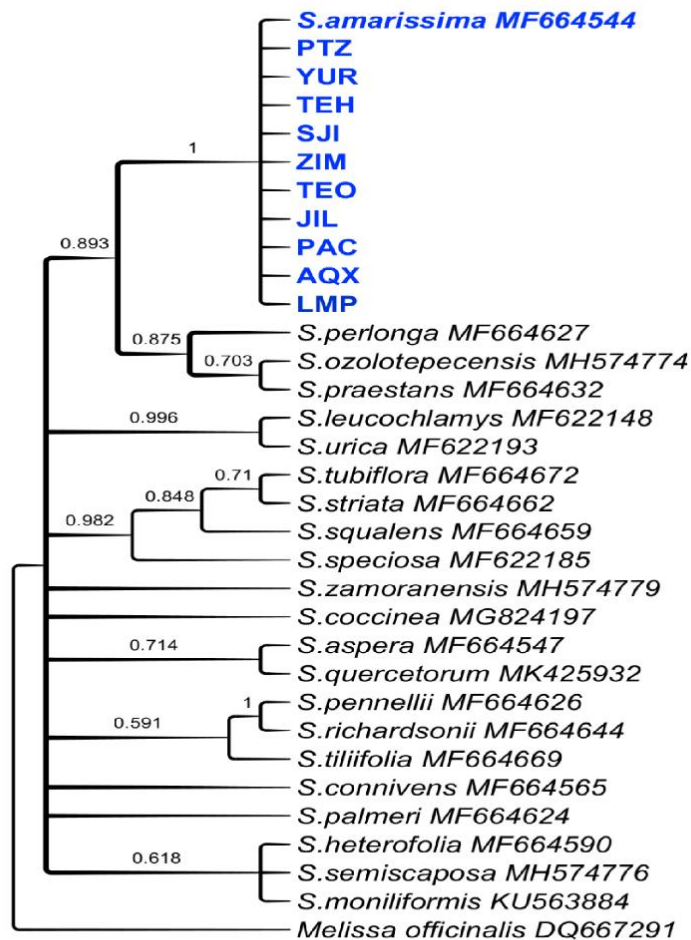


Figura 25. Árbol de consenso de máxima verosimilitud realizado con ITS secuencias marcadoras obtenidas de poblaciones naturales de *Salvia circinnata*. TEH: Tehuacán, PTZ: Pátzcuaro, TEO: Teotihuacán, AQX: Aquixtla, JIL: Jilotepec, YUR: Yuriria, PAC: Pachuca, ZIM: Zimapán, LMP: Parque Nacional los Mármolés y SJI: San José de Iturbide.

Se encontraron, mediante el análisis de GC-MS de los extractos de las diez poblaciones, la presencia de 35 metabolitos, de los cuales los principales constituyentes fueron 12 alcanos y 9 sesquiterpenos (Tabla 10). El tetradecano se encontró en todas las poblaciones con concentraciones que oscilan entre $0,64 \pm 0,17 \%$ y $19,50 \pm 1,45 \%$ (Tabla 10). Otros metabolitos comunes fueron el cariofileno, humuleno y el éster metílico del ácido hexadecanoico, que estaban presentes en todas las poblaciones con excepción de PTZ y el 2,2-dimetiloctadecano, que se registró en todas las poblaciones excepto en ZIM (Tabla 10).

Del grupo de los sesquiterpenos se encontró al espatulenol en seis poblaciones (YUR, SJI, ZIM, PAC, AQX y LMP), con concentraciones que oscilaron entre $8,20 \pm 1,29 \%$ y $35 \pm 2,97 \%$ (Tabla 10). Otros sesquiterpenoides identificados en las fracciones volátiles fueron cubebeno, isobiciclogermacreno, óxido de cariofileno, cariofilenoles I y II y 4,10(14)-muroladien-8 β -ol (Tabla 10). También se detectaron metabolitos secundarios como amidas, antraquinonas y benzofuranos (Tabla 10). En la población de PTZ solo se observaron cinco constituyentes, todos ellos alcanos, incluido el tetradecano, heptadecano; 2,2,11,11-tetrametildodecano, octadecano y 2,2-dimetiloctadecano (Tabla 10).

En la población de TEH la presencia de cariofilenos I y II fue distintiva ya que no se detectaron en ninguna otra población. Las hojas de esta población se caracterizaron fenotípicamente por carecer de tricomas glandulares, esta adaptación podría ser la razón de su perfil metabolómico

Tabla 10. Metabolitos volátiles de *S. amarissima* detectados por GC-MS. La tabla indica la clase de cada compuesto y su nombre. Los valores de la tabla son promedios de cantidades normalizadas de compuestos volátiles (% $\pm$ DE) detectados en los extractos de hojas secas de cada población.

Entrada	Clase	Nombre del compuesto	POBLACIONES									
			AQX	PAC	PNM	TEO	ZIM	JIL	SJI	YUR	PTZ	TEH
1	alcano	dodecano				9.12 $\pm$ 4.22	4.17 $\pm$ 0.74					
2	Alcano	tridecano				2.60 $\pm$ 1.86	2.96 $\pm$ 1.09					
3	Alcano	tetradecano	2.10 $\pm$ 0.41	1.75 $\pm$ 0.44	1.69 $\pm$ 0.44	1.74 $\pm$ 0.57	1.69 $\pm$ 0.26	0.28 $\pm$ 0.06	0.64 $\pm$ 0.17	4.79 $\pm$ 0.96	19.50 $\pm$ 1.45	5.27 $\pm$ 0.40
4	Sesquiterpeno	caryophylleno	12.1 $\pm$ 2.02	7.62 $\pm$ 3.44	22.9 $\pm$ 5.40	18.0 $\pm$ 4.35	21.5 $\pm$ 1.17	5.36 $\pm$ 1.43	16.28 $\pm$ 1.27	10.4 $\pm$ 1.99		8.02 $\pm$ 0.64
5	Sesquiterpeno	humuleno	4.72 $\pm$ 0.84	2.54 $\pm$ 1.32	3.61 $\pm$ 1.30	6.68 $\pm$ 1.67	7.30 $\pm$ 0.70	1.74 $\pm$ 0.45	4.970 $\pm$ 0.67	3.01 $\pm$ 0.57		1.91 $\pm$ 0.12
6	Sesquiterpeno	cubeneno	3.95 $\pm$ 1.75	1.13 $\pm$ 0.89	11.7 $\pm$ 2.18	5.43 $\pm$ 1.48	6.31 $\pm$ 0.24		10.35 $\pm$ 1.20	13.1 $\pm$ 2.21		
7	Sesquiterpeno	isobycyclogermacren	7.47 $\pm$ 1.28		3.62 $\pm$ 1.50	1.68 $\pm$ 0.86	6.96 $\pm$ 0.39		4.334 $\pm$ 0.48			
8	Alcano	2,2-Dimetiltetradecano	9.44 $\pm$ 1.73	7.86 $\pm$ 1.59					5.761 $\pm$ 1.51			
9	Alcohol	spathulenol	15.9 $\pm$ 7.08	16.9 $\pm$ 5.23	18.4 $\pm$ 6.74	14.0 $\pm$ 6.81	35.0 $\pm$ 2.97		8.204 $\pm$ 1.29	13.1 $\pm$ 4.62		
10	Sesquiterpeno	oxido de cariofileno						9.01 $\pm$ 4.25	3.408 $\pm$ 2.73			26.0 $\pm$ 1.29
11	Alqueno	z-8Z-hexadeceno	3.11 $\pm$ 0.34	3.43 $\pm$ 1.04	3.53 $\pm$ 0.64			0.11 $\pm$ 0.09				
12	Alqueno	hexadecano	3.49 $\pm$ 0.63	3.46 $\pm$ 0.95	3.22 $\pm$ 0.65	2.87 $\pm$ 0.95	3.15 $\pm$ 0.35	0.42 $\pm$ 0.20		4.62 $\pm$ 1.10		6.08 $\pm$ 0.27
13	Sesquiterpeno	cariofileno I										7.03 $\pm$ 0.62
14	Sesquiterpeno	cariofilenol II										4.24 $\pm$ 1.28
15		4,10(14)-muroladien-8 β -ol			8.42 $\pm$ 1.03		6.00 $\pm$ 0.16			10.5 $\pm$ 1.47		
16	Alcano	heptadecano		1.42 $\pm$ 0.95						15.2 $\pm$ 8.37	11.47 $\pm$ 3.82	4.77 $\pm$ 1.56

17		pentano,2,2,3,4-tetrametil										13.8±0.76
18	alcano	Dodecano,2,2,11,11-tetrametil						3.33±0.85	7.741±2.05		29.15±0.95	
19	Benzofurano	loliolide	3.23±0.59	0.55±0.32	0.76±0.44	0.63±0.48	1.37±0.79	0.50±0.17	2.599±0.64			
20		heptadecano,2-metil		1.42±0.92						2.10±0.21		4.46±0.04
22	Alcano	octadecano	1.88±1.02	0.81±0.21	0.88±0.21		0.74±0.43			6.50±2.25	12.55±0.72	6.63±0.12
23	Salicilato	homosalato	1.94±0.38	1.60±0.46	0.91±0.58	0.54±0.32	1.51±0.16	0.23±0.06	0.478±0.16			
25	Alcano	2,2-dimethiloctadecano	4.99±1.47	6.47±1.32	1.03±0.19	4.15±1.52		1.46±0.89	5.346±1.48	9.91±2.62	27.31±2.67	9.28±0.90
26	ácido graso saturado	ácido hexadecanoico, metil ester	3.63±2.06	1.55±0.45	5.25±0.93	1.63±0.44	1.24±0.14	0.50±0.12	1.024±0.31	3.31±0.82		2.35±0.06
27	ácido graso saturado	ácido hexadecanoico	3.18±0.60	2.02±0.76				1.12±0.54	1.316±1.31			
28	Fitol	fitol		8.07±3.22	0.37±0.25					3.21±0.93		
30	dihidroxyanthraquinona.	1,4-dihidroxi-2-(prop-2'-enil)antraquinone						1.84±0.47	0.717±0.51			
32	Amida	13-Docoseamida							4.493±1.64			
33		1,2,4-trimetil antraquinona,						1.34±0.72				
34	Amida	erucylamida	2.25±2.35	3.81±2.28	1.49±0.87			2.06±1.28				
35	Triterpeno	squalene	4.04±3.42	0.43±0.25	0.61±0.35			0.83±0.30	2.240±1.05			
37	Vitamina	gamma tocoferol	1.61±1.00	0.42±0.24	0.25±0.17				2.128±1.13			
38	Alcano	nonadecano						10.3±9.04				
40	Vitamina	α tocoferol	2.80±1.82	0.91±0.53	0.84±0.48			0.78±0.32	2.596±1.49			
41	Esterioide	stigmasterol										
42	Fitosterol	sitosterol		8.06±4.66		8.57±6.25		7.77±1.88				

43	Triterpenoide	β -amirina	7.06 $\pm$ 4.11				0	10.3 $\pm$ 3.47	9.181 $\pm$ 3.89
44	Triterpenoide	α -amirina	7.98 $\pm$ 6.94	10.4 $\pm$ 6.12	10.3 $\pm$ 6.04	19.7 $\pm$ 13.6		40.5 $\pm$ 18.1	6.178 $\pm$ 4.52

Se realizó la cuantificación del contenido de amarisolida A (**17**, $r_t = 22,9$ min, 240 nm) (Apéndice 43), amarissinina A (**23**, $r_t = 25,2$ min, 330 nm) (fig. A44) y teotihuacanina (**27**, $r_t = 17$ min, 240 nm) (Apéndice 45). Los resultados del análisis HPLC-PDA indicaron que las poblaciones SJI, ZIM, JIL, PAC, AQX y LMP, TEO cuentan con teotihuacanina (**27**) además de amarisinina (**23**). La presencia de estos dos compuestos se confirmó mediante la comparación del tiempo de retención con las referencias utilizando un detector de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 250 nm y una longitud de onda de emisión de 410 nm. Las cantidades de amarisinina A (**23**) en estas siete poblaciones oscilaron entre $16,20 \pm 1,03$ y $60,32 \pm 2,83$ mg/g, siendo la población AQX la que presentó la mayor concentración de este diterpenoide (Tabla 11). Las concentraciones de teotihuacanina (**27**) oscilaron entre $0,96 \pm 0,10$ y $2,72 \pm 0,19$ mg/g, donde TEO y AQX presentaron concentraciones más altas de este metabolito que las otras poblaciones ($2,71 \pm 0,19$ mg/g y $2,72 \pm 0,35$ mg/g, respectivamente). La amarisolida A (**17**) solo se detectó en la población PTZ ($258,25 \pm 8,63$ mg/g), mientras que la amarisinina A (**23**) se detectó en concentraciones inusualmente altas en la población YUR ($55,81 \pm 4,06$ mg/g extracto), en comparación con las demás poblaciones

Tabla 11. Cuantificación de de amarisolida A (**17**), amarisinina A (**23**) y teotihuacanina (**27**) y mediante HPLC-PAD en extractos totales de hojas de *S. amarissima*. Los valores son promedios (mg/g $\pm$ DE) para cada población estudiada.

Entrada	POBLACIONES									
	PTZ	YUR	TEH	SJI	ZIM	TEO	JIL	PAC	AQX	LMP
Extracto de acetona (% w/w)	7.51 $\pm$ 1.1	6.05 $\pm$ 0.95	7.9 $\pm$ 3.4	6.25 $\pm$ 1.4	12.31 $\pm$ 1.4	9.46 $\pm$ 1.5	7.79 $\pm$ 0.84	11.41 $\pm$ 2.40	10.95 $\pm$ 1.1	11.74 $\pm$ 2.09
amarisinina A (17)										
(mg/g extracto) ^a	np	55.81 $\pm$ 4.06	np	16.20 $\pm$ 1.03	56.96 $\pm$ 4.7	37.75 $\pm$ 0.29	25.53 $\pm$ 3.65	44.28 $\pm$ 7.66	60.32 $\pm$ 2.83	42.71 $\pm$ 1.49
teotihuacanina (23)										
(mg/g de extracto) ^b	np	np	np	0.96 $\pm$ 0.10	1.96	2.71 $\pm$ 0.19	1.49 $\pm$ 0.28	1.70 $\pm$ 0.54	2.72 $\pm$ 0.35	2.26 $\pm$ 0.20
amarisolida A (27)										
(mg/ g de extracto) ^b	258.25 $\pm$ 8.63	np	np	np	$\pm$ 0.32	np	np	np	np	np
a medida a 330 nm										
b medidas a 240 nm										
* np: no presente en esa población.										

Mediante la composición de compuestos volátiles y no volátiles se encontraron diferencias en los perfiles metabólicos de las poblaciones, por lo que se evidencia la existencia de diferentes quimiotipos (CT) que fueron asignados de la siguiente manera: población PTZ CT amarisinina A, población YUR CT amarissinina A, este solo se restringirá a las poblaciones que producen amarisinina, pero no teotihuacanina. Las poblaciones SJI, ZIM, JIL, PAC, AQX, LMP y TEO, identificados como productores de teotihuacanina, fueron clasificados como CT teotihuacanina, dependiendo de si producen amarisinina A. En la población de TEH, no se encontró ninguno de los tres diterpenos. Sin embargo, el óxido de cariofileno fue su componente principal de su fracción volátil por lo que se le dio la clasificación de CT oxido de cariofileno.

Para el análisis PCA los tres primeras componentes (tres ejes de ordenación) explicaron el 68.95% de la variación total de los datos. El primer componente (F1) (Fig. 26, Tabla 12) explica el 33.56% de la variabilidad de los perfiles fitoquímicos de las muestras asociado principalmente a los metabolitos amarsolide A; cariofileno; 2,2-dimetiloctadecano; espatulenol; y 2,2,11,11-tetrametildodecano. La segunda función (F2) (Fig. 26, Tabla 12) explicó el 22.2% de la variabilidad y se asoció con α -amirina. Y la tercera función (F3) (Fig. 26, Tabla 12) explicó el 13.14% de la variación de los datos y se asoció con el óxido de cariofileno. Mediante este análisis se reforzó la existencia de los diferentes quimiotipos para *S. circinata*.

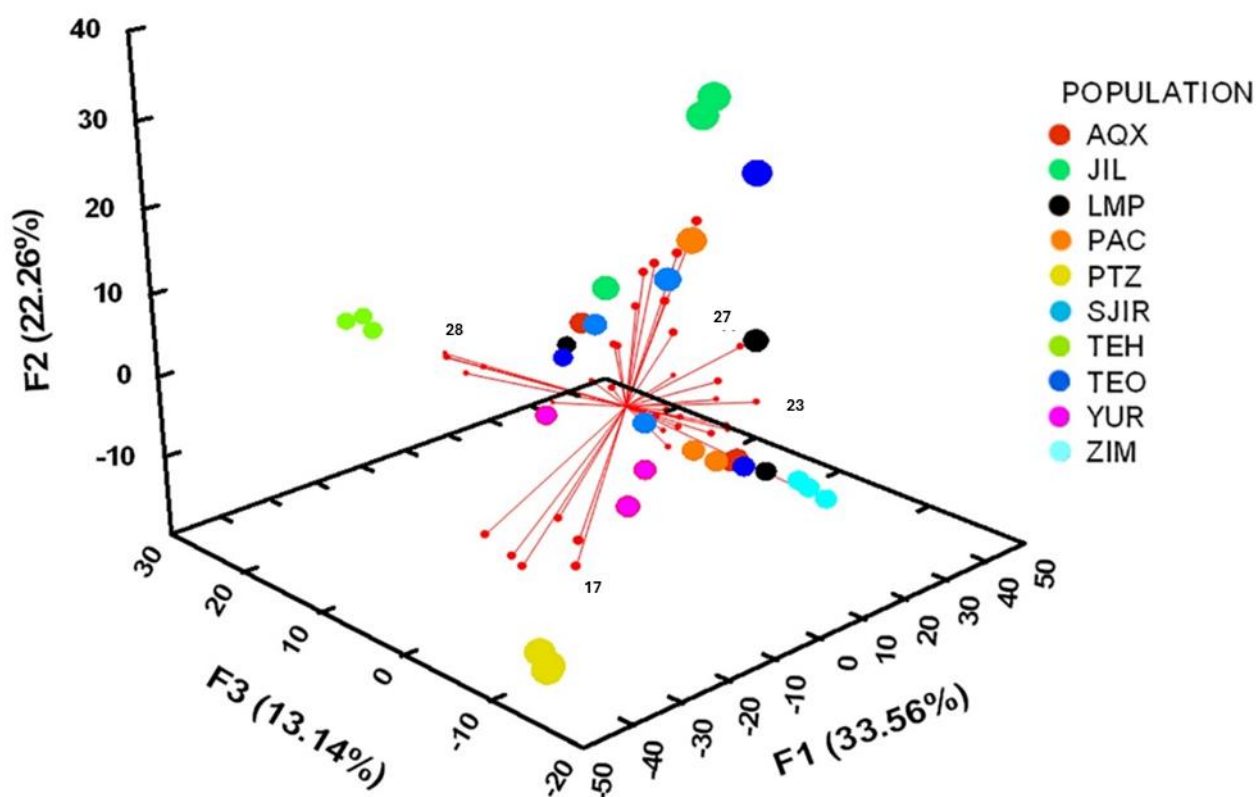


Figura 26. Análisis de componentes principales (PCA) comparando los perfiles de metabolitos entre las poblaciones de *Salvia circinnata* incluidos en este estudio. Las líneas rojas representan los MS volátiles y no volátiles. Los números los marcadores químicos: amarisolide A (**17**), amarissinina A (**23**), teotihuacanina (**27**) y óxido de cariofileno (**28**). Y los círculos las poblaciones TEH: Tehuacán, PTZ: Pátzcuaro, TEO: Teotihuacán, AQX: Aquixtla, JIL: Jilotepec, YUR: Yuriria, PAC: Pachuca, ZIM: Zimapan, LMP: Parque Nacional los Mármoles y SJIR: San José de Iturbide:

Tabla 12. Análisis de componentes principales (PCA) indicando el porcentaje de contribución de cada metabolito, estos valores explican la variabilidad entre poblaciones.

Eigenvalue	9.432		7.755		5.572	
Variability (%)	33.557		22.257		13.138	
	F1	%	F2	%	F3	%
Dodecano	0.072	0.524	-0.046	0.212	-0.016	0.025
Tridecano	0.028	0.076	-0.015	0.022	-0.024	0.058
Tetradecano	-0.235	5.536	-0.163	2.649	-0.056	0.309
cariofileno	0.331	10.927	-0.063	0.395	0.190	3.600
Humuleno	0.102	1.043	-0.026	0.068	0.003	0.001
Cubeneno	0.140	1.960	-0.107	1.140	0.063	0.398
Isobyciclogermacren	0.100	0.991	-0.042	0.172	-0.035	0.119
2,2-dimetiltetradecano	0.046	0.207	-0.014	0.019	-0.020	0.042
Spathulenol	0.538	28.956	-0.403	16.238	-0.445	19.840
oxido de cariofileno	-0.099	0.983	0.018	0.032	0.566	32.072
z-8 hexadecano	0.035	0.125	-0.016	0.027	-0.002	0.001
Hexadecano	0.041	0.164	-0.045	0.204	0.130	1.681
cariofileno I	-0.029	0.085	0.003	0.001	0.162	2.609
cariofilenol II	-0.013	0.016	0.001	0.000	0.073	0.530
4,10(14)-muroladien-8.β.-ol	0.081	0.650	-0.083	0.696	0.012	0.015
Heptadecano	-0.244	5.973	-0.194	3.769	-0.054	0.292
pentano,2,2,3,4-tetrametil	-0.050	0.249	0.005	0.003	0.279	7.774
dodecano,2,2,11,11-tetrametil	-0.388	15.035	-0.133	1.757	-0.303	9.198
Loliolide	0.026	0.068	0.009	0.008	-0.024	0.056
heptadecano,2-metil	-0.016	0.025	-0.004	0.002	0.094	0.883
Octadecano	-0.177	3.142	-0.103	1.054	0.021	0.045
Homosalato	0.025	0.065	-0.011	0.013	-0.011	0.012
2,2-dimetiloctadecano	-0.322	10.355	-0.217	4.689	-0.039	0.149
acido hexadecanoico metil ester	0.038	0.145	-0.015	0.022	0.080	0.644
acido hexadecanoico	0.006	0.003	0.029	0.085	-0.017	0.029
fitol	0.017	0.028	-0.009	0.007	-0.023	0.054
1,4-dihidroxy-2-(prop-2'-enyl) antraquinona	-0.004	0.002	0.043	0.187	-0.012	0.014
13-docoseamida	0.001	0.000	0.003	0.001	0.006	0.003
Erucilamida	-0.004	0.001	0.072	0.524	-0.036	0.129
Squaleno	0.001	0.000	0.041	0.165	0.014	0.020
γ tocoferol	0.001	0.000	0.015	0.022	0.005	0.002
vitamina E	0.001	0.000	0.039	0.152	-0.003	0.001
Sitosterol	-0.012	0.015	0.289	8.377	-0.130	1.698
β-amirina	-0.032	0.099	0.286	8.203	-0.104	1.087
α-amirina	0.001	0.000	0.676	45.675	-0.312	9.740
amarissinina A	0.081	0.664	-0.011	0.013	-0.039	0.150
Teotihuacanina	0.004	0.001	0.001	0.000	-0.001	0.000
amarisolida A	-0.345	11.884	-0.184	3.397	-0.259	6.720

Del análisis de redundancia (RDA) la primera función (F1) (Fig. 27) explica el 64.12% de la varianza y estuvo definida principalmente (mayor contribución) por las variables predictoras ambientales: latitud y precipitación total anual y las variables de respuesta amarisolida A (17), dodecano; 2,2-dimetiloctaecano; espatulenol; y cariofileno. La segunda función (F2) (Fig. 27) explico el 20.06% restante de la variación de los datos y se definió por las variables predictoras elevación y temperatura mínima y como variables de respuesta el óxido de cariofileno y α -amirina.

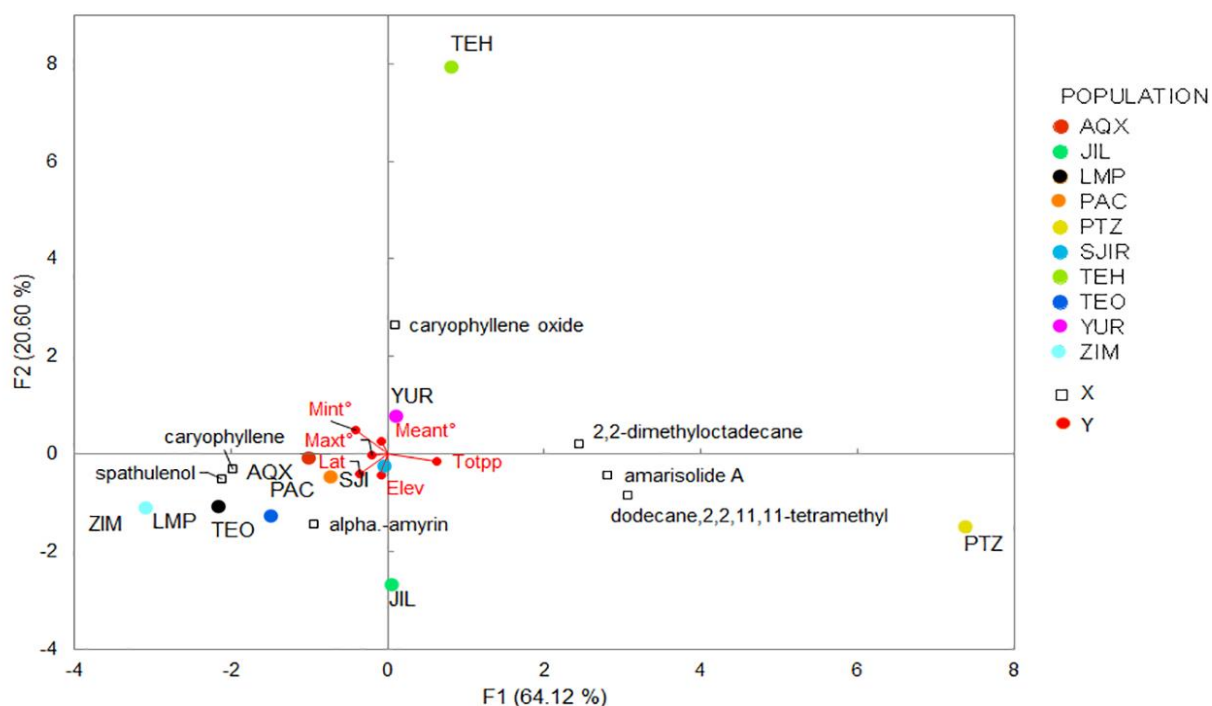


Figura 27. Análisis de redundancia (RDA) de las poblaciones con sus distintos CT relacionadas con sus variables ambientales. **Maxt**: temperatura máxima anual, **Mint**: temperatura mínima anual, **Meant**: temperatura anual promedio, **Totpp**: precipitación anual, **Elev**: elevación y **Lat**: latitud. TEH: Tehuacán, PTZ: Pátzcuaro, TEO: Teotihuacán, AQX: Aquixtla, JIL: Jilotepec, YUR: Yuriria, PAC: Pachuca, ZIM: Zimapán, LMP: Parque Nacional los Mármoles y SJIR: San José de Iturbide: X: componentes como variables dependientes y variables ambientales independientes.

4.7 DISCUSIÓN

Los resultados del análisis filogenético indicaron una coincidencia del 99.9 % de los individuos de cada una de las poblaciones por lo que las diferencias en la composición química de las poblaciones no son por una clasificación taxonómica errónea. Estos resultados rechazan la hipótesis de que la clasificación taxonómica errónea sería la causa de las diferencias observadas en los perfiles químicos entre las poblaciones de *S. circinnata* recolectadas.

También mediante el análisis BLASRn se encontró que las secuencias de las diez poblaciones de *S. circinnata* coinciden con otras secuencias de especies de *Salvia* depositadas en GenBank. Esta relación está respaldada por su relación filogenética entre las secuencias ITS de las poblaciones de *S. circinnata* con las otras especies de *Salvia*, que concuerdan con estudios previos para este género (Fragoso-Martínez et al., 2017, 2018). Se ha demostrado que la región ITS proporciona la mayor divergencia interespecífica entre especies congénicas, en el caso del género *Salvia*, se sugirió como un código de barras favorable para distinguir entre especies (Wang et al., 2013; Fragoso-Martínez et al., 2018).

En la familia de las Lamiáceas los quimiotipos (CT) suelen ser comunes, las plantas pueden tener las mismas características morfológicas, pero producir diferentes cantidades de componentes químicos como aceites esenciales, por ejemplo, en el “tomillo” *Thymus vulgaris* se encuentra el CT timol (György et al., 2020) o en el “romero” *Rosmarinus officinalis* CT el alcanfor (Diass et al. 2021). En el género *Salvia* se han encontrado diferentes CTs definidos por la presencia y diferencia de concentración de sus compuestos volátiles y no volátiles específicos en especies como *S. aegyptiaca* L. (Tahar et al., 2021), *S. africana-lutea* L. (Lim-Ah-Tock et al., 2021), *S. chamelaeagnea* P.J. Bergius (Lim -Ah-Tock et al., 2021), *S. officinalis* L. (Craft et al., 2017; Novak et al., 2006), *S. lanceolata* Lam. (Lim-Ah-Tock et al., 2021), *S. multicaulis* Vahl. (Mehdi-Talebi et al., 2021), *S. rosmarinus* Spenn. (Flamini et al., 2020), y *S. sclarea* L. (Tuttolomondo et al., 2020).

La ausencia de tricomas solo se limitó a la población de TEH, debido quizás a la barrera geográfica del valle de Tehuacán-Cuicatlán, dificultando el flujo de

genes entre otras poblaciones como ocurre con *S. multicaulis* (Mehdi-Talebi et al., 2021). En otros estudios se han relacionado los tricomas con la composición de metabolitos en las plantas, como el que ha sido reportado para *S. limbata* (Talebi et al., 2021). También algunos metabolitos fueron distintivos para cada población como la presencia de la 13-docosamida en la población de SJI, permitiendo distinguir las poblaciones de acuerdo con la presencia o ausencia de compuestos.

Debido a los efectos farmacológicos reportadas en los metabolitos de esta especie es de gran interés identificar poblaciones productoras de estos metabolitos (amarisolida A, amarisinina A y teotihuacanina). En el presente trabajo se estudió la presencia de estos constituyentes a través de perfiles de HPLC-PDA y HPLC-FLD, se identificaron cuatro poblaciones con el CT teotihuacanina en la especie de *S. circinnata*, clasificándolas de la siguiente manera: las poblaciones SJI, ZIM, JIL, PAC, AQX, LMP y TEO como *S. circinnata* CT teotihuacanina; PTZ como *S. circinnata* amarisolida A; YUR como *S. circinnata* CT amarisininaA y TEH como *S. circinnata* CT oxido de cariofileno.

Los factores abióticos y bióticos del hábitat pueden activar diferentes vías de señalización que involucran la expresión génica relacionada con la biosíntesis o acumulación de metabolitos secundarios. Estos metabolitos pueden conferir defensa contra los herbívoros y/o tolerancia a condiciones ambientales estresantes (Ramakrishna y Ravishankar, 2011; Bandurska et al., 2013; Yobi et al., 2013; Yang et al., 2018). Para explorar el grado de divergencia de los perfiles fitoquímicos entre las diferentes poblaciones de *S. circinnata* incluidas en este estudio, se utilizó un análisis de PCA y RDA para evaluar si las diferencias observadas en los perfiles fitoquímicos estaban relacionadas con alguna variabilidad en los factores ambientales asociados a cada hábitat de población. Encontrando una mayor contribución en los metabolitos amarsolida A (**17**), cariofileno, 2,2-dimetiloctadecano, espatulenol y 2,2,11,11-tetrametildodecano (F1), α -amirina (F2) y óxido de cariofileno (F3). Este análisis RDA sugiere que la disminución en la elevación y el aumento de la temperatura conducen a una mayor producción/acumulación de óxido de cariofileno en las plantas, mientras que ocurre

lo contrario con la producción/acumulación de α -amirina (Fig. 26). En cambio, la producción/acumulación de espatulenol y cariofileno aumentara hacia latitudes más altas o sitios con menor precipitación, mientras que estos gradientes ambientales conducen a disminuciones en la producción/acumulación de amarsolida A (**17**); dodecano; y 2,2-dimetiloctadecano (Fig. 26). Por lo que las diferencias en los metabolitos secundarios están asociadas a factores ambientales.

Contar con una variabilidad en los marcadores químicos nos permite identificar nuevos CT intrapoblacionales (Lim-Ah-Tock et al., 2021), por lo que es un tema que debería explorarse más a fondo. Se ha encontrado que los factores bióticos también pueden influenciar los perfiles metabolómicos en el género *Salvia*. Giuliani et al., (2018) encontraron que la presencia de sesquiterpenoides como el biciclogermacreno; β -cariofileno; 1,8-cineol; α -farneseno; germacreno D y linalol en *S. verticillata* tienen un efecto atrayente de polinizadores. En este estudio se identificaron un total de nueve sesquiterpenos en concentraciones variables, algunos presentes en diversas poblaciones como el espatulenol (YUR, SJI, ZIM, TEO, PAC, AQX y LMP) y otros como marcadores químicos distintivos de poblaciones específicas como en oxido de cariofileno que solo se encontró en la población de Tehuacán. El espatulenol fue detectado previamente en poblaciones crecientes en el Valle de Teotihuacan (Estado de México) e Ixtlán de Juárez (Estado de Oaxaca) (Fragoso-Serrano et al., 2019; Salinas-Arellano et al., 2020).

Como se mencionó previamente los *neo*-clerodanos se encuentran comúnmente en el género *Salvia* y se ha descrito que estos tienen propiedades anti alimentarias en insectos como defensa contra los herbívoros (Li et al., 2016), además se ha reportado actividad alelopática en *Salvia miniata*, relacionada con su contenido de *neo*-clerodanos (Bisio et al., 2011). Por lo tanto, la producción de diterpenoides de tipo *neo*-clerodano en *S. circinnata* también podría ser una respuesta contra factores bióticos como la herbivoría. Sin embargo, se necesitan estudios de campo de ecología química adicionales para aclarar esta variabilidad entre poblaciones.

4.8 CONCLUSIONES

Se realizó la determinación taxonómica y el análisis filogenético de diez poblaciones de *S. circinnata*, indicando que todas las poblaciones pertenecen a la misma especie.

Se encontraron marcadores químicos distintivos en todas las poblaciones analizadas para establecer perfiles metabolómicos y caracterizar la variabilidad interpoblacional para esta especie. Varios metabolitos volátiles fueron identificados por primera vez como el benzofurano conocido como loliolida; los sesquiterpenoides: cariofilenoles I y II, óxido de cariofileno, humuleno y cubebeno; y las alcamidas: 13-docosenamida y erucilamida.

Se identificó mediante los análisis de HPLC-PDA/FLD una nueva población productora de amarisolida A (**17**) (PTZ), una población con altas cantidades de amarissinina A (**23**) (YUR) y seis nuevas poblaciones con altas cantidades de teotihuacanina (**27**) (SJI, ZIM, JIL, PAC, AQX y LMP). Estos resultados sugieren la existencia de al menos cuatro quimiotipos para *S. circinnata*:

Población	Quimiotipo
Yuriria	CT amarissinina A
Tehuacán	CT oxido de cariofileno
San José de Iturbide	CT teotihuacanina
Zimapán	CT teotihuacanina
Jilotepec	CT teotihuacanina
Pachuca	CT teotihuacanina
Aquixtla	CT teotihuacanina
Parque Nacional los Mármoles	CT teotihuacanina
Teotihuacan	CT teotihuacanina
Pátzcuaro	CT amarisolida A

La producción/acumulación de algunos metabolitos como, amarsolidida A (**17**); α -amirina; cariofileno; óxido de cariofileno; dodecano; 2,2-dimetiloctaecano; y espatulenol, está relacionado con factores ambientales locales (altitud, latitud, temperatura mínima y precipitación).

4.9 REFERENCIAS

- Balderas, G.S., Alcala, R.E., Ortiz-Caltempa, A., Cardoso-Taketa, A., Villarreal, M.L. (2020). Variation in the production of sedative and anxiolytic compounds among *Galphimia* sp. Populations grown in a greenhouse. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 30, 99–102
- Bandurska, H., Niedziela, J., Chadzinikolau, T. (2013). Separate and combined responses to water deficit and UV-B radiation. *Plant Science*, 213, 98-105.
- Bautista, E., Toscano, R. A., Ortega, A. (2014). 5, 10-seco-neo-Clerodanes and neo-Clerodanes from *Salvia microphylla*. *Journal of Natural Products*, 77(4), 1088-1092.
- Bautista, E., Fragoso-Serrano, M., Toscano, R. A., García-Peña, M.D.R., Ortega, A. (2015). Teotihuacanin, a diterpene with an unusual spiro-10/6 system from *Salvia amarissima* with potent modulatory activity of multidrug resistance in cancer cells. *Organic letters*, 17(13), 3280-3282.
- Bautista, E., Fragoso-Serrano, M., Ortiz-Pastrana, N., Toscano, R.A., Ortega, A. (2016). Structural elucidation and evaluation of multidrug-resistance modulatory capability of amarissinins A–C, diterpenes derived from *Salvia amarissima*. *Fitoterapia*, 114, 1-6.
- Bautista, E., Ortiz-Pastrana, N., Pastor-Palacios, G., Montoya-Contreras, A., Toscano, R. A., Morales-Jiménez, J., ... Ortega, A. (2017). Neo-clerodane diterpenoids from *Salvia polystachya* stimulate the expression of extracellular matrix components in human dermal fibroblasts. *Journal of Natural Products*, 80(11), 3003-3009.
- Bisio, A., Damonte, G., Fraternali, D., Giacomelli, E., Salis, A., Romussi, G., Cafaggi, S., Ricci, D., De Tommasi, N. (2011). Phytotoxic clerodane diterpenes from *Salvia miniata* Fernald (Lamiaceae). *Phytochemistry*, 72(2-3), 265-275.
- Cahill, J. P. (2003). Ethnobotany of chia, *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae). *Economic Botany*, 57(4), 604-618.
- Calzada, F., Bautista, E., Yépez-Mulia, L., García-Hernandez, N., Ortega, A. (2015). Antiamoebic and anti-giardial activity of clerodane diterpenes from Mexican *Salvia* species used for the treatment of diarrhea. *Phytotherapy Research*, 29(10), 1600-1604.
- Calzada, F., Bautista, E., Barbosa, E., Salazar-Olivo, L. A., Alvidrez-Armendariz, E., Yépez-Mulia, L. (2020). Antiprotozoal activity of secondary metabolites from *Salvia circinata*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 30, 593-596.
- Craft, J. D., Satyal, P., Setzer, W. N. (2017). The chemotaxonomy of common sage (*Salvia officinalis*) based on the volatile constituents. *Medicines*, 4(3), 47.
- Da Silva, M. D., Ming, L. C., Pereira, A.M.S., Bertoni, B.W., Batistini, A.P., Pereira, P.S. (2006). Phytochemical and genetic variability of *Casearia sylvestris*

- Sw. from Sao Paulo State Atlantic Forest and Cerrado populations. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 8(esp), 159-66.
- Diass, K., Brahmi, F., Mokhtari, O., Abdellaoui, S., Hammouti, B. (2021). Biological and pharmaceutical properties of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. and *Lavandula officinalis* L. *Mater Today: Proc 2021* in press.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*.
- Flamini, G., Najar, B., Leonardi, M., Ambryszewska, K. E., Cioni, P. L., Parri, F., Melai, B., Pistelli, L. (2022). Essential oil composition of *Salvia rosmarinus* Spenn. wild samples collected from six sites and different seasonal periods in Elba Island (Tuscan Archipelago, Italy). *Natural Product Research*, 36(7), 1919-1925.
- Flores-Bocanegra, L., González-Andrade, M., Bye, R., Linares, E., Mata, R. (2017). α -glucosidase inhibitors from *Salvia circinata*. *Journal of Natural Products*, 80(5), 1584-1593.
- Fragoso-Martínez, I., Salazar, G. A., Martínez-Gordillo, M., Magallón, S., Sánchez-Reyes, L., Lemmon, E. M., Lemmon, A.R., Sazatorni, F., Mendoza, C.G. (2017). A pilot study applying the plant Anchored Hybrid Enrichment method to New World sages (*Salvia* subgenus Calosphace; Lamiaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 117, 124-134.
- Fragoso-Martínez, I., Martínez-Gordillo, M., Salazar, G. A., Sazatornil, F., Jenks, A. A., García Peña, M.D.R., Barrera-Avelaida, G., Benitez-Vieyra, S., Magallon, S., Cornejo-Tenorio, G., Granados Mendoza, C. (2018). Phylogeny of the Neotropical sages (*Salvia* subg. Calosphace; Lamiaceae) and insights into pollinator and area shifts. *Plant Systematics and Evolution*, 304, 43-55.
- Fragoso-Serrano, M., Ortiz-Pastrana, N., Luna-Cruz, N., Toscano, R. A., Alpuche-Solís, A. G., Ortega, A., Bautista, E. (2018). Amarisolide F, an acylated diterpenoid glucoside and related terpenoids from *Salvia amarissima*. *Journal of natural products*, 82(3), 631-635.
- Gesto-Borroto, R., Cardoso-Taketa, A., Yactayo-Chang, J. P., Medina-Jimenez, K., Hornung-Leoni, C., Lorence, A., Villarreal, M. L. (2019). DNA barcoding and TLC as tools to properly identify natural populations of the Mexican medicinal species *Galphimia glauca* Cav. *PLoS One*, 14(5), e0217313.
- Gesto-Borroto, R., Medina-Jimenez, K., Lorence, A., Villarreal, M. L. (2021). Application of DNA barcoding for quality control of herbal drugs and their phytopharmaceuticals. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 31, 127-141.
- Giuliani, C., Ascrizzi, R., Lupi, D., Tassera, G., Santagostini, L., Giovanetti, M., Flaminia, G., Fico, G. (2018). *Salvia verticillata*: Linking glandular trichomes, volatiles and pollinators. *Phytochemistry*, 155, 53-60.

- Gonzalez-Martin, A., Gorostiza, A., Regalado-Liu, L., Arroyo-Pena, S., Tirado, S., Nuno-Arana, I., Rubi-Castellanos, R., Sandoval, K., Coble, M.D., Rangel-Villalobos, H. (2015). Demographic history of indigenous One 20:e0131791.
- György, Z., Incze, N., Pluhár, Z. (2020). Differentiating *Thymus vulgaris* chemotypes with ISSR molecular markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 92, 104118.
- Hernández-Alvarado, R.B., Madariaga-Mazón, A., Ortega, A., Martinez-Mayorga, K. (2020). DARK classics in chemical neuroscience: salvinatorin A. *ACS Chemical Neuroscience*, 11(23), 3979-3992.
- Hollingsworth, P.M., Forrest, L.L., Spouge, J.L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., Van Deer, B.M., Chase, M.W., Cowan, R.S., Erickson, D.L., Fazekas, A.J. et al. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proc Ntl Acad Sci USA* 106,12794–12797.
- Hollingsworth, P. M., Graham, S. W., Little, D. P. (2011). Choosing and using a plant DNA barcode. *PloS one*, 6(5), e19254.
- Jenks, A. A., Kim, S.C. (2013). Medicinal plant complexes of *Salvia* subgenus Calospatha: An ethnobotanical study of new world sages. *Journal of ethnopharmacology*, 146(1), 214-224.
- Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A., Janzen, D. H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(23), 8369-8374.
- Kress, W. J., García-Robledo, C., Uriarte, M., Erickson, D. L. (2015). DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. *Trends in ecology and evolution*, 30(1), 25-35.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Li, R., Morris-Natschke, S. L., Lee, K.H. (2016). Clerodane diterpenes: sources, structures, and biological activities. *Natural product reports*, 33(10), 1166-1226.
- Lim-Ah-Tock, M.J., Chen, W., Combrink, S., Sandasi, M., Kamatou, G.P.P., Viljoen, A.M. (2021). Exploring the phytochemical variation of nonvolatile metabolites within tree south African *Salvia* species using UPLC-MS fingerprinting and chemometric analysis. *Fitoterapia*, 152, 104940.
- Maldonado, E., Cárdenas, J., Bojórquez, H., Escamilla, E. M., Ortega, A. (1996). Amarisolide, a neo-clerodane diterpene glycoside from *Salvia amarissima*. *Phytochemistry*, 42(4), 1105-1108.
- González-Gallegos, J. G., Bedolla-García, B. Y., Cornejo-Tenorio, G., Fernández-Alonso, J. L., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M.D.R., ... Xifreda, C. C.

- (2020). Richness and distribution of *Salvia* subg. Calosphace (Lamiaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 181(8), 831-856.
- Mehdi-Talebi, S., Askary, M., Khalili, N., Matsyura, A., Ghorbanpour, M., Kariman, K. (2021). Genetic structure and essential oil composition in wild populations of *Salvia multicaulis* Vahl. *Biochemical Systematics and Ecology*, 96, 104269.
- McGarigal, K., Cushman, S. A., Stafford, S. (2013). *Multivariate statistics for wildlife and ecology research*. Springer Science & Business Media.
- Moreno-Pérez, G. F., González-Trujano, M. E., Martínez-Gordillo, M. J., Miguel-Chávez, S., Basurto-Peña, F. A., Dorazco-González, A., Aguirre-Hernández, E. (2019). Amarisolide A and pedalitin as bioactive compounds in the antinociceptive effects of *Salvia circinata* (Lamiaceae). *Botanical Sciences*, 97(3), 355-365.
- Novak, J., Marn, M., Franz, C.M. (2006). An α -Pinene Chemotype in *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae). *Journal of Essential Oil Research*, 18(3), 239-241.
- Olvera-Mendoza, E.I., Godden, G.T., Montero-Castro, J.C., Porter, J.M., Lara-Cabrera, S.I. (2020). Chloroplast and nuclear ribosomal cistron phylogenomics in a group of closely related sections in *Salvia* subg. Calosphace. *Brazilian Journal of Botany*, 43(1), 177-191.
- Prisinzano, T. E., Rothman, R.B. (2008). Salvinorin A analogs as probes in opioid pharmacology. *Chemical reviews*, 108(5), 1732-1743.
- Ramakrishna, A., Ravishankar, G.A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6:1720–1731.
- Salinas-Arellano, E., Pérez-Vásquez, A., Rivero-Cruz, I., Torres-Colin, R., González-Andrade, M., Rangel-Grimaldo, M., Mata, R. (2020). Flavonoids and terpenoids with PTP-1B inhibitory properties from the infusion of *Salvia amarissima* Ortega. *Molecules*, 25(15), 3530.
- Sharma, A., Folch, J. L., Cardoso-Taketa, A., Lorence, A., Villarreal, M. L. (2012). DNA barcoding of the Mexican sedative and anxiolytic plant *Galphimia glauca*. *Journal of ethnopharmacology*, 144(2), 371-378.
- Solares-Pascasio, J. I., Ceballos, G., Calzada, F., Barbosa, E., Velazquez, C. (2021). Antihyperglycemic and lipid profile effects of *Salvia amarissima* Ortega on streptozocin-induced type 2 diabetic mice. *Molecules*, 26(4), 947.
- Soltis, D. E., Kuzoff, R. K., Mort, M. E., Zanis, M., Fishbein, M., Hufford, L., Koontz, J., Arroyo, M. K. (2001). Elucidating deep-level phylogenetic relationships in Saxifragaceae using sequences for six chloroplastic and nuclear DNA regions. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 669-693.
- Smaili, T., Bendif, H., Zedam, A., Flamini, G., Maggi, F. (2022). A new chemotype with high tricyclene content from the essential oil of *Salvia aegyptiaca* L. growing in Algerian Pre-Sahara. *Natural Product Research*, 36(20), 5364-5369.

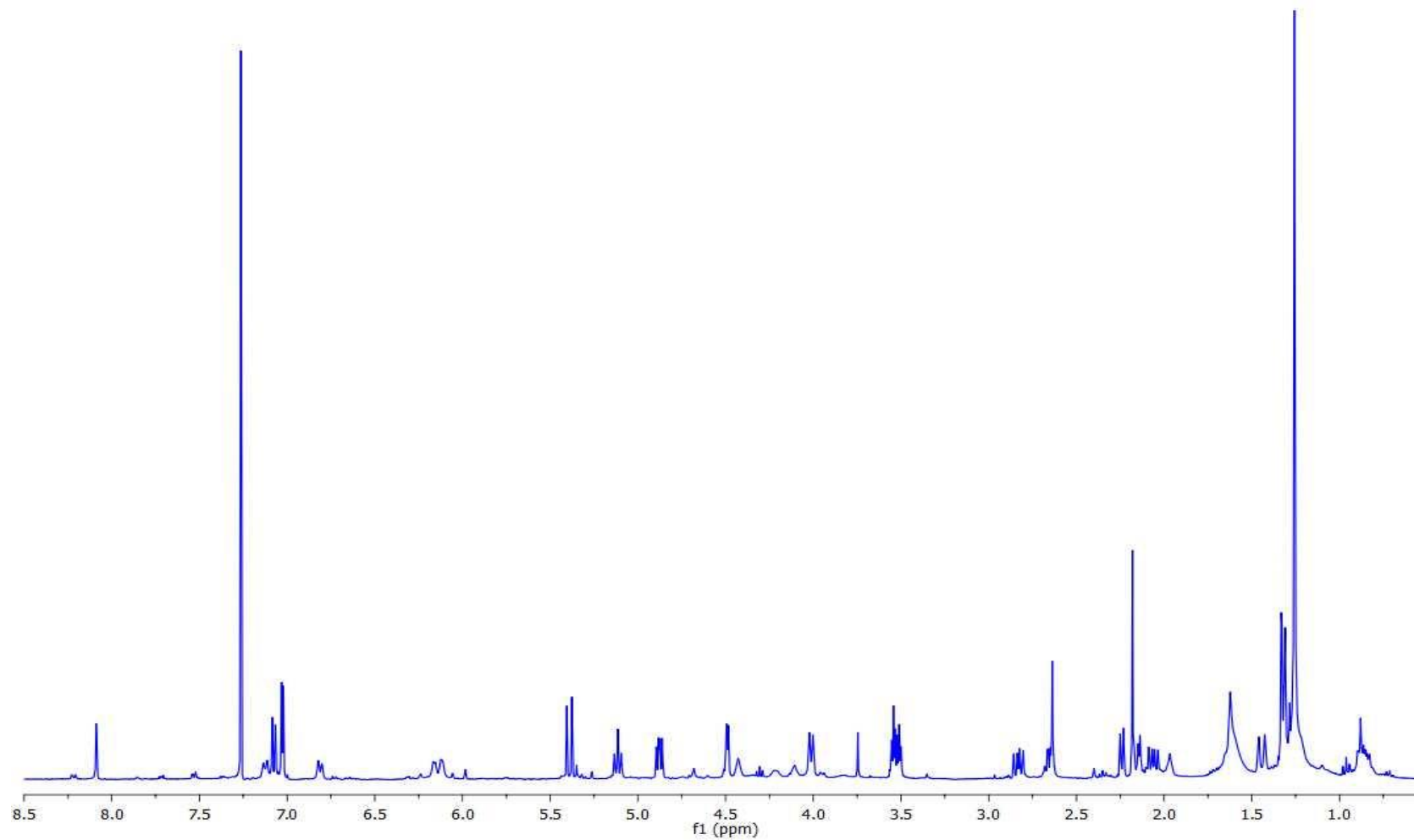
- Talebi, S.M., Behzadpour, S., Yadegari, P., Ghorbanpour, M. (2021). Trichomes structure and characterization of essential oil constituents in Iranian populations of *Salvia limbata* C.A.Meyer. *Iranian Journal of Science and Technology*, 45, 4154.
- Tamura, K., Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution*, 10(3), 512-526.
- Tuttolomondo, T., Iapichino, G., Licata, M., Virga, G., Leto, C., La Bella, S. (2020). Agronomic evaluation and chemical characterization of Sicilian *Salvia sclarea* L. accessions. *Agronomy*, 10(8), 1114.
- Velázquez-Domínguez, J.A., Hernández-Ramírez, V.I., Calzada, F., Varela-Rodríguez, L., Pichardo-Hernández, D.L., Bautista, E., Herrera-Martínez, M., Castellano-Mijangos, R.D., Matus-Meza, A.S., Chávez-Munguía, V., Talamas-Rohana, P. (2020). Linearolactone and kaempferol disrupt the actin cytoskeleton in *Entamoeba histolytica*: Inhibition of amoebic liver abscess development. *Journal of Natural Products*, 83:3671–3680.
- Wang, M., Zhao, H.X., Wang, L., Wang, T., Yang, R. W., Wang, X. L., Zhou, Y.H., Ding, C.B., Zhang, L. (2013). Potential use of DNA barcoding for the identification of *Salvia* based on cpDNA and nrDNA sequences. *Gene*, 528(2), 206-215.
- Wu, Y. B., Ni, Z.Y., Shi, Q.W., Dong, M., Kiyota, H., Gu, Y.C., Cong, B. (2012). Constituents from *Salvia* species and their biological activities. *Chemical reviews*, 112(11), 5967-6026.
- Yang, L., Wen, K.S., Ruan, X., Zhao, Y.X., Wei, F., Wang, Q. (2018). Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*, 23(4), 762.
- Yobi, A., Wone, B.W., Xu, W., Alexander, D.C., Guo, L., Ryals, J.A., Oliver, M.J., Cushman, J.C. (2013). Metabolomic profiling in *Selaginella lepidophylla* at various hydration states provides new insights into the mechanistic basis of desiccation tolerance. *Molecular Plant*, 6(2), 369-385.
- Zubair, M., Nybom, H., Ahnlund, M., Rumpunen, K. (2012). Detection of genetic and phytochemical differences between and within populations of *Plantago major* L.(plantain). *Scientia horticultruae*, 136, 9-16.

CONCLUSIONES GENERALES

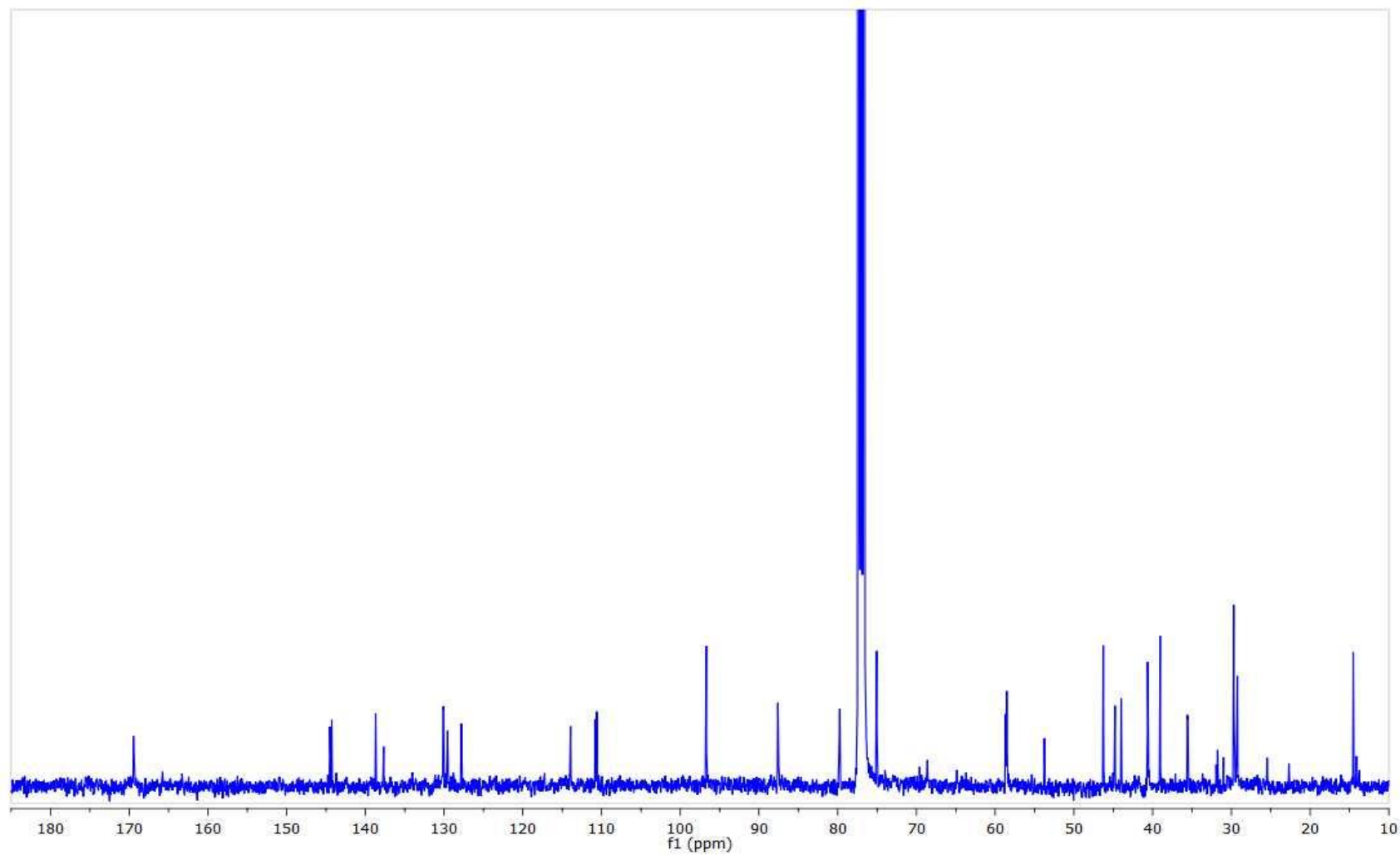
1. Se encontraron estructuras anatómicas (traqueoides) antes no reportadas en semillas de especies de *Salvia*, se identificó cuál es la ruta que sigue el agua para el proceso de imbibición en las especies de *S. pennellii*, *S. chamaedryoides* y *S. reflexa*, así como también se encontró la función del mucílago en estas especies.
2. Se identificó cómo se afectan las semillas de las especies *S. pennellii*, *S. chamaedryoides* y *S. reflexa* ante estrés abiótico (aumento de temperatura y sequía) y como afecta su proceso de germinación.
3. Se aislaron e identificaron tres compuestos antes no descritos de la especie *S. pennellii*: wirikutina/15-*epi*-wirikutina (**1/2**) y wixaricolida (**3**), siendo este último la cuarta descripción de un compuesto con esqueleto tilifolano.
4. Se aisló e identificó un compuesto nuevo de la especie *S. reflexa*: reflexiolida/16-*epi*-reflexdiolida (**7/8**), además de que se aisló la 6- β -acetoxysalviarina (**9**), compuesto que solo se había podido aislar hasta ahora como una mezcla.
5. Se identificó la tolerancia de plantas de *S. reflexa* ante dos intensidades de sequía (moderada y severa), encontrando alteraciones en sus variables fisiológicas (ϕ PSI, ETR, clorofilas totales, RWC, peso fresco y seco), así como modificaciones en sus características anatómicas como ancho de hoja, tallo y raíz, mayor número de canales de mucílago en tallo y disminución en el número de vasos y de cloroplastos. Además, se observó un aumento en la concentración de pedlitina y circiliol (flavonas) en presencia de sequía. Se encontraron MS específicos para cada uno de los tratamientos, los cuales podrían servir como marcadores de estrés hídrico.

6. De la evaluación de las diez poblaciones de *S. circinnata* se identificó una nueva población productora de amarisolida A (**17**), una población con altas cantidades de amarissinina A (**23**) (YUR) y seis nuevas poblaciones con altas cantidades de teotihuacanina (**27**) (SJI, ZIM, JIL, PAC, AQX y LMP).
7. Se estableció la existencia de cuatro quimiotipos: *S. circinnata* CT amarissinina A (YUR), *S. circinnata* CT amarissinina A (YUR), *S. circinnata* CT óxido de cariofileno (TEH) y *S. circinnata* CT teotihuacanina (SJI, ZIM, JIL, PAC, AQX, LMP y TEO).
8. Se encontró que variables ambientales como la latitud, altitud, temperatura y precipitación tiene influencia en la concentración de MS de *S. circinnata*: a altitudes más altas y con menos precipitación se da un aumento en la concentración de espatulenol y cariofileno y una disminución en la concentración de amarisolida A (**17**) y dodecano; 2,2-dimetiloctaecano y al disminuir la altitud y temperatura mínima se da un aumento en la concentración del óxido de cariofileno y una disminución en la concentración de α -amirina.

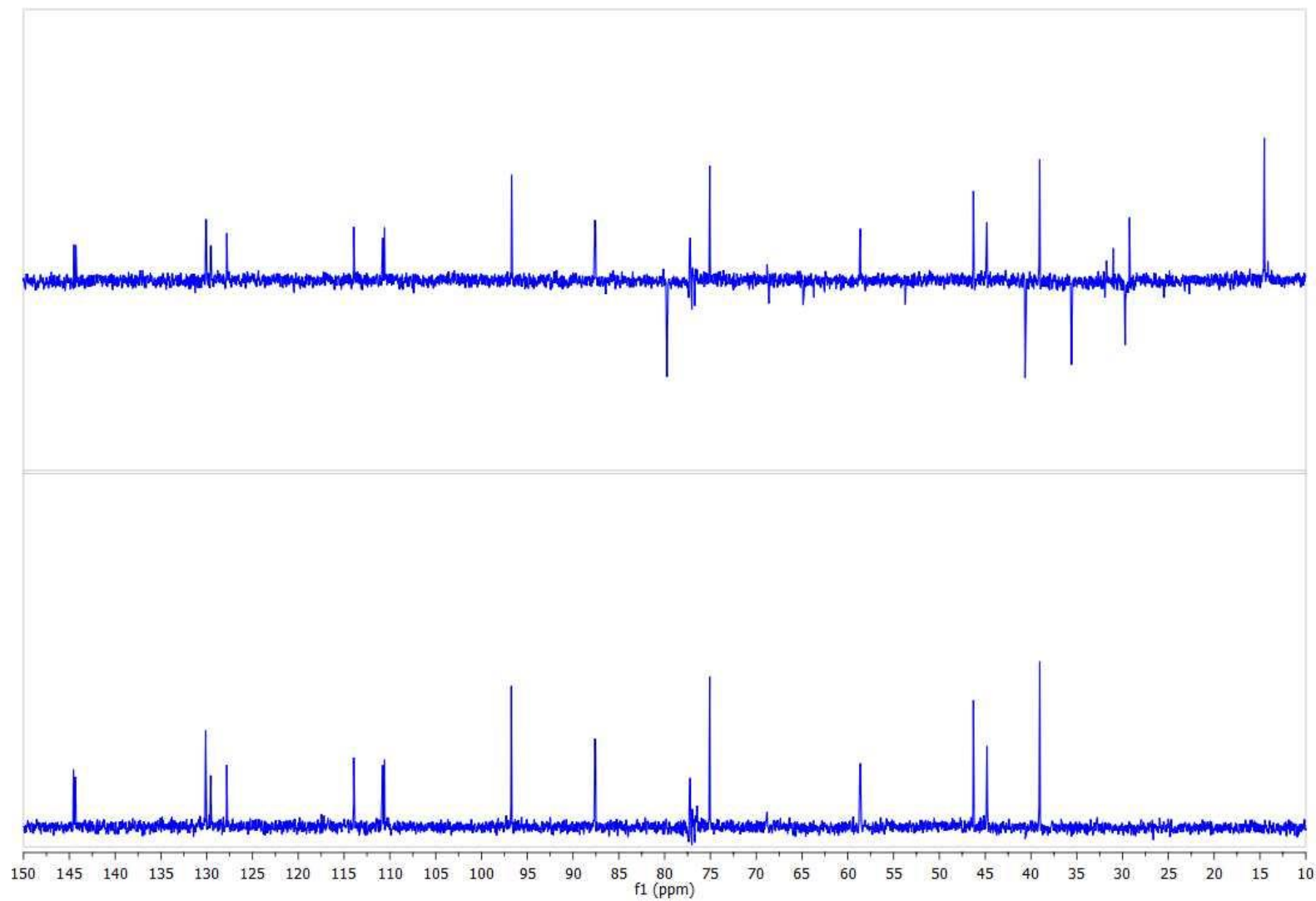
7. APÉNDICES



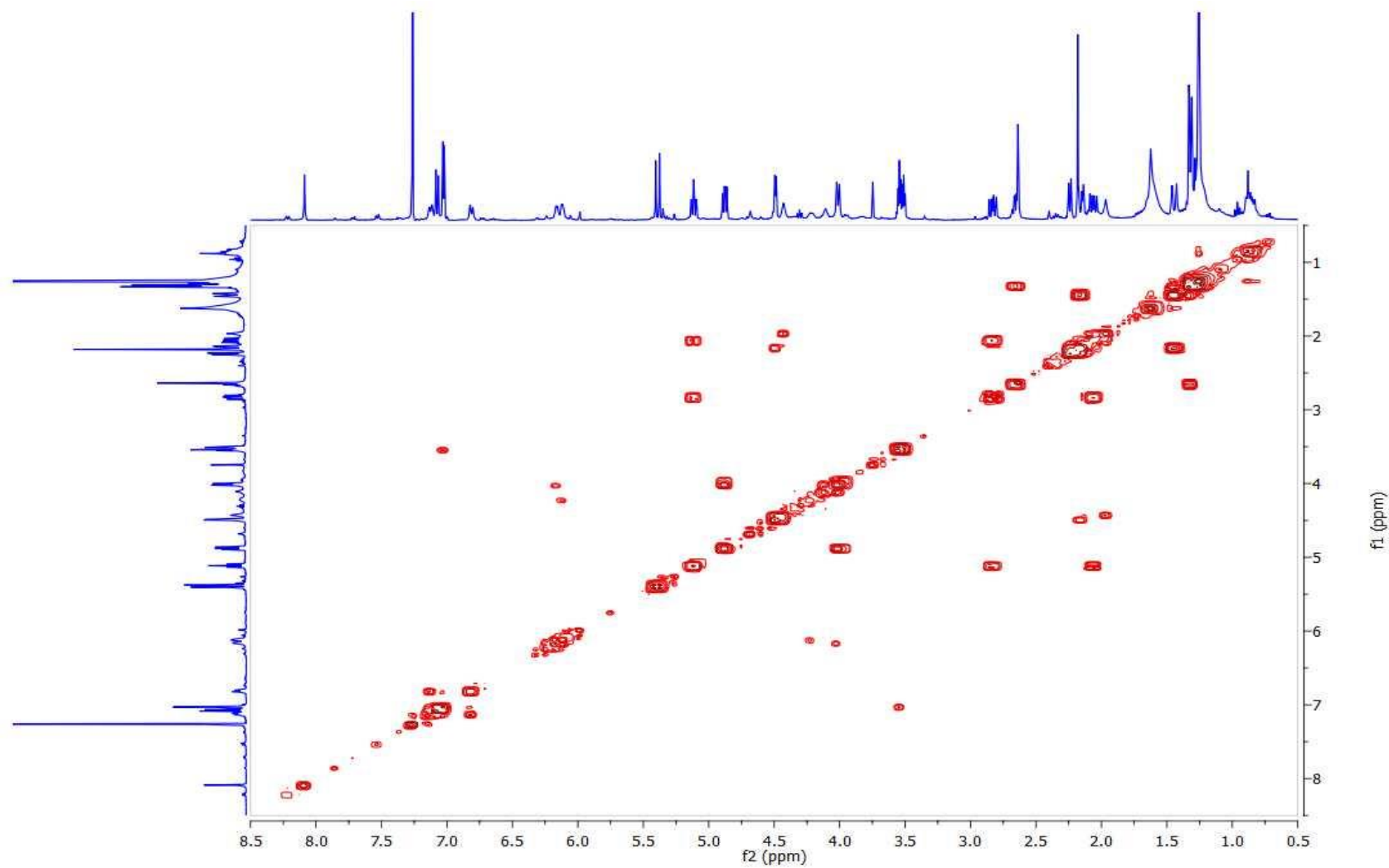
Apéndice 1. Espectro ¹H NMR de las wirikutina/15-*epi*-wirikutina (**1/2**, 700 MHz, CDCl₃).



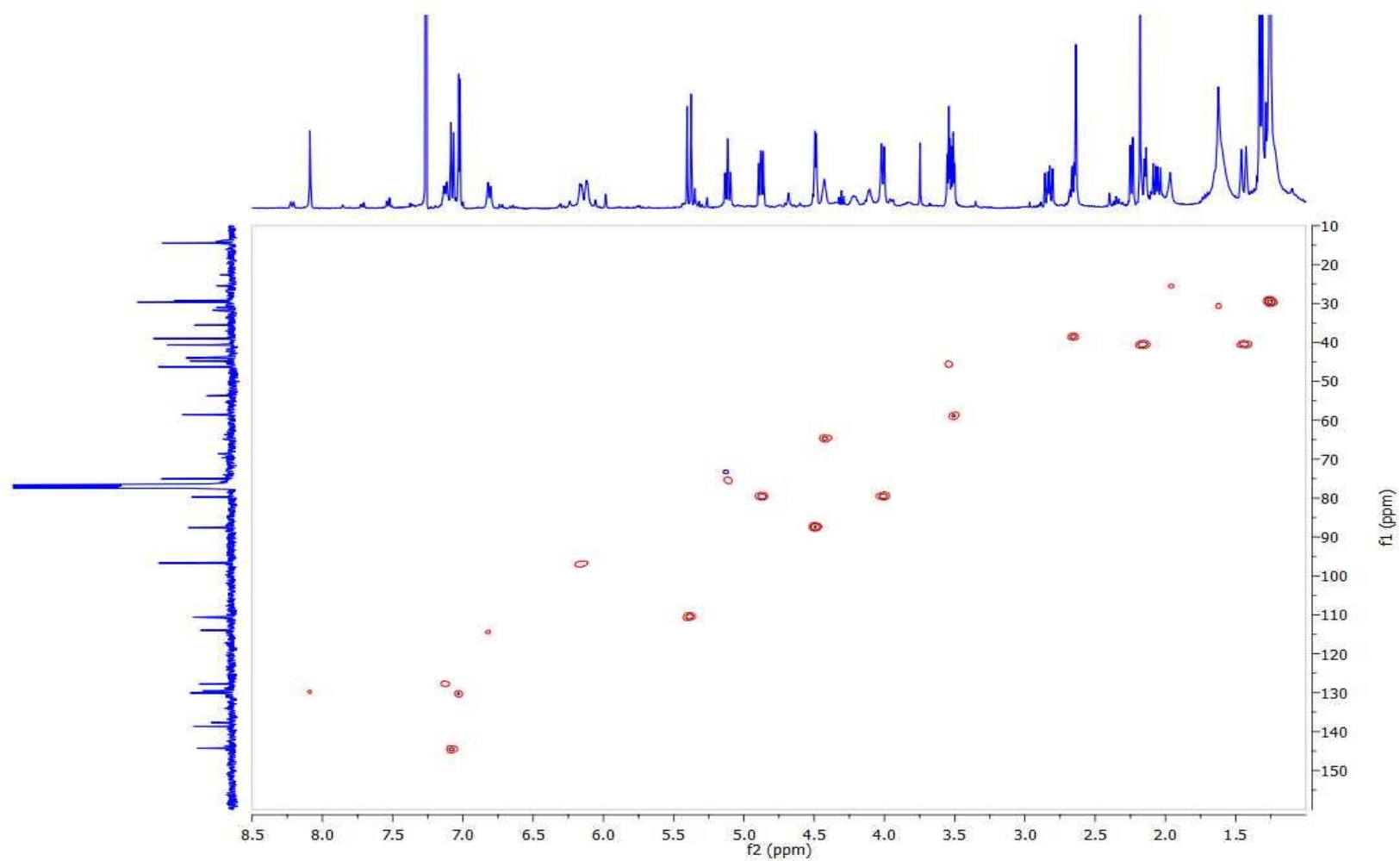
Apéndice 2. Espectro ^{13}C NMR de las wirikutina/15-*epi*-wirikutina (**1/2**, 175 MHz, CDCl_3).



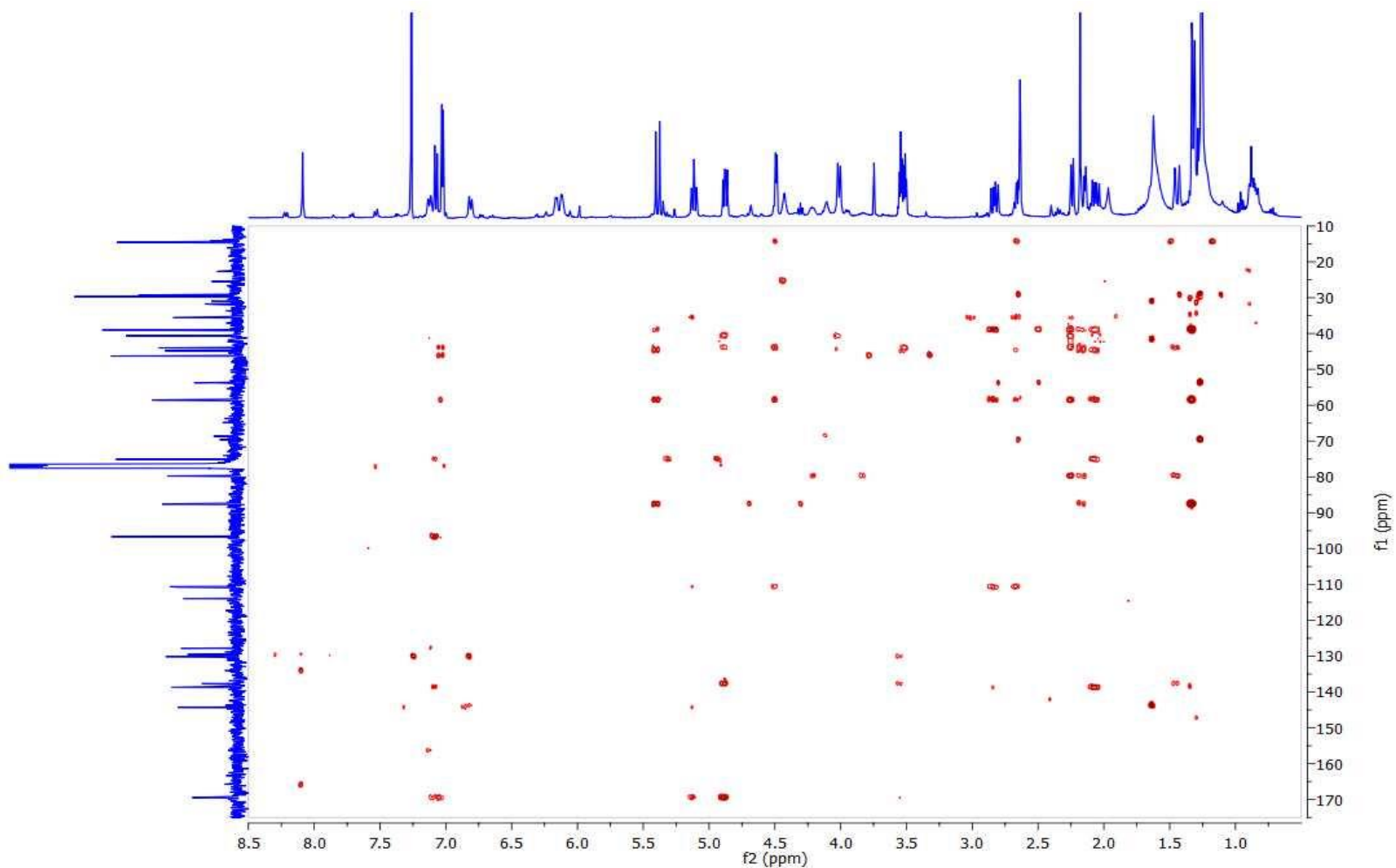
Apéndice 3. Espectro DEPT 135 y DEPT 90 wirikutina/15-*epi*-wirikutina (1/2).



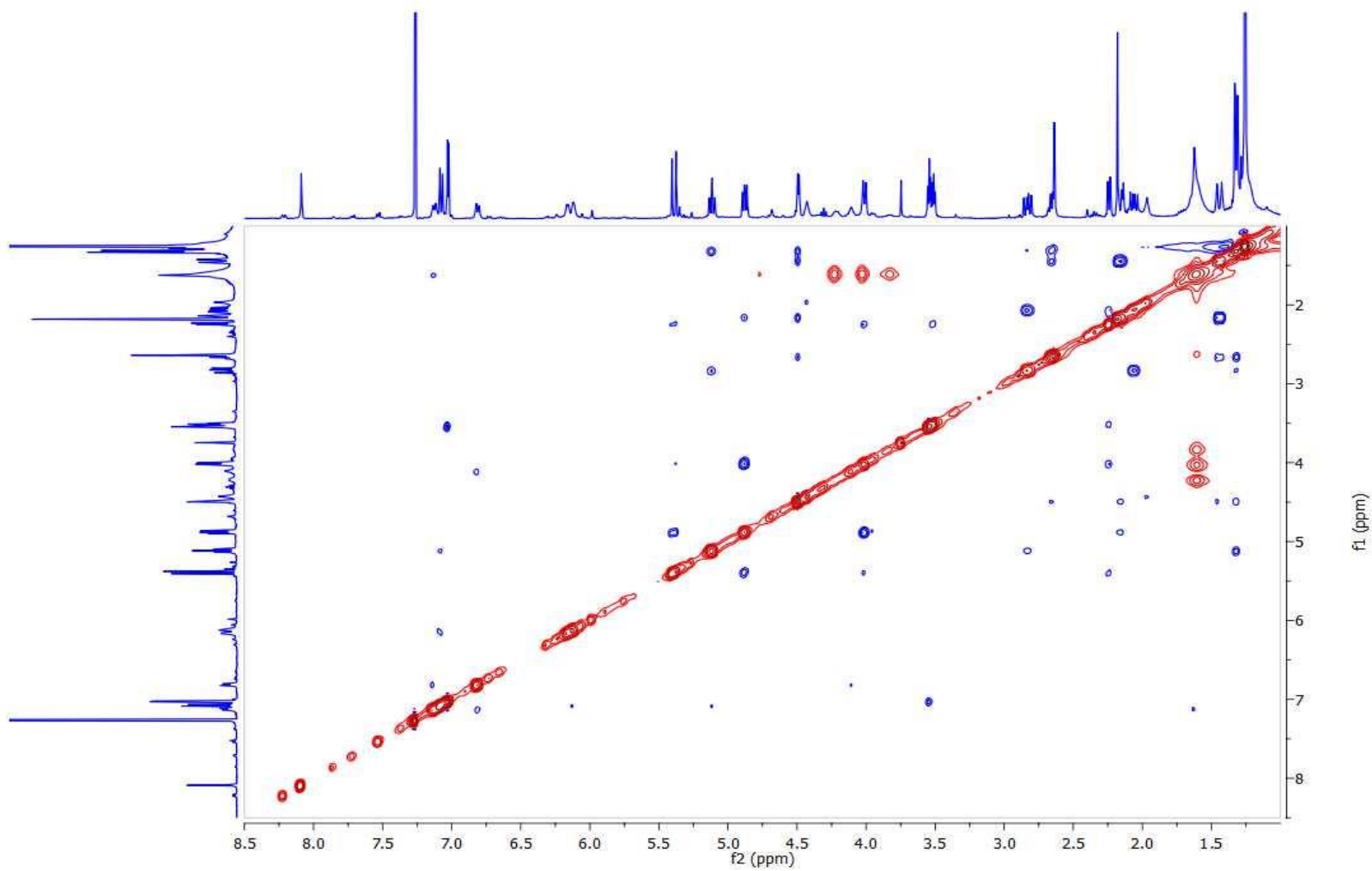
Apéndice 4. Espectro COSY de la wirikutina/15-*epi*-wirikutina (1/2, CDCl₃).



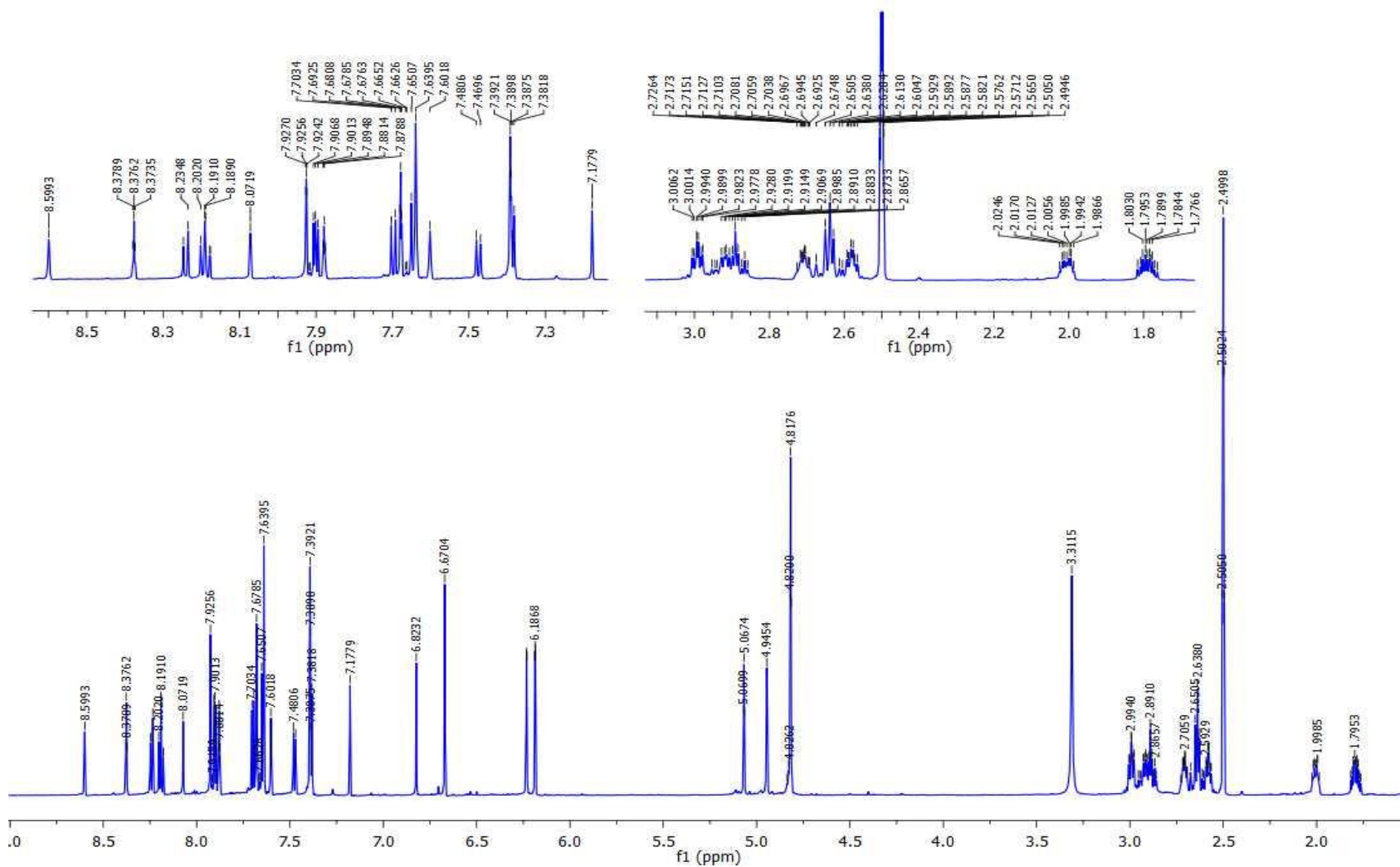
Apéndice 5. Espectro HSQC de las wirikutina/15-*epi*-wirikutina (**1/2**, CDCl₃).



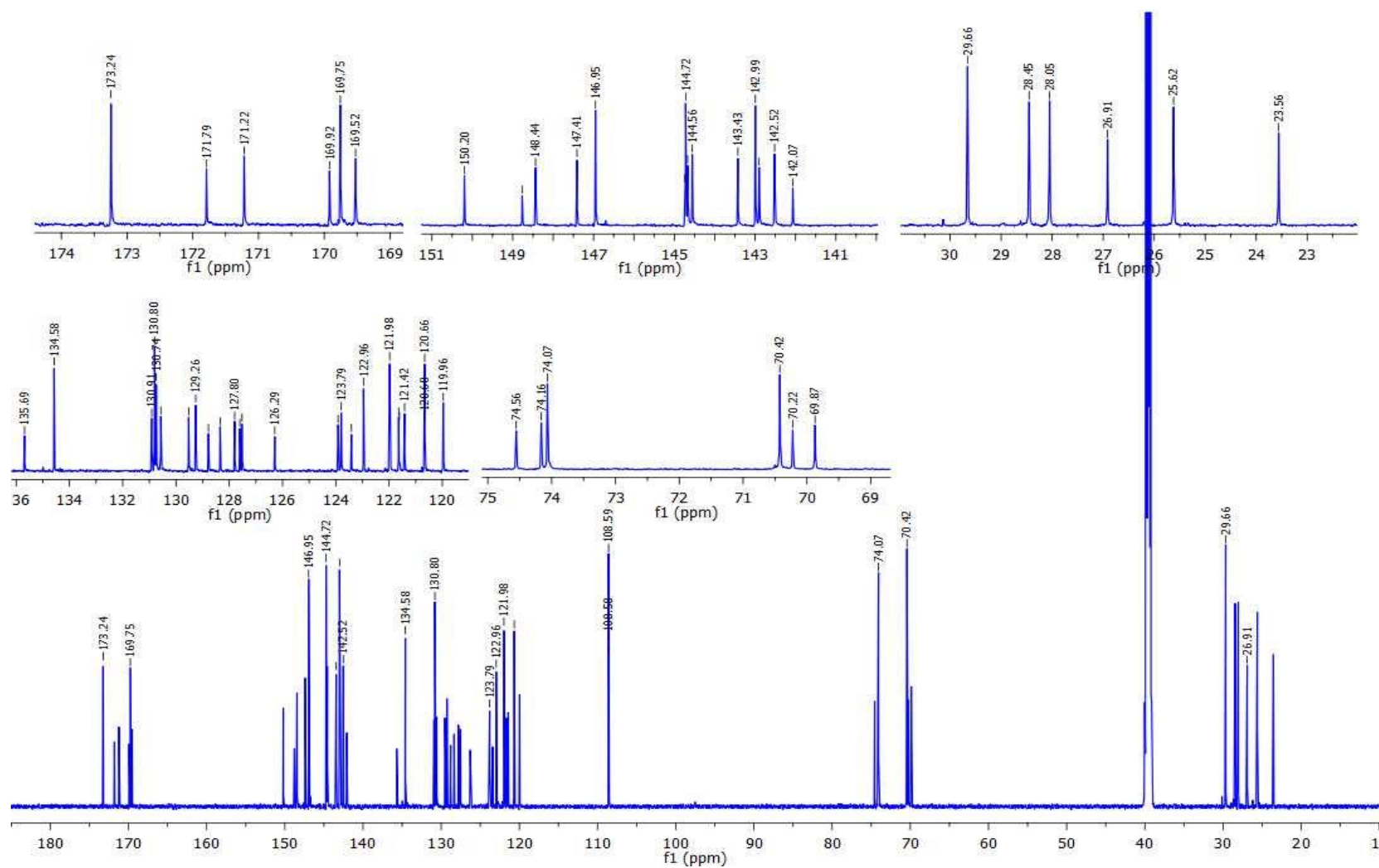
Apéndice 6. Espectro HMBC de las wirikutina/15-*epi*-wirikutina (1/2, CDCl_3).



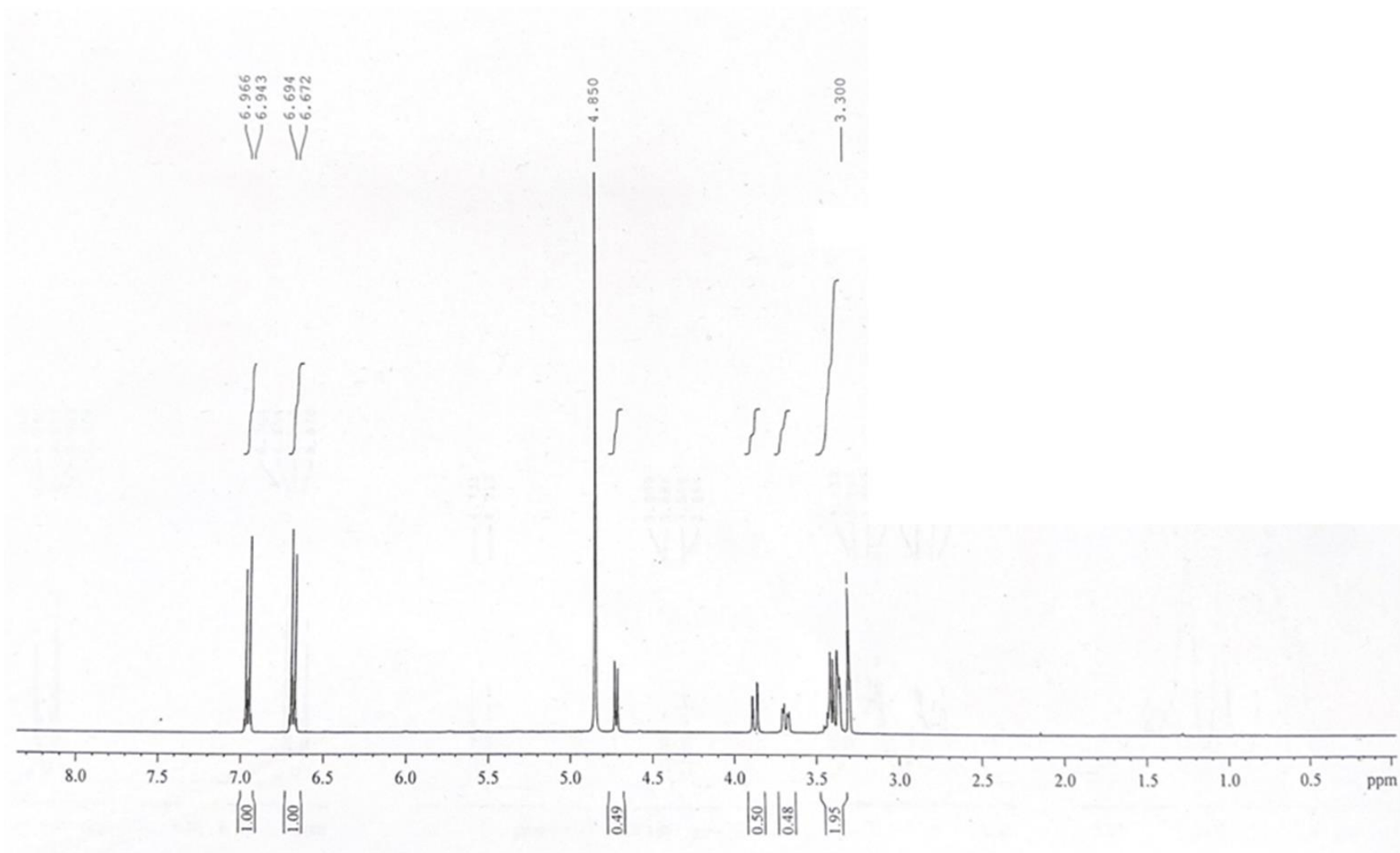
Apéndice 7. Espectro NOESY de las wirikutina/15-*epi*-wirikutina (**1/2**, CDCl_3).



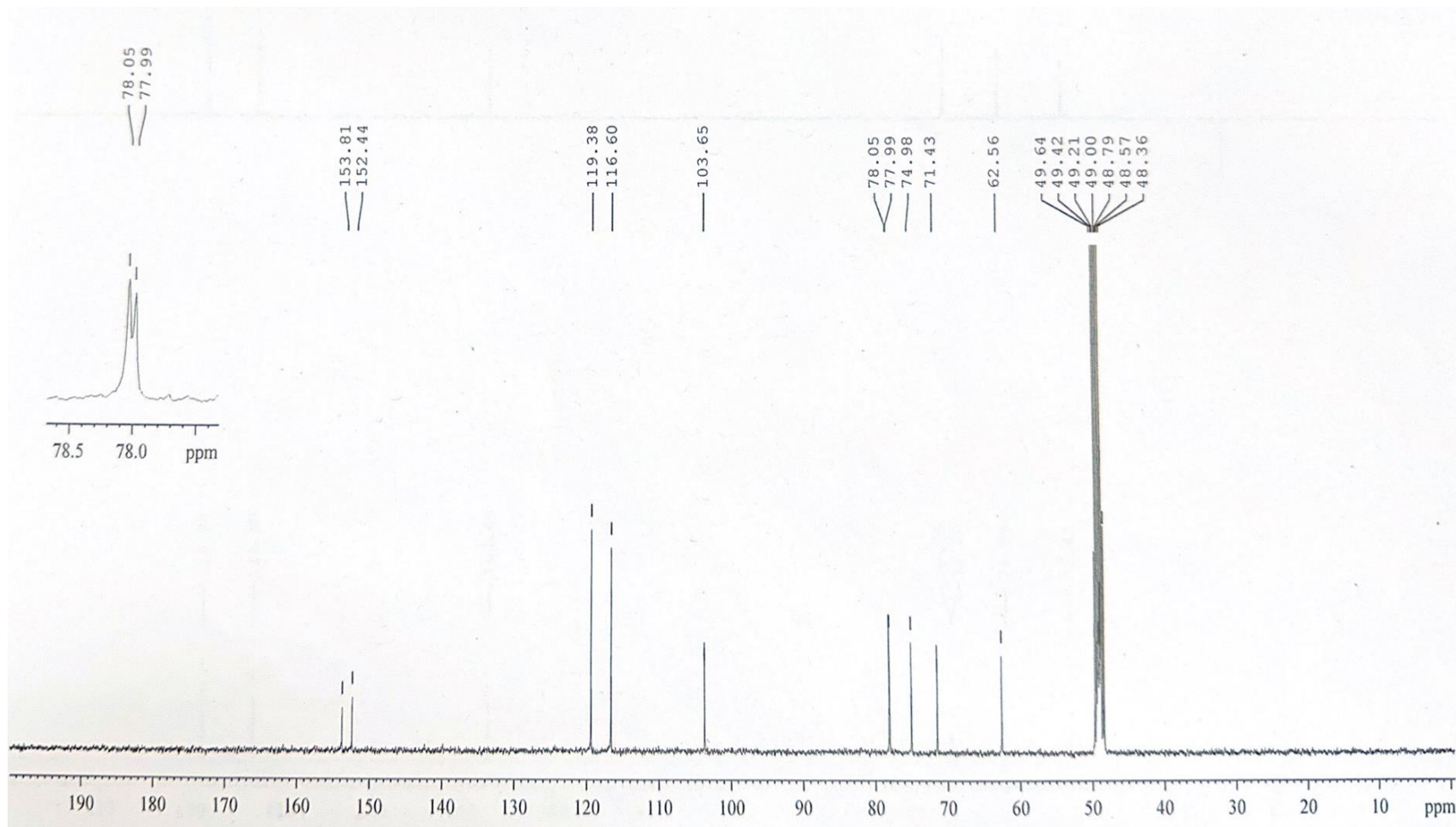
Apéndice 8. Espectro ^1H NMR de la mezcla de la wixarikolida (3,700 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}-d_6$).



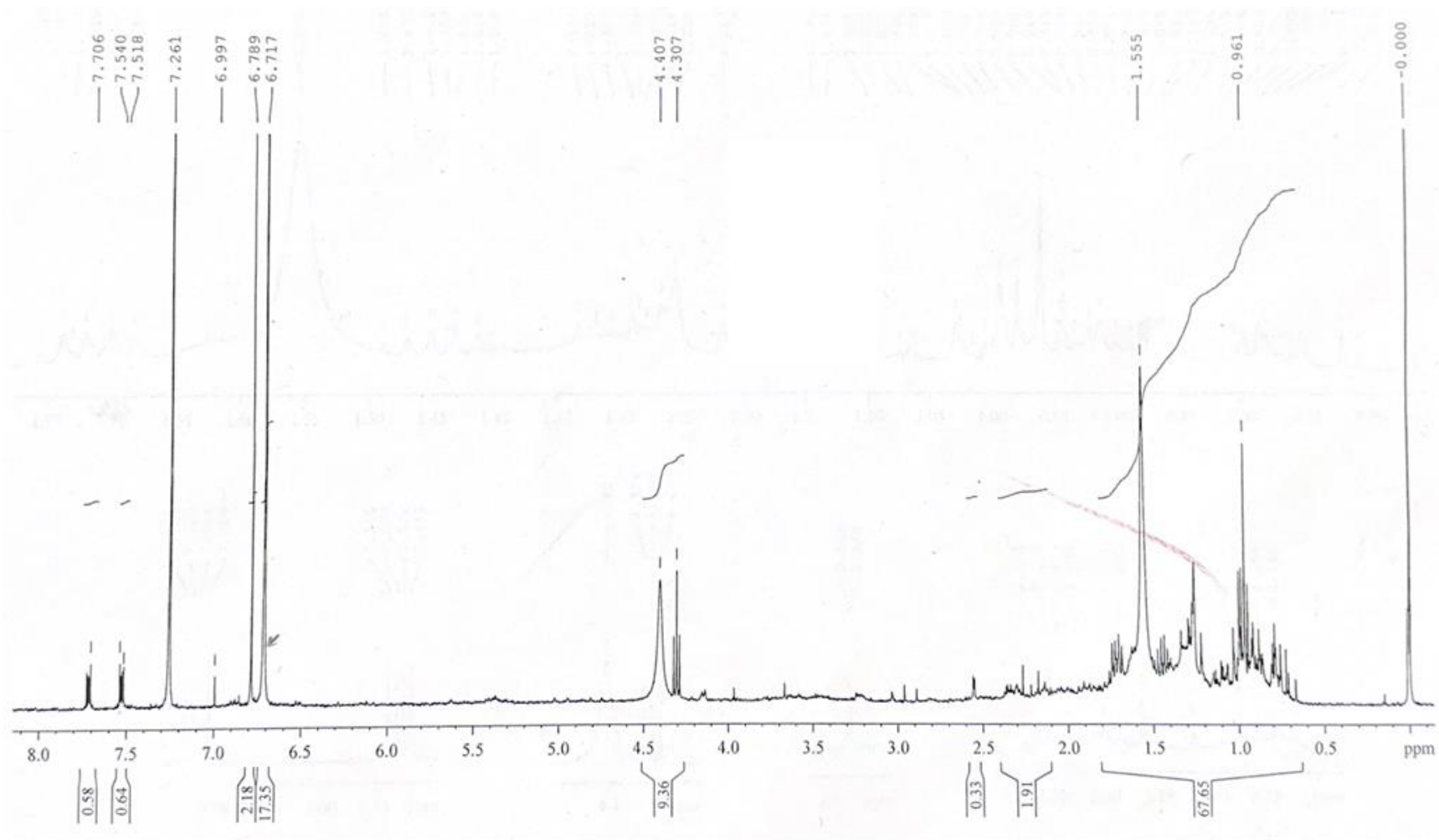
Apéndice 9. Espectro ^{13}C NMR de la mezcla de la wixarikolida (3, 175 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}-d_6$).



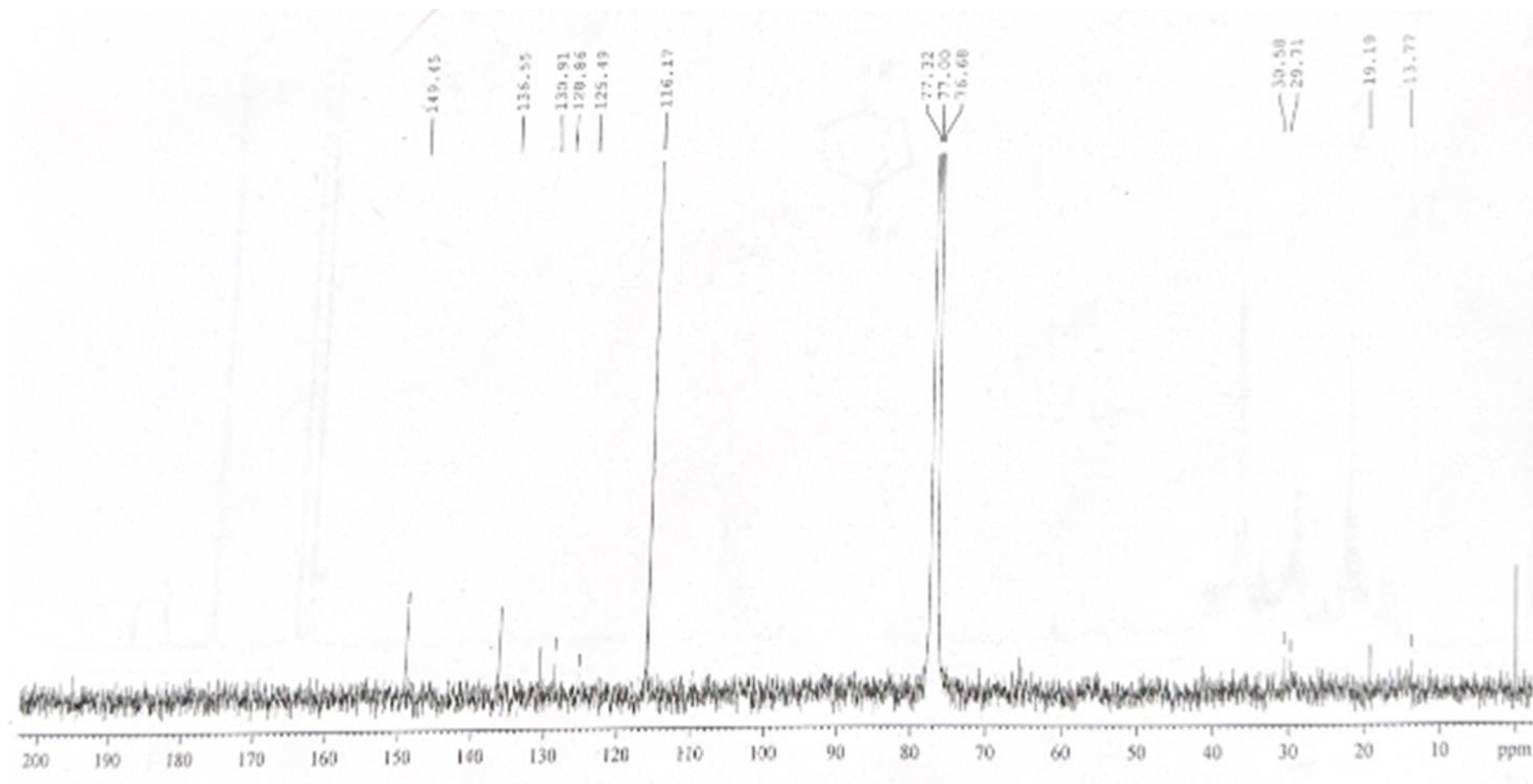
Apêndice 10. Espectro ^1H NMR de arbutina (**4**, MeOD 400 MHz).



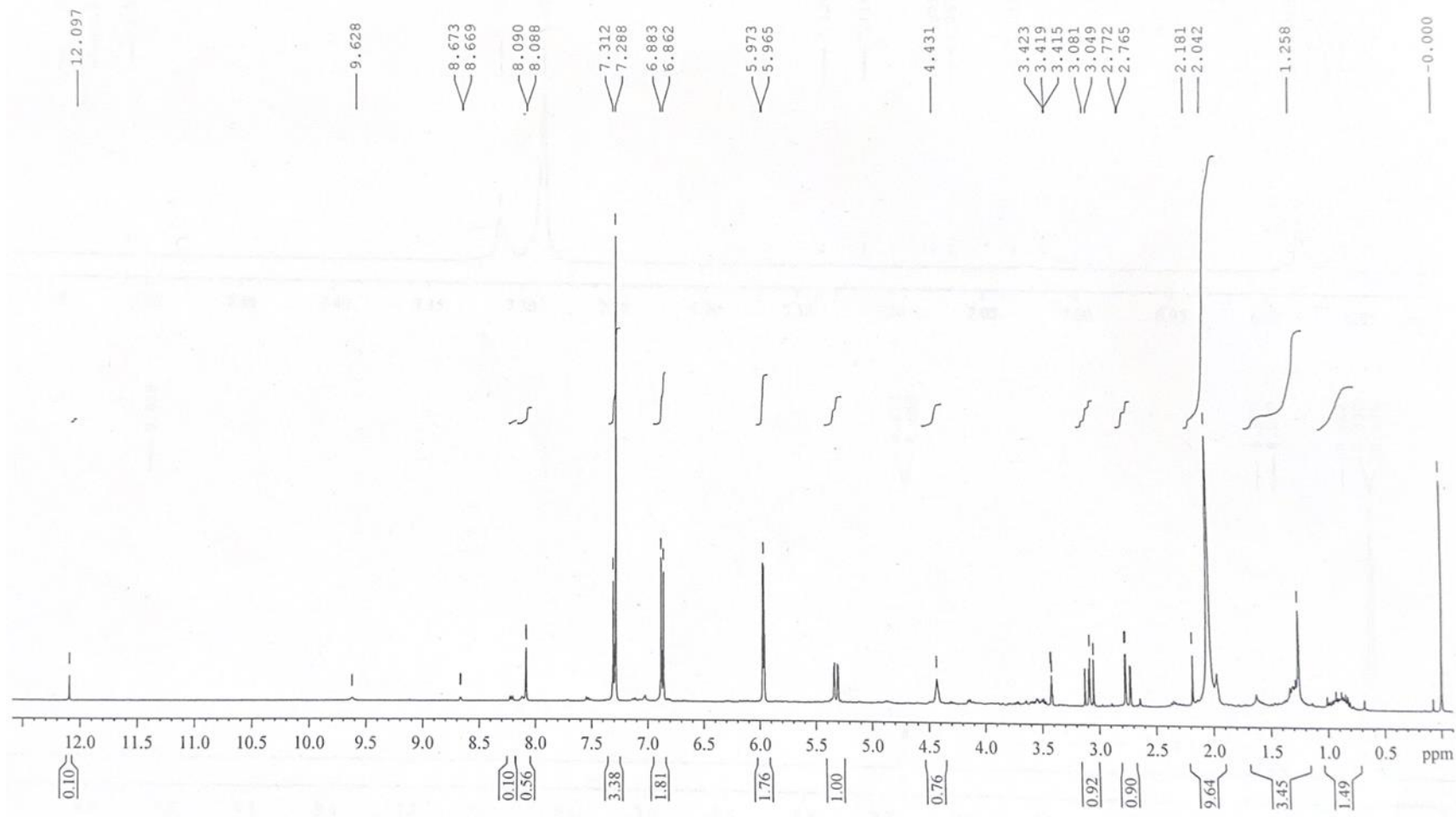
Apéndice 11. Espectro ^{13}C NMR de arbutina (**4**, MeOD 400 MHz).



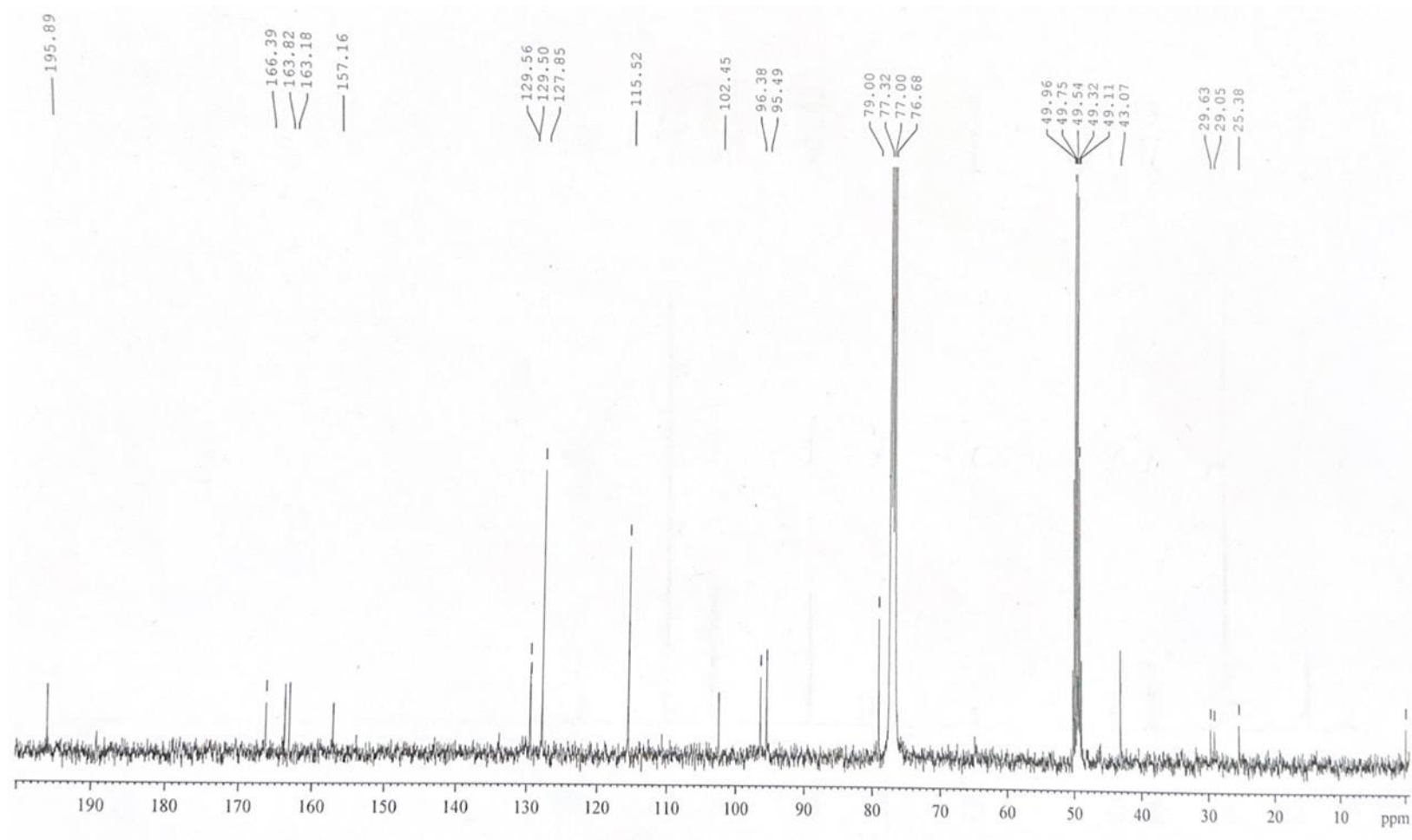
Apéndice 12. Espectro ^1H NMR de la hidroquinona (**5**, CDCl_3 400 MHz).



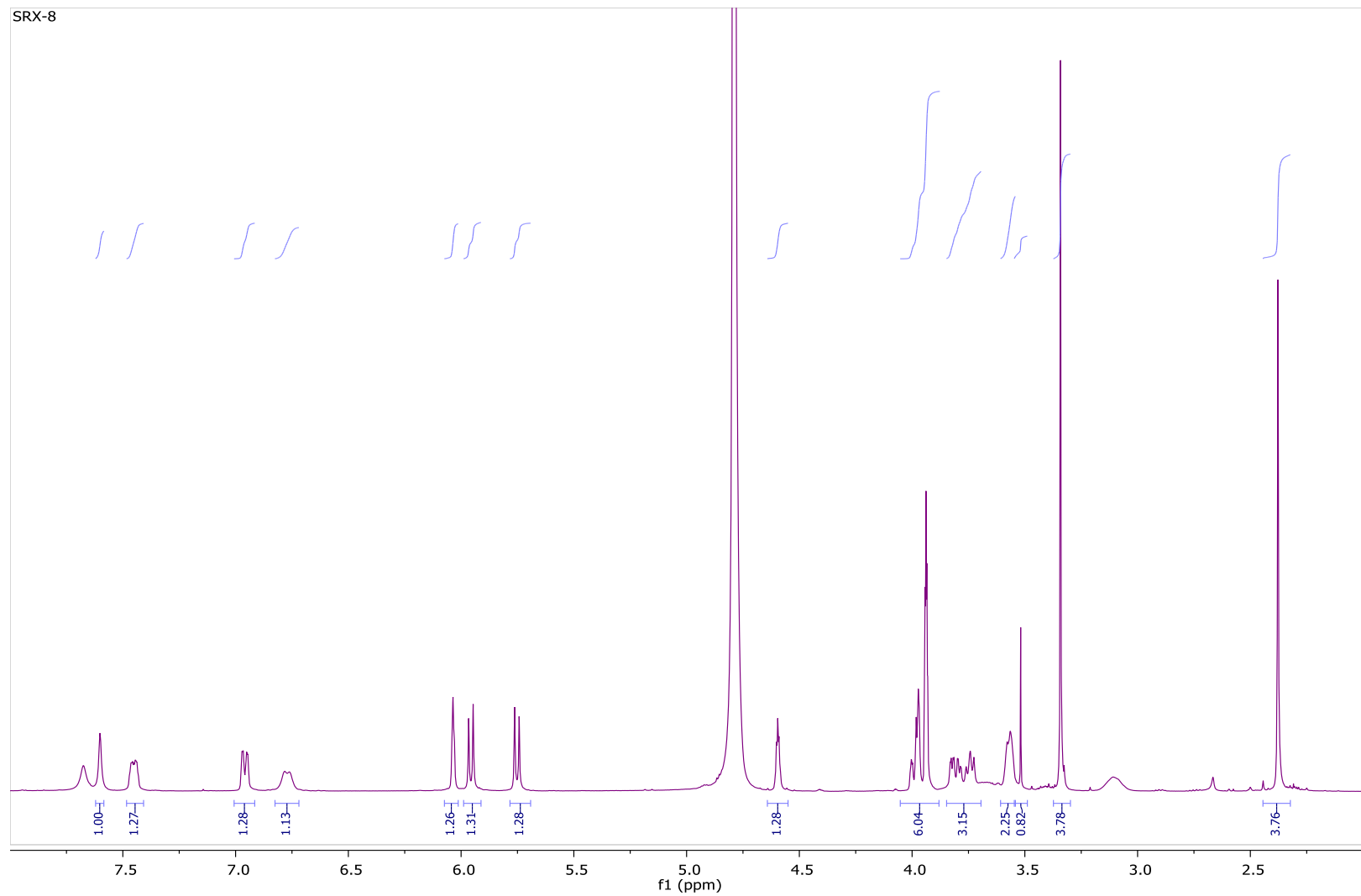
Apéndice 13. Espectro ^{13}C NMR de la hidroquinona (**5**, CDCl_3 400 MHz).



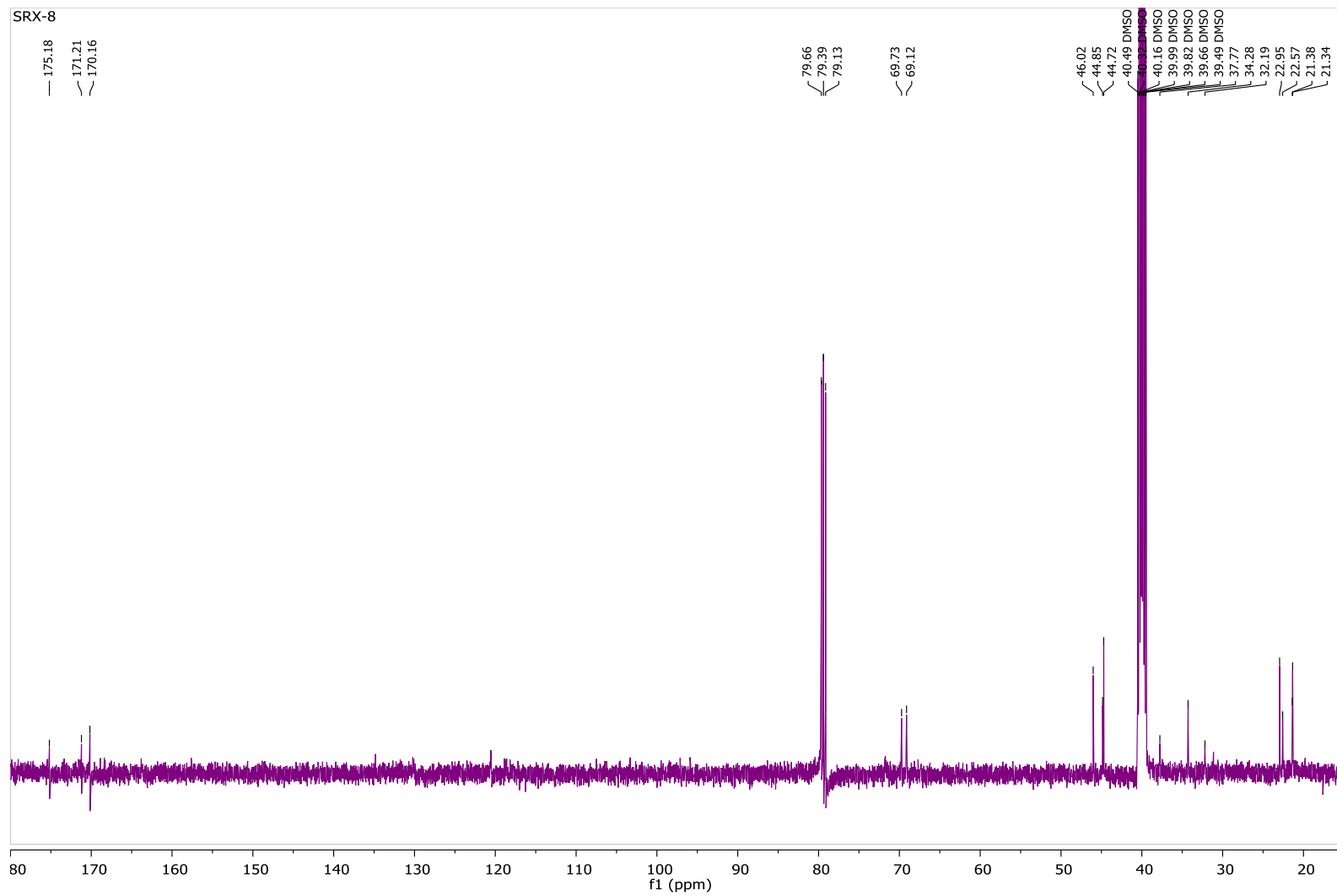
Apéndice 14. Espectro ^1H NMR de la naringenina (**6**, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ 400 MHz).



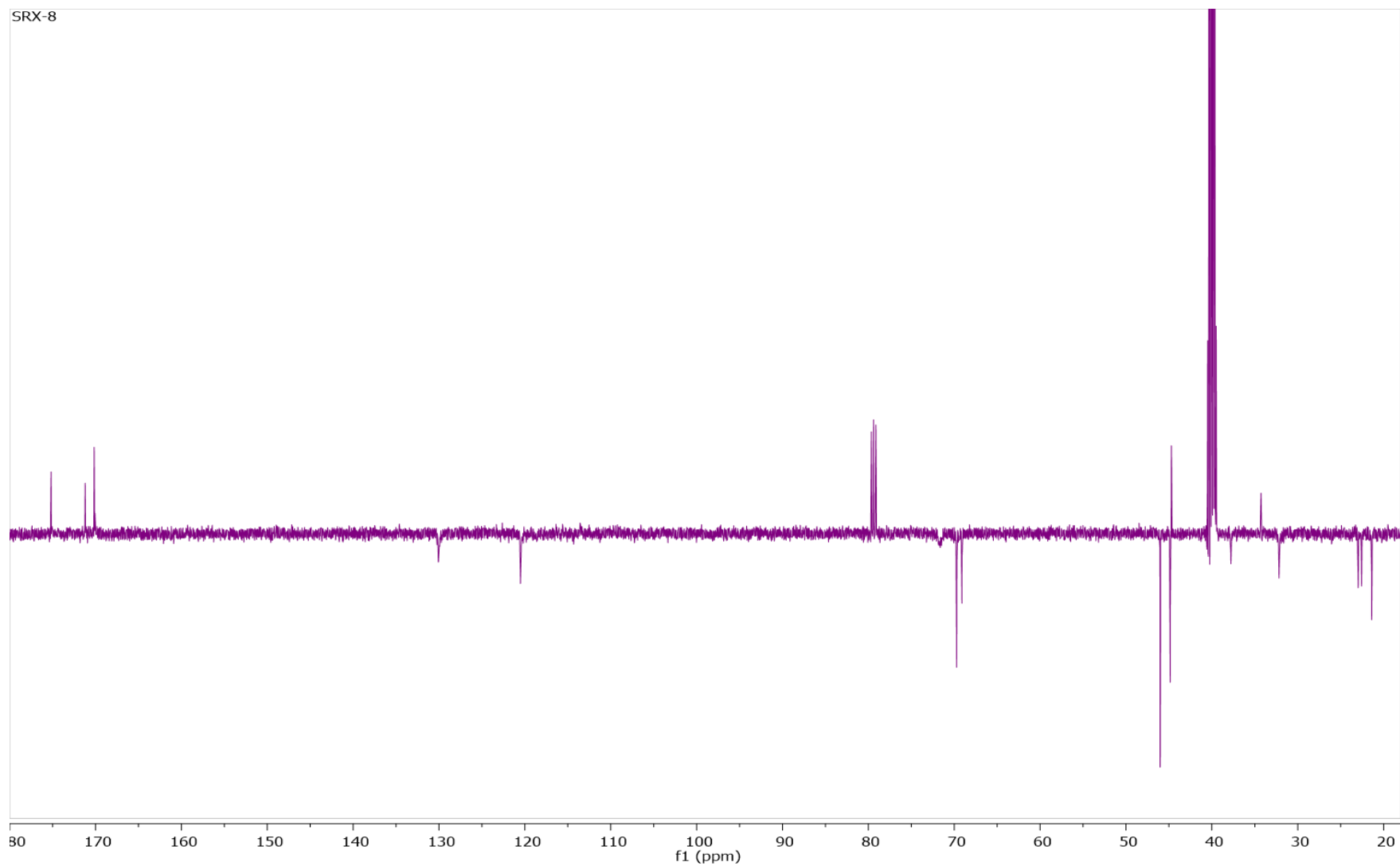
Apéndice 15. Espectro ¹³C NMR de la naringenina (**6**, CDCl₃ + CD₃OD 400 MHz).



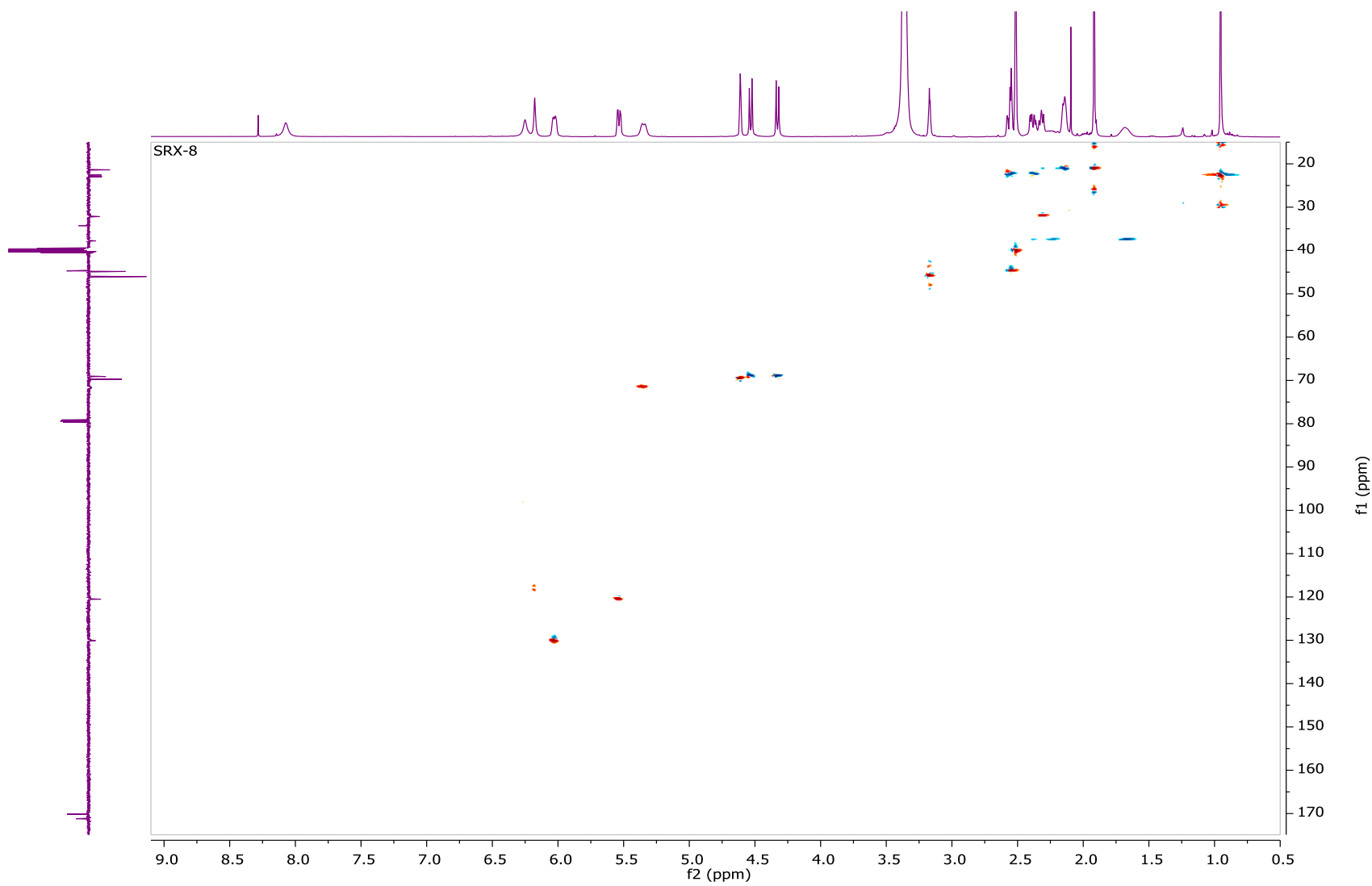
Apéndice 16. Espectro ^1H NMR de reflexiolida/16-*epi*-reflexdiolida (7/8, DMSO 400 MHz).



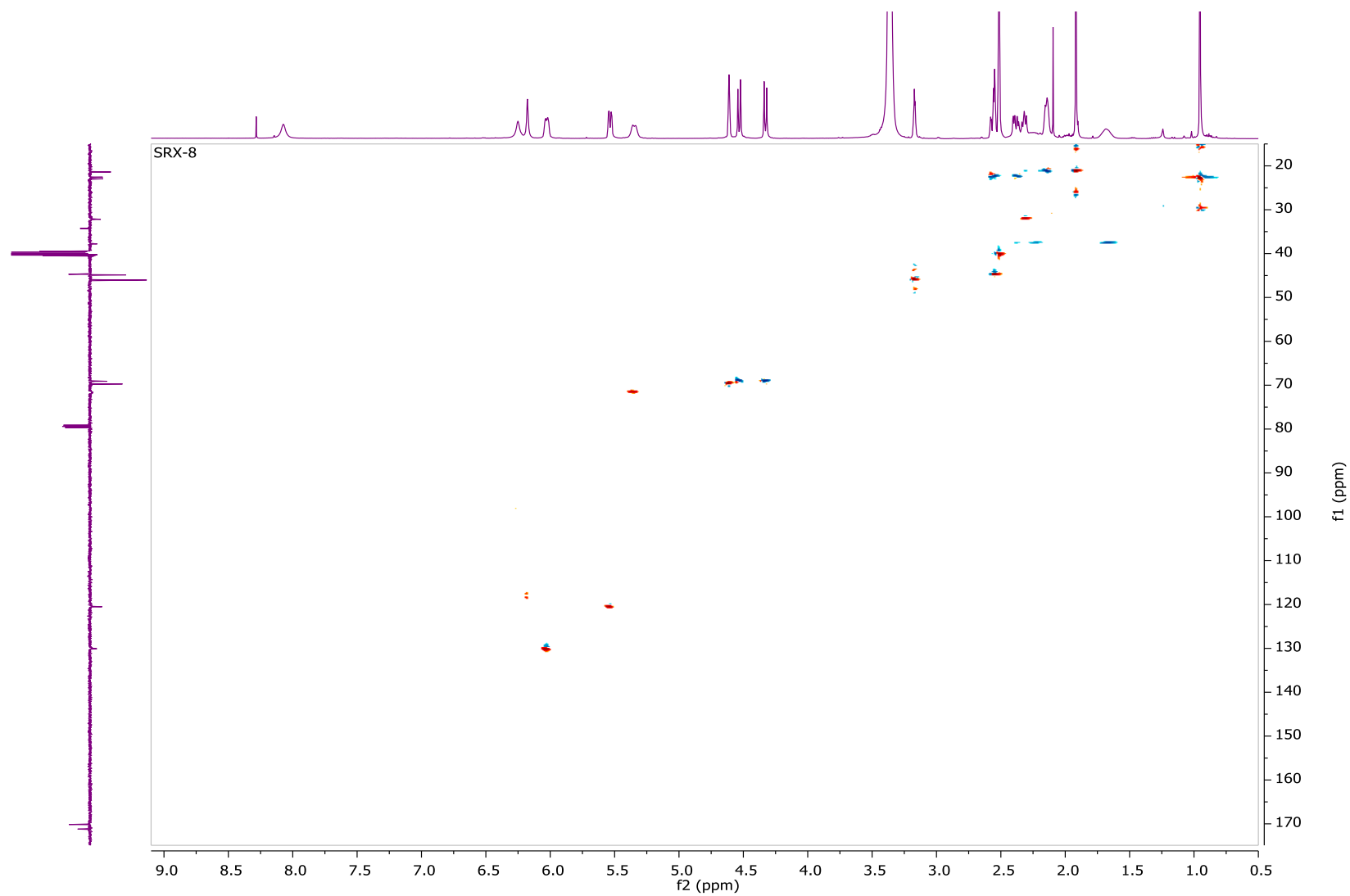
Apéndice 17. Espectro ^{13}C NMR de reflexiolida/16-*epi*-reflexdiolida (7/8, DMSO 400 MHz).



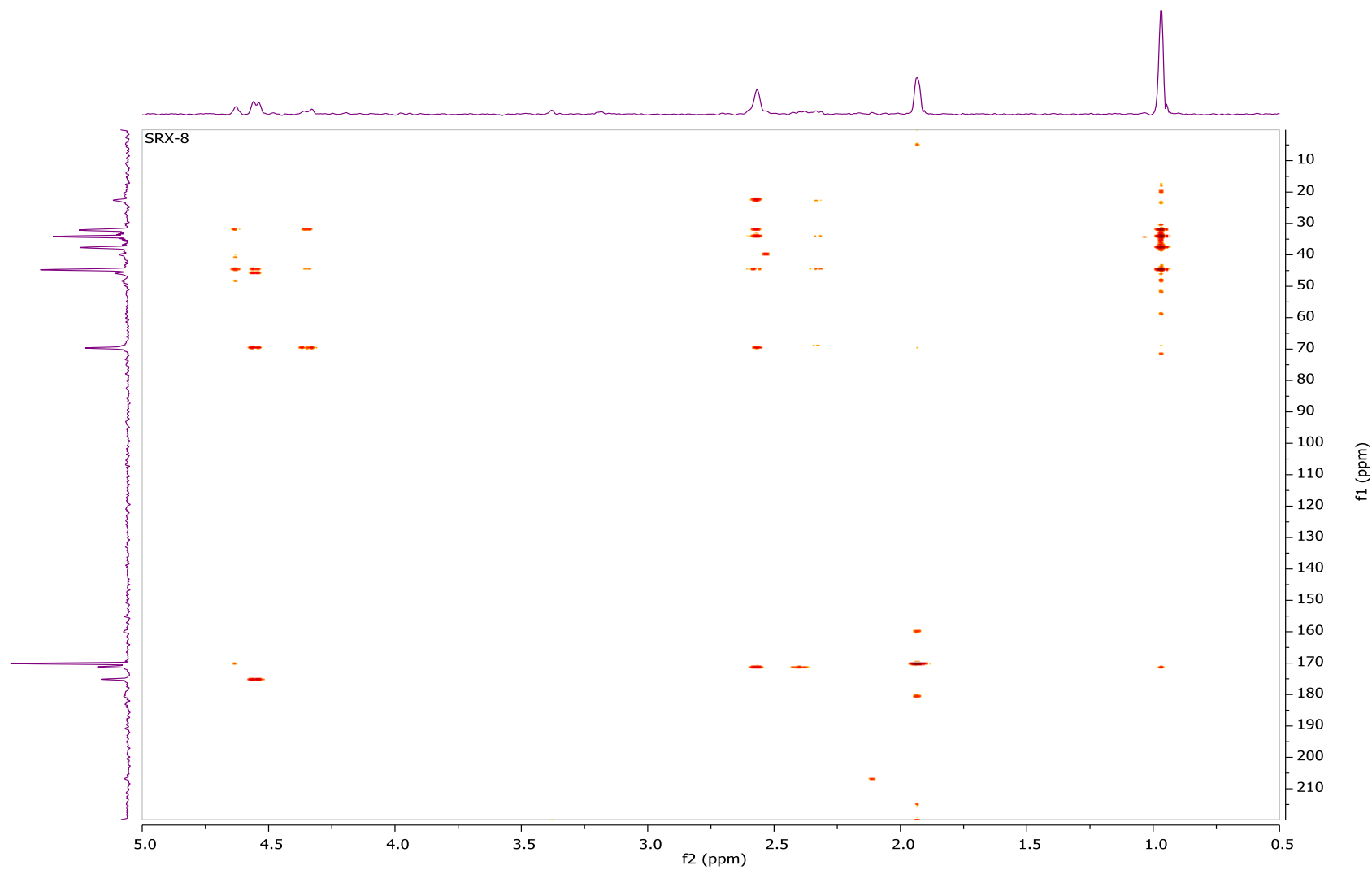
Apéndice 18. Espectro DEPT de reflexiolida/16-*epi*-reflexdiolida (**7/8**, DMSO 400 MHz)



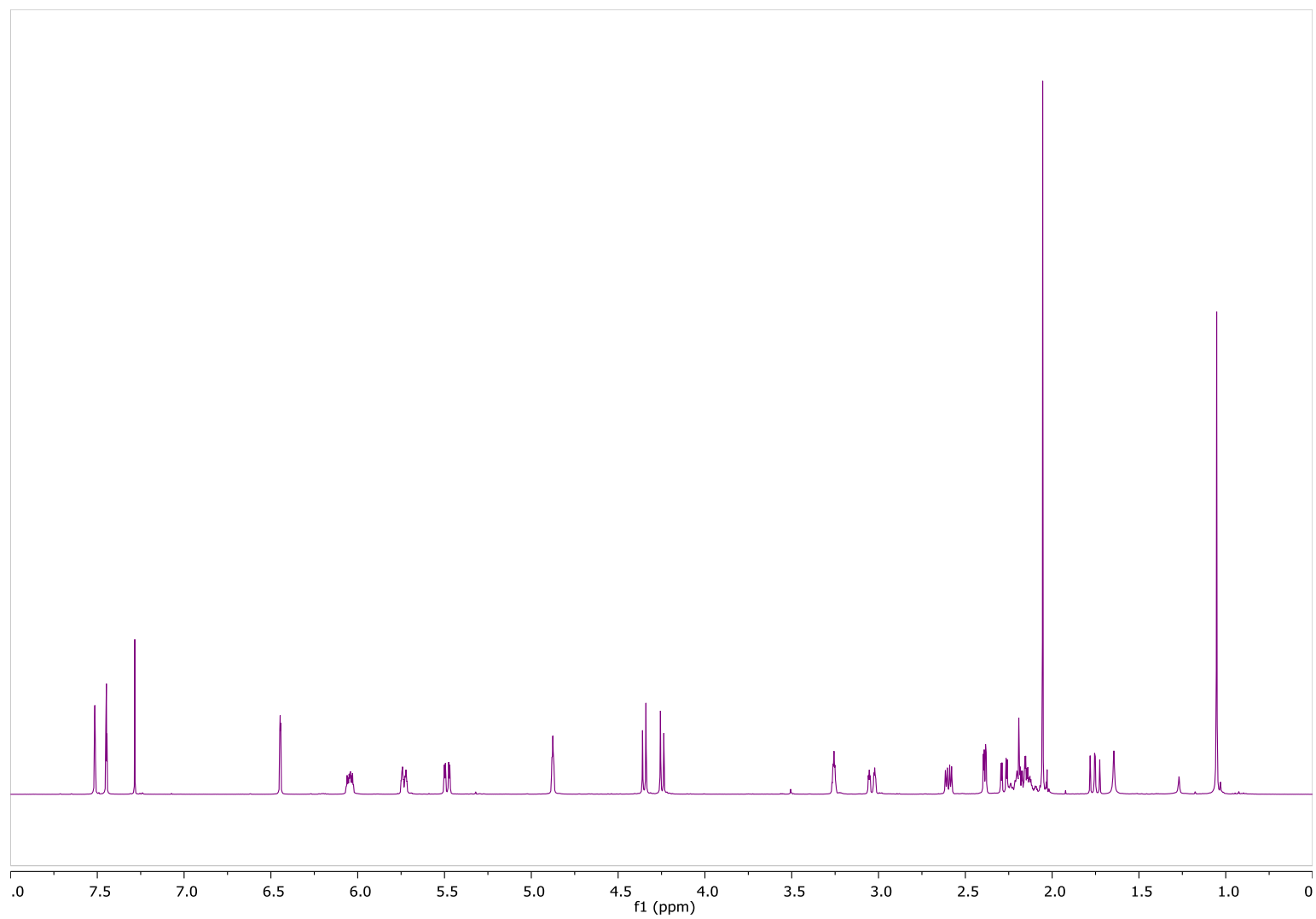
Apéndice 19. Espectro HSQC de reflexiolida/16-*epi*-reflexdiolida (7/8, DMSO 400 MHz)



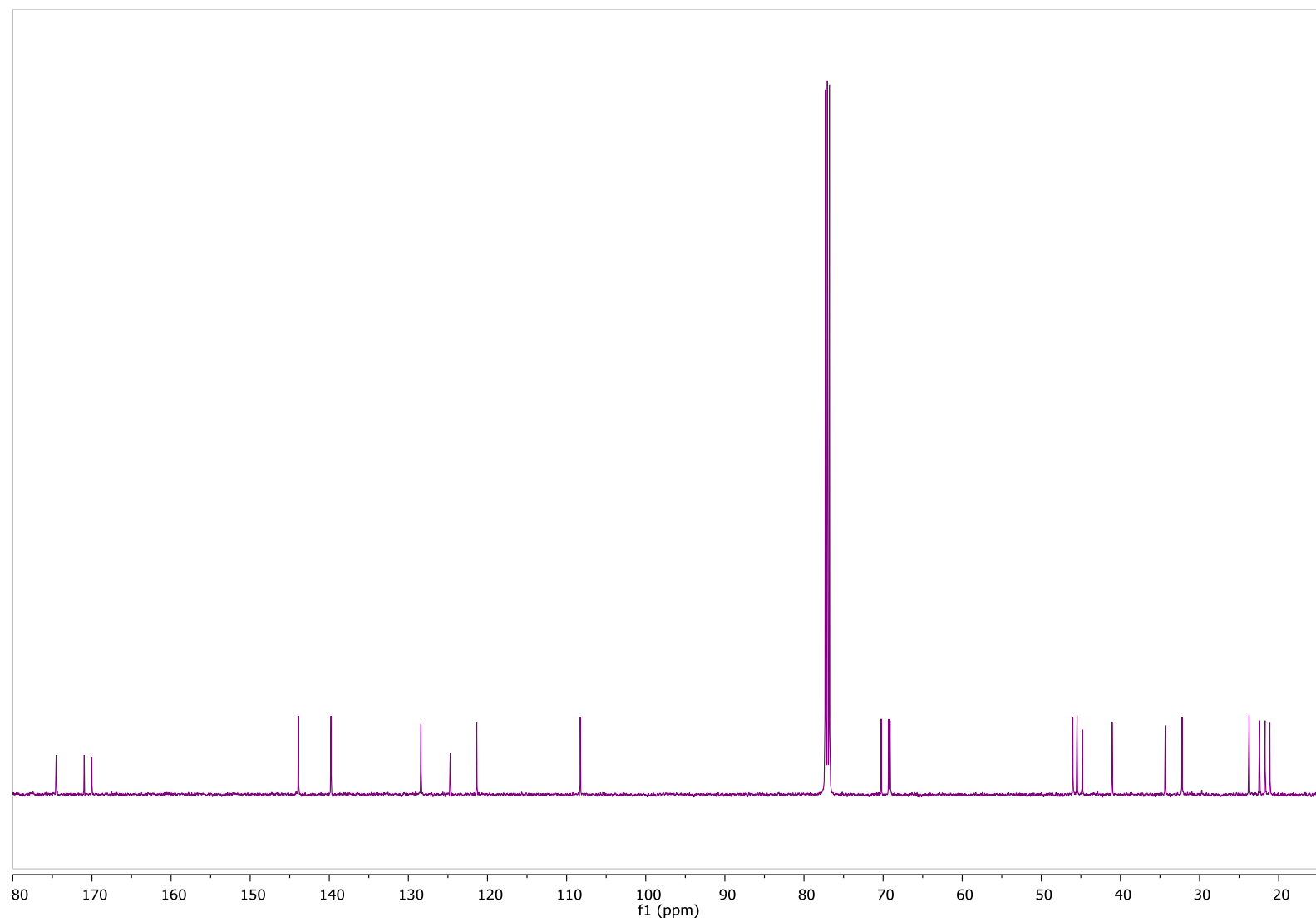
Apéndice 20. Espectro COSY de reflexiolida/16-*epi*-reflexdiolida (7/8, DMSO 400 MHz).



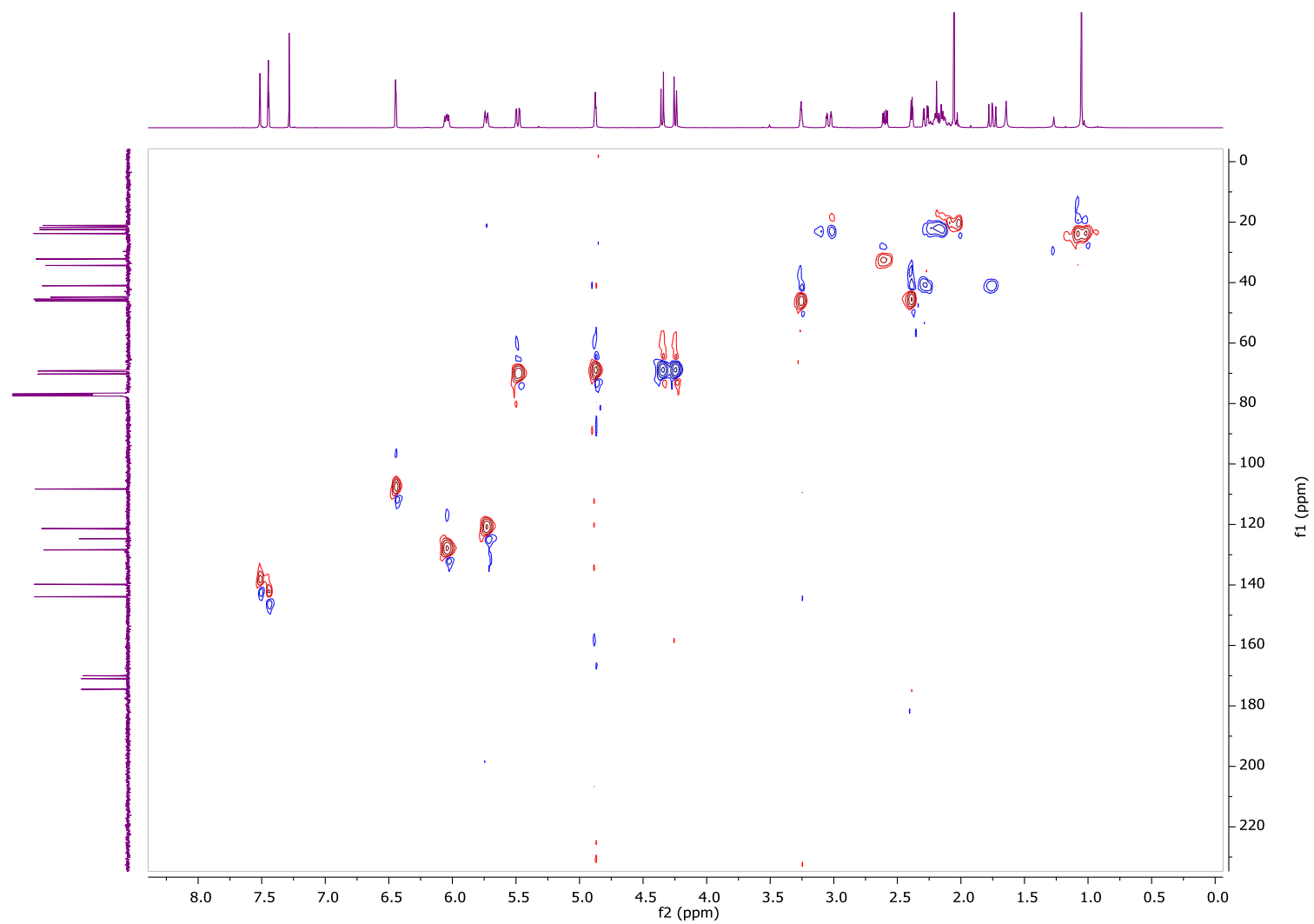
Apéndice 21. Espectro HMBC de reflexiolida/16-*epi*-reflexdiolida (7/8, DMSO 400 MHz).



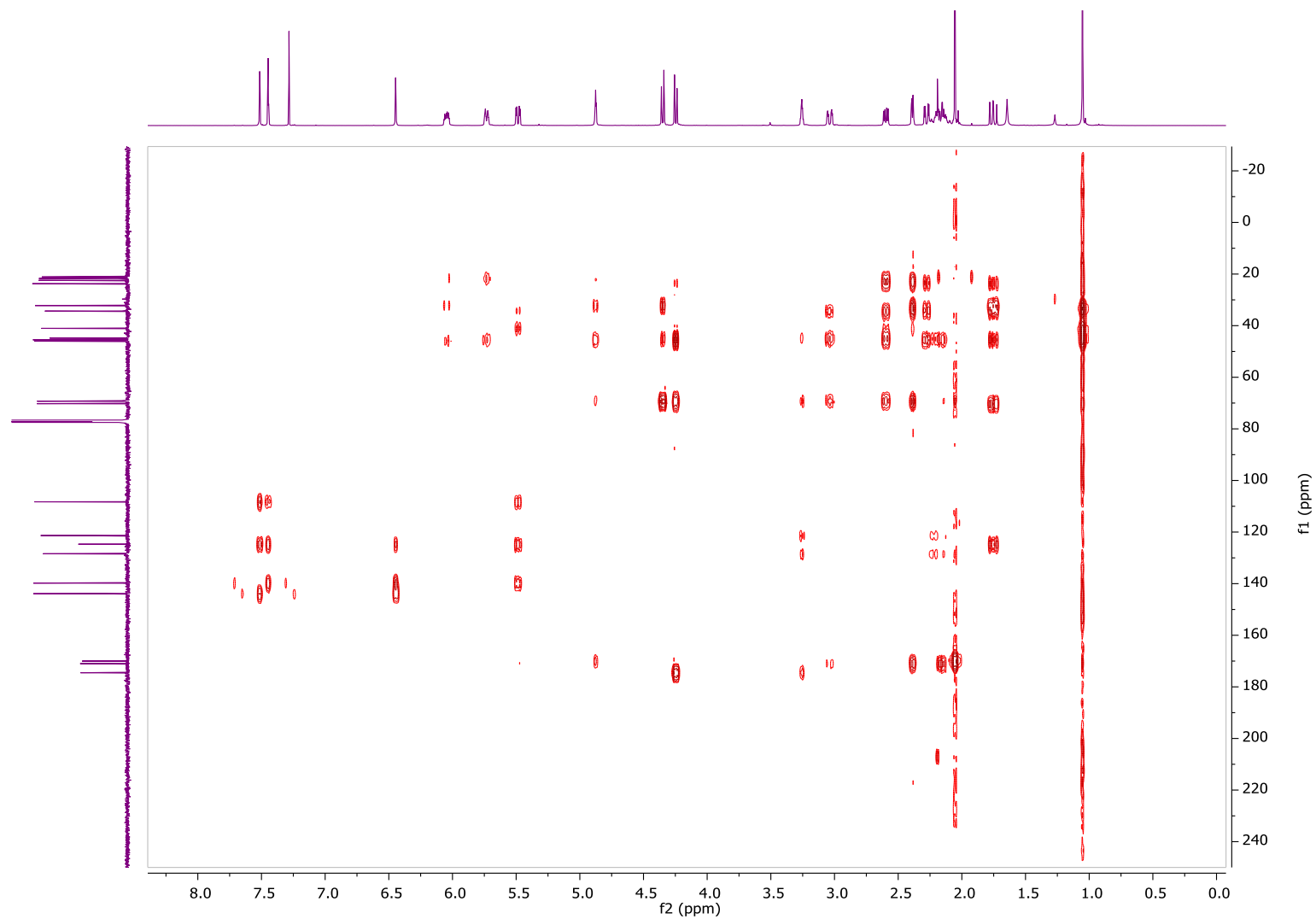
Apéndice 22. Espectro ^1H NMR del compuesto 6- β -acetoxysalviarina (**9**, DMSO 500 MHz).



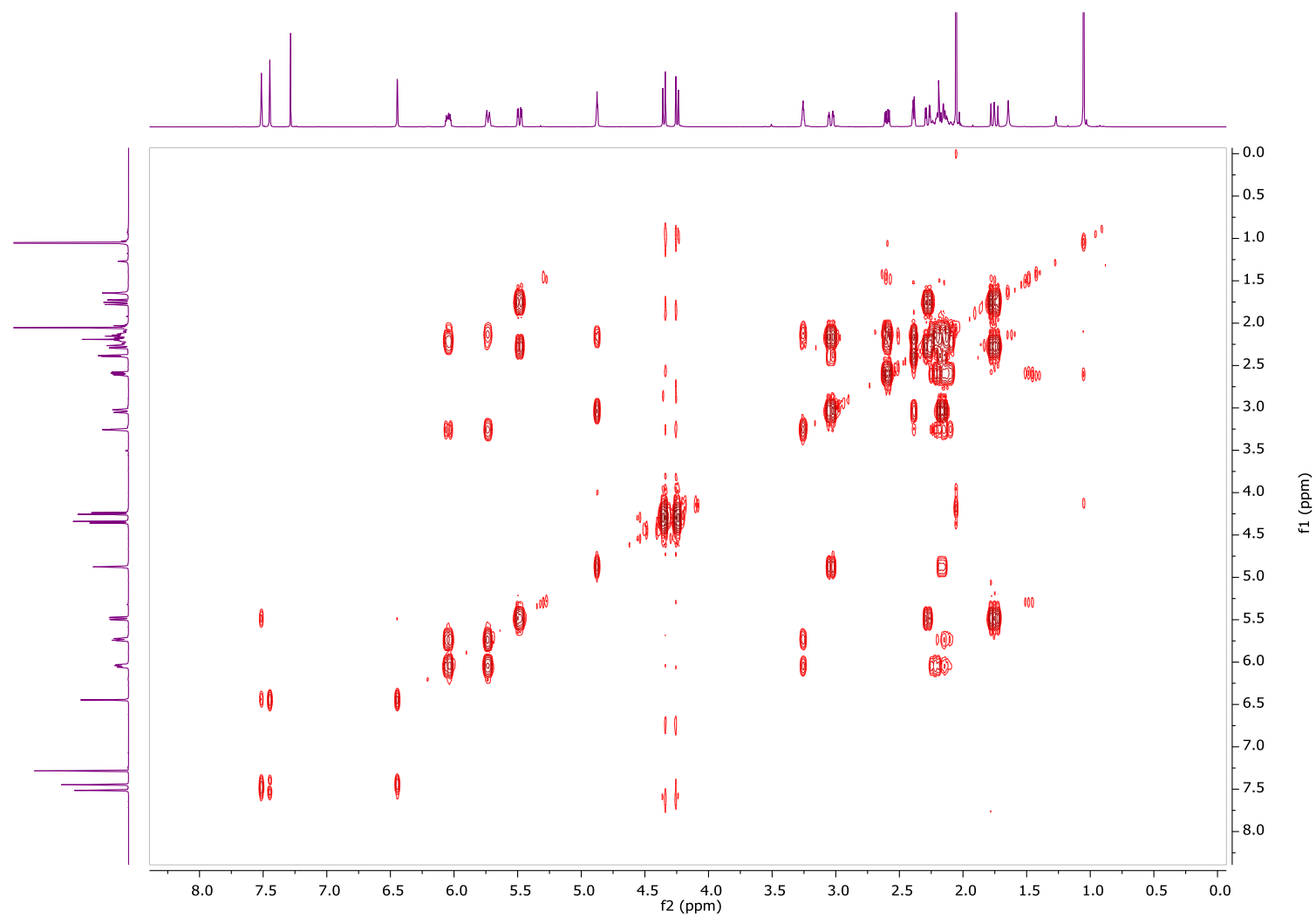
Apéndice 23. Espectro ^{13}C NMR de 6- β -acetoxysalviarina (**9**, DMSO 500 MHz).



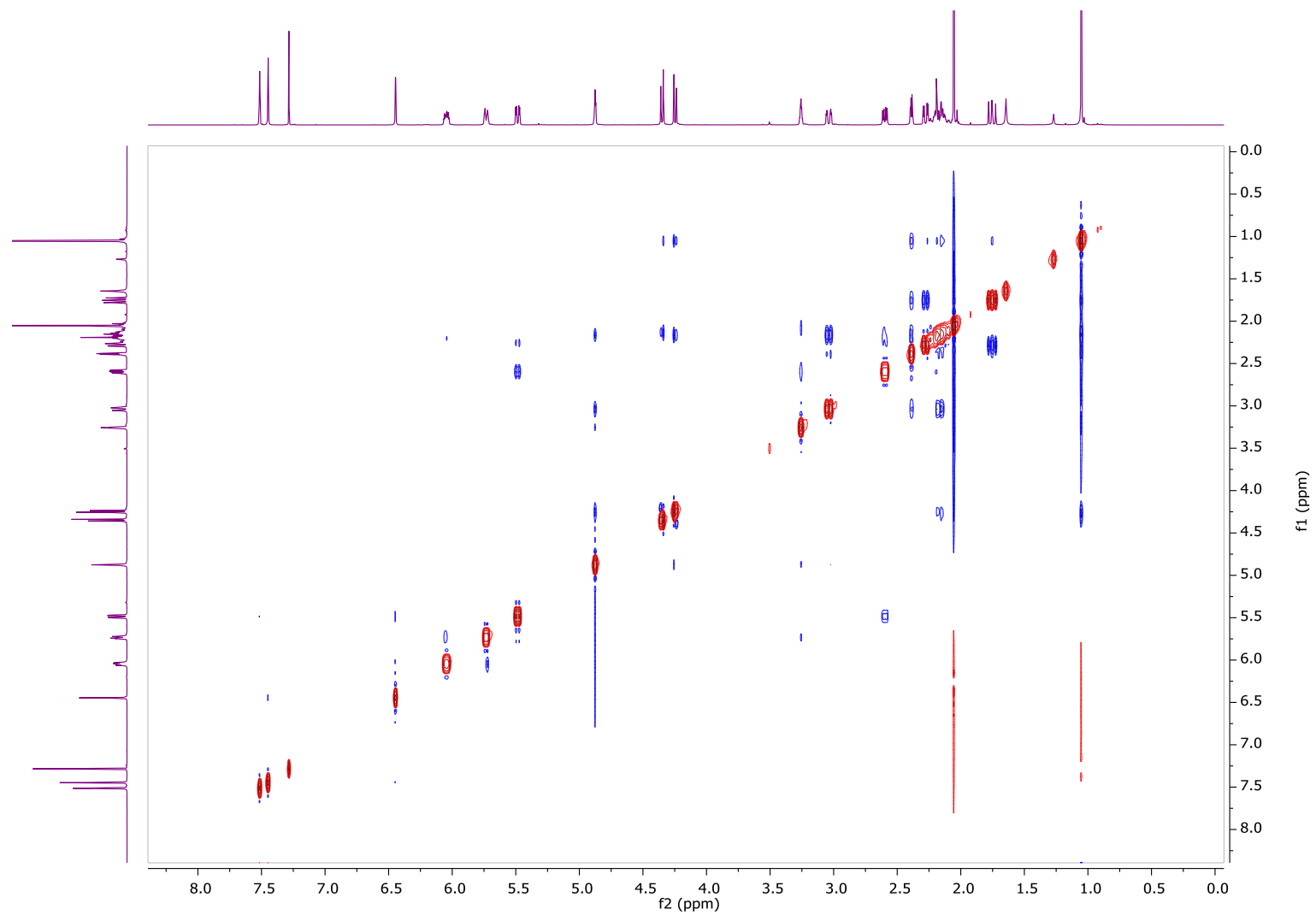
Apéndice 24. Espectro HSQC de 6-β-acetoxysalviarina (**9**, DMSO 500 MHz).



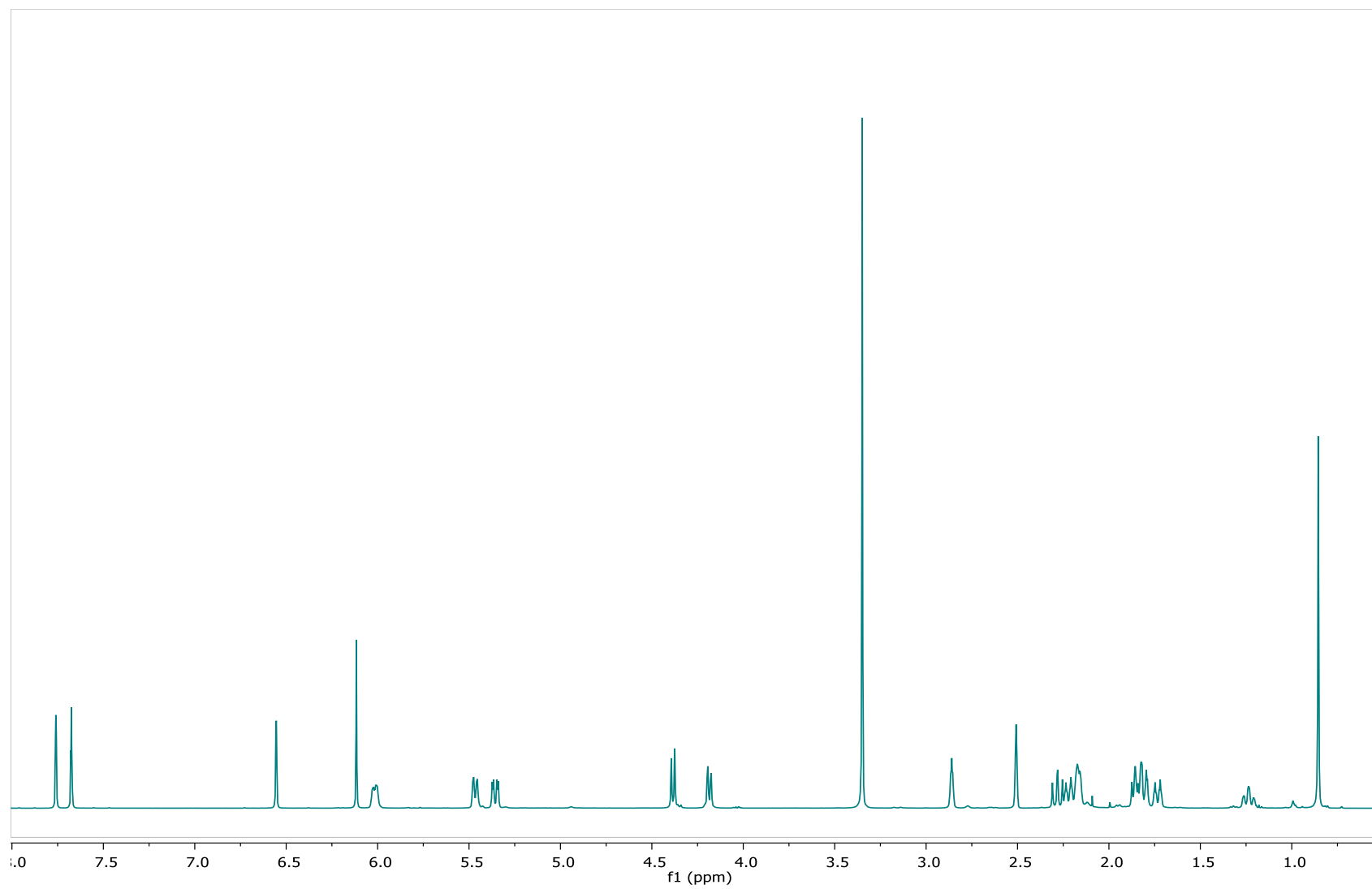
Apéndice 25. Espectro HMBC de 6- β -acetoxysalviarina (**9**, DMSO 500 MHz).



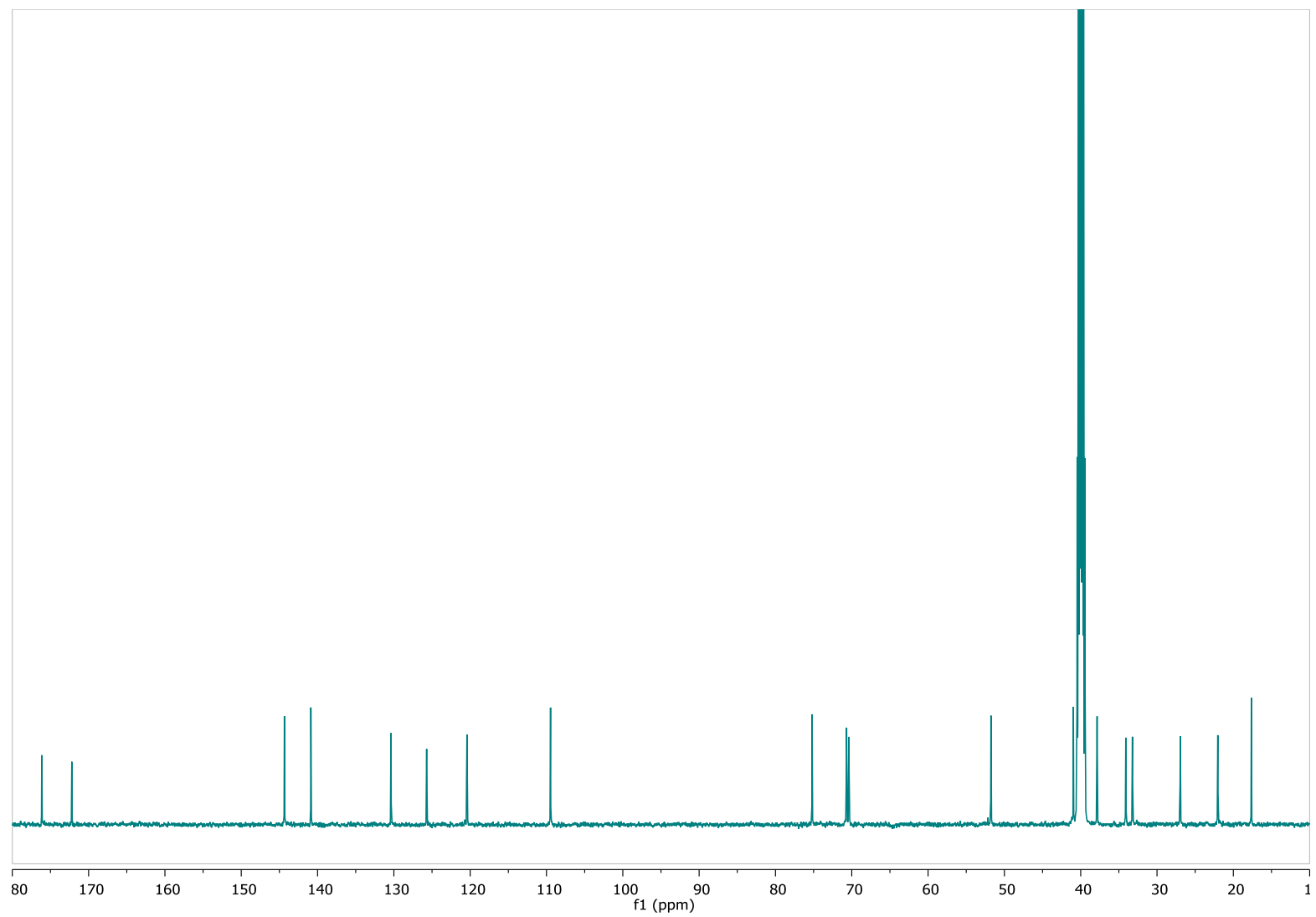
Apéndice 26. Espectro COSY de 6- β -acetoxysalviarina (**9**, DMSO 500 MHz).



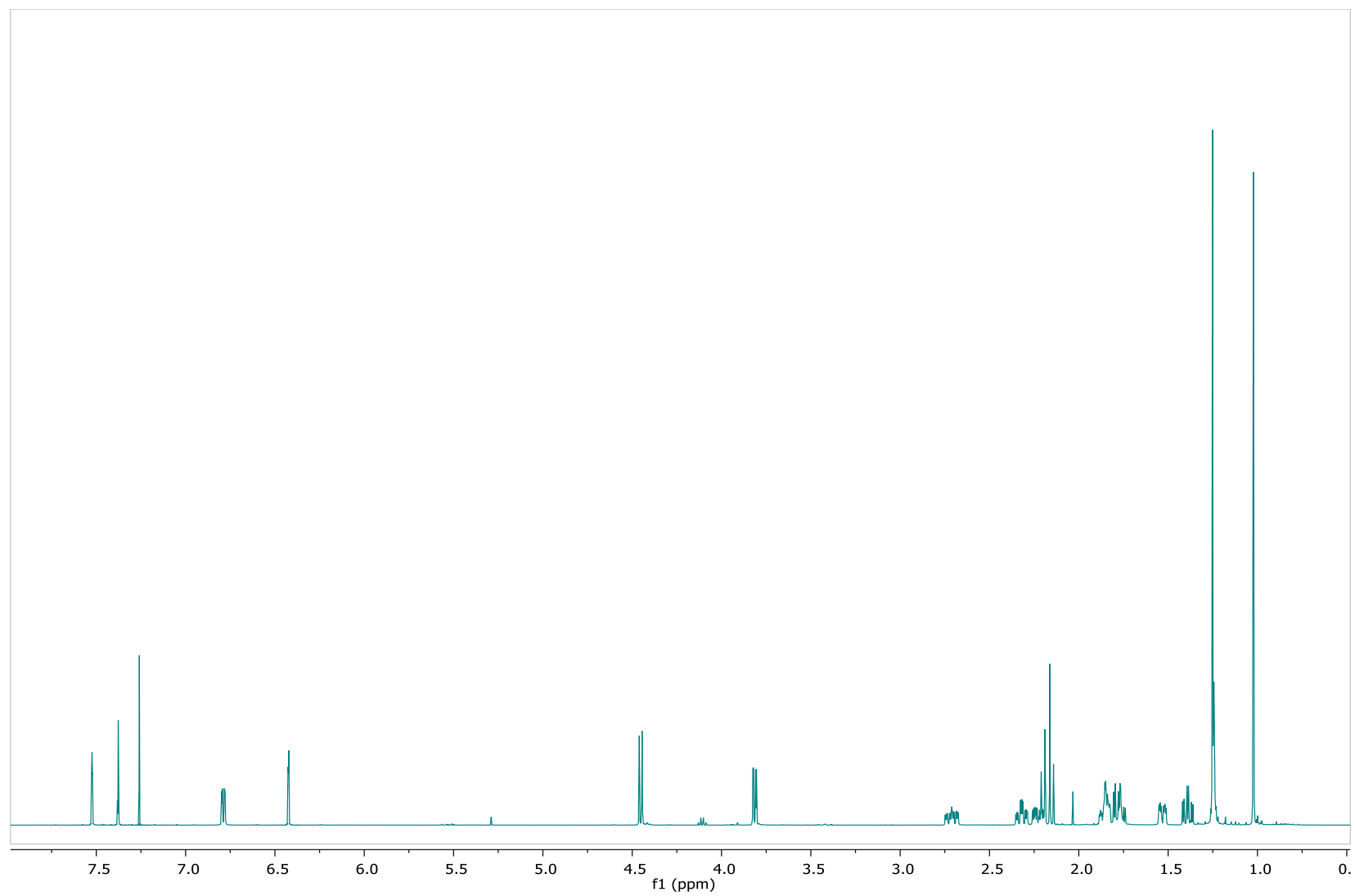
Apéndice 27. Espectro NOESY de 6- β -acetoxysalviarina (**9**, DMSO 500 MHz).



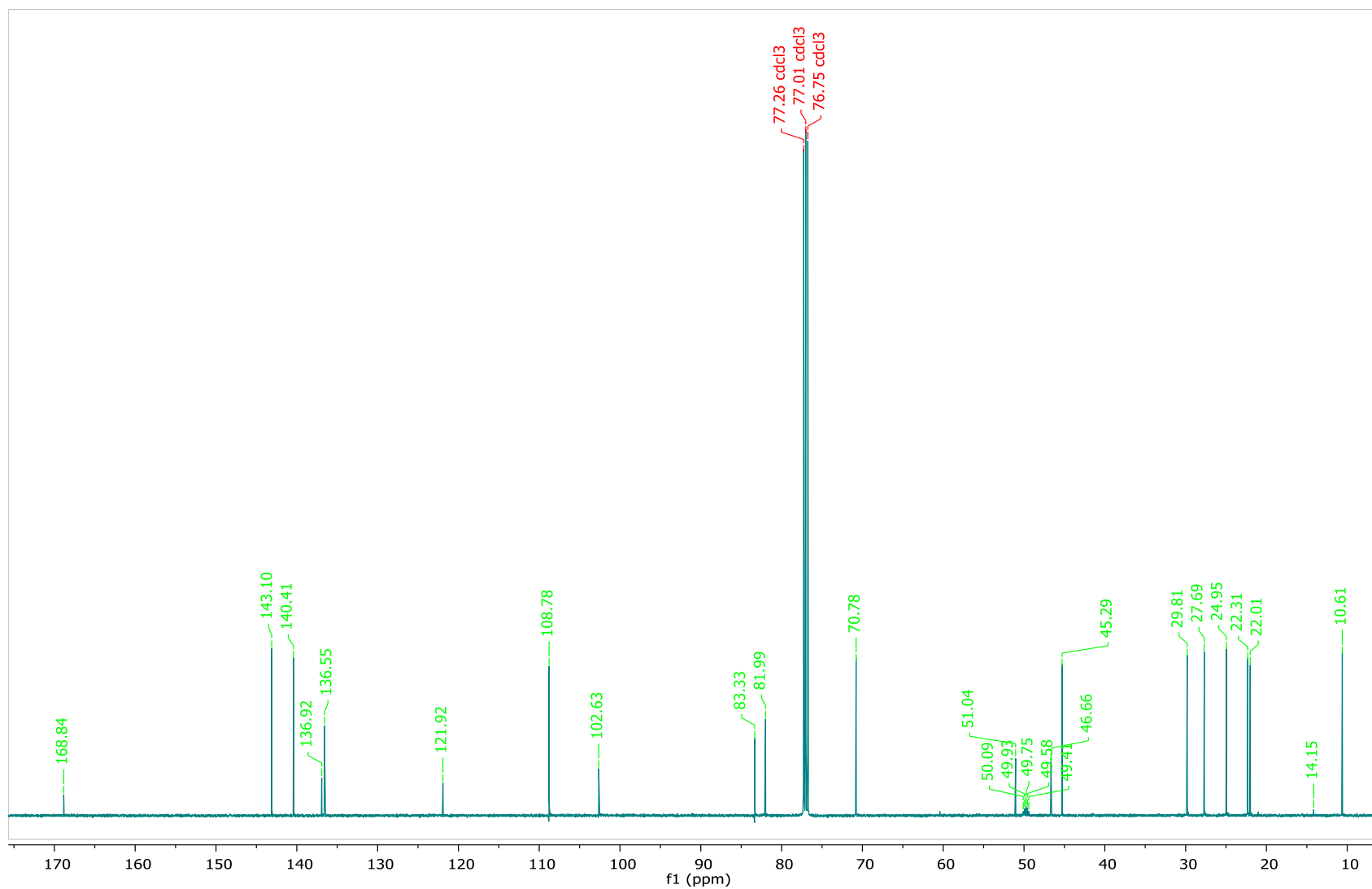
Apéndice 28. Espectro ^1H NMR del 6- β -hydroxysalviarina (**10**, DMSO 500 MHz).



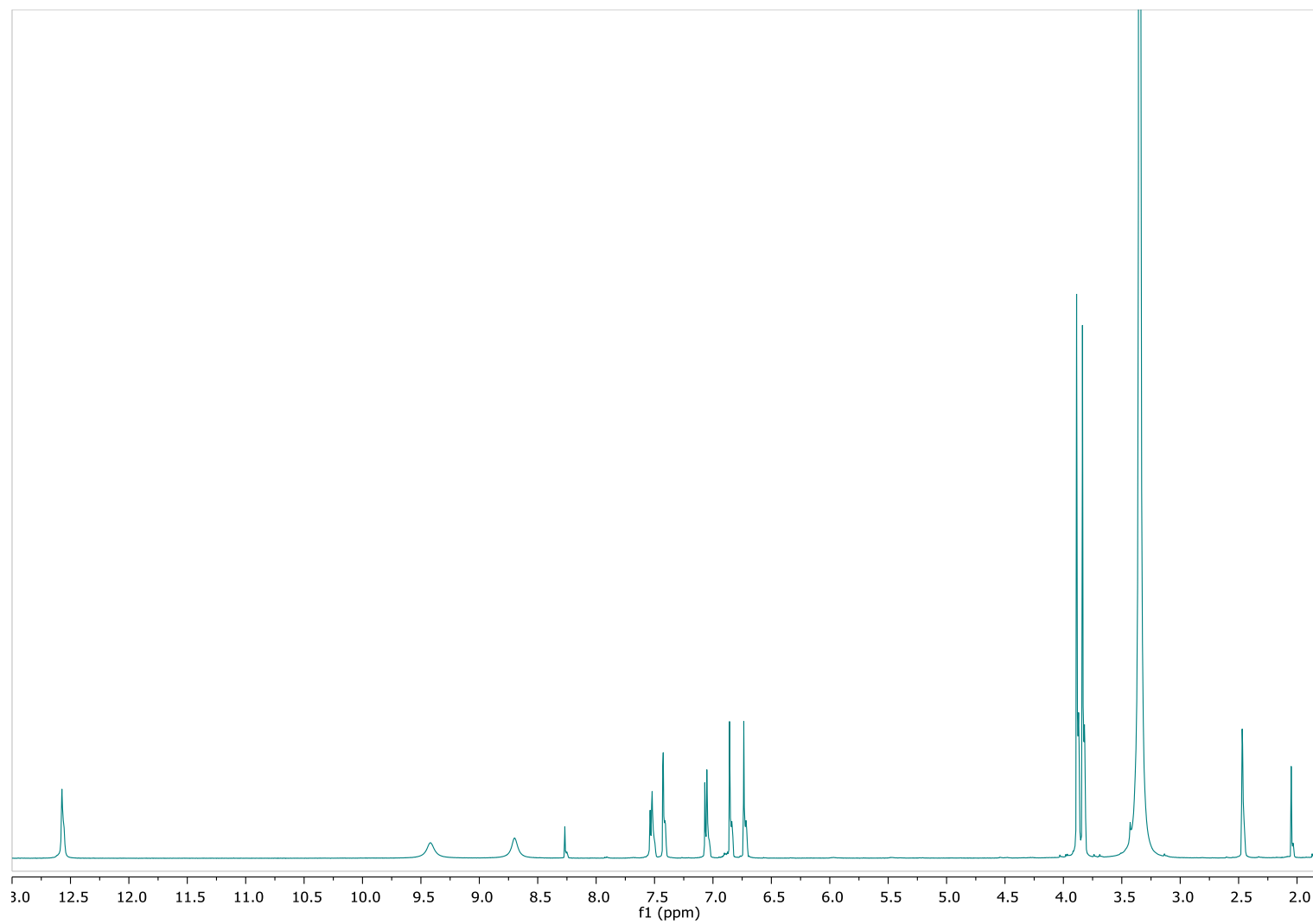
Apéndice 29. Espectro ^{13}C NMR del 6- β -hydroxysalviarina (**10**, DMSO 500 MHz).



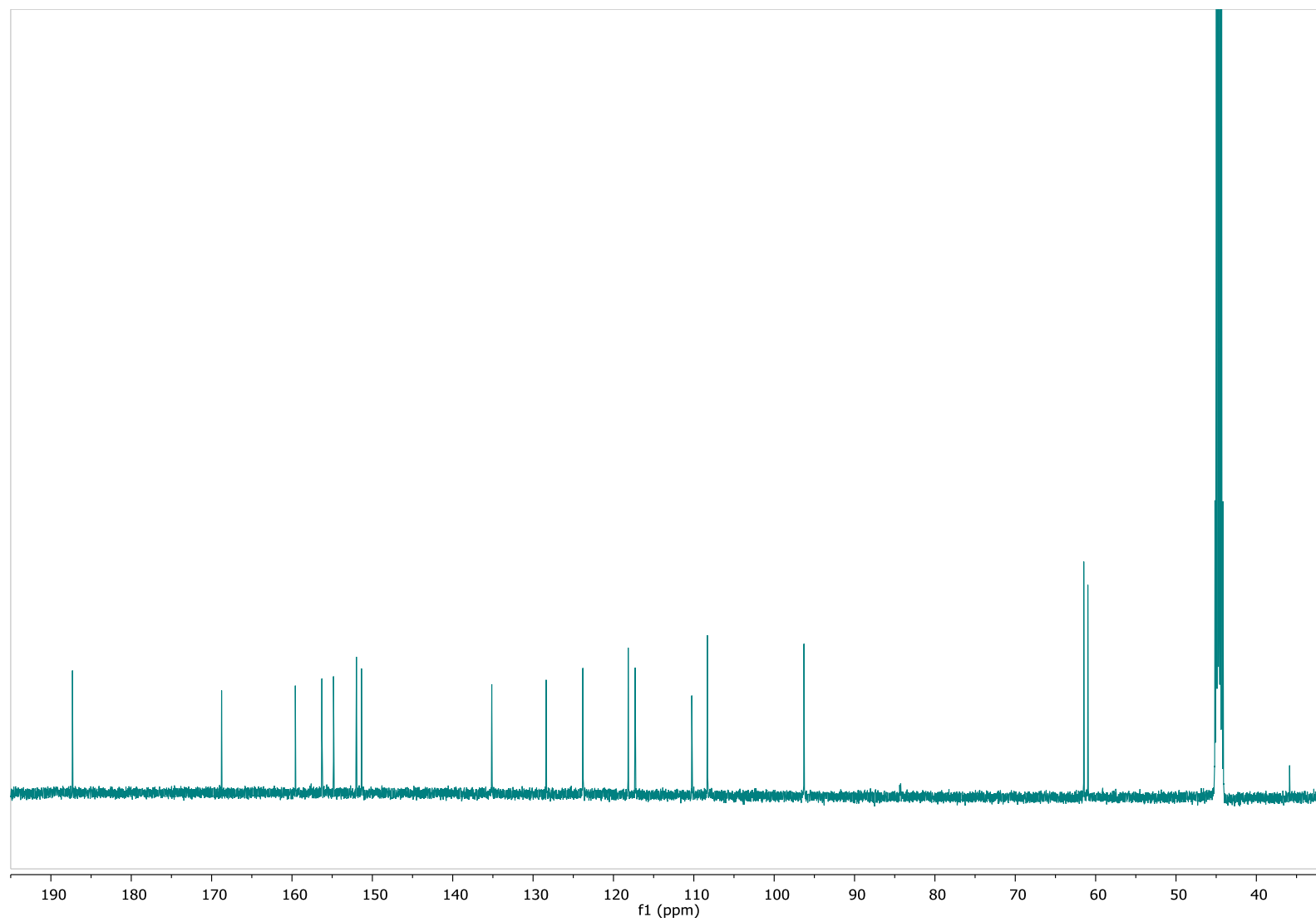
Apéndice 30. Espectro ^1H NMR de la salviandulina D (**11**, CDCl_3 500 MHz).



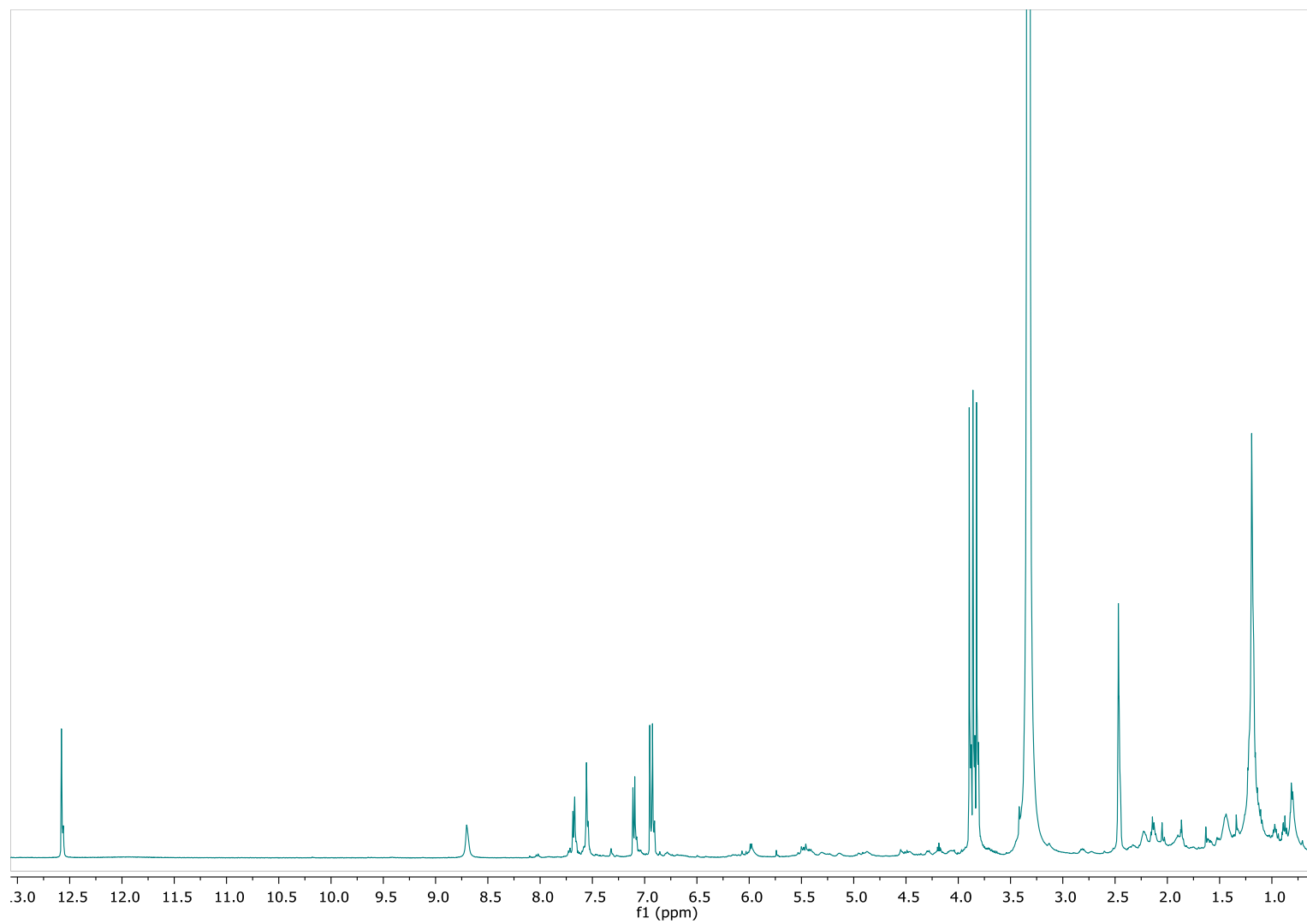
Apéndice 31. Espectro ¹³C NMR de la salviandulina D (**11**, CDCl₃ 500 MHz).



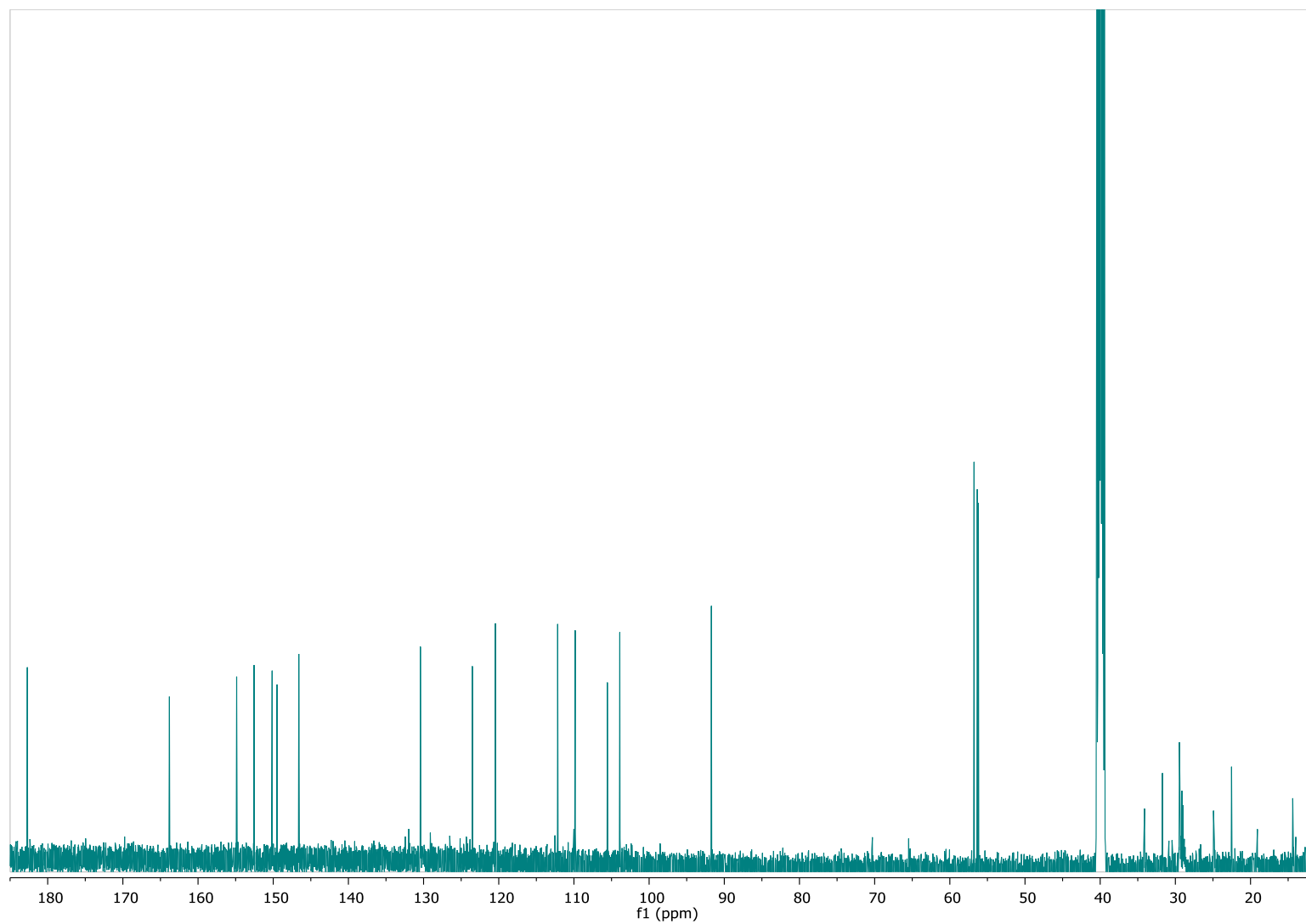
Apéndice 32. Espectro ^1H NMR del cirsiol (**14**, CDCl_3 500 MHz).



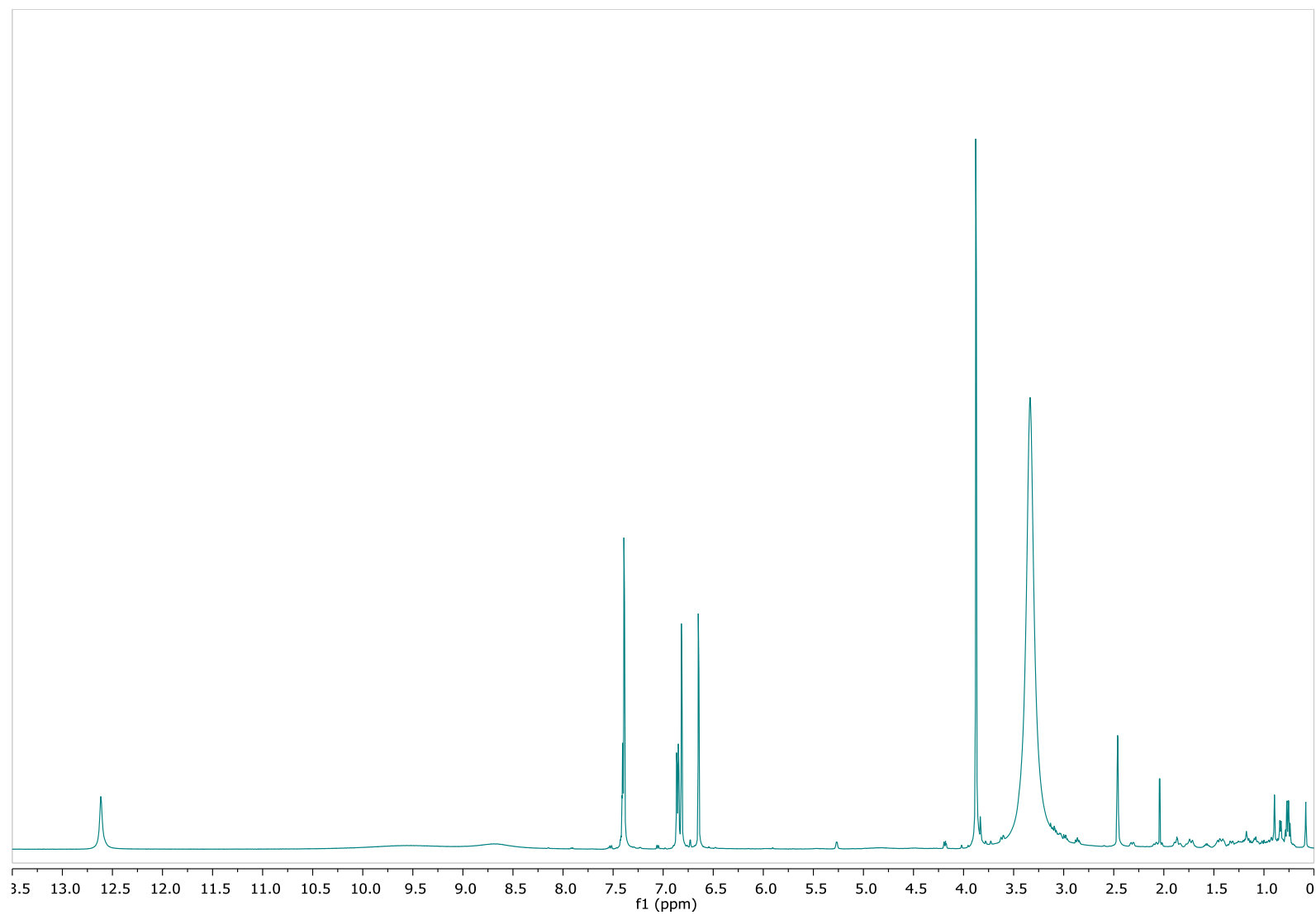
Apéndice 33. Espectro ^{13}C NMR de cirsiolol (**14**, CDCl_3 500 MHz).



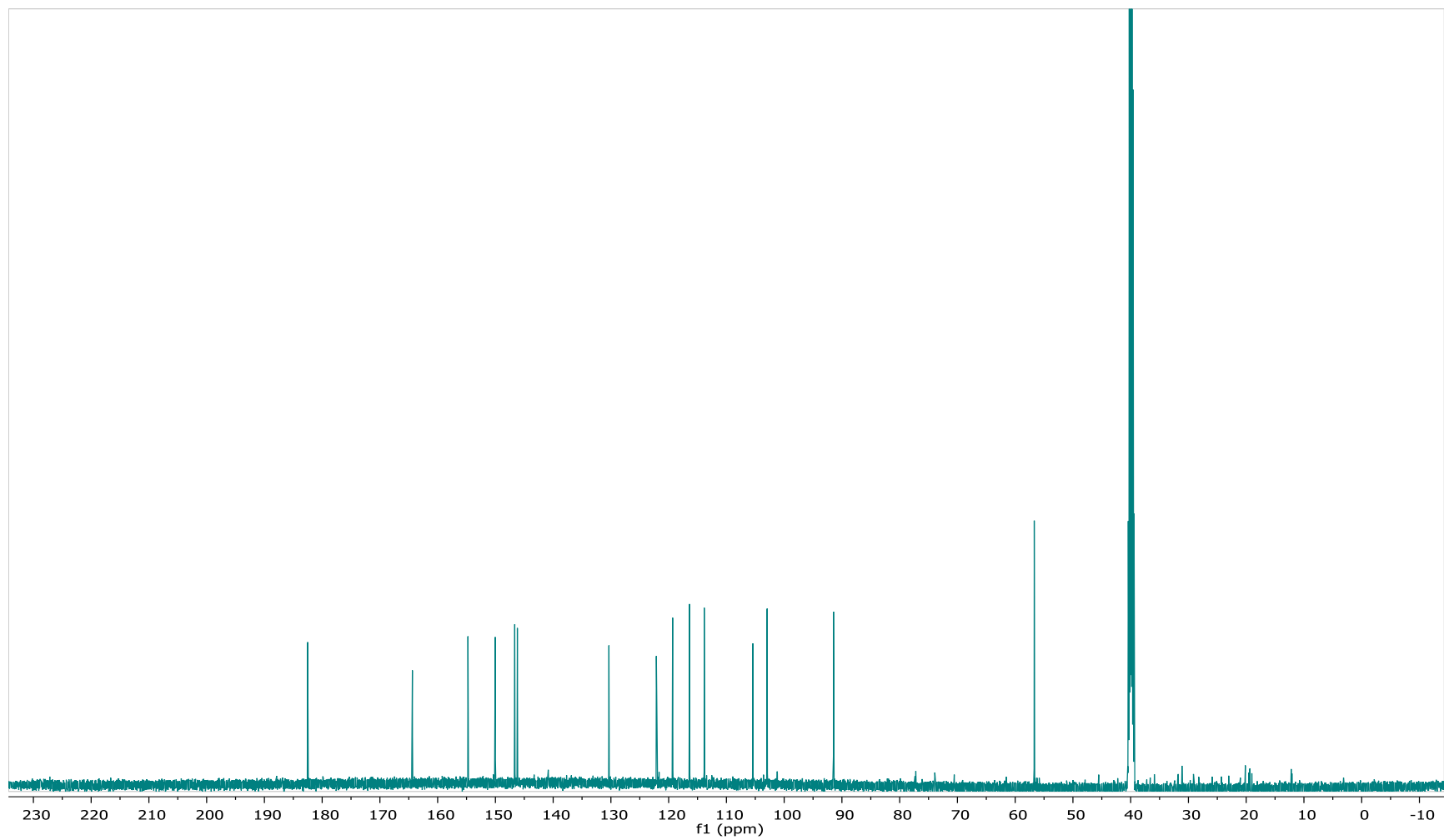
Apéndice 34. Espectro ^1H NMR de la 5,6 dihidroxi-7',3',4'-trimetilflavona (**15**, CDCl_3 500 MHz).



Apéndice 35. Espectro ^{13}C NMR de la 5,6 dihidroxi-7',3',4'-trimetilflavona (**15**, CDCl_3 500 MHz).



Apéndice 36. Espectro ^1H NMR de la pedalitina (**16**, CDCl_3 500 MHz).



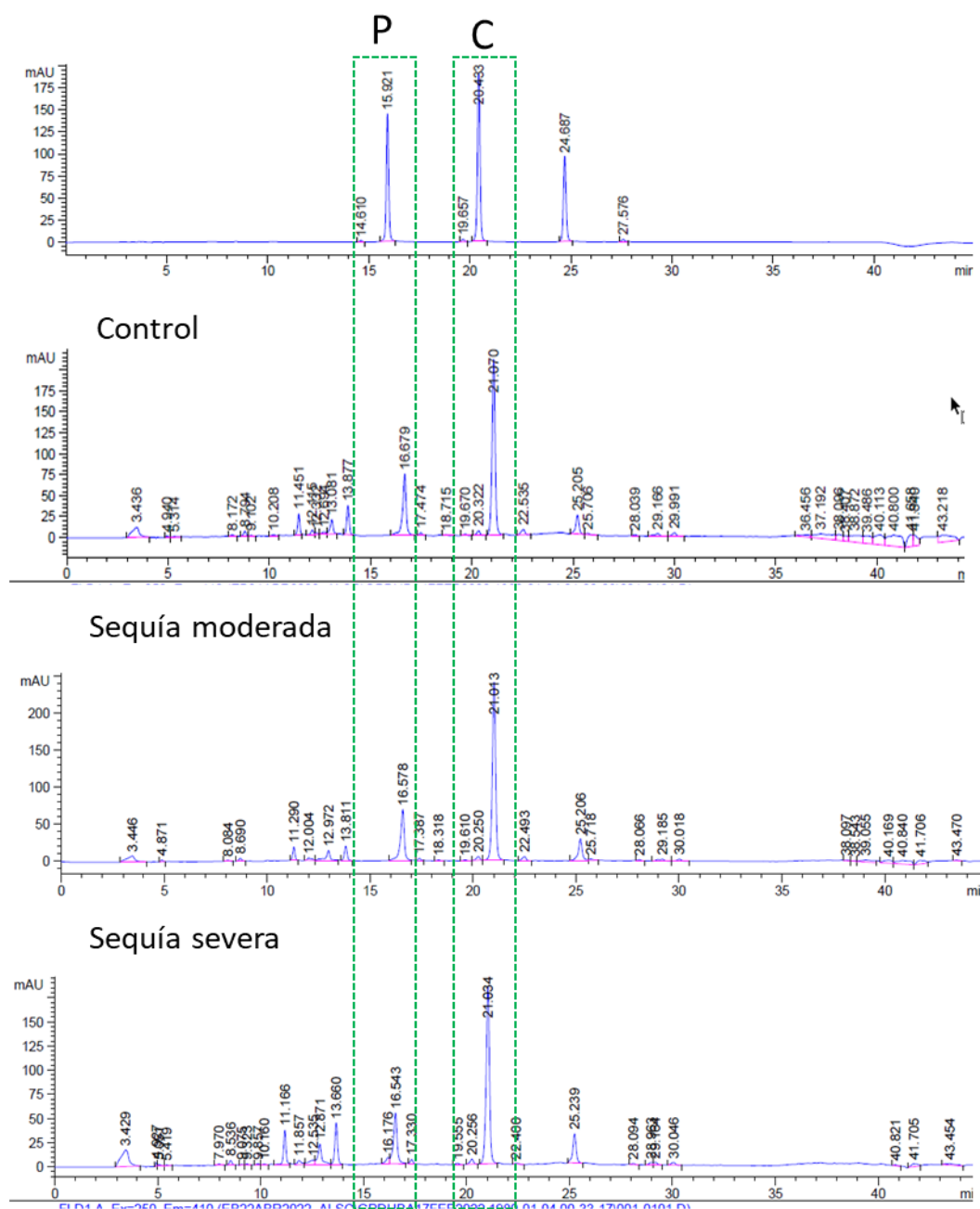
Apéndice 37. Espectro ^{13}C NMR de la pedalitina (**16**, CDCl_3 500 MHz).

Apéndice 38. Tabla de contribución PCA metabolitos secundarios.

Standard deviations (1, ..., p=9):								
[1] 3.886949e+00 3.401249e+00 1.668444e+00 1.455571e+00 1.070046e+00 8.464401e-01 6.331651e-01 3.979688e-01 5.695069e-16								
Rotation (n x k) = (34 x 9):								
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8
undecano	-0.20442628	0.04050861	-0.077018740	-0.1846999075	0.14844864	0.544139471	0.04557688	0.378136026
2-methyldecalin	-0.24516903	0.01114008	0.099120386	0.0191959723	-0.06768384	-0.197944154	0.26408324	0.080481173
metilcyclohexano	-0.17442311	-0.21009561	0.010524323	-0.0282314888	0.05660824	-0.130789662	0.09832554	0.223599855
dodecano	-0.21641056	0.06709698	-0.156682309	-0.2209576045	-0.15537937	0.174750427	0.19015058	-0.169401603
2,6-dimetilundecano	-0.06962220	-0.04188171	-0.291487427	0.3301351963	-0.54959561	0.208334772	0.38706376	0.113247833
iso-endecano	0.07330331	-0.27007762	0.104658563	0.0418727453	-0.13046551	0.129134039	-0.14999946	-0.045366208
tirdecano	-0.02681694	-0.28334945	-0.069724697	-0.1016877367	0.01502008	0.066254397	0.17836764	-0.234871066
tetracontano, 3,5,24-trimetil	-0.11718774	0.25775418	-0.017088707	0.0275179056	-0.09595455	-0.018720147	-0.14891114	0.107728829
fitano	-0.07511004	0.27904846	0.018776047	0.0209591006	-0.09498795	-0.005502989	-0.06459366	0.008758421
heptylcyclohexano	-0.24029649	0.06991343	-0.025835900	0.0663672224	0.15635037	-0.124901045	0.17864734	0.223464841
tridecano, 2 metil	-0.17406915	-0.20771825	-0.017030846	-0.0001506724	0.11560151	-0.128697731	0.12850361	0.231323446
dodecano, 2,6,10-trimetil	-0.02391158	-0.27758437	-0.106036461	-0.1086189234	0.03860231	0.102824674	0.25081608	-0.240704945
tetradecano	-0.19365094	0.04255669	-0.017433930	-0.4085289727	-0.10771449	0.049456573	-0.29383075	-0.230007409
octadecano	-0.20735250	0.14733926	0.080958829	-0.0612798143	-0.20936109	-0.071637304	-0.18148548	0.194724975
2-pentadecanona	-0.24281154	0.02819895	0.145562280	0.1316572740	-0.03238774	-0.048772652	0.04482185	0.063183805
2,2-dimetiloctadecano	-0.07369606	0.27493683	0.004809691	0.0634525959	-0.16115137	-0.074169251	0.03263460	-0.070211451
2,2-dimetileicosano	-0.23451658	0.01275877	-0.205406881	-0.0147345401	0.07758772	-0.039403889	-0.31996157	-0.037997147
palmitato metilico	-0.23201809	0.02104056	0.087519159	-0.0585351803	-0.03736740	-0.456232901	0.06959244	0.043989295
i-propil 14 metil-pentadecanoato	-0.07505782	-0.25618377	-0.044188915	-0.2259324222	-0.01048322	-0.208507051	0.12833960	-0.162460926
docosano	-0.15588765	-0.20031352	0.154450921	-0.1205570951	-0.22568635	-0.096203142	-0.09124021	0.141556948
tricosano	-0.09403736	-0.24698349	0.171324558	0.1304225454	-0.11166142	0.117730867	-0.21566517	0.026182354
pentacosano	0.24517716	-0.06178517	-0.046965843	-0.0567062212	-0.02021904	-0.047946460	0.07868760	0.435915436
tetracosano	0.25087645	0.03507644	-0.015552091	-0.0933853833	0.03412296	-0.115822060	-0.03682600	0.163284531
heptacosano	0.24617395	-0.06138417	-0.036109252	-0.0615030209	0.02321252	-0.168512484	-0.03602077	0.220377965
eicosano	0.22190544	0.02662514	-0.051569176	-0.2199736813	-0.29889086	0.177122316	-0.12544153	0.207735912
hexacosano	-0.15649065	-0.20865570	0.172277333	0.0078877138	-0.16527065	-0.012845583	-0.16406022	0.094413108
nonacosano	-0.14263125	-0.20181607	0.186542225	0.1974581228	-0.06616448	0.114017318	-0.26252603	0.013233803
heneicosano	-0.12333816	-0.11720831	0.027976694	0.4240152194	0.40929054	0.214190124	-0.09064092	0.033209793
octacosano	0.24746940	-0.06318406	-0.050669687	-0.0717042763	0.01256077	-0.109552586	-0.01082621	0.103475655
γ sitosterol	-0.06765269	0.26988319	0.152808979	-0.0464120097	0.08482079	0.072299150	0.12620859	-0.043756380
β amirina	0.09786739	0.04593664	0.513289422	0.0733275691	-0.24401976	0.114232759	0.13236156	-0.098082080
α amirina	0.19226615	0.04863346	0.312790435	0.2453540431	-0.05519677	-0.084918759	0.08104375	-0.136612878
cirsiliol	0.02426457	-0.08762043	0.452106320	-0.3652873560	0.10950530	0.160770789	0.19677799	0.133458304
pedalitin	-0.05944231	0.24786721	0.222672670	-0.0995877751	0.20791010	0.141032559	0.17938787	-0.034268128

Apéndice 39. Tabla de contribución PCA metabolitos secundarios con variables anatómicas y fisiológicas.

Standard deviations (1, ..., p=9):									
[1] 3.931575e+00 2.205372e+00 1.137077e+00 9.875706e-01 8.631357e-01 6.473268e-01 3.940969e-01 3.024270e-01 7.461247e-16									
Rotation (n x k) = (24 x 9):									
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9
Y(II)	-0.23110238	0.077322214	-0.287235608	0.057343009	-0.111331298	-0.19610081	-0.255007483	-0.02236308	-0.16994129
ETR	-0.23336346	-0.096790491	-0.284137444	0.086008349	-0.004105555	0.03918566	0.048543782	-0.01910007	0.03308117
biomasa	-0.18987339	-0.054325215	-0.142711470	-0.071448960	-0.703153014	0.24511536	-0.015814080	-0.19583072	0.01157655
peso fresco	-0.20972345	-0.240905546	-0.139166869	0.023228455	-0.091890886	0.06787829	0.035698552	-0.20586317	0.09904376
RWC hoja	-0.22948829	0.007411516	-0.167856299	-0.011139400	0.337318968	0.31879890	-0.365815076	-0.10379862	0.17280257
RWC tallo	-0.23427535	0.054679353	-0.213954134	0.115504387	0.273848807	-0.07217546	0.021465443	-0.27194271	0.46156132
# cloroplastos	-0.22105979	0.027614059	0.127692156	-0.080676424	0.362091417	0.43766730	0.448173433	-0.21842716	-0.40608081
Ancho hoja	-0.23236548	0.111078996	0.070249129	-0.048128289	0.149105656	0.31763317	-0.315819472	0.49513466	0.12553116
Ancho tallo	-0.05524458	0.183035032	0.486862965	0.696974526	-0.055825862	-0.10467778	-0.047157058	-0.16123989	0.19475306
# vasos tallo	-0.18320476	-0.281848121	0.204425051	0.119447754	-0.078460457	0.17627081	-0.161373862	-0.23918613	-0.01684226
# canales m	0.20390882	0.235480033	0.018114631	0.005630998	-0.179683956	0.30952593	-0.343680061	-0.22452566	-0.16072426
Ancho raíz	0.22540153	-0.135565780	-0.230902979	0.054785231	-0.139522770	0.22138689	0.329191083	0.13066497	0.31355095
Ancho f.s	-0.23545992	0.070281156	0.229995334	0.089322871	-0.177105734	0.14004318	0.059823952	0.34180694	-0.23649306
# vasos raíz	0.13824011	-0.027741816	-0.467980912	0.644243734	0.083206767	0.11643932	0.091405039	0.09157859	-0.37300979
tetracosano	0.19029297	-0.290199270	0.058094766	0.063974439	0.005789189	0.18507164	-0.209406882	-0.11114248	-0.01450392
octacosano	0.23470249	-0.160698103	0.052606686	0.052687852	0.030889564	0.16814945	-0.141805045	0.10273951	0.05710519
heptacosano	0.23110097	-0.164746233	0.088501744	0.032014422	0.036341082	0.25611991	-0.100699305	0.11845977	0.09697234
pentacosano	0.23288144	-0.165509446	0.041499662	0.043773359	-0.017123575	0.18920279	0.240244271	0.04467279	0.27089988
2-methyldecalin	-0.21213161	0.222350592	-0.009799989	0.083212889	-0.163029065	0.26625415	0.175065449	0.17565858	0.22481323
2-pentadecanona	-0.22290260	0.200190327	0.123977180	-0.024405731	-0.095053572	0.01568956	0.250321162	-0.02532167	0.10843717
tirdecano	0.11971919	0.391504251	-0.147916843	-0.012416946	-0.052258305	0.06046165	-0.048610517	0.08110131	-0.03899213
fitano	-0.19463460	-0.286974067	-0.045509252	0.039699001	-0.036001410	-0.13319408	-0.044229353	0.10331416	-0.07035221
dodecano, 2,6,10-trimetil	0.12192208	0.383404876	-0.204574870	0.021058387	-0.008846913	0.03785404	0.005860604	0.02653671	0.15037244
2,2-dimetiloctadecano	-0.19346910	-0.279862505	-0.022290170	0.125590888	-0.031058206	-0.13464555	0.006769670	0.42012974	0.03814992



Apéndice 40. Perfil de HPLC-FLD de extractos solubles en acetona de los tres tratamientos de sequía de *S. reflexa* con cromatogramas de referencia de pedalitina (P) y circinilol (C).

Apéndice 41. Datos de recolección de las poblaciones naturales de *S. circinnata* incluidas en este estudio. Para poder diferenciarlas a cada una de las poblaciones se les asigno un código.

Localidad	Datos geográficos			Código	Número de Váucher	Estación	Fecha de recolección	Bioma asociado	Número de acceso a GeneBank
	Latitud	Longitud	Altitud (m)						
Pátzcuaro, Michoacán	19° 31' 27.57"	-101° 36' 25.83"	2117	PTZ	IEB-266237	Otoño 2020	Septiembre 19, 2020	Bosque de pino y encino	MW756372
Yuriria, Guanajuato	20° 4' 59.19"	-101° 4' 47.61"	1936	YUR	IEB-266292	Otoño 2021	Septiembre 12, 2020	Matorral espinoso semiárido	MW756373
Tehuacán, Puebla	18° 28' 35.4"	-97° 34' 37.10"	1946	TEH	IEB-267375	Otoño 2022	Septiembre 22, 2020	Matorral espinoso semiárido	MW756374
San José Iturbide, Guanajuato	21° 3' 24.10"	-100° 22' 14.00"	2087	SJI	IEB-256938	Verano 2019	Agosto 12, 2019	Matorral espinoso semiárido	MW756375
Zimapán, Hidalgo	20° 38' 6.54"	-99° 19' 34.40"	2033	ZIM	IEB-265918	Verano 2020	Agosto 6, 2019	Matorral espinoso semiárido	MW756376
Teotihuacan, Estado de México	19° 42' 33.88"	-98° 51' 45.28"	2370	TEO	MEXU-1407290	Verano 2021	Agosto 8, 2019	Bosque secundario de pino-encino	MW756377
Jilotepec, Estado de México	20° 3' 29.6"	-99° 35' 39.20"	2554	JIL	IEB-261761	Verano 2022	Agosto 9, 2019	Bosque de encino	MW756378
Pachuca, Hidalgo	20° 7' 40.62"	-98° 40' 51.58"	2587	PAC	IEB-265920	Verano 2023	Agosto 7, 2019	Matorral espinoso semiárido	MW756379
Aquixtla, Puebla	19° 47' 33.46"	-97° 55' 14.19"	2082	AQX	IEB-265919	Verano 2024	Agosto 5, 2019	Bosque de pino y encino	MW756380
Parque Nacional Los Marmoles, Hidalgo	20° 50' 32.36"	-99° 15' 2.16"	2219	LMP	IEB-265917	Verano 2025	Agosto 6, 2019	Bosque de pino	MW756381

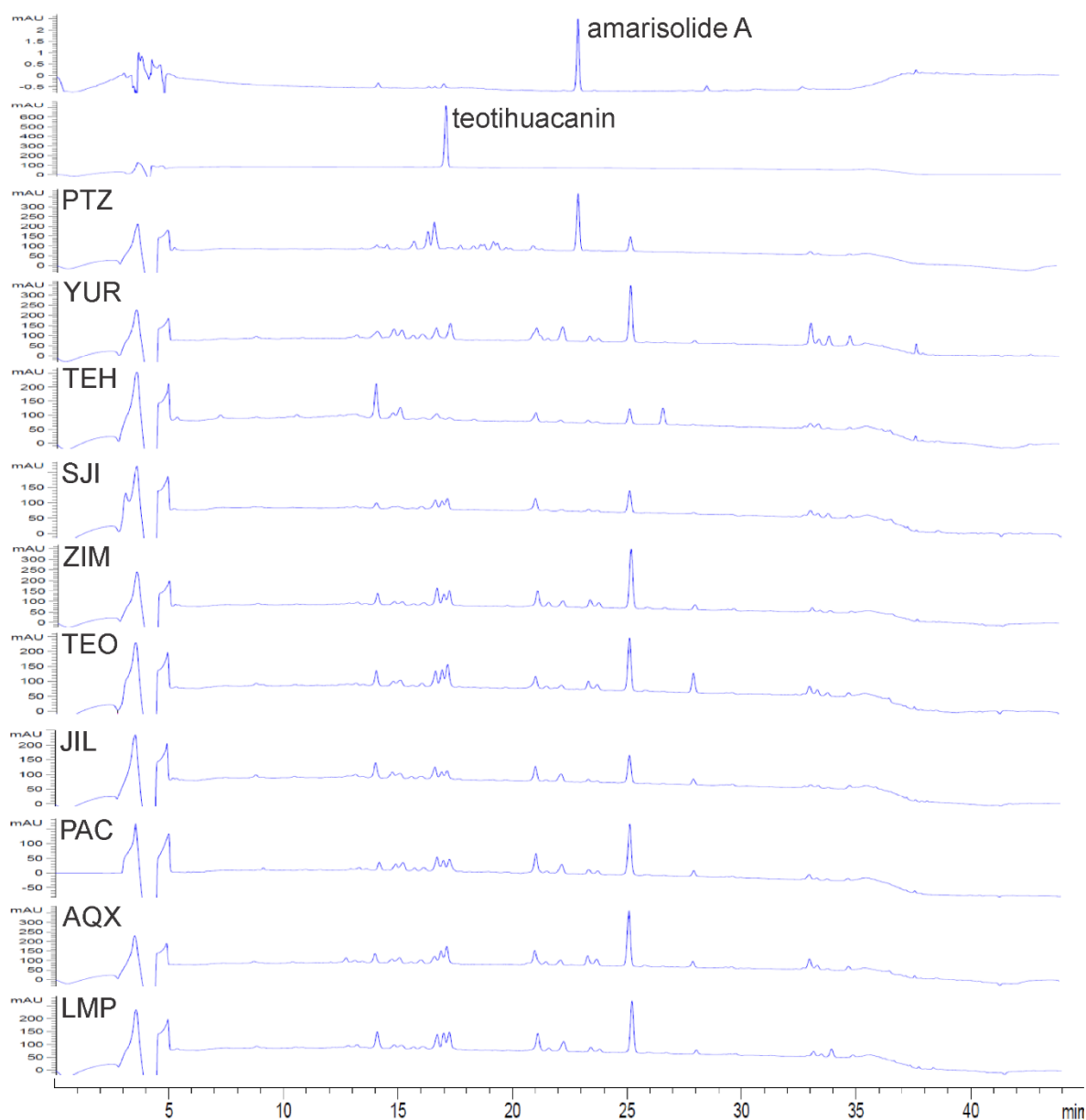
Apéndice 42. Variables ambientales de las diez poblaciones de *S. circinata*.

Población	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)	Precipitación (mm/año)	Altitud (msnm)	Latitud (°)
PTZ	3	15	26	1745	2140	19.516
YUR	6	21	31	714	1788	20.211
TEH	8	17	27	754	1625	18.461
SJI	4	16	28	705	2102	21.002
ZIM	6	18.5	28	391	1779	20.738
TEO	9	15.4	35	823	1632	25.742
JIL	3	15	25	599	2426	20.015
PAC	4	16	24	790	2463	20.117
AQX	4	12	23	718	2253	19.796
LMP	6	14	28	1500	3000	21.008

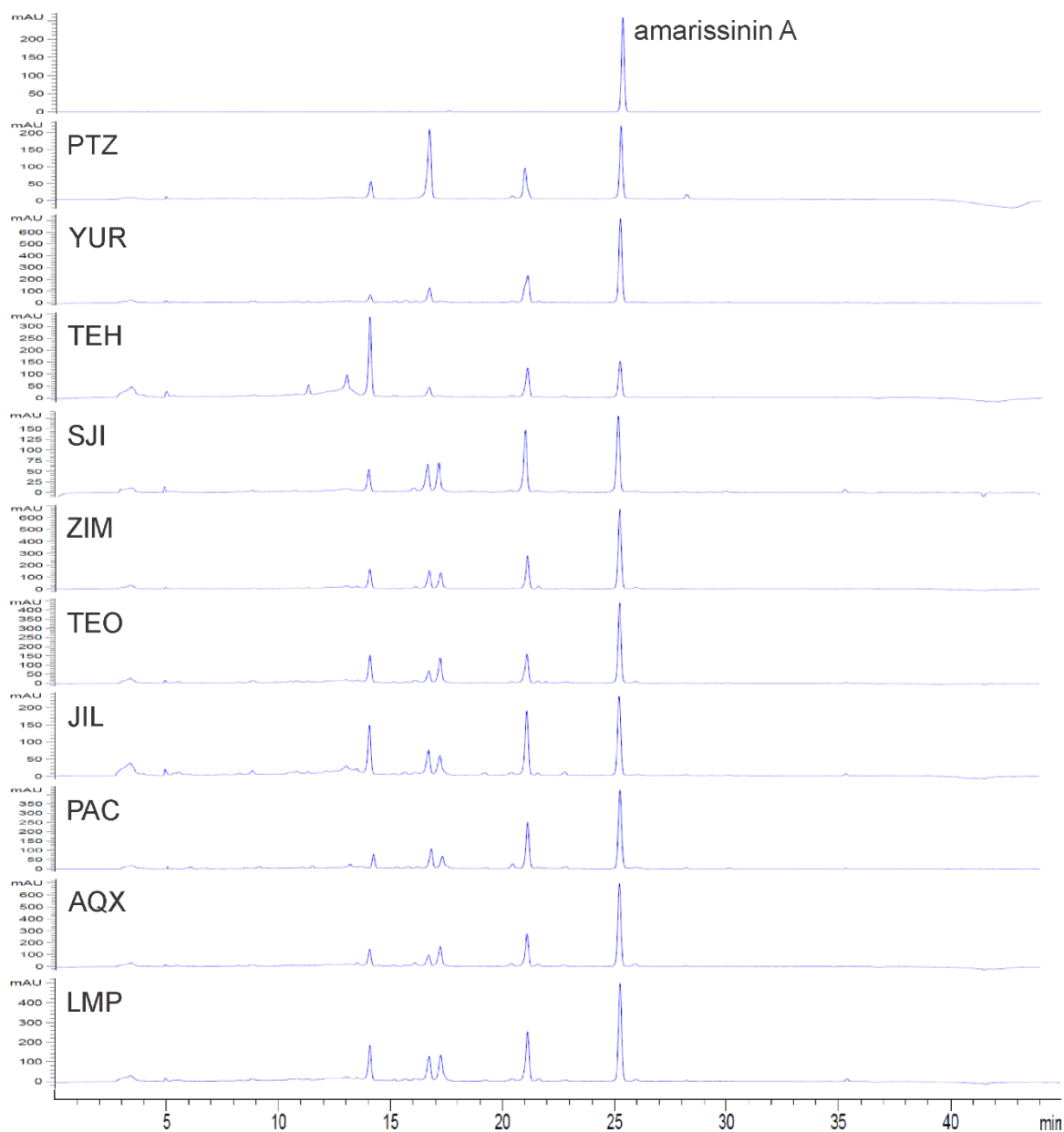
Los datos se obtuvieron de la Red Nacional de Estaciones Agrometeorológicas Automatizadas, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

<https://clima.inifap.gob.mx/Inmysr/Estaciones/MapaEstaciones> (consultado el 28 de mayo de 2021).

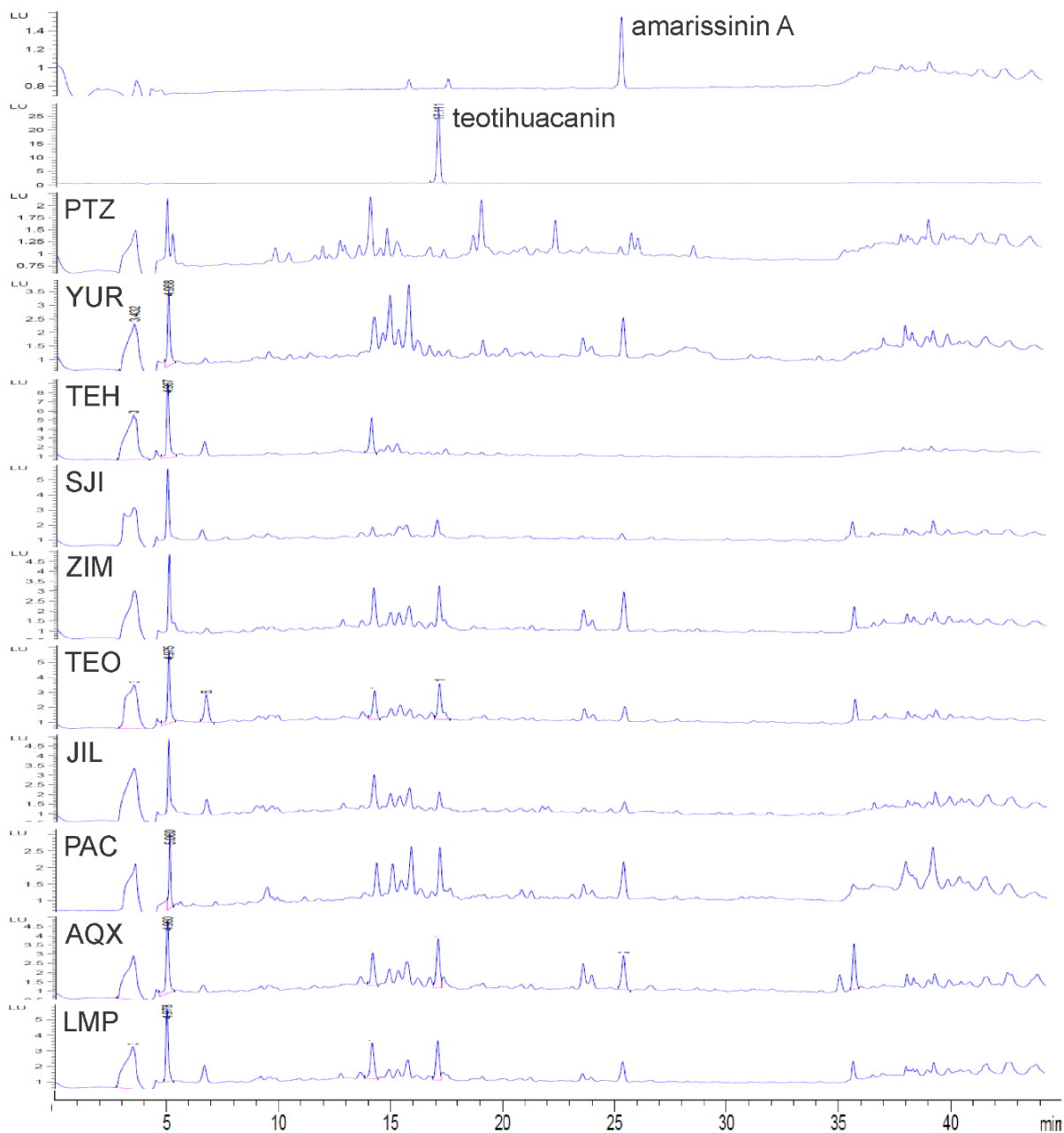
Apéndice 43. Desplazamiento de HPLC-PDA a 240 nm de los extractos solubles en acetona de las diez poblaciones de *S. circinnata* con los cromatogramas de referencia para amarisolide A y teotihuacanin.



Apéndice 44. Perfil HPLC-PDA a 330 nm extractos solubles en acetona de *S. circinnata* con el cromatograma de referencia para amarissinina A (7, 330 nm) y los cromatogramas obtenidos para las diferentes poblaciones de la especie.



Apéndice 45. Perfil de HPLC-FLD de extractos solubles en acetona de las diez poblaciones de *S. circinnata* con los cromatogramas para amarissinina A y teotihuacanina, así como los cromatogramas obtenidos para las diferentes poblaciones de la especie.





Phylogenetic and Chemical Analyses of the Medicinal Plant *Salvia circinnata*: an Approach to Understand Metabolomics Differences

Laura Sepúlveda-Cuellar^{1,2} · Arianna Duque-Ortiz^{1,3} · Laura Yáñez-Espinosa⁴ · Fernando Calzada⁵ · Elihú Bautista¹ · Guillermo Pastor-Palacios¹ · Brenda Y. Bedolla García⁶ · Joel Flores-Rivas² · Ernesto I. Badano² · David Douterlungne⁷

Received: 9 June 2021 / Accepted: 30 June 2021 / Published online: 18 August 2021
© Sociedade Brasileira de Farmacognosia 2021

Abstract

Salvia circinnata Cav. (Syn. *S. amarissima* Ortega), Lamiaceae, is a Mexican medicinal plant used in traditional medicine for the treatment of gastrointestinal illness, cancer, and diabetes. Samples of ten natural populations were analyzed by application of a systematic approach which involved the combination of DNA barcoding, GC–MS, HPLC–DAD, and HPLC–FLD for differentiation of their chemical profiles. Taxonomic and phylogenetic analyses indicated that all of them belong to the same analyzed plant species. The GC–MS analysis showed the presence of alkanes, amides, anthraquinones, and sesquiterpenoids in the volatile fraction of the extracts. HPLC–PDA and HPLC–FLD analyses indicated that at least four chemotypes exist for the analyzed species, diverging in the production of clerodane diterpenes: (i) an amarissinin A-rich population; (ii) another single population producer of amarisolide A; (iii) producing populations of teotihuacanin and amarissinin A, (iv) while another population only produced alkanes and sesquiterpenes as distinctive constituents not previously reported for this plant. The multivariate statistical analysis suggests that this chemical diversity depends on environmental factors.

Keywords Chia complex · Chemical fingerprinting · Interpopulation variability · Mint family · Principal component analysis · Redundancy analysis



Contents lists available at ScienceDirect

Tetrahedron Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tetlet

neo-Clerodane and tiliifolane-type diterpenoids, and other constituents from *Salvia pennellii*



Laura Sepúlveda-Cuellar^{a,b}, Jorge Cárdenas^c, Rubén A. Toscano^c, José Rivera-Chávez^c, Elihú Bautista^{a,*}, Brenda Y. Bedolla-García^d, Joel Flores^b

^a CONACYT-División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C., San Luis Potosí, S.L.P., Mexico

^b División de Ciencias Ambientales, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C., San Luis Potosí, S.L.P., Mexico

^c Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Mexico

^d Instituto de Ecología A. C., Centro Regional Bajío, Pátzcuaro, Michoacán, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 February 2023

Revised 31 March 2023

Accepted 4 April 2023

Available online 8 April 2023

Keywords:

Terpenoids
Structural elucidation
Biological prospecting
Mexican flora
Salvia species

ABSTRACT

Two undescribed neo-clerodanes (**1** and **2**) and a novel tiliifolane (**3**) diterpenoids, were isolated from the leaves and flowers of *Salvia pennellii*. Wirikutin (**1**) and 15-*epi*-wirikutin (**2**) were isolated as a C-15 epimeric mixture containing a 5-hydroxyfuran-2(5*H*)-one moiety in the side chain of the neo-clerodane framework. Wixarikolide (**3**) was isolated as a $\Delta^{3(20)}$ derivative of tiliifodiolide. The structures of compounds **1/2** were deduced through the analyses of their MS spectrometric, and the 1D/2D NMR data. The structure of **3** was determined directly by single crystal X-ray diffraction. The PTP1B inhibitory activity of compounds **1/2** was assayed.

© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Floristic diversity of Mexico comprises near 30 000 species of vascular plants, from which 23 314 are considered native and 11 578 are endemic. According to these data, *Eschschacea* family is

hydrangea [11], and microphyllanes from *Salvia microphylla* and *Salvia hirsuta* [12,13], among others. Recently, from these plant species, new diterpenoids with neoclerodane and microphyllane skeletons, occurring as epimeric and diastereomeric mixtures have been isolated and fully characterized [12].