



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

SISTEMÁTICA

**Análisis filogenético de *Salvia* sección *Fulgentes* (Lamiaceae)**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**EMMANUEL MARTÍNEZ AMBRIZ**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARTHA JUANA MARTÍNEZ GORDILLO**

**FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. GERARDO ADOLFO SALAZAR CHÁVEZ**

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM**

**DRA. SUSANA AURORA MAGALLÓN PUEBLA**

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM**

**CD. MX. ENERO, 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

SISTEMÁTICA

**Análisis filogenético de *Salvia* sección *Fulgentes* (Lamiaceae)**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**EMMANUEL MARTÍNEZ AMBRIZ**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARTHA JUANA MARTÍNEZ GORDILLO**

**FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. GERARDO ADOLFO SALAZAR CHÁVEZ**

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM**

**DRA. SUSANA AURORA MAGALLÓN PUEBLA**

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM**

**MÉXICO, CD. MX. ENERO, 2019**



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

OFICIO FCIE/DAIP/1173/2018

ASUNTO: Oficio de Jurado


M. en C. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 24 de septiembre de 2018 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en el campo de conocimiento de Sistemática del alumno MARTÍNEZ AMBRIZ EMMANUEL con número de cuenta 304260326 con la tesis titulada "Análisis filogenético de *Salvia* sección *Fulgentes* (Lamiaceae)", realizada bajo la dirección del (la) DRA. MARTHA JUANA MARTÍNEZ GORDILLO:

Presidente: DR. DAVID SEBASTIAN GERANDT  
Vocal: DR. JUAN JOSÉ MORRONE LUPI  
Secretario: DRA. SUSANA AURORA MAGALLÓN PUEBLA  
Suplente: DR. GERARDO ADOLFO SALAZAR CHÁVEZ  
Suplente: M. EN C. ITZI FRAGOSO MARTÍNEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 4 de diciembre de 2018

  
DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGNS/MMVA/ASR/grf\*

## **Agradecimientos**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención proporcionada durante los estudios de maestría.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (UNAM-DGAPA-PAPIIT, proyecto IG200316, corresponsables: Dra. Susana Aurora Magallón Puebla y Dr. Gerardo Adolfo Salazar Chávez), por el apoyo financiero otorgado para llevar a cabo el proyecto de investigación propuesto para la maestría.

A los miembros de mi comité tutor por sus valiosas observaciones sobre el manuscrito.

A mi tutora, la **Dra. Martha Juana Martínez Gordillo**, de la Facultad de Ciencias UNAM, por el apoyo brindado a lo largo del desarrollo del presente trabajo.

Al **Dr. Gerardo Adolfo Salazar Chávez**, del Instituto de Biología UNAM, por el apoyo y asesoría brindada en la parte de laboratorio y análisis de datos moleculares.

A la **Dra. Susana Magallón Puebla**, del Instituto de Biología UNAM, por el apoyo otorgado en la parte teórica y metodológica del presente trabajo.

## **Agradecimientos a título personal**

A mi tutora la **Dra. Martha Juana Martínez Gordillo**, por su disposición, observaciones, paciencia y consejos durante la realización del presente trabajo.

Al **Dr. Gerardo Adolfo Salazar Chávez**, por sus enseñanzas y tiempo en el trabajo de laboratorio, durante el cual se obtuvieron los datos moleculares utilizados para desarrollar este trabajo.

A la **Dra. Susana Aurora Magallón Puebla**, por su tiempo y observaciones en la parte metodológica y fundamentos teóricos, los cuales me sirvieron para desarrollar de una mejor manera el presente trabajo.

A los sinodales: **Dr. David Sebastian Gernandt, Dr. Juan José Morrone Lupi, M. en C. Itzi Fragoso Martínez**, por su tiempo, correcciones y observaciones realizadas a este trabajo.

Al personal de las colecciones ENCB, FCME, IEB, HUAP, MEXU, MO, OAX, SERO, SLPM, TEX, USON, por permitirme consultar y en algunos casos muestrear sus colecciones, además de otorgarme préstamos de sus ejemplares.

A la **Dra. Carolina Granados Mendoza**, por su tiempo y asesoría en el desarrollo de los primers para el marcador nuclear de copia única AT5G18580.

A la **M. en C. Itzi Fragoso Martínez**, por su tiempo y sobre todo por compartirme su conocimiento sobre la biología y evolución del género *Salvia*, el cual me permitió entender y desarrollar de una manera más completa el presente trabajo.

Al **Dr. Ricardo García Sandoval**, por su tiempo, paciencia y asesoría en cuanto a los métodos de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana, lo cual me permitió mejorar sustancialmente el presente estudio.

A la **Dra. Lidia Irene Cabrera Martínez**, del Laboratorio de Sistemática Molecular del Departamento de Botánica, Instituto de Biología, UNAM, por su apoyo y tiempo durante la extracción y amplificación de las muestras. A la **M. en C. Laura Márquez Valdemar**, del Laboratorio de Biología Molecular de la Biodiversidad y la Salud, Instituto de Biología, UNAM, por su apoyo durante la secuenciación de las muestras. A la **M. en C. Andrea Rubí Jiménez Marín**, del Laboratorio de Biología Molecular de Zoología, por su ayuda y asesoría en la amplificación y optimización de la purificación del marcador nuclear de copia única.

A la **M. en F. Ana Isabel Bieler Antolín** del Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias, UNAM, por la toma y edición de fotografías de estructuras reproductivas empleadas para los análisis y figuras del presente trabajo. A la **M. en C. María Eugenia Muñiz Díaz de León** del Taller de Plantas I y II de la Facultad de Ciencias, UNAM, por la ayuda en el secado y preservación de los ejemplares colectados.

A la **M. en C. Patricia Rivera Pérez** y al **Biol. Christian E. Tun Tun** por el tiempo y la ayuda prestada para obtener muestras de los herbarios TEX y MO.

A **Jacqueline V. Soriano Benítez** por los años de apoyo y comprensión en mi aventura por el mundo de la botánica y la ciencia.

A **mis padres y hermanas**, por alentarme a seguir adelante en los momentos de flaqueza cuando quería tirar la toalla.

Finalmente, a mis amigos **Emmanuel A. Cantú Morón, Nadia Castro Cárdenas, Saddam Morales Saldaña, Ana Belén Adame González, Felipe de Jesús Eslava Silva, Luis Alberto Flores Rocha, Dulce Yehimi López Miranda, Emmanuel Gómez Cantoya, Cynthia Peralta García, Aldo Domínguez de la Torre, Amanda Ortiz Garza y Diego Anzo Aguilar**, por el apoyo y ratos de diversión a lo largo de los últimos dos años.



## Índice

<b>Resumen/Abstract.....</b>	<b>2</b>
<b>I. Introducción.....</b>	<b>4</b>
<b>II. Objetivos.....</b>	<b>5</b>
<b>III. Antecedentes.....</b>	<b>6</b>
La sección <i>Fulgentes</i> Epling.....	6
El clado <i>Fulgentes</i> .....	6
<b>IV. Materiales y métodos.....</b>	<b>7</b>
<b>V. Resultados.....</b>	<b>26</b>
Análisis de congruencia filogenética.....	26
Análisis de informatividad filogenética.....	26
Análisis filogenéticos.....	26
Optimización de caracteres morfológicos.....	31
<b>VI. Discusión.....</b>	<b>35</b>
Análisis de congruencia filogenética.....	35
Análisis de informatividad filogenética.....	35
Relaciones filogenéticas del clado <i>Fulgentes</i> .....	36
Optimización de caracteres.....	39
Implicaciones taxonómicas.....	42
<b>VII. Conclusiones.....</b>	<b>44</b>
<b>VIII. Literatura citada.....</b>	<b>45</b>

## Resumen

*Salvia* es el género más diverso de Lamiaceae, dentro de los linajes que lo componen, destaca el subgénero *Calosphace* con más de 600 especies, endémicas de América. Dentro de él se encuentra la sección *Fulgentes*, la cual se ubica al interior del clado Fulgentes. La sección *Fulgentes* está conformada por arbustos o sufrútices, con flores de coloraciones rojizas y polinización ornitófila. Sin embargo, aún no se han incluido todas las especies de esta sección en un estudio filogenético. Por lo que el objetivo central de este trabajo consiste en explorar las relaciones filogenéticas de la sección *Fulgentes*, así como identificar la totalidad de las especies pertenecientes a esta. Para ello, con base en trabajos moleculares y taxonómicos previos se seleccionaron 40 taxones pertenecientes a *Calosphace*, de los cuales 32 podrían pertenecer a la sección *Fulgentes*, el resto se emplearon como grupos externos. Se extrajo el DNA y posteriormente se amplificaron y secuenciaron los marcadores nucleares ITS y AT5G18580, además de los plastidiales *trnL-trnF* y *trnH-psbA*. También, se codificaron 18 caracteres morfológicos florales a partir de material colectado y ejemplares de herbario. Se llevaron a cabo análisis filogenéticos con los métodos de Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (IB), con una matriz únicamente con los datos moleculares, además de un análisis de evidencia total en el cual se concatenaron las matrices de los marcadores moleculares y los caracteres morfológicos codificados. Las hipótesis filogenéticas obtenidas recuperaron a la sección *Fulgentes* como polifilética, y al igual que en estudios previos, la mayoría de sus especies se encontraron al interior del clado del mismo nombre, el cual fue recuperado con valores de soporte altos (100 BS/1 PP). El clado Fulgentes está conformado por la sección *Holwaya* en su totalidad y algunas especies de las secciones *Fulgentes*, *Flocculosae* y *Nobiles*, incluyendo en total 23 especies y tres variedades. En cuanto al resto de taxones, atribuidos a la sección con base en caracteres morfológicos, no se encontraron emparentados con el grupo. Los resultados apoyan la necesidad de una reevaluación de la clasificación actual para *Calosphace*, así como de la utilidad de los caracteres empleados para establecer agrupaciones en el subgénero.

**Palabras clave:** análisis de evidencia total, DNA nuclear, filogenia, sección *Fulgentes*, *Salvia*.

## **Abstract**

*Salvia* is the most diverse genus of Lamiaceae, within the lineages that compose it, the subgenus *Calosphace* distinguish with more than 600 species endemic of America. Within the groups that compose it is the *Fulgentes* section, contained within Fulgentes clade. The *Fulgentes* section is composite by shrubs or suffrutex with flowers of reddish colorations and ornitophilous pollination. However, all the species of the aforementioned section have not yet been included in a phylogenetic study. Therefore, the main objective of this work is to explore the phylogenetic relationships of the *Fulgentes* section, besides to identify the totality of the species belonging to this. For this, based on previous molecular and taxonomic works, 40 taxa belonging to *Calosphace* were selected, of which 32 could belong to the *Fulgentes* section, the rest were used as outgroups. DNA was extracted and subsequently the nuclear markers ITS and AT5G18580, besides the plastidals *trnL-trnF*, *trnH-psbA* they were amplified and sequenced. As well 18 floral morphological characters were coded from collected material and herbarium specimens. Phylogenetic analyses were carried out with Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (IB) methods with a matrix only with the molecular data, in addition to a total evidence analysis in which the molecular markers and the codified morphological characters were included. The phylogenetic hypotheses recovered the section *Fulgentes* as polyphyletic, and as in previous studies, including most of their species within the clade of the same name, which was recovered with strong support (100 BS /1 PP). The Fulgentes clade is composite of all the species of the *Holwaya* section and some species of the *Fulgentes*, *Flocculosae* and *Nobiles* sections, in total 23 species and three varieties. As for the rest of the taxa, presumably attributed to the section, based on morphological characters, they were not related to the group. The results support the need for a reassessment of the current classification for *Calosphace*, as well as the usefulness of the characters used to establish groupings in the subgenus.

**Key words:** total evidence analysis, AT5G18580, phylogeny, *Fulgentes*, *Salvia*.

## 1. Introducción

La familia Lamiaceae se encuentra entre las diez más abundantes dentro de la flora de México, con un total de 33 géneros y 598 especies (Martínez-Gordillo *et al.*, 2018). Dentro de esta familia se encuentra el género *Salvia* L., el más diverso de la familia con alrededor de 1000 especies alrededor del mundo (Harley *et al.*, 2004). El género *Salvia*, a diferencia del resto de las lamiáceas, se caracteriza morfológicamente por la presencia de dos estambres, con anteras monotecas, separadas por un conectivo alargado, en el cual, las tecas inferiores y el tejido conectivo forman un apéndice generalmente estéril, con forma de palanca, denominado balancín o gubernáculo, el cual ha sido identificado como una estructura clave involucrada en la polinización y evolución del género *Salvia* (Claßen-Bockhoff *et al.*, 2003; 2004a).

Debido a su gran diversidad y de acuerdo a la clasificación propuesta por Bentham (1876) *Salvia* se divide en cuatro subgéneros: *Calosphace* Benth., *Leonia* Benth., *Salviastrum* Benth. y *Sclarea* Benth. Encontrándose la mayoría de las especies mexicanas dentro del subgénero *Calosphace* (Walker *et al.*, 2004). Éste subgénero se caracteriza morfológicamente por la presencia de una palanca estaminal linear y la ausencia de tecas posteriores fértiles. Es el más diverso al interior de *Salvia*, con alrededor de 500 especies, distribuidas exclusivamente en el continente americano, desde México hasta Sudamérica y uno de los siete grupos monofiléticos reconocidos al interior del género *Salvia* (Walker & Sytsma, 2007; Drew *et al.*, 2017).

De acuerdo con la clasificación taxonómica infragénica, se reconocen 99 secciones al interior de *Calosphace*, de las cuales cerca del 60% se encuentra en México y 26 son endémicas (Epling, 1939, 1940, 1941, 1947, 1951; Ramamoorthy y Elliot, 1998; Fragoso-Martínez *et al.*, 2018). Sin embargo, estudios filogenéticos para el subgénero *Calosphace* han sugerido que solamente 12 de las secciones propuestas son monofiléticas (Jenks *et al.*, 2013; Fragoso-Martínez *et al.*, 2018).

Por otro lado, en la filogenia más reciente para el subgénero se distinguen 27 clados (Fragoso-Martínez *et al.*, 2018). Dentro de estos grupos monofiléticos al interior de *Calosphace*, se encuentra el clado Fulgentes, el cual se caracteriza por la corola roja,

polinización ornitófila y una distribución restringida a México y Centroamérica (Jenks *et al.*, 2013).

A pesar de las características antes mencionadas, tanto el clado Fulgentes como la sección del mismo nombre y la mayoría de los grupos monofiléticos al interior de *Calosphace*, aún se encuentran representados de manera parcial en las filogenias publicadas. Por lo que identificar la totalidad de las especies pertenecientes a la sección *Fulgentes* Epling, así como dilucidar las relaciones filogenéticas entre las mismas y si se trata de un grupo monofilético, además de analizar caracteres morfológicos relevantes en la evolución y delimitación del grupo, representan la oportunidad de realizar un análisis integral.

## 1. Objetivos

### General

Analizar las relaciones filogenéticas de las especies al interior de la sección *Fulgentes*, con base en caracteres morfológicos y moleculares.

### Particulares

- Explorar la utilidad de un marcador nuclear de copia única (gen AT5G18580), en combinación con marcadores usados anteriormente para el género *Salvia* (ITS, *trnL-trnF* y *psbA*), con el fin de postular hipótesis de relación entre las especies de la sección *Fulgentes*.
- Explorar la utilidad de caracteres morfológicos florales, con el fin de postular hipótesis de relación entre las especies de la sección *Fulgentes*.
- Identificar las especies que conforman la sección *Fulgentes*.

## II. Antecedentes

### La sección *Fulgentes*

La sección *Fulgentes* fue delimitada por Epling (1939) tomando en cuenta caracteres morfológicos, como: el hábito, el cual generalmente es sufrútice; el labio superior del cáliz 7-nervado; la corola de color rojo, el tubo de la corola ventricoso y ligeramente invaginado en la base, con papilas en el interior del tubo de la corola; los estambres insertos en el labio superior de la corola y el estilo hirsuto. Esta sección incluye seis especies, las cuales se distribuyen desde Arizona en el suroeste de los Estados Unidos de América, hasta Oaxaca en el sur de México.

En ese mismo trabajo Epling diferencia las secciones *Fulgentes* y *Cardinales* Epling, debido a caracteres relacionados con la corola, como la similitud de tamaño entre los labios y la base del tubo recta o invaginada. Además, designa como especie tipo para la sección *Cardinales*, a *Salvia cardinalis* Kunth, la cual posteriormente fue sinonimizada por Ramamoorthy (1984) bajo el nombre de *S. fulgens* Cav., considerada como tipo de la sección *Fulgentes*. Por esta razón, la sección *Cardinales* fue sinonimizada bajo *Fulgentes*, las siete especies restantes se agruparon en una nueva sección con el nombre de *Holwaya* Ramamoorthy, cuya especie tipo es *S. holwaya* S.F. Blake.

### El clado *Fulgentes*

Jenks *et al.* (2013) mencionan por primera vez al clado *Fulgentes*, compuesto por 22 especies, presentes en México y Centroamérica, en el cual se anidan especies de las secciones *Cardinales*, *Flocculosae*, *Fulgentes* y *Nobiles* de acuerdo con la circunscripción de Epling (1939). Las características importantes para delimitar este clado son las flores rojas, grandes, polinizadas por colibríes. Sin embargo, a pesar de que este análisis recupera al clado *Fulgentes* como monofilético, lo hace con un valor bootstrap y de probabilidad posterior bajo.

Posteriormente, Fragoso-Martínez *et al.* (2018) recuperan nuevamente al clado *Fulgentes*, con un valor de soporte bootstrap de 100. Sin embargo, se modificó la circunscripción del clado, ya que *S. adenophora* Fernald, *S. disjuncta* Fernald y *S.*

*madrensis* Seem., no se encuentran al interior del clado Fulgentes y no están cercanamente emparentadas con el grupo. En el estudio de Fragoso-Martínez *et al.* (2018), el clado hermano de Fulgentes es Membranaceae, relación que se observó al incrementar el muestreo con respecto al estudio de Jenks *et al.* (2013).

Otros resultados importantes en el estudio de Fragoso-Martínez *et al.* (2018), para el clado Fulgentes consistieron en la división de éste en los subclados Holwaya y Fulgentes, ambos con un valor de soporte bootstrap de 100. La detección de una inversión en la evolución del síndrome de polinización, de orintofilia a melitofilia, específicamente en el subclado Fulgentes. Además, de un análisis de los caracteres morfológicos florales relacionados a esta reversión.

### III. Material y métodos

#### Diseño de muestreo

Se seleccionaron 39 especies pertenecientes al género *Salvia*, subgénero *Calosphace* (Anexo I). El grupo interno está conformado por 32 especies, 16 de las cuales corresponden al clado Fulgentes, de acuerdo con los resultados de los análisis de Jenks *et al.* (2013) y Fragoso-Martínez *et al.* (2018). En el presente trabajo también se incluyeron las especies consideradas por Epling (1939) dentro de las secciones *Cardinales* y *Fulgentes*, que no habían sido incluidas previamente. Además de especies descritas recientemente y que no habían sido asignadas a ninguna sección, pero morfológicamente son similares al grupo de estudio.

Como grupos externos se incluyeron ocho especies de *Calosphace*, entre ellas *Salvia axillaris* Moc. & Sessé ex Benth., hermana del resto de las especies del subgénero *Calosphace* (Jenks *et al.*, 2013, Fragoso-Martínez *et al.*, 2018). También, se incluyeron a *S. lasiocephala* Hook. & Arn. y *S. mocinoi* Benth., las cuales corresponden al clado Membranaceae, grupo hermano de Fulgentes de acuerdo a Fragoso-Martínez *et al.* (2018). Finalmente, debido a que comparten similitudes morfológicas con el grupo de estudio, como la corola de color rojo y de tamaño similar, se incluyeron a *S. blepharophylla* Brandegee, *S. disjuncta* Fernald, *S. oaxacana* Fernald, *S. pexa* Epling y *S. regla* Cav.

## **Trabajo de campo**

Se realizaron cinco salidas al campo, a los estados de Chiapas, Oaxaca, Puebla y San Luis Potosí. Se tomó como base los datos de colecta de los ejemplares revisados en los herbarios ENCB, FCME, IEB, HUAP, MEXU, MO, OAX, SERO, SLPM, TEX y USON. Las localidades visitadas fueron: Motozintla, El Porvenir y Las Margaritas (Chiapas); Montenegro, San Marcos Monte de León y Santiago Tilantongo (Oaxaca); Atexcoco, Azumbilla, Cerro El Gavilán, Esperanza y San Luis Tultitlanapa (Puebla) y El Peaje (San Luis Potosí). Se colectaron ejemplares pertenecientes a la sección *Fulgentes* y grupos afines, preservando tejido en sílica gel, el cual se empleó para la extracción de DNA. Además, se preservaron flores en alcohol para el análisis de caracteres morfológicos florales.

## **Caracteres morfológicos florales cualitativos y estados de carácter**

A partir de la observación de ejemplares de herbario y flores fijadas en alcohol, se postularon y codificaron 18 caracteres florales potencialmente informativos filogenéticamente para la sección *Fulgentes* (cuadro 1), otras especies no asignadas seccionalmente pero que son floralmente similares y los grupos externos. En este trabajo no se consideraron caracteres vegetativos debido a que en varias especies del género *Salvia* se observa plasticidad en este tipo de caracteres Epling (1939), mientras que los caracteres reproductivos parecen ser más estables.

**1. Número de nervaduras en el labio superior del cáliz: (0) 3-nervado, (1) 5-nervado, (2) 7-nervado.**

Debido a la fusión de los sépalos en el género *Salvia*, los cuales forman un cáliz bilabiado, se ha dividido el cáliz en un labio superior y uno inferior, se ha observado que el número de nervios en el labio superior del cáliz es un carácter constante para algunas secciones del subgénero *Calosphace* y ha ayudado en la delimitación de estas (Epling, 1939). Debido a que en el clado *Fulgentes* se anidan especies de diferentes secciones, se decidió probar la utilidad de este carácter, separando los tres estados observados entre las especies analizadas.



**2. Ápice del labio superior del cáliz: (0) tridentado, (1) apiculado, (2) acuminado, (3) agudo, (4) mucronado.**

Como se mencionó anteriormente, el cáliz en el género *Salvia* se divide en un labio superior y uno inferior, en el caso del ápice del labio superior se observó cierto grado de variación de acuerdo a la forma (fig. 2 C–D), empleándose los siguientes estados de carácter: terminación en tres dientes (tridentado), terminación en punta aguda, corta y flexible (apiculado), terminación con ángulo inferior a 45° (acuminado), terminación con ángulos de 45 a 90° (agudo) y terminación en una proyección aguda, corta y rígida (mucronado).

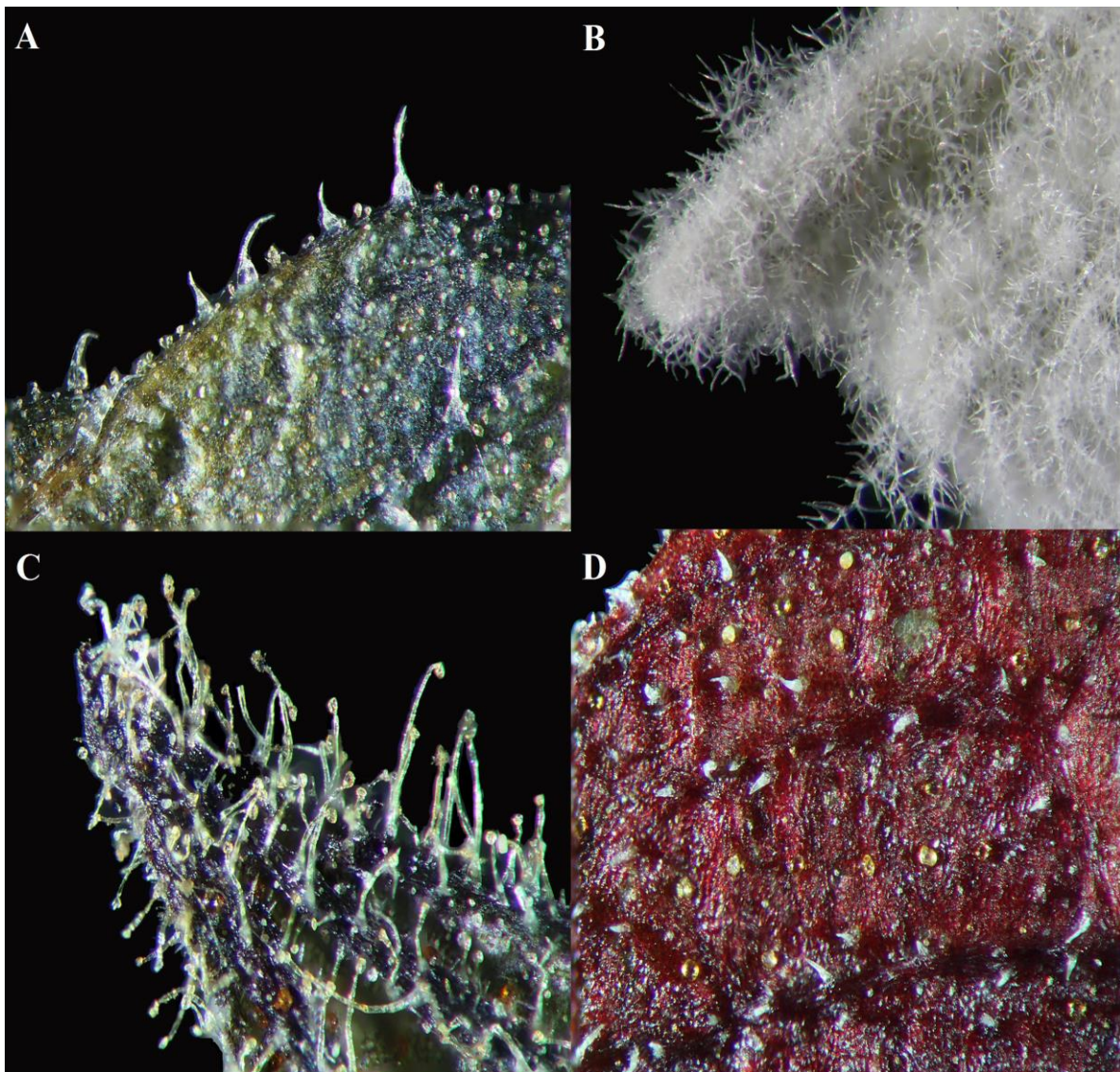
Este carácter no ha sido explorado, a pesar de la variación de formas presentes en *Calosphace* y a la evidencia aportada en algunos estudios morfométricos, en los cuales este carácter puede ser útil en la delimitación e identificación de especies (Fernández, 2006; Fragoso-Martínez, 2014).

**3. Tricomas en el cáliz: (0) ausentes, (1) simples, (2) ramificados.**

Los tricomas son apéndices epidérmicos presentes en diversas partes de las plantas, en el género *Salvia* los tipos más comunes de tricomas son los pluricelulares simples, los tricomas dendríticos (fig. 1) y los tricomas glandulares con cabeza unicelular (El-Gazzar y Watson, 1970). Sin embargo, hasta ahora no está claro si los tricomas eglandulares y glandulares en *Salvia* son homólogos, sobre todo debido a la función secretora de estos últimos, pues se ha observado que tienen relación con rutas metabólicas para la síntesis de terpenos y aceites esenciales (Hallahan, 2000; Baran *et al.*, 2010). Esto, podría sugerir que el origen de ambos tipos de tricomas es distinto, razón por la cual se consideraron como caracteres independientes y se trataron por separado. Sumado a lo anterior, en algunas ocasiones el indumento en el cáliz puede estar ausente o conformado únicamente por tricomas de tipo glandular, por lo que fue necesario considerar la ausencia de tricomas como un estado adicional de carácter.

#### 4. Tricomas en la corola: (0) ausentes, (1) presentes.

Para este caracter únicamente se consideró la presencia o ausencia de tricomas, debido a que en los taxones analizados no se observaron tricomas ramificados en la corola. Aunque vale la pena mencionar que al interior del subgénero *Calosphace* hay especies con tricomas ramificados en la corola. Por otra parte, si bien todas las especies de *Calosphace* presentan indumento en la corola, en el caso de algunos taxones observados, el indumento que presentaban era únicamente de tipo glandular, por lo que se codificó como ausencia.



**Figura 1. Tipos de tricomas.** A. Simples, (*S. microphylla*). B. Ramificados, (*S. pexa*). C. Glandular-pedunculados, (*S. wagneriana*). D. Glandular-peltados, (*S. regla*).

## **5. Tricomas glandulares, pedicelados en el cáliz: (0) ausentes, (1) presentes.**

Como se mencionó anteriormente, el género *Salvia* presenta tricomas de tipo glandular los cuales se clasifican de manera general en capitado glandulares y peltado glandulares (fig. 1). Ambos tipos se pueden diferenciar debido al número de células que componen la cabeza del tricoma, ya que mientras la cabeza de los tricomas glandular pedicelados es unicelular, la de los tricomas peltados es multicelular (Eiji y Salamaki, 2016).

Por otro lado, en ocasiones ambos tipos de tricomas glandulares se presentan en el cáliz de algunas especies del subgénero *Calosphace*. Sin embargo, se optó por codificar ambos tipos de tricomas glandulares como caracteres independientes, debido a que hasta el momento no hay evidencia de una correlación entre ambos tipos de tricomas cuando ambos están presentes.

Finalmente, diversas secciones del género *Salvia* presentan tricomas glandulares pedicelados, en hojas, cáliz y corola; estos caracteres han servido para delimitar secciones y han demostrado tener importancia sistemática (Eiji y Salmaki, 2016), además de estar relacionados en estrategias de defensa a herbivoría y amortiguamiento de condiciones ambientales (Krstic *et al.*, 2006; Baran *et al.*, 2010).

## **6. Tricomas glandulares peltados en el cáliz: (0) ausentes, (1) presentes.**

En varias especies de la sección *Fulgentes* se observa variación en cuanto a este carácter, por lo que se decidió analizar su utilidad. Como estados de carácter se consideraron la presencia o ausencia de este tipo de tricoma glandular en la estructura de interés, en este caso el cáliz.

Al igual que los tricomas pedicelados, han sido empleados para delimitar secciones (Eiji y Salamaki, 2016). Este tipo de tricomas se encuentran relacionados con la producción de aceites esenciales (Krstic *et al.*, 2006; Baran *et al.*, 2010).

**7. Tricomas glandulares pedicelados en la corola: (0) ausentes, (1) presentes.**

Los tricomas glandulares de la corola son similares a los del cáliz y de igual manera se consideraron los mismos criterios para tratarlos como independientes y codificarlos únicamente de acuerdo a la presencia o ausencia de éstos en la corola. Por otro lado se observó cierto grado de variación, razón por la cual se consideró útil incluirlos.

**8. Tricomas glandulares peltados en la corola: (0) ausentes, (1) presentes.**

Al igual que los tricomas del mismo tipo en el cáliz, se observó variación en la presencia y ausencia de éstos, por lo que se optó por codificarlos por separado a los tricomas glandulares de tipo pedicelados.

**9. Color de la corola: (0) azul: tonalidades sin combinación de rojo, (1) púrpura: colores con combinaciones de azul y rojo, (2) rojo: tonalidades sin combinaciones de azul.**

De manera general, el color de las corolas ha sido relacionado con el tipo de polinización para cada especie. En el caso de *Calosphace* las corolas con tonalidades rojizas, rosadas, púrpuras y amarillas, generalmente han sido relacionadas con una polinización ornitófila, mientras que los colores azul, violeta y blanco se han observado en especies melitófilas (Wester y Claßen-Bockhoff, 2011). Con base en esta clasificación general sobre los colores y su relación con el tipo de polinización, se decidió dividir en tres el color de las flores de las especies analizadas. Aquellas que presentaban colores azules sin combinación de rojo, las que presentaban colores rojos sin combinación de azul y finalmente aquellas que presentaban una combinación de ambos.

**10. Constricción de la boca del tubo de la corola: (0) ausente, (1) presente.**

Todas las especies de la sección *Fulgentes* presentan corolas tubulares, al igual que la mayoría de las especies de *Salvia* que se distribuyen en América (Wester y Claßen-Bockhoff, 2011). Sin embargo, se ha observado que algunas especies presentan corolas con la boca del tubo reducida de manera conspicua (fig. 2A), característica que podría funcionar como una barrera al impedir el acceso al néctar a cierto tipo de animales.

Para la codificación de este carácter, se diferenció entre las especies que presentaban la boca del tubo de la corola reducido y las que no, en este caso se consideró el carácter como ausente.

**11. Base del tubo de la corola invaginado: (0) ausente, (1) presente.**

Se trata de un carácter poco estudiado en el grupo, aunque varias especies de *Calosphace* presentan pliegues orientados al interior del tubo de la corola, sobre todo en la base de éste (fig. 2B). En cuanto a los estados de carácter considerados, se diferenció entre aquellas especies que presentaban la base del tubo invaginado y aquellas que no lo presentaban, en este último caso, el carácter se consideró como ausente.

Por otra parte, este carácter ha sido empleado taxonómicamente para diferenciar entre secciones (Epling, 1939), además de ser considerado como un carácter diagnóstico en la descripción de nuevas especies (Fragoso-Martínez y Martínez-Gordillo, 2013; Bedolla y Zamudio, 2015), por lo que se consideró interesante analizar la utilidad de este carácter para el grupo.

**12. Orientación del labio inferior de la corola: (0) divaricado: dirigido en un ángulo de 75 a 105°, (1) descendente: dirigido gradualmente hacia abajo en un ángulo de hasta 136 a 166°, (2) reflexo: doblado abruptamente hacia atrás.**

La posición del labio inferior de la corola ha sido relacionada con el tipo de polinización, ya que dependiendo de ésta, el acceso a las recompensas puede ser preferente o exclusivo a ciertos tipos de polinizador (Wester y Claßen-Bockhoff, 2011); de esta manera, en las especies que presentan labios reflexos o deflexos es prácticamente imposible que los insectos actúen como polinizadores, ya que carecen de una plataforma de aterrizaje.

De acuerdo a la variación observada, se distinguieron tres estados de carácter. El primero correspondiente a las especies que presentan el labio inferior de la corola en un ángulo de 75 a 105° respecto al tubo de la corola; el segundo a las que lo presentan en un ángulo de 136 a 166° respecto al tubo y el tercero a las especies con el labio doblado de manera abrupta hacia atrás respecto al tubo de la corola.



**Figura 2.** Algunos de los caracteres florales analizados. A. Corola con la boca del tubo de la corola constreñida, (*S. dorisiana*). B. Base del tubo de la corola invaginada (*S. microphylla*). C. Cáliz con el labio superior apiculado (*S. microphylla*). D. Cáliz con el labio superior acuminado (*S. karwinski*). E. Unión del filamento con bisagra (*S. microphylla*). F. Unión del filamento continuo (*S. macellaria*). G. y H. Glándulas en el interior del tubo de la corola.

**13. Posición de los estambres respecto al labio superior de la corola: (0) incluidos, (1) exsertos.**

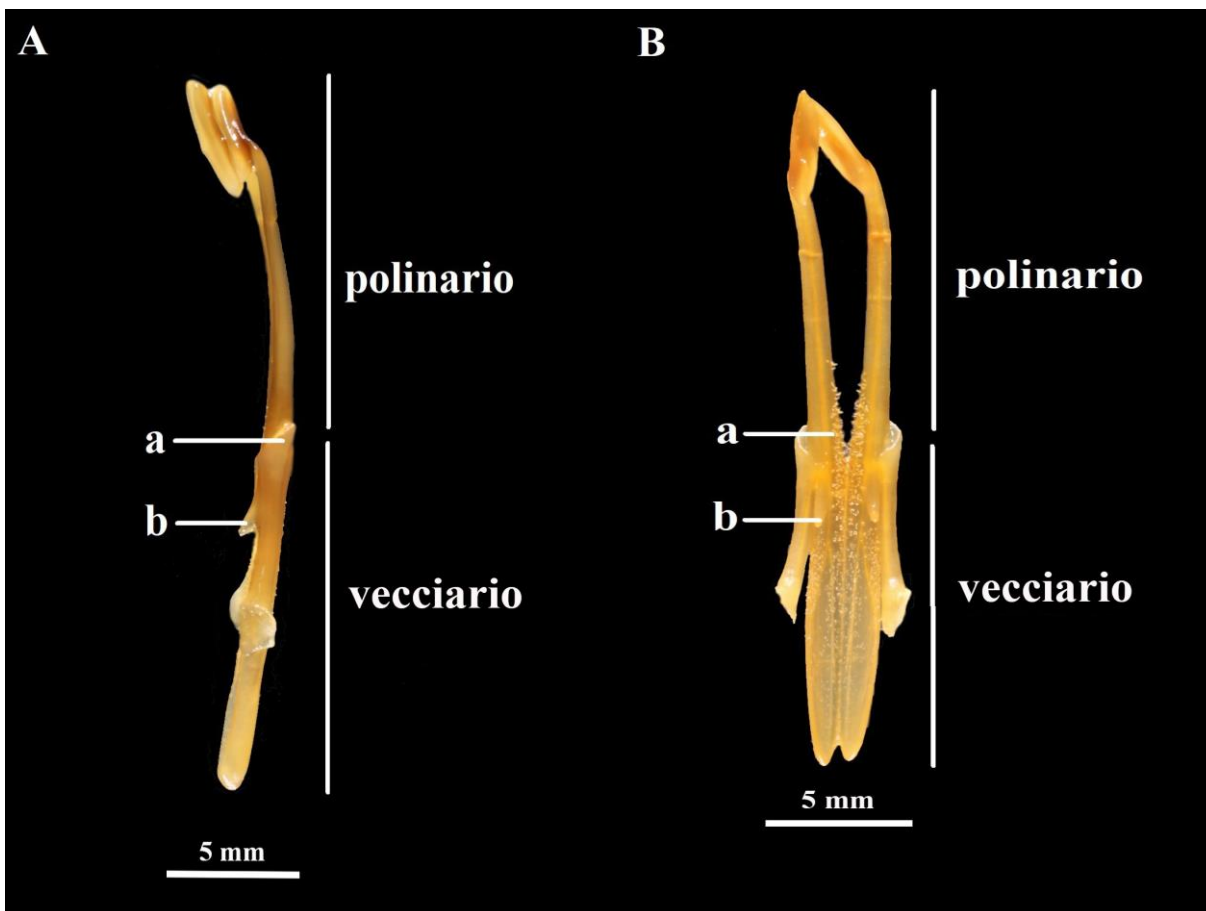
Este carácter ha sido empleado taxonómicamente para diferenciar entre secciones y especies para el género (Epling, 1939). En el caso del subgénero *Calosphace*, se reconocen dos tipos de posición de los estambres respecto a la corola, estambres incluidos los cuales se caracterizan por encontrarse inmersos en el labio superior de la corola y estambres exsertos, los cuales se distinguen por sobresalir del labio superior o el tubo de la corola.

Por otra parte, se ha observado que la inserción de los estambres en combinación con el mecanismo de palanca estaminal, incide directamente en el lugar de deposición del polen, facilitando o excluyendo el contacto en lugares específicos del cuerpo del polinizador, lo que podría funcionar en algunas especies como un mecanismo de aislamiento reproductivo (Claßen-Bockhoff *et al.*, 2004b).

**14. Ubicación de los dientes en el androceo: (0) sin dientes, (1) en el veccario.**

De manera general, el androceo en el subgénero *Calosphace* se ha dividido en dos partes (fig. 3). La primera correspondiente a la parte fértil que porta las tecas, denominada polinario y la segunda a la parte estéril denominada veccario, en algunas especies, estas estructuras pueden presentar proyecciones en forma de dientes (fig. 3). La presencia, ubicación y posición de los dientes en el androceo, han sido considerados caracteres de importancia taxonómica para *Salvia* (Epling, 1939).

Por otro lado, se ha observado que estos dientes pueden funcionar como un impedimento para el libre forrajeo de polinizadores ilegítimos; por ejemplo, en diversas especies ornitófilas de *Salvia*, los dientes se encuentran dispuestos de manera lateral o distal, por lo cual no obstruyen la entrada del tubo floral (Wester y Claßen-Bockhoff, 2011).



**Figura 3. Androceo *Salvia fulgens*.** A. Vista lateral a. unión del filamento con el conector, b. diente del androceo. B. Vista frontal a. indumento del filamento, b. diente del androceo.

**15. Indumento del filamento: (0) glabro, (1) pubescente.**

En el filamento del androceo de las especies de la sección *Fulgentes*, se observó que algunas contaban con indumento (fig. 3B) y otras no, razón por lo que posiblemente este carácter podría estar relacionado con una estrategia de impedimento en dicha estructura, al dificultar la entrada de visitantes ilegítimos.

**16. Unión del filamento con el conector: (0) continuo, (1) con bisagra.**

El filamento, en el punto de inserción con el conector puede extenderse en un diente por encima de éste (fig. 3A), dando la idea de una bisagra, o insertarse directamente al conector en una continuación del tejido, lo cual se manifiesta en la continuidad de los haces vasculares (Claßen-Bockhoff *et al.*, 2004b) en este último caso, la movilidad del mecanismo de palanca es menor.



**17. Forma de la proyección de la glándula de la ginobase: (0) inconspicua, (1) botuliforme, (2) lingüiforme, (3) linear, (4) conoidal.**

Este es un carácter que no ha sido explorado, a pesar de que la forma de la proyección de la glándula de la ginobase varía entre especies. En el caso de ésta estructura se observaron cinco estados de carácter basados únicamente en la variación de las especies analizadas. Sin embargo, vale la pena señalar que a nivel del subgénero probablemente exista una variación aún mayor en cuanto a la forma de ésta estructura. En cuanto a la importancia ecológica y evolutiva de este carácter, vale la pena considerar que esta estructura es la encargada de generar el néctar para los polinizadores.

A continuación se describen los estados de carácter en el mismo orden del inciso 17. El primer estado de carácter corresponde a las especies en las cuales no se observa a simple vista la presencia de la glándula de la ginobase; en el caso del segundo se hace referencia a las proyecciones con forma rolliza y de extremos redondeados; el tercero engloba a las especies con una proyección en forma de lengua, el cuarto hace referencia a una glándula prolongada y angosta de márgenes paralelos y el quinto incluye a las especies con una proyección de forma aproximada a un cono.

**18. Glándulas en el interior del tubo de la corola: (0) presentes, (1) ausentes.**

Varias especies del subgénero *Calosphace* presentan glándulas de origen corolino al interior del tubo de la corola (fig. 2 G–H). Sin embargo, este carácter no ha sido explorado y básicamente solo ha sido empleado por Epling (1939) para distinguir algunas secciones. Se ha hipotetizado como una posible especialización para impedir el ingreso de polinizadores ilegítimos o como estructuras de retención de néctar (Wester y Claßen-Bockhoff, 2011).

**Cuadro 1.** Matriz de caracteres morfológicos cualitativos

Terminales Especie/Carácter	Caracteres cualitativos																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<i>S. axillaris</i>	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2	0	0
<i>S. blepharophylla</i>	2	1	0	1	1	1	0	0	2	1	1	1	0	1	1	2	2	0
<i>S. booleana</i>	2	3	1	0	1	1	1	0	2	1	1	2	0	1	1	2	2	1
<i>S. carranzae</i>	2	1	1	1	1	1	0	1	2	1	0	1	0	1	?	?	?	0
<i>S. coahuilensis</i>	2	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	2	2	0
<i>S. darcy</i>	2	3	1	1	1	1	0	0	2	1	1	1	0	1	?	2	2	1
<i>S. disjuncta</i>	2	3	1	0	1	1	1	0	2	1	0	1	0	1	1	2	2	0
<i>S. dichlamys</i>	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	2	1	1
<i>S. dorisiana</i>	2	2	0	0	1	0	1	0	2	1	1	1	0	1	1	2	2	1
<i>S. fulgens</i>	2	3	1	1	1	1	0	1	2	1	0	1	0	1	1	2	4	1
<i>S. gesneriiflora</i>	1	2	0	1	1	1	0	1	2	1	0	1	0	1	1	2	2	0
<i>S. greggii</i>	2	3	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	2	2	0
<i>S. guevarae</i>	2	1	1	1	1	0	0	0	2	1	0	1	0	0	1	2	2	0
<i>S. holwayi</i>	1	2	1	1	1	1	0	1	2	1	1	2	0	1	1	2	2	1
<i>S. involucrata</i>	2	2	1	1	1	1	0	0	2	1	1	2	0	1	1	2	4	1
<i>S. karwinskii</i>	1	2	2	1	1	0	0	0	2	1	0	2	0	1	0	2	2	1
<i>S. lasiocephala</i>	1	3	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3	0
<i>S. lineata</i>	2	1	1	1	1	1	0	0	2	1	1	1	0	1	0	2	2	1
<i>S. sp.</i>	2	1	1	1	1	1	0	1	2	1	1	1	0	1	1	2	2	1
<i>S. lycioides</i>	2	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	2	2	0
<i>S. macellaria</i>	2	1	2	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	2	0
<i>S. microphylla</i>	2	1	1	1	1	1	0	1	2	1	1	1	0	1	1	2	2	1
<i>S. microphylla</i> var. <i>can.</i>	2	1	1	1	1	1	0	1	2	1	1	1	0	1	1	2	2	1
<i>S. microphylla</i> var. <i>neu.</i>	2	1	1	1	1	1	0	1	2	1	1	1	0	1	1	2	2	1
<i>S. microphylla</i> var. <i>wis.</i>	2	2	1	1	1	1	0	1	2	1	1	1	0	1	1	2	2	0
<i>S. mocinoi</i>	0	3	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	2	3	1
<i>S. modica</i>	2	2	1	1	0	1	0	1	2	1	1	1	0	1	1	1	2	1
<i>S. muelleri</i>	2	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	?	?	?	?
<i>S. nigriflora</i>	2	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	2	1	1
<i>S. oaxacana</i>	2	3	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	0	1	1	2	2	0
<i>S. patriciae</i>	2	1	1	1	1	0	0	0	2	0	0	1	1	1	1	2	2	1
<i>S. pexa</i>	2	3	2	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	2	2	0
<i>S. puberula</i>	2	2	1	1	1	1	0	0	2	1	1	1	0	1	1	2	2	1
<i>S. pulchella</i>	2	2	1	1	1	1	0	1	2	1	1	2	0	1	1	2	2	1
<i>S. regla</i>	1	3	1	1	0	1	0	1	2	1	0	1	0	1	1	2	1	0

<i>S. stolonifera</i>	2	1	1	1	1	0	0	0	2	1	0	1	0	1	1	2	4	1
<i>S. tilantongensis</i>	2	4	0	1	1	1	0	0	2	1	0	1	0	1	1	2	4	0
<i>S. univerticillata</i>	2	3	1	1	1	1	0	0	2	1	0	2	0	0	1	1	2	1
<i>S. venturana</i>	2	1	1	1	1	1	0	1	2	1	0	1	0	1	0	2	2	1
<i>S. wagneriana</i>	1	2	1	0	1	0	1	1	2	1	1	2	0	1	1	2	2	1

## Caracteres moleculares

### Selección de marcadores moleculares

Los marcadores moleculares fueron elegidos con base en los estudios previamente realizados por Jenks *et al.* (2013) y Fragoso-Martínez *et al.* (2018) para el género *Salvia*, con excepción del marcador nuclear de copia única AT5G18580, el cual se emplea por primera vez en un análisis filogenético.

1. Región de los espaciadores transcritos internos (ITS): Los espaciadores transcritos internos, ITS1 e ITS2 son regiones no codificantes que forman parte del DNA ribosomal del núcleo y se encuentran flanqueados por las regiones altamente conservadas de los genes 28S, 5.8S y 16S; por lo anterior se pueden emplear *primers* universales para su amplificación. La evolución rápida de estas regiones permite que se empleen en la comparación a nivel de géneros y especies cercanamente relacionados (Soltis y Soltis, 1998).
2. Región del intrón *trnL* y el espaciador intergénico entre el exón *trnL* y el gen *trnF* (*trnL-trnF*): Se trata de dos fragmentos no codificantes, localizados en el cloroplasto. Ambas regiones son relativamente pequeñas y se han empleado ampliamente para inferir relaciones filogenéticas desde el nivel de familia hasta especie, debido, sobre todo, a la facilidad con que se pueden coamplificar (Soltis y Soltis, 1998).
3. Región del espaciador intergénico entre el gen *psbA* y el gen *trnH* (*psbA-trnH*): Se trata de una región del cloroplasto no codificante. Se ubica entre el gen *psbA*, que codifica para la proteína del fotosistema II y el gen que codifica para el RNA de transferencia de la histidina. Es una de las regiones más variables del cloroplasto,

por lo que se ha empleado en combinación con otros marcadores, llegando a delimitar hasta el 85% de especies para un género (Kress y Erickson, 2007).

4. Gen AT5G18580: Este marcador nuclear ha sido relacionado con la orientación de los microtúbulos corticales (Atkinson *et al.*, 2014). Se trata de una región que codifica una proteína altamente conservada y está compuesto por 12 exones y 11 intrones, los cuales son variables en tamaño. Hasta el momento no se ha empleado para estudios filogenéticos. Sin embargo, promete ser un marcador útil, ya que además de la diferencia en el tamaño, los intrones también son regiones variables en cuanto a sus secuencias de nucleótidos.

### **Extracción y amplificación**

La extracción de DNA se realizó a partir del material colectado y deshidratado en gel de sílice o material de herbario, mediante el método 2×CTAB (Doyle & Doyle, 1987) modificado por Salazar *et al.* (2003). Las reacciones de amplificación se realizaron en volúmenes de 15 µl usando el 'Taq PCR Core Kit' (Qiagen). Las regiones ITS, *trnL-trnF* y *psbA-trnH* fueron amplificadas de acuerdo a los protocolos descritos para el género *Salvia* por Fragoso-Martínez *et al.* (2018).

Para el marcador AT5G18580 se empleó un protocolo de amplificación anidado; la amplificación se llevó a cabo de acuerdo al siguiente programa: temperatura inicial de desnaturalización de 94°C por 2 min, seguido por un período de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 seg, hibridación de primers a 53°C por 30 seg y extensión a 72°C por 2 min, seguido de un período de extensión final a 72°C por 7 minutos, empleando el par de primers F1 (5'-ATGTGGGTTTGCCTGAGGGA-3') y R1 (5'-TGAGGTTGAAGRAAGCCATC-3'). Posteriormente, mediante una reamplificación y el mismo perfil de amplificación mencionado anteriormente, se amplificó en dos fragmentos el marcador de interés con la combinación de primers F1-R6 (5'-GCATCACATAGAGGTAGAAAG-3') y F6 (5'-AAGACTTCTGCCACATAGCCT-3')-R1.

Los productos de PCR de estas regiones se concentraron y corrieron en un gel al 1.5% de agarosa por 3.5 horas, con la finalidad de separar posibles bandas múltiples que correspondieran a diferentes copias del marcador. Posteriormente, las bandas de los productos se cortaron y purificaron con el kit de extracción QIAquick de Qiagen. Las muestras purificadas se corrieron nuevamente en un gel de agarosa al 1.5% por 1 hora para corroborar que no existieran bandas múltiples y fueron enviadas para su secuenciación.

### **Secuenciación, edición y alineamiento**

La secuenciación se llevó a cabo por el método Sanger, en el Laboratorio de Biología Molecular de la Biodiversidad y la Salud, Instituto de Biología, UNAM, y en la empresa Macrogen<sup>®</sup>. Los cromatogramas fueron analizados y editados mediante el programa Geneious v. 11.0.3. (Biomatters<sup>®</sup>). Posteriormente, para los marcadores ITS, *trnL-trnF* y *psbA-trnH*, se realizó un nucelotide BLAST<sup>®</sup> (Madden *et al.*, 1996), en la página del National Center for Biotechnology Information (NCBI), con el fin de corroborar que las secuencias pertenecieran al género *Salvia*. En el caso del marcador AT5G18580, para corroborar la identidad de las secuencias, se llevó a cabo el nucleotide BLAST<sup>®</sup> a través de la página The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR), con la finalidad de corroborar que se tratara del marcador de interés. Finalmente, las secuencias se alinearon a través del programa MAFFT v. 7 (Kato & Standley, 2013), con un método de refinamiento iterativo y el resto de los parámetros seleccionados por defecto. Posteriormente los alineamientos fueron editados manualmente a través del programa PhyDE v. 0.9971 (Muller *et al.*, 2010).

### **Prueba de congruencia filogenética**

Para determinar si los marcadores nucleares y de cloroplasto podían combinarse en los análisis filogenéticos, se llevó a cabo la prueba de “Congruencia entre Matrices de Distancia”, CADM por sus siglas en inglés, la cual emplea el estadístico de concordancia W de Kendall, en el cual, un valor de 0 implica la incongruencia completa entre las matrices que se comparan, mientras que un valor de 1 indica concordancia completa (Campbell *et al.*, 2011). La prueba de congruencia filogenética se realizó a partir de los alineamientos de cada uno de los marcadores, con los cuales se generó una matriz de distancia por marcador. Posteriormente, éstas se emplearon para realizar la prueba de

congruencia mediante la función ‘CADM.global’, incluida en el paquete *ape* (Paradis *et al.*, 2012), del lenguaje R (R Core Team 2018). La hipótesis nula de completa incongruencia entre las matrices de distancia se puso a prueba con 9999 permutaciones.

### **Análisis filogenéticos**

Se realizó un análisis de ML con los marcadores ITS, *trnL-trnF* y *psbA-trnH*, en el programa IQ-TREE web server (Trifinopoulos *et al.* 2016), en el cual se incluyeron 18 taxones de *Calosphaea*, secuenciados para estos marcadores por primera vez, además de las 273 especies empleadas en los estudios previos de Fragoso-Martínez *et al.* (2018) y González-Gallegos *et al.* (2018), con el fin de analizar las relaciones de los taxones pertenecientes a la sección *Fulgentes* y al clado del mismo nombre, al incrementar el tamaño del muestreo. Para este análisis, se empleó una partición por marcador y se seleccionaron los modelos: GTR+F+I+G4 para ITS, TVM+F+G4 para *psbA* y TIM+F+G4 para la región *trnL-F*, de acuerdo a González-Gallegos *et al.* (2018).

Posteriormente, con las secuencias obtenidas de los marcadores AT5G18580, ITS, *trnL-trnF* y *psbA-trnH*, además de la matriz concatenada con los cuatro marcadores, antes mencionados. Se realizaron análisis a través de los métodos de máxima verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana (IB). Con el fin de incluir la mayor cantidad de especies pertenecientes al grupo interno, se consideraron especies de las cuales por lo menos se contara con dos de los cuatro marcadores moleculares. La secuencia del marcador faltante se consideró como datos faltantes (“?”). De igual manera, se realizó un análisis, en el cual se incluyeron los 18 caracteres morfológicos codificados concatenados con los datos moleculares, con la finalidad de observar si ayudaban en la resolución de las relaciones entre las especies de la sección *Fulgentes*.

Los análisis bajo el criterio de ML se llevaron a cabo a través del programa RAxML HPC v. 8 (Stamatakis, 2014). Se eligió un modelo particionado (-q), con 1000 iteraciones de bootstrap y el resto de los parámetros seleccionados por defecto. Para la selección de modelos y particiones se empleó el programa PartitionFinder v. 2 (Lanfear *et al.*, 2016). Los marcadores se dividieron en regiones codificantes y no codificantes, dando como resultado un total de 9 regiones, agrupadas en 5 particiones (tabla 1). Los modelos de

sustitución nucleotídica se seleccionaron de acuerdo al criterio de información bayesiano (BIC). Para el análisis de evidencia total se empleó una partición adicional con los caracteres morfológicos, usando el modelo Mk (Pagel, 1994). Los árboles filogenéticos resultado del análisis, fueron compilados y dibujados en FigTree v. 1.4.3 (Rambaut, 2016).

Los análisis de IB, se realizaron en Mr. Bayes v. 3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012); se emplearon las mismas particiones y modelos que en ML. Se corrieron veinticinco millones de generaciones, con un muestreo cada 10000 generaciones y descartando el primer 20% de las generaciones como “burn-in”. Con los árboles restantes se obtuvo el consenso de mayoría, así como la estimación de las probabilidades posteriores. Para corroborar que las cadenas convergieron y el muestreo fue adecuado, se empleó el programa Tracer v. 1.7.1 (Rambaut *et al.*, 2018), revisando los valores de efective simple size, promedio y desviación estándar.

**Tabla I.** Particiones y modelos empleados para los análisis filogenéticos.

<b>Partición</b>	<b>Marcador</b>	<b>Modelo</b>
<b>1–249</b>	ITS1	GTR+G
<b>250–419</b>	ITS5.8S	K80
<b>420–652</b>	ITS2	GTR+G
<b>653–1549</b>	<i>trnL-F</i>	K81+G
<b>1550–1576</b>	<i>psbA</i>	K80
<b>1577–1956</b>	<i>psbA</i>	K81+G
<b>1957–1974</b>	<i>psbA</i>	K80
<b>1975–2133</b>	AT5G18580	K80
<b>2134–2881</b>	AT5G18580	HKY+G

### **Análisis de informatividad filogenética**

Con el fin de cuantificar la cantidad de información filogenética y el nivel de resolución en el que los marcadores son útiles, se llevó a cabo un análisis de informatividad filogenética (Towsend, 2007) para los cuatro marcadores moleculares empleados. Para ello, se utilizó la matriz concatenada con los datos codificados como faltantes para las especies

empleadas en el presente estudio, así como el árbol obtenido del análisis de ML en RAxML. Este árbol se transformó a ultramétrico y se escaló arbitrariamente a un rango que va de cero a uno, todo esto a través del programa R (R Core Team, 2018), mediante los paquetes *phytools* (Revell, 2012) y *phangorn* (Schliep *et al.*, 2017). Finalmente se llevó a cabo el análisis de informatividad filogenética en la aplicación en línea PhyDesign (López-Giraldez & Townsend, 2011).

### **Reconstrucción de estados ancestrales**

Con los caracteres morfológicos codificados como binarios o multiestado, se llevó a cabo una reconstrucción de estados ancestrales. En el caso de los taxones para los cuales no se pudieron determinar algunos estados de carácter por falta de material fueron codificados como faltantes (?) en la matriz morfológica.

La reconstrucción se llevó a cabo en el árbol de ML obtenido a través de los datos moleculares, esto mediante la función ‘ace’, incluida en el paquete *ape* (Paradis *et al.* 2012), del lenguaje R (R Core Team 2018). La reconstrucción de estados ancestrales se llevó a cabo bajo el criterio de ML con el modelo Mk (Pagel, 1994). Los árboles resultado del análisis fueron dibujados mediante el paquete *phytools* (Revell, 2012), del lenguaje R (R Core Team 2018).



## IV. Resultados

### 1. Análisis de congruencia filogenética

En la prueba de congruencia filogenética CADM, el estadístico de concordancia de Kendall para la matriz concatenada con los cuatro marcadores empleados, indicó que existía congruencia entre los marcadores nucleares y de cloroplasto ( $W=0.47$ ,  $X^2=1526.84$ ,  $p=0.001$ ). Con base en los valores de esta prueba ambos tipos de marcadores se combinaron en un solo análisis filogenético.

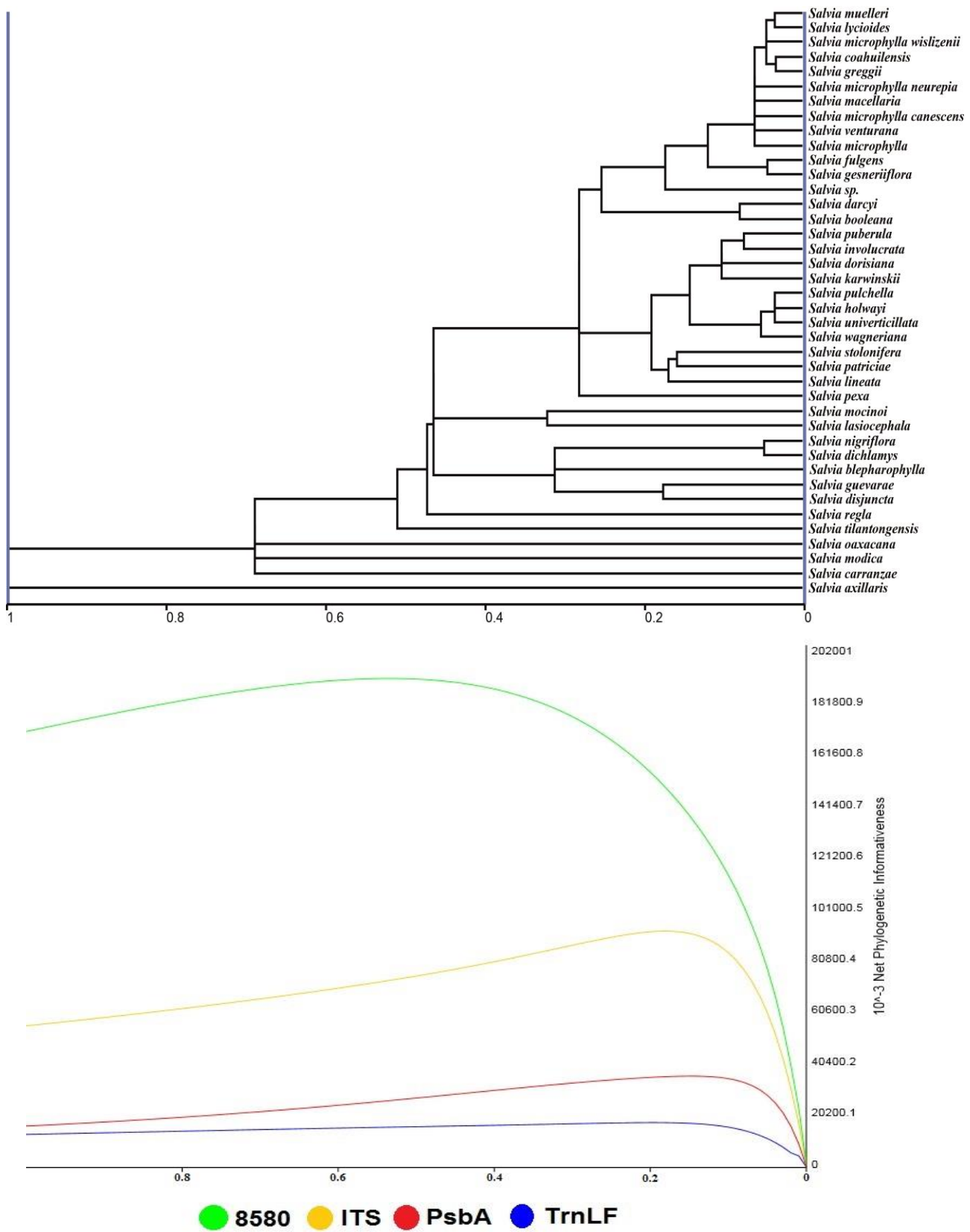
### 2. Análisis de informatividad filogenética

En cuanto a la prueba de informatividad filogenética, los marcadores que aportan una mayor cantidad de información corresponden a los marcadores nucleares AT5G18580 e ITS, aportando información a distintos niveles, AT5G18580 a nivel de clado y subclado e ITS a nivel de especie (fig. 4). Los marcadores de cloroplasto *psbA-trnH* y *trnL-trnF*, son los que proporcionaron la menor cantidad de información.

#### 1. Análisis filogenéticos

##### 3.1 Filogenia subgénero *Calosphace*

En cuanto al análisis de ML realizado para el subgénero *Calosphace*, se recuperó al clado Fulgentes como monofilético, con un valor de BS= 99, con *S. rupicola* Fernald como especie hermana. De igual manera que en los análisis de ML e IB, realizados posteriormente y en los que únicamente se consideró al clado Fulgentes y especies afines, éste se recobró con los mismos 26 taxones. Sin embargo, se recuperó una topología diferente, en la cual el clado Fulgentes se compone por cuatro subclados, tres de ellos con un  $BS \geq 84$  y se presentan complejos de especies con una baja resolución al interior de los subclados (Anexo II).



**Figura 4. Perfil de informatividad filogenética.** Arriba. Árbol ultramétrico. Abajo. Gráfica de informatividad filogenética neta para los marcadores convencionales y el marcador nuclear AT5G18580.

Respecto a las seis especies restantes, que no pertenecen al clado *Fulgentes* y que se incluyen por primera vez en la filogenia para *Calosphace*, sólo cuatro de ellas se encuentran dentro de clados reportados anteriormente por Fragoso-Martínez *et al.* (2018): *S. dichlamys* Epling y *S. nigriflora* Epling se encuentran al interior del clado Sigmoidae, mientras que *S. guevarae* Bedolla & Zamudio se encuentra al interior del clado Membranaceae y *S. modica* Epling se recuperó al interior del clado Micranthae. Por otro lado, *S. pexa* se encuentra formando un clado con *S. aspera* M. Martens & Galeotti y *S. semiatrata* Zucc. (BS=72), mientras que *S. carranzae* Zamudio & Bedolla y *S. tilantongensis* J.G. González & Aguilar-Santelises no se encuentran dentro de ningún clado (Anexo II).

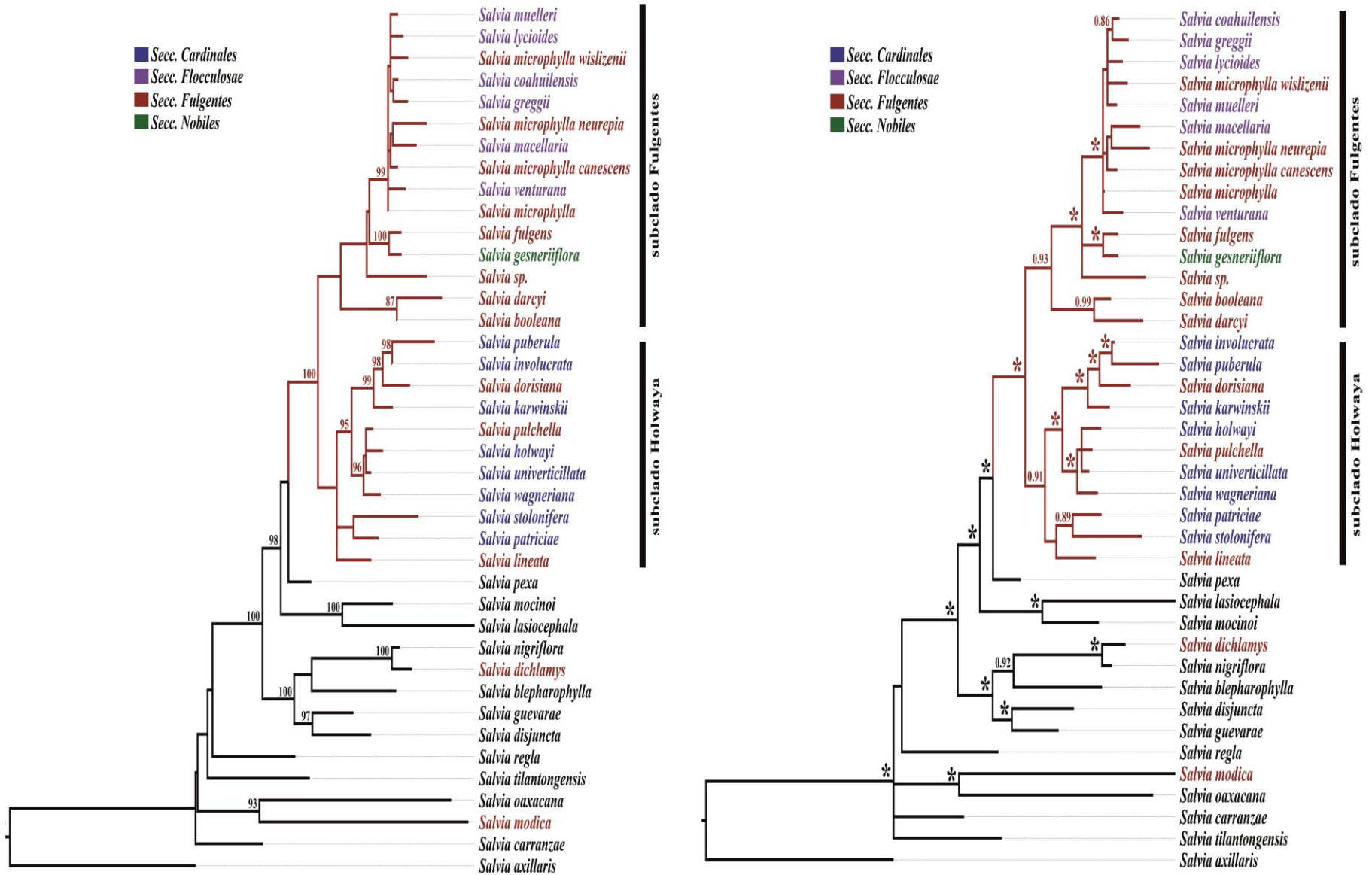
### **3.2 Filogenia del clado Fulgentes**

#### **3.2.1 Análisis de datos moleculares**

La matriz concatenada con las cuatro regiones para los 40 taxa, está compuesta por un total de 2881 caracteres, de los cuales 1559 corresponden a los marcadores nucleares, 652 a la región ITS y 907 caracteres a la región AT5G18580. Mientras que 1322 caracteres corresponde a los marcadores de cloroplasto, 425 a la región *trnH-psbA* y 897 a la región *trnL-trnF*.

En el análisis de ML con los marcadores moleculares (fig. 5), se recuperó el clado Fulgentes como monofilético, con un valor de soporte bootstrap (BS) de 100 y *Salvia pexa* como hermana del clado Fulgentes. También se encontraron tres clados fuertemente soportados con valores de  $BS \geq 93$ : 1) clado Membranaceae, 2) *S. disjuncta* + *S. guevarae* + *S. blepharophylla* + sección *Nigriflora*, 3) *S. oaxacana* + *S. modica*.

Respecto a la topología general del clado Fulgentes, éste se encuentra conformado por los subclados Fulgentes y Holwaya, los cuales presentan valores de soporte bajos  $BS \leq 50$ . Sin embargo, al interior de estos subclados se encuentran complejos de especies resueltas como es el caso del grupo conformado por *S. dorisiana* Standl., *S. karwinski* Benth., *S. involucrata* Cav. y *S. puberula* Fernald. En relación al número de especies que conforman al clado Fulgentes, éste se encuentra conformado por 23 especies y tres variedades.



**Figura 5.** Relaciones filogenéticas del clado Fulgentes basadas en los análisis de ML e IB con los datos moleculares. En rojo se indica el clado Fulgentes. En el caso del análisis de ML únicamente se conservaron valores BS $\geq$ 85. Los asteriscos sobre las ramas indican los nodos con valores de PP=1.

En cuanto a la sección *Fulgentes*, se recuperó como polifilética y aunque se recobraron la mayoría de las especies de la sección al interior del subclado *Fulgentes*, algunas especies se anidaron en el grupo hermano, el subclado *Holwaya*, como en el caso de *S. dorisiana*, *S. lineata* Benth. y *S. pulchella* DC. Mientras que especies como *S. modica* y *S. dichlamys*, se encuentran fuera del clado *Fulgentes*.

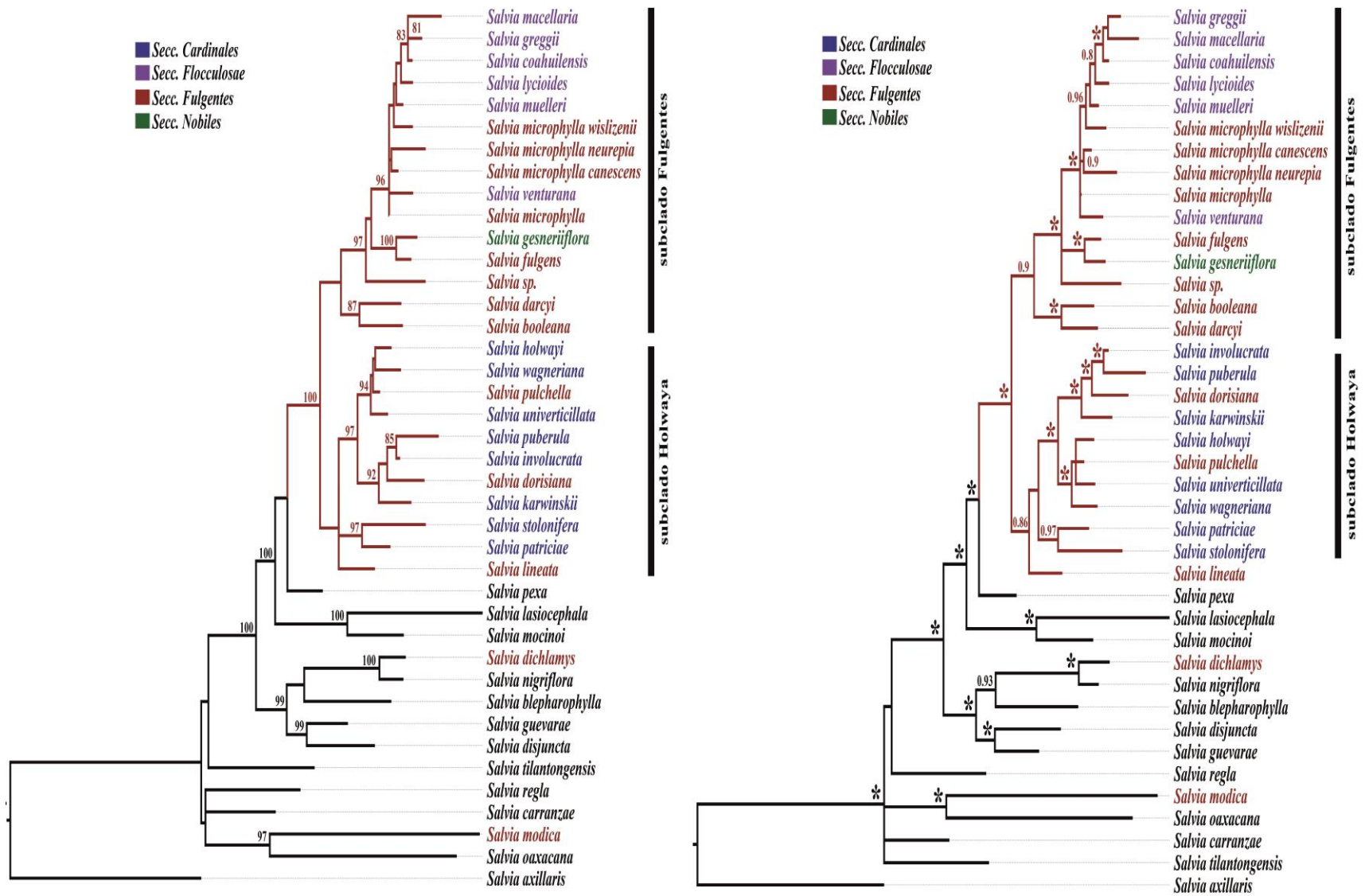
En el análisis de IB con los marcadores moleculares (fig. 5), se recuperó el clado *Fulgentes* como monofilético, con un valor de probabilidad posterior (PP)= 1, *Salvia pexa* como hermana del clado *Fulgentes* y una topología similar al análisis de ML. Sin embargo, a diferencia del análisis antes mencionado ambos subclados, *Fulgentes* y *Holwaya*, se recuperaron con un valor de soporte alto  $PP \geq .91$  y de manera general las relaciones al interior de ambos grupos se encuentran con un mayor grado de apoyo en comparación del análisis de ML.

### **3.2.2 Análisis de evidencia total**

La matriz concatenada con los datos moleculares y morfológicos para los 40 taxa, está compuesta por un total de 2899 caracteres, de los cuales 2881 corresponden a los marcadores moleculares antes mencionados y 18 a los caracteres morfológicos florales codificados.

En el caso del análisis de evidencia total con ML (fig. 6) se recuperó una topología y valores de soporte similares a lo encontrado únicamente con los datos moleculares. Sin embargo, se incrementó la resolución de las relaciones al interior de ambos subclados.

Finalmente en el análisis de evidencia total con IB (fig. 6) se recuperó una topología similar a la encontrada únicamente con los datos moleculares y al igual que en el caso del análisis de ML, al incluir los caracteres morfológicos se incrementó de manera considerable el valor de soporte de las relaciones al interior de los subclados.



**Figura 6.** Relaciones filogenéticas del clado Fulgentes basadas en los análisis de ML e IB con los datos moleculares y morfológicos combinados. En rojo se indica el clado Fulgentes. En el caso del análisis de ML únicamente se conservaron valores BS $\geq$ 85. Los asteriscos sobre las ramas indican los nodos con valores de PP=1.

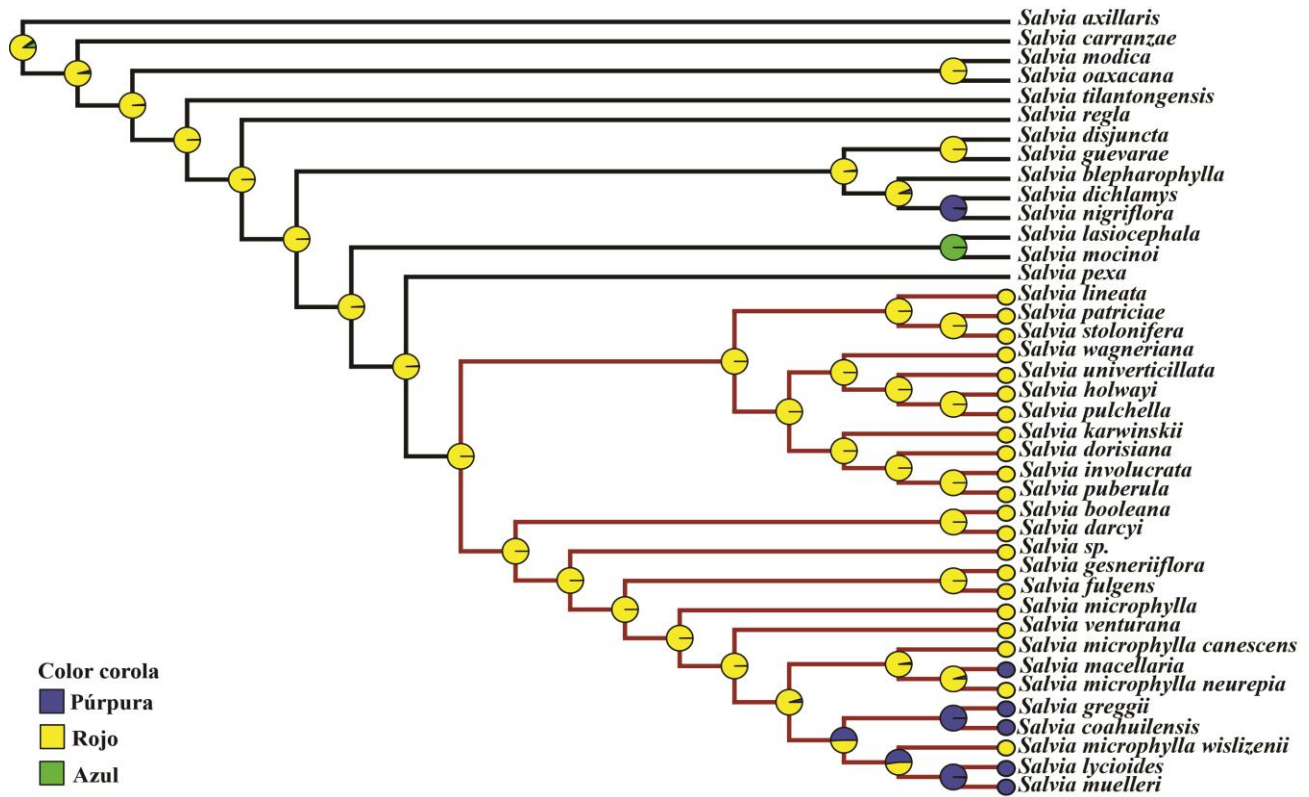
#### **4. Reconstrucción de caracteres morfológicos**

De acuerdo con el análisis de los caracteres morfológicos codificados (Anexo III), las flores pertenecientes al clado Fulgentes se distinguen por presentar un cáliz 7-nervado, con tricomas simples, además de tricomas glandulares pedicelados; en su mayoría con corola de color rojo (fig. 7), con tricomas simples, la boca del tubo de la corola constreñida, el labio inferior de la corola descendente y un par de glándulas al interior del tubo; estambres incluidos, con un diente en el veccario (fig. 8), unión del filamento con el conectivo móvil a manera de bisagra, filamento pubescente y la proyección de la glándula de la ginobase lingüiforme. En el caso de caracteres, como la forma del labio superior del cáliz, la presencia de tricomas glandulares peltados en el cáliz y corola, así como la invaginación del tubo, el análisis dio un resultado ambiguo para la reconstrucción de estos caracteres.

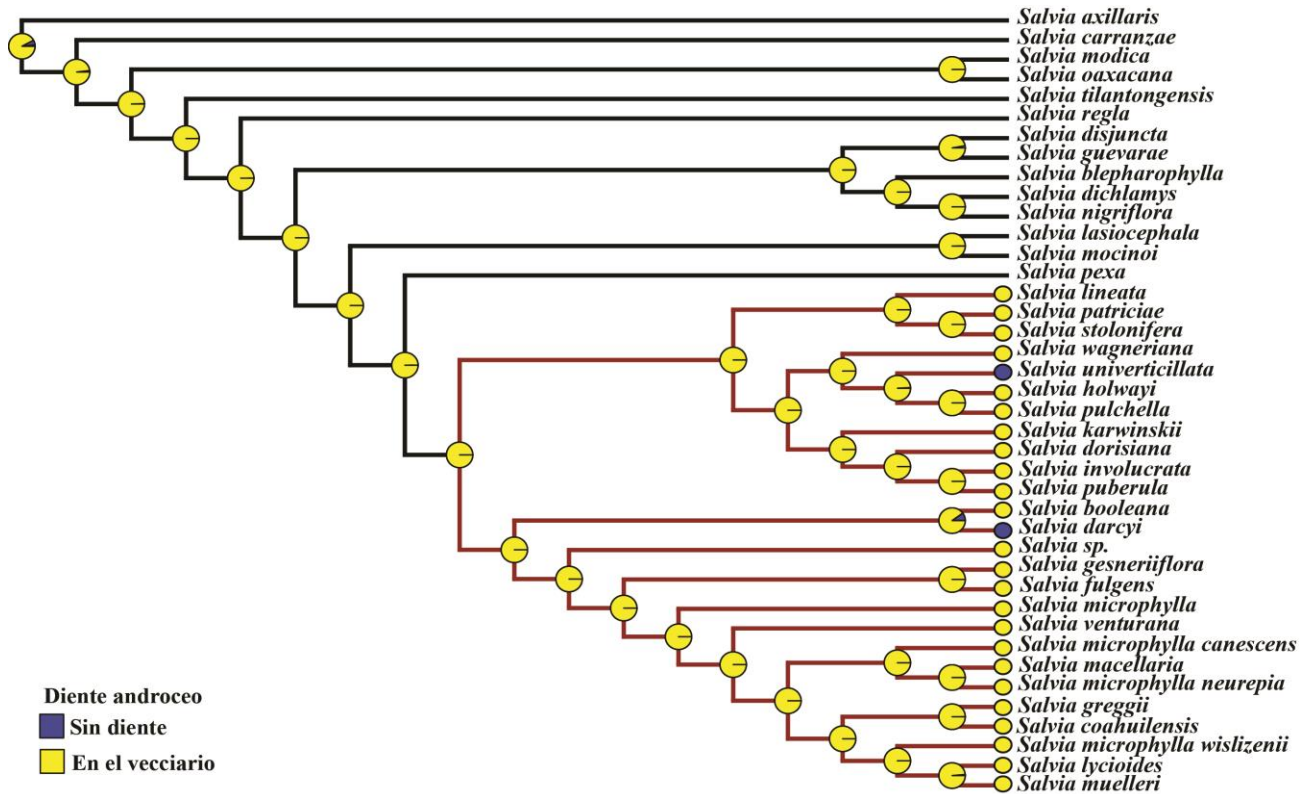
Otro aspecto importante, de acuerdo con los caracteres morfológicos analizados, en las especies que componen al clado Fulgentes, es que se pueden diferenciar tres morfotipos florales (fig. 9).

1. Morfotipo Holwaya: Se caracteriza por presentar el labio superior del cáliz acuminado, con la base del tubo de la corola invaginado y un par de glándulas corolinas, cilíndricas, en el interior del tubo, el labio inferior de la corola reflexo y flores con tonalidades rojizas.

2. Morfotipo Fulgentes: Se caracteriza por presentar el labio superior del cáliz agudo o apiculado, con la base del tubo de la corola sin invaginación en la base y un par de glándulas corolinas cónicas en el interior del tubo, el labio inferior de la corola descendente y flores con tonalidades rojizas.



**Figura 7.** Reconstrucción del carácter color de la corola, en el cual se puede apreciar como la mayoría de las especies del clado Fulgentes, presentan corolas de color rojo.



**Figura 8.** Reconstrucción del carácter del diente presente en el androceo, en el cual se puede apreciar como el clado Fulgentes, se caracteriza por presentar un diente en el veccario.



3. Morfotipo *Microphylla*: Se caracteriza por presentar el labio superior del cáliz apiculado, la base del tubo de la corola puede o no estar invaginado, al igual que las glándulas corolinas pueden o no estar presentes; sin embargo, si están presentes son conoidales a subcilíndricas, el labio inferior de la corola descendente y flores con tonalidades rojizas a púrpuras.



**Figura 9. Morfotipos florales del clado Fulgentes.** Arriba morfotipo Holwaya (*S. involucrata* cáliz y corola). Centro morfotipo Fulgentes (*S. fulgens* cáliz y corola). Abajo morfotipo Microphylla (*S. macellaria* cáliz y corola).

## V. **Discusión**

### 1. **Análisis de congruencia filogenética**

Al igual que en análisis anteriores realizados para el subgénero *Calosphace* (Jenks *et al.*, 2013, Fragoso-Martínez *et al.*, 2018) los marcadores moleculares empleados en los análisis filogenéticos de ML e IB para la sección *Fulgentes* tienen un nivel de congruencia aceptable y pueden ser combinados. Sin embargo, vale la pena mencionar que el valor más alto de incongruencia encontrado, de acuerdo con la prueba CADM, es entre los marcadores que pertenecen al núcleo y al cloroplasto.

Si bien no es rara la incongruencia filogenética, sobre todo entre ADN de cloroplasto y núcleo, en diferentes grupos de angiospermas, ésta puede llegar a ser absoluta entre los marcadores empleados (Zhu *et al.*, 2015, Vicentini, 2016). Por lo que la prueba de congruencia filogenética es importante para cualquier estudio en el género *Salvia*, sobre todo, al momento de probar nuevos marcadores nucleares, como en el caso del presente trabajo. Esto con la finalidad de saber si pueden ser combinados con otros marcadores, ya sean de origen mitocondrial o plastidial.

### 2. **Análisis de informatividad filogenética**

De acuerdo con el análisis de informatividad filogenética realizado para evaluar el marcador nuclear de copia única AT5G18580, se observó que este marcador presenta una utilidad filogenética mayor, en comparación con los marcadores de cloroplasto y similar a la del marcador ITS, aunque a un nivel filogenético distinto. Pues se observó que este marcador aportaba una mayor cantidad de información a nivel de clados y subclados. Esto coincide con diversas publicaciones, en las cuales se ha documentado que el uso de marcadores nucleares de copia única, incrementa la resolución de las relaciones filogenéticas a distintos niveles taxonómicos (Granados-Mendoza *et al.* 2015, Wanke *et al.* 2017). Lo cual, también se observó para el clado *Fulgentes* ya que las relaciones al interior del grupo se recuperaron con un mayor grado de resolución a diferencia del análisis realizado únicamente con los marcadores convencionales ITS, *trnL-trnF* y *psbA-trnH*.

Otro aspecto importante en cuanto al uso del marcador AT5G18580 es que debido a su longitud y cantidad de información adicional que aporta, permite incluir en los análisis a las especies en las que faltaban uno o dos de los cuatro marcadores utilizados. Sin que por esta razón, disminuyera la precisión en cuanto a la asignación de taxones a nivel de clados y subclados.

### **3. Relaciones filogenéticas del clado Fulgentes**

Al igual que en los análisis filogenéticos realizados anteriormente para *Calsophace*, en los cuales se incluye al clado Fulgentes (Jenks *et al.*, 2013, Fragoso-Martínez *et al.*, 2018, González-Gallegos *et al.*, 2018). En los análisis de ML e IB realizados en el presente trabajo el grupo se recupera como monofilético, con un valor de soporte alto ( $BS \geq 100/PP = 1$ ). Incluyendo especies pertenecientes a las secciones *Fulgentes*, *Cardinales*, *Flocculosae* y *Nobiles* sensu Epling (1939), lo cual coincide con lo reportado por los autores antes mencionados.

Respecto a la topología interna del clado Fulgentes, los resultados obtenidos en los análisis de ML e IB son similares a lo reportado por Fragoso-Martínez *et al.* (2018), ya que al interior del grupo se recuperaron los subclados Holwaya y Fulgentes, ambos bien soportados en el análisis de IB ( $PP \geq .91$ ). Con relación a las secciones que componen cada uno de los subclados, en Fulgentes se encuentran especies correspondientes a las secciones *Flocculosae*, *Nobiles* y *Fulgentes*; mientras que el subclado Holwaya se encuentra compuesto por especies pertenecientes a las secciones *Cardinales* y *Fulgentes*.

En cuanto a las relaciones al interior del clado, éstas cambian considerablemente respecto a estudios anteriores, debido esencialmente a dos factores. El primero al incremento en el muestreo en cuanto al número de taxones se refiere, ya que en el presente trabajo se incrementó alrededor del 90% respecto a estudios previos en los que se incluye el clado Fulgentes (Jenks *et al.*, 2013, Fragoso-Martínez *et al.*, 2018, González-Gallegos *et al.*, 2018), vale la pena mencionar que dichos estudios se realizaron a nivel del subgénero *Calosphace*. El segundo factor que incidió en las relaciones recuperadas, respecto a trabajos anteriores, está relacionado con la

identificación de algunas especies, ya que al realizar el trabajo de gabinete y morfológico, se observó que especies como *S. involucrata*, *S. lineata* y *S. stolonifera* Benth. se encontraban identificadas de manera errónea y algunos de estos ejemplares habían sido muestreados para análisis filogenéticos en estos trabajos.

En comparación con trabajos anteriores, las relaciones similares que se recuperan en el presente trabajo son las existentes entre *S. holwayi* S.F. Blake, *S. pulchella*, *S. univerticillata* Ramamoorthy ex Klitg. y *S. wagneriana* Pol. (PP=1), además de la relación entre *S. fulgens* y *S. gesneriiflora* Lindl. & Paxton (PP=1), lo cual se explica debido a que estas especies son similares en morfología y hábitat.

A continuación se describen detalladamente los subclados Fulgentes y Holwaya, con base en el árbol obtenido del análisis de IB con la matriz combinada de los datos moleculares y morfológicos (fig. 6), debido a que se trata de la hipótesis filogenética más robusta.

**a) Subclado Fulgentes (PP= 0.9):** Este subclado está conformado por 12 especies y tres variedades, en él se incluyen tres subclados:

1. *S. booleana* B.L. Turner + *S. darcyi* J. Compton (PP= 0.99), en el caso de la relación entre estas especies, además de estar soportadas por los datos moleculares, también se encontraron similitudes morfológicas entre ellas: la forma del labio superior del cáliz, la ausencia de tricomas glandulares peltados en la corola y la base del tubo de la corola invaginada. Por otro lado, ambas especies se encuentran en zonas geográficamente cercanas, ya que *S. booleana* y *S. darcyi* son endémicas de los estados de San Luis Potosí y Nuevo León respectivamente (Turner, 1995; Martínez-Gordillo *et al.*, 2018).

2. *S. fulgens* + *S. gesneriiflora* (PP= 1), ambas especies son similares morfológicamente y su delimitación prácticamente se ha basado en el tamaño de las brácteas y la presencia o ausencia de glándulas al interior de la corola (González-Gallegos y Aguilar-Santelises, 2014). Estas especies se han incluido en trabajos anteriores en los cuales, tanto la identidad de cada una de ellas, así como su estrecha

relación filogenética se han mantenido (Jenks *et al.*, 2013, Fragoso-Martínez *et al.*, 2018, González-Gallegos *et al.*, 2018). Por otra parte y de acuerdo al análisis morfológico realizado, otros caracteres útiles para diferenciarlas son la nervación del cáliz, forma del labio superior y pubescencia del cáliz, así como la forma de la proyección de la glándula de la ginobase.

3. *S. microphylla* Kunth + Secc. *Flocculosae* (PP= 1), éste es el complejo con mayor número de taxones al interior del clado Fulgentes, así como el que presenta un menor grado de resolución, a pesar del uso en conjunto de datos moleculares y morfológicos. Dentro de los caracteres morfológicos analizados, uno de los que distingue a este complejo de especies es el labio superior del cáliz apiculado. Si bien, en el presente trabajo no se emplearon caracteres continuos en los análisis realizados, otro carácter útil para distinguir este conjunto de especies es el tamaño de la corola, el cual va de ca. 1.5–3 cm (Epling, 1939; Turner, 2013), siendo flores de menor tamaño, en comparación al resto de las especies del clado Fulgentes.

Otro aspecto interesante es que en este complejo se encuentran las especies con corolas de coloraciones púrpuras, glándulas de la corola ausentes y la mitad de las especies presentan la base del tubo de la corola sin invaginaciones. En el caso de estos dos últimos caracteres, éstos podrían indicar una transición de una polinización especialista a una generalista, coincidiendo con lo encontrado por Fragoso-Martínez *et al.* (2018). Por otra parte, en diversos grupos de plantas se ha observado que los cambios en la morfología del tubo de la corola y estructuras de retención de néctar regularmente se ajustan a la morfología de los cuerpos de los polinizadores (Wozniak y Sicard, 2018).

Finalmente, otro aspecto importante para este complejo es la polifilia de *S. microphylla* y sus variedades. Pues a diferencia de la relación bien sustentada entre las variedades *S. microphylla* var. *canescens* A. Gray y *S. microphylla* var. *neurepia* (Fernald) Epling (PP= 0.91), la variedad *S. microphylla* var. *wislizenii* A. Gray no se anida en este grupo y se encuentra como el linaje hermano de la sección *Flocculosae*, mostrando que se trata de una especie distinta al resto de las variedades. Esto se respalda con evidencia morfológica, ya que al igual que entre *S. fulgens* y *S.*

*gesneriiflora*, una de las características que diferencia a la variedad *S. microphylla* var. *wislizenii*, al menos en cuanto a los caracteres morfológicos analizados en el presente trabajo, es la ausencia de papilas al interior de la corola y el labio superior del cáliz acuminado.

**b) Subclado Holwaya (PP= 0.86):** Este subclado se encuentra conformado por 11 especies, en él se anidan dos grupos:

1. *S. pulchella* + *S. dorisiana* + Secc. *Cardinales* (PP= 1), este complejo de especies, además de encontrarse soportado por los datos moleculares, también presenta congruencia morfológica, ya que las especies que lo componen se caracterizan por presentar corolas con el tubo ventricoso e invaginado, salvo *S. karwinskii*, labio inferior deflexo a reflexo y presencia de papilas al interior del tubo de la corola.

2. *S. stolonifera* + *S. patriciae* J.G. González & Martínez-Ambriz (PP= 0.97), ambas especies son similares morfológicamente, sobre todo en los caracteres vegetativos (González-Gallegos *et al.*, 2018). Sin embargo, existen varios caracteres morfológicos florales que las distinguen, siendo el principal de ellos los estambres exsertos en *S. patriciae*. Esta es la única especie que lo presenta para el clado *Fulgentes*, sugiriendo que la transición de los estambres de exsertos a insertos es más frecuente y común de lo que se piensa. Razón por lo que sería interesante analizar la evolución de este carácter a lo largo de la filogenia del subgénero *Calosphace*.

#### 4. Optimización de caracteres

De acuerdo con el análisis de caracteres realizado, la morfología que distingue al clado *Fulgentes* coincide en algunos aspectos con las delimitaciones para las secciones *Cardinales*, *Fulgentes* y *Holwaya* realizadas en trabajos taxonómicos previos (Epling 1939, Ramamoorthy 1984), como el cáliz 5 o 7 nervado, corola con tonalidades rojizas y estambres incluidos. Sin embargo, caracteres poco explorados como la pubescencia en el cáliz y corola, presencia de diente en el veccario, unión del filamento con el conectivo, pubescencia del filamento y forma de la proyección de la glándula de la ginobase, demostraron ser caracteres útiles no sólo para delimitar al clado

morfológicamente, si no también incrementaron la resolución de las relaciones filogenéticas, al ser incluidos en los análisis, a pesar de ser pocos caracteres morfológicos en comparación con los caracteres moleculares.

En cuanto a caracteres como la presencia de tricomas glandulares peltados en el cáliz y la corola, la invaginación de la base del tubo de la corola y la presencia de glándulas al interior de ésta, se observó que son caracteres que se han perdido y ganado a lo largo de la historia evolutiva del clado Fulgentes, por lo que no mostraron utilidad en la delimitación del clado de manera general al presentar un estado ancestral de carácter ambiguo.

Por otra parte, en el caso de la invaginación de la base del tubo de la corola y la presencia de papilas en el interior de la corola, se observó que todas las especies pertenecientes al subclado Holwaya presentaban estos estados de carácter (figs. 10 y 11), mientras que en especies que corresponden al subclado Fulgentes, la base del tubo no se encontraba invaginada y en ocasiones las glándulas estaban ausentes, en especial aquellas incluidas en el complejo de *S. microphylla*. Formado por: *S. coahuilensis* Fernald, *S. greggii* A. Gray, *S. lycioides* A. Gray, *S. macellaria* Epling, *S. microphylla* var. *microphylla*, *S. microphylla* var. *canescens*, *S. microphylla* var. *neurepia*, *S. microphylla* var. *wislizenii*, *S. muelleri* Epling y *S. venturana* B.L. Turner.

De manera general, tanto la presencia de papilas como las invaginaciones de la corola, han sido relacionadas a la polinización ornitófila, pues se consideran parte de las estructuras que hacen posible la retención de néctar (Wester y Claßen-Bockhoff, 2011). La ausencia de este tipo de estructuras en el complejo de *S. microphylla* + secc. *Flocculosae*, podría indicar una posible transición de una polinización ornitófila a una melitófila.

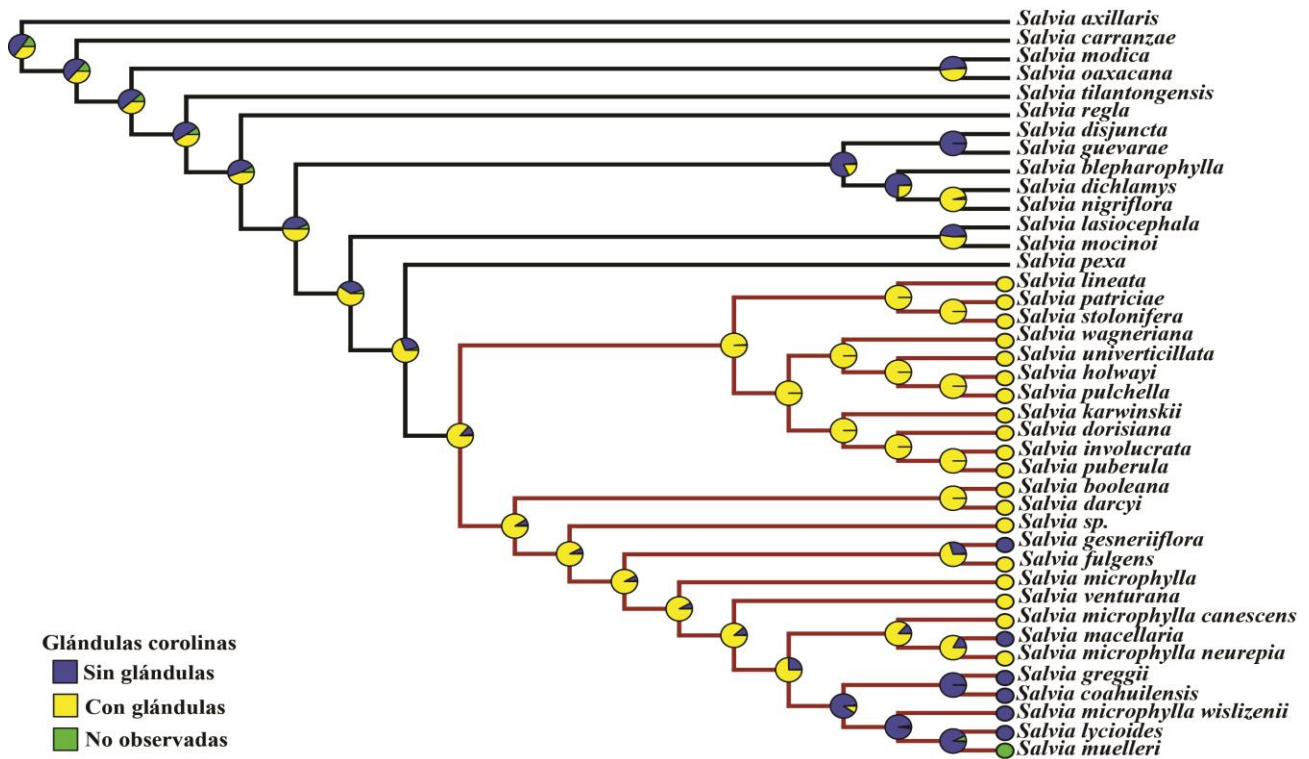
Otro factor que podría incidir en la ausencia de las glándulas e invaginaciones, podría estar relacionado con el tamaño de la corola, ya que las especies que pertenecen al subclado Holwaya presentan flores y glándulas tubulares desarrolladas y de mayor tamaño. Por lo que aparentemente la reducción del tamaño de la corola podría estar



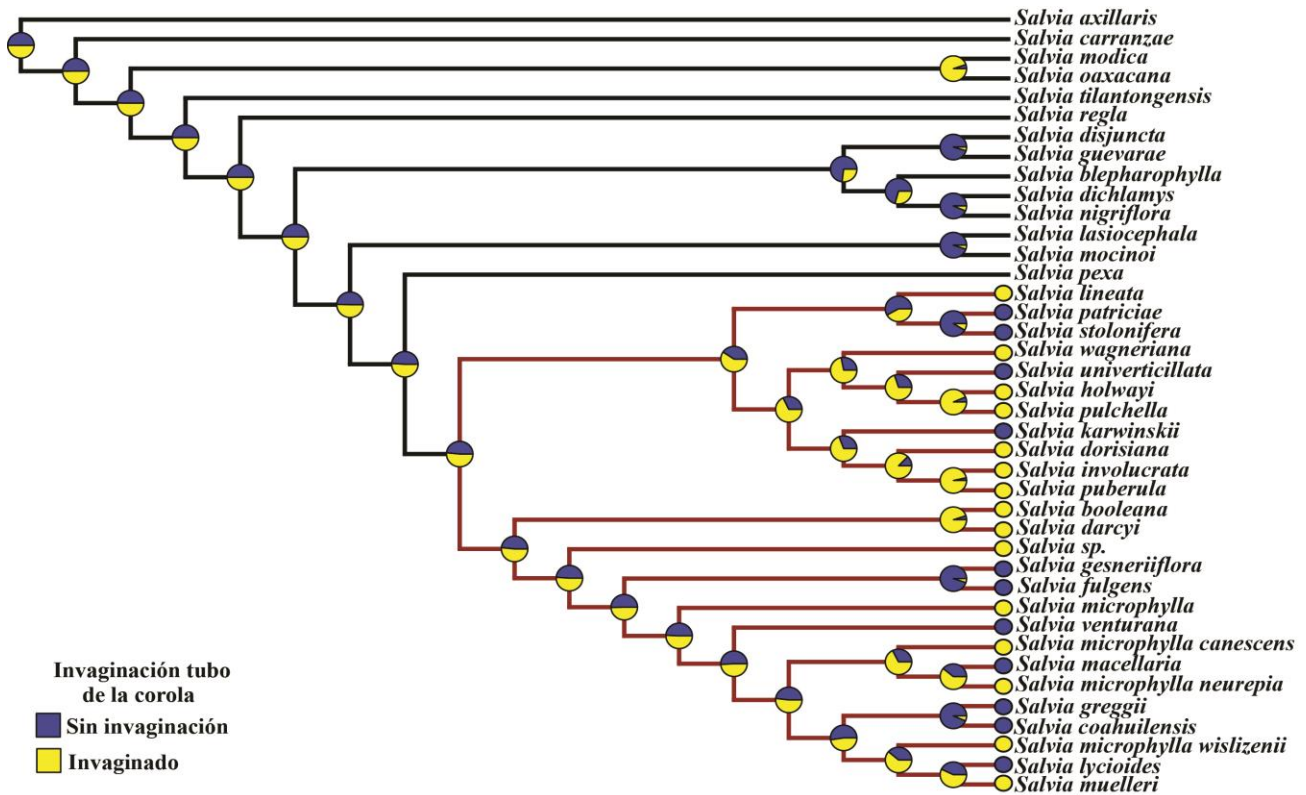
relacionada con la ausencia de estas estructuras de retención. Sin embargo, se requeriría hacer análisis adicionales para observar si existe dicha correlación.

De manera general, la mayoría de las especies del clado Fulgentes han sido relacionadas con una polinización de tipo ornitófila, debido esencialmente a las tonalidades rojas de las flores, posición y estabilidad del labio inferior de la corola, además de la presencia de dientes y estructuras de retención de néctar en el androceo y corola (Wester y Claßen-Bockhoff, 2011; Jenks *et al.*, 2013;). Sin embargo, de acuerdo con la variación floral descrita en el presente trabajo, si bien a las especies del morfotipo Holwaya se pueden asignar a una polinización de tipo ornitófila, ya que cumplen con las características antes mencionadas.

Las especies de los morfotipos Fulgentes y Microphylla presentan características ambiguas, por las cuales podrían asignarse a otros síndromes de polinización, esencialmente melitófilos o psicófilos, debido a la disminución o pérdida en cuanto a las estructuras de retención de néctar, en el caso de *S. gesneriiflora* y las especies pertenecientes a la sección *Flocculosae* o la presencia de guías de néctar en el caso de *S. greggii*, *S. lycioides* y *S. macellaria*. Además de estructuras como el labio inferior de la corola extendido, estambres incluidos en el labio superior de la corola y palanca estaminal funcional, caracteres que reflejan la reversión de la ornitofilia a la melitofilia en el subclado Fulgentes de acuerdo a Fragoso-Martínez *et al.* (2018). Por lo que es necesaria una reevaluación y análisis cuidadoso, relacionado a la polinización del clado Fulgentes.



**Fig. 10.** Reconstrucción del carácter de las glándulas en la corola, en el cual se puede apreciar como este carácter se ha perdido y ganado a lo largo de la evolución del clado Fulgentes.



**Fig. 11.** Reconstrucción del carácter invaginación del tubo de la corola, en el cual se puede apreciar como este carácter se ha perdido y ganado a lo largo de la evolución del clado Fulgentes.

## 5. Implicaciones taxonómicas

De manera general, tanto la clasificación como la subdivisión encontrada para el clado Fulgentes, coincide con lo reportado anteriormente por Fragoso-Martínez *et al.* (2018). El clado Fulgentes es un grupo monofilético, compuesto por dos subclados, Fulgentes y Holwaya. Sin embargo, cabe resaltar que hasta el momento no se han realizado trabajos basados en la clasificación derivada del contexto filogenético, salvo el realizado por Barrera-Aveleida (2017) en el cual se analiza la morfología del androceo.

Lo anterior es relevante, ya que hasta la fecha se ha optado por continuar con la clasificación taxonómica derivada del trabajo morfológico realizado por Epling (1939), el cual continúa siendo la revisión más completa, exhaustiva y útil para el subgénero *Calosphace*. Sin embargo, ha demostrado tener limitaciones debido a la descripción constante de nuevas especies, las cuales, en ocasiones, no pueden asignarse a una sección (González-Gallegos *et al.*, 2018), así como la parafilia o polifilia de algunas secciones (Jenks *et al.*, 2013; Fragoso-Martínez *et al.*, 2018), como es el caso de las que componen el clado Fulgentes. Por lo que debe realizarse un esfuerzo para cambiar hacia una clasificación basada en clados como unidades, pues ésta además de ser natural, refleja la evolución del grupo.

Uno de los aportes a la clasificación consistió en que las especies recientemente descritas, *S. carranzae*, *S. guevarae* y *S. tilantongensis*, al igual que *S. dichlamys* y *S. modica*. Las cuales habían sido colocadas al interior de la sección *Fulgentes* por Epling (1939) no forman parte del clado Fulgentes. A pesar de presentar similitudes morfológicas, razón por la cual habían sido incluidas en alguna de las secciones que conforman al clado.

Otra consideración importante es la propuesta de sinonimizar *S. puberula* bajo el nombre de *S. involucrata* (Bedolla y Zamudio, 2018). Sin embargo, el presente estudio muestra que ambas especies presentan diferencias a nivel de los marcadores moleculares empleados, así como de características morfológicas. Por ejemplo, la proyección de la glándula de la ginobase conoidal en *S. puberula*, mientras que en *S.*

*involucrata* es linguiforme, por lo que ambos taxones deberían de conservar su estatus de especie.

Respecto a las variedades de *S. microphylla*, como se mencionó anteriormente en los diferentes análisis realizados con ML e IB, puede apreciarse como *S. microphylla* var. *wislizenii* es un taxón diferente al resto de las variedades, por lo que debería ser considerada como una especie distinta. Pues además de la diferencia en los marcadores moleculares empleados, presenta características morfológicas distintivas al resto de las variedades, sobre todo a nivel vegetativo y en la inflorescencia.

Finalmente, es importante mencionar que gracias a las exploraciones botánicas realizadas durante el presente trabajo, se identificaron dos especies nuevas para el clado Fulgentes: *S. patriciae*, endémica del estado de Oaxaca (Anexo IV), además de una especie endémica del estado de Puebla.

## VI. Conclusiones

- La sección *Fulgentes* es un grupo polifilético, ya que en el contexto filogenético encontrado en el presente trabajo, las especies que componen a la sección pertenecen a linajes distintos distribuidos en la filogenia del subgénero *Calosphace*.
- En cuanto al clado *Fulgentes* se trata de un grupo monofilético, el cual se encuentra conformado por dos subclados, *Fulgentes* y *Holwaya*, al interior de los cuales las relaciones entre las especies se recuperaron con mayor resolución respecto a análisis anteriores.
- El marcador molecular de copia única AT5G18580 demostró ser útil para incrementar la resolución de las relaciones filogenéticas del clado *Fulgentes*, en comparación con los marcadores convencionales utilizados anteriormente.
- La combinación de caracteres moleculares y morfológicos incrementó la resolución de las relaciones para el clado *Fulgentes*, a pesar de que la cantidad de caracteres morfológicos es menor, en comparación con los moleculares.
- El clado *Fulgentes* está compuesto por 26 taxones, de los cuales 23 presentan el rango taxonómico de especie y tres el de variedad.
- El incremento del muestreo en un 90%, así como al uso de análisis de evidencia total, en combinación, ayudaron a mejorar la resolución para el grupo de estudio con respecto a análisis anteriores.
- El complejo conformado por las especies correspondientes a la secc. *Flocculossae* + *S. microphylla* y sus variedades no logró un buen nivel de resolución a pesar del uso de los datos moleculares y morfológicos combinados en los análisis. Por lo que deben incrementarse las fuentes de datos moleculares y morfológicos.
- Caracteres morfológicos como la invaginación de la corola, presencia de papilas corolinas y presencia de tricomas glandulares en la corola, se han perdido y ganado a lo largo de la historia evolutiva del clado *Fulgentes*.

## VII. Literatura citada

- Atkinson S., Kirik A., Kirik V. (2014). Microtubule array orientation in response to hormones does not involve changes in microtubule nucleation modes at the periclinal cell surface. *Journal of Experimental Botany* 65(20): 5867–5875.
- Baran P., Ozdemir C., Aktas K. (2010). Structural investigation of the glandular trichomes of *Salvia argentea*. *Biologia* 65(1): 33–38.
- Barrera G.B. (2017). Morfología del androceo de *Salvia* subgénero *Calosphace* (Lamiaceae) con relación a su filogenia. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bedolla B.Y., Zamudio S. (2015). Four new species of *Salvia* (Lamiaceae) from central Mexico. *Phytotaxa* 217(1): 35–52.
- Bedolla-García B.Y., Zamudio S. (2018). Nueva especie de *Salvia* (Lamiaceae) del centro de México. *Phytoneuron* 2017–66: 1–12.
- Bentham G. (1876). Labiatae. En: G. Bentham y J.D. Hooker (eds.). *Genera Plantarum Vol. 2* Reeve and Co., Reino Unido, Londres pp 1160–1196.
- Campbell V., Legendre P., Lapointe F.J. (2011). The performance of the Congruence Among Distance Matrices (CADM) test in phylogenetic analysis. *BMC Evolutionary Biology* 11: 1–15.
- Claßen-Bockhoff R., Wester P., Tweraser E. (2003). The staminal lever mechanism in *Salvia* L. (Lamiaceae) a review. *Plant Biology* 5(1): 33–41.
- Claßen-Bockhoff R., Speck T., Tweraser E., Wester P., Thimm S., Reith M. (2004a). The staminal lever mechanism in *Salvia* L. (Lamiaceae): a key innovation for adaptive radiation? *Organisms, Diversity & Evolution* 4(3): 189–205.

- Claßen-Bockhoff R., Crone M., Baikova E. (2004b). Stamen Development in *Salvia* L.: Homology Reinvestigated. *International Journal of Plant Sciences* 165(4): 475–498.
- Costa V.B.S., Pimentel R.M.M., Chagas M.G.S, Alves G.D., Castro C.C. (2017). Petal micromorphology and its relationship to pollination. *Plant Biology* 19(2): 115–122.
- Doyle J., Doyle J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.
- Drew T.B., González-Gallegos J.G., Xiang C.L., Kriebel R., Drummond C.P., Walker J.B., Sytsma K.J. (2017). *Salvia* united: The greatest good for the greatest number. *Taxon* 66(1): 133–145.
- Eiji S., Salmaki Y. (2016). Evolution of trichomes and its systematic significance in *Salvia* (Menthae; Nepetoideae; Lamiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 180(2): 241–257.
- El-Gazzar A., Watson L. (1970). A taxonomic study of Labiatae and related genera. *New Phytologist* 2(69): 451–486.
- Epling C. (1939). A revision of *Salvia* subgenus *Calosphace*. En: Beihefte Feddes Repertorium Specierum novarum regni vegetabilis 380 pp.
- Epling C. (1940). Supplementary notes on American Labiatae. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 67(6): 509–534.
- Epling C. (1941). Supplementary notes on American Labiatae. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 68(8): 552–568.
- Epling C. (1947). Supplementary notes on American Labiatae. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 74(6): 512–518.

- Epling C. (1951). Supplementary notes on American Labiatae. *Brittonia* 7(3): 129–142.
- Fernández J.L. (2006). Revisión taxonómica de *Salvia* sect. *Siphonantha* (Labiatae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 63(2): 145–157.
- Fragoso-Martínez I., Martínez-Gordillo M. (2013). Una nueva especie del género *Salvia* sección *Membranaceae* de Guerrero, México. *Acta Botánica Mexicana* 103: 1–9.
- Fragoso-Martínez I. (2014). Análisis filogenético del complejo *Salvia lavanduloides* Kunth (Lamiaceae). Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Fragoso-Martínez I, Martínez M., Salazar G.A., Sazatornil F., Jenks A.A., García M.R., Barrera G., Benítez S., Magallón S., Cornejo G., Granados C. (2018). Phylogeny of the Neotropical sages (*Salvia* subg. *Calosphace*; Lamiaceae) and insights into pollinator and area shifts. *Plant Systematics and Evolution* 304(1): 43–55.
- González-Gallegos J.G., Aguilar-Santelises R. (2014). *Salvia tilantongensis* (Lamiaceae), una especie nueva de la mixteca alta de Oaxaca, México. *Acta Botánica Mexicana* 109: 1–22.
- González-Gallegos J.G., Fragoso-Martínez I., González-Adame G., Martínez-Ambríz E., López-Enríquez I.L. (2018). *Salvia ozolotepecensis*, *S. patriciae* and *S. sirenis* (Lamiaceae), three new species from Miahuatlán district, Oaxaca, Mexico. *Phytotaxa* 362 (2): 143–159.
- Granados C., Naumann J., Samain M.S., Goetghebeur P., de Smet Y., Wanke S. (2015). A genome-scale mining strategy for recovering novel rapidly-evolving nuclear single-copy genes for addressing shallow-scale phylogenetics in *Hydrangea*. *BMC Evolutionary Biology* 15: 132.
- Hallahan D.L. (2000). Monoterpenoid biosynthesis in glandular trichomes of Labiatae plants. *Advances in Botanical Research* 31: 77–120.



- Harley R.M., Atkins S., Budansteve A.L., Cantino P.D., Conn B.J., Grayer R., Harley M.M., de Kok R., Krestovskaja T., Morales R., Paton A.J., Ryding O., Upson T. (2004). Labiatae. In: Kubitzki K, Kadereit JW (eds) *The Families and Genera of Vascular Plants 7: Lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae)*. Springer, Berlin, pp 167–275.
- Jenks A.A., Walker J.B., Kim SC. (2013). Phylogeny of New World *Salvia* subgenus *Calosphace* (Lamiaceae) based on cpDNA (psbAtrnH) and nrDNA (ITS) sequence data. *Journal of Plant Research* 126:483–496.
- Katoh K., Standley D.M. (2013). MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30(4): 772–780.
- Kress W.J., Erickson D.L. (2007). A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE* 2(6): e508.
- Krstic L., Malencic D., Anackov G. (2006). Structural investigations of trichomes and essential oil composition of *Salvia verticillata*. *Botanica Helvetica* 116(2): 159–168.
- Lanfear R., Frandsen P.B., Wright A.M., Senfeld T., Calcott B. (2016). Partitioned Models of Evolution for Molecular and Morphological Phylogenetic Analyses. *Molecular Biology and Evolution* 34(1): 772–773.
- López-Giraldez F., Townsend J.P. (2010). PhyDesign: a webapp for profiling phylogenetic informativeness. Disponible en línea: <http://phydesign.townsend.yale.edu/> (Consultado: Abril, 2018).
- Madden T.L., Tatusov R.L., Zhang J. (1996). Applications of network BLAST server. *Methods in Enzymology* 266: 131–141.
- Martínez M., Bedolla B., Cornejo G., Fragoso I., García M.R., González J.G., Lara S.I., Zamudio S. (2018). Lamiaceae de México. *Botanical Sciences* 95(4): 780–806.

- Muller K., Quandt D., Muller J., Neinhuis C. (2010). PhyDE<sup>®</sup> Phylogenetic data editor version 0.9997. Disponible en: <http://www.phyde.de/download.html> (Consultado: Febrero, 2018).
- Pagel M. (1994). Detecting correlated evolution on phylogenies: a general method for the comparative analysis of discrete characters. *Proceedings of the Royal Society B* 255: 37–45.
- Paradis E. (2012). Analysis of phylogenetics and evolution with R, segunda edición. Springer, USA, New York, 385 pp.
- Ramamoorthy T.P. (1984). Typifications in *Salvia* (Lamiaceae). *Taxon* 33:322–324.
- Ramamoorthy T.P., Elliot E. (1998). Lamiaceae de México: diversidad distribución endemismo y evolución. En: Ramamoorthy, Bye, Lot y Fa (eds.). *Diversidad biológica de México: orígenes y su distribución* Instituto de Biología, UNAM, México, D.F. pp 129–145.
- Rambaut A. (2016). FigTree, Version 1.4.3 disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. último acceso: mayo de 2018.
- Rambaut A., Drummond A.J., Xie D., Baele G., Suchard M.A. (2018). Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology* 67(5): 901–904.
- Revell L.J. (2012). Phytools: An R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution* 3: 217–223.
- Ronquist F., Teslenko M., Van der Mark P., Ayres D.L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M.A., Huelsenbeck J.P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61(3): 539–542.
- Salazar G.A., Chase M.W., Soto-Arenas M.A., Ingrouille M. (2003). Phylogenetics of Cranichidae with emphasis on Spiranthinae (Orchidaceae, Orchidoideae):

- evidence from plastid and nuclear DNA sequences. *American Journal of Botany* 90: 777–795.
- Schliep K., Potts A.J., Morrison D.A., Grimm G.W. (2017). Intertwining phylogenetic trees and networks. *Methods in Ecology and Evolution* 8: 1212–1220.
  - Soltis D.E., Soltis P.S. (1998). Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. En: Soltis D.E., Soltis P.S., Doyle J.J. (eds.). *Molecular systematics of plants II: DNA Sequencing*. Kluwer Academic Press, USA, pp 1–42.
  - Stamatakis A. (2014). RAxML versión 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30(9): 1312-1313.
  - Townsend, J.P. (2007). Profiling phylogenetic informativeness. *Systematic Biology* 56: 222– 231.
  - Turner B.L. (2013). Taxonomic overview of the mexican species of *Salvia* sect. *Flocculosae* (Lamiaceae). *Phytoneuron* 36: 1–11.
  - Turner B.L. (1995). *Salvia booleana* (Lamiaceae), a new species from northeastern Mexico. *Phytologia* 79(4): 289–292.
  - Vicentini A. (2016). The evolutionary history of *Pagamea* (Rubiaceae), a white-sand specialist lineage in tropical South America. *Biotropica* 48(1): 58–69.
  - Trifinopoulos J., Nguyen L.T., von Haeseler A., Minh B.Q. (2016). W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research* 44 (W1): W232–W235.
  - Walker J.B., Sytsma K.J., Treutlein J., Wink M. (2004). *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe *Mentheae*. *American Journal of Botany* 91(7): 1115–1125.

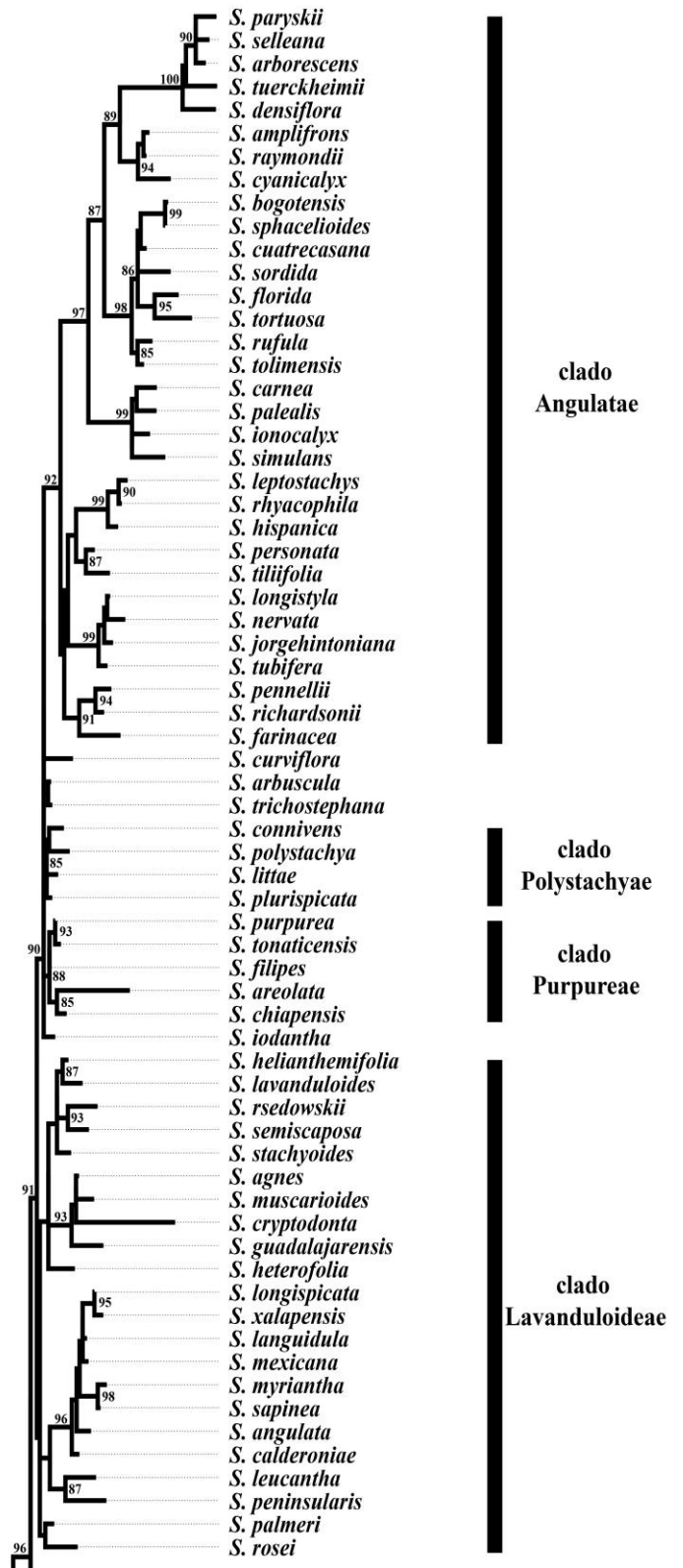
- Walker J.B., Sytsma K.J. (2007). Staminal evolution in the genus *Salvia* (Lamiaceae): molecular phylogenetic evidence for multiple origins of the staminal lever. *Annals of Botany (Oxford)* 100(2): 375–391.
- Wanke S., Granados C., Muller S., Paizanni A., Neinhuis C., Lemmon A.R., Lemmon E.M., Samain M.S. (2017). Recalcitrant deep and shallow nodes in *Aristolochia* (Aristolochiaceae) illuminated using anchored hybrid enrichment. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 117: 111–123.
- Wester P., Claßen-Bockhoff R. (2011). Pollination syndromes of New World *Salvia* species with special reference to bird pollination. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 98(1):101-155.
- Wozniak N.J., Sicard A. (2018). Evolvability of flower geometry: Convergence in pollinator-driven morphological evolution of flowers. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 79: 3–15.
- Zhu Z.M., Gao X.F., Fougère-Danezan M. (2015). Phylogeny of *Rosa* sections *Chinensis* and *Synstylae* (Rosaceae) based on chloroplast and nuclear markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 87: 50–64.

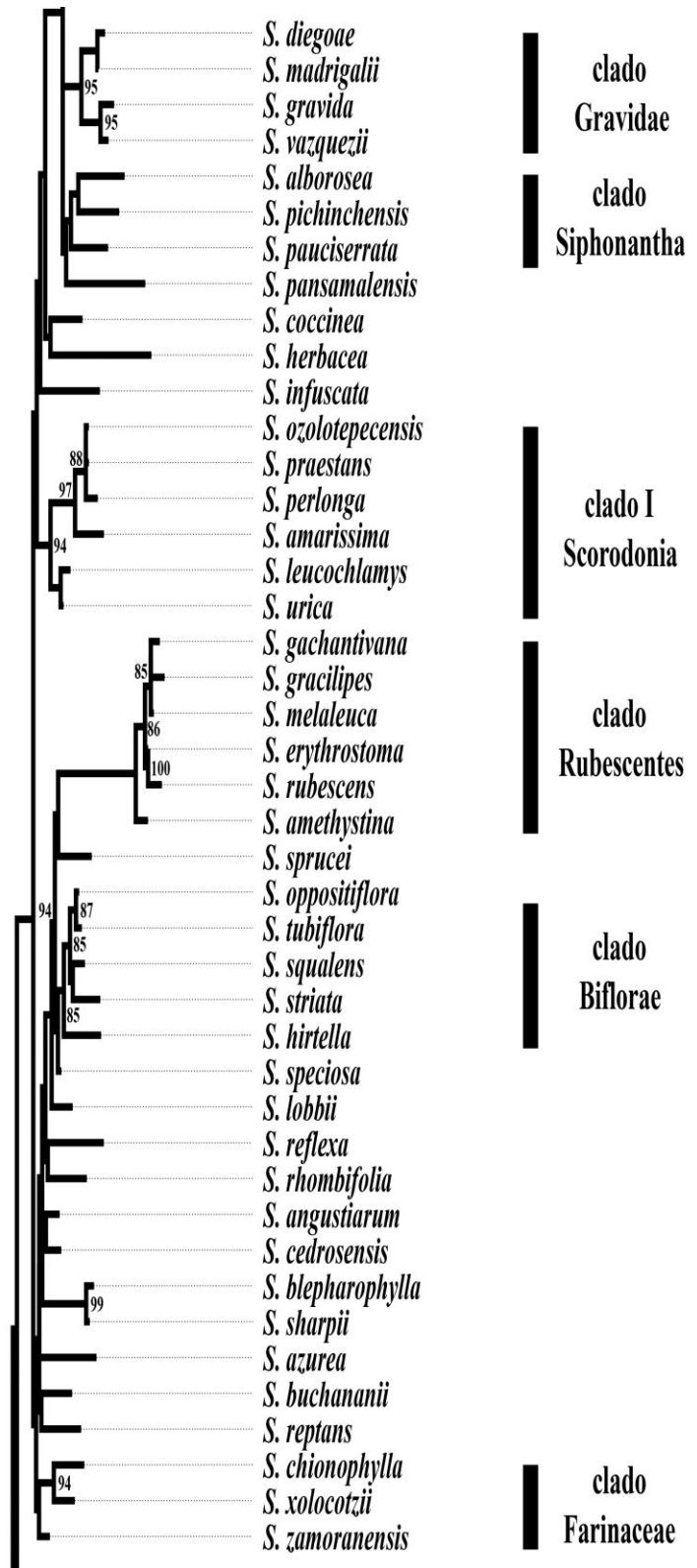
**Anexo I.** Taxa incluidos en el análisis de datos moleculares y ejemplares de respaldo.

<b>Taxón</b>	<b>Ejemplar voucher</b>
<i>Salvia axillaris</i> Moc. & Sessé ex Benth.	C. Martorell & A. Martínez s.n. (MEXU)
<i>S. blepharophylla</i> Brandegees	S. Zamudio 13158 (MEXU)
<i>S. booleana</i> B.L. Turner	Palzkill y Gass s/n (TEX)
<i>S. carranzae</i> Zamudio & Bedolla	S. Zamudio <i>et al.</i> 11189 (IEB)
<i>S. coahuilensis</i> Fernald	Hinton 24383 (MEXU)
<i>S. darcyi</i> J. Compton	Jardín Botánico de la Universidad de Cambridge 20120498
<i>S. dichlamys</i> Epling	J. Rojas 5411 (FCME)
<i>S. disjuncta</i> Fernald	I. Fragoso & R. Middleton 257 (MEXU)
<i>S. dorisiana</i> Standl.	I. Fragoso & R. Middleton 250 (MEXU)
<i>S. fulgens</i> Cav.	F. Sazatornil 5 (MEXU)
<i>S. gesneriiflora</i> Lindl. & Paxton	G. Salazar-Chávez 9217 (MEXU)
<i>S. greggii</i> A. Gray	G. Cornejo-Tenorio 4352 (MEXU)
<i>S. guevarae</i> Bedolla & Zamudio	S. Zamudio 14465 (IEB)
<i>S. holwayi</i> S.F. Blake	G. Salazar-Chávez 9589 (MEXU)
<i>S. involucrata</i> Cav.	I. Fragoso-Martínez <i>et al.</i> 426 (MEXU)
<i>S. karwinskii</i> Benth.	I. Fragoso-Martínez <i>et al.</i> 351 (MEXU)
<i>S. lasiocephala</i> Hook. & Arn.	J. Contreras 9202 (FCME)
<i>S. lineata</i> Benth.	P. Tenorio L. 17163 (MEXU)
<i>S. lycioides</i> A. Gray	I. Fragoso & R. Middleton 242 (MEXU)
<i>S. macellaria</i> Epling	E. Martínez A. 543a (FCME)
<i>S. microphylla</i> Kunth	E. Martínez-Ambriz <i>et al.</i> 513 (FCME)
<i>S. microphylla</i> var. <i>canescens</i> A. Gray	J. Reyes 8466 (MEXU)
<i>S. microphylla</i> var. <i>neurepia</i> (Fernald) Epling	T.F. Daniel 5416 (MEXU)
<i>S. microphylla</i> var. <i>wislizenii</i> A. Gray	K. Peterson 704 (MEXU)

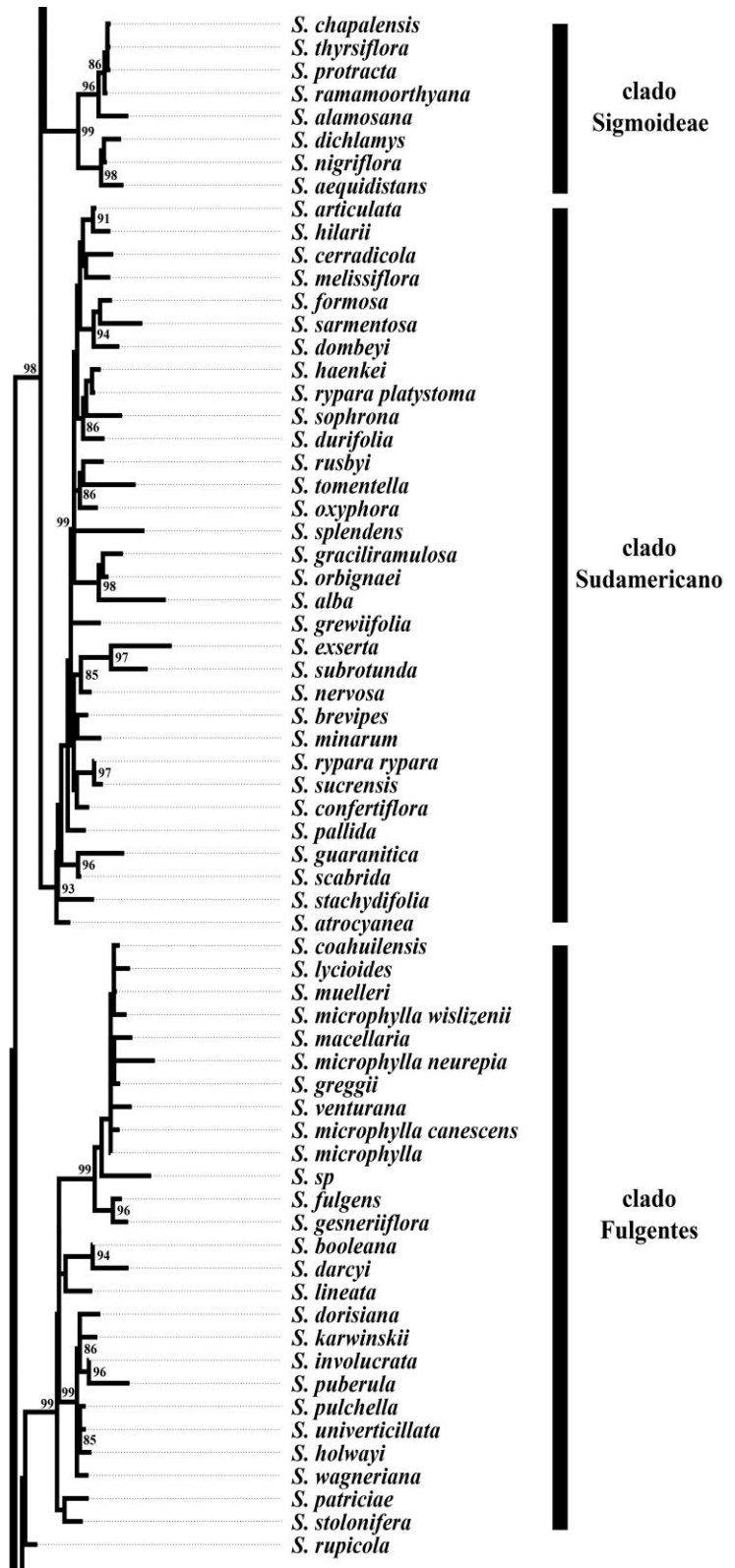
<i>S. mocinoi</i> Benth.	I. Fragoso-Martínez 98 (FCME)
<i>S. modica</i> Epling	T.R. Davender 2000-817 (USON)
<i>S. muelleri</i> Epling	Powell 1450 (TEX)
<i>S. nigriflora</i> Epling	V.W. Steinmann 6055 (IEB)
<i>S. regla</i> Cav.	F. Sazatornil 15 (MEXU)
<i>S. oaxacana</i> Fernald	M. Castañeda-Zarate 1066 (MEXU)
<i>S. patriciae</i> J.G. González & Martínez-Ambriz	I. Fragoso-Martínez <i>et al.</i> 363 (MEXU)
<i>S. pexa</i> Epling	E. Martínez-Ambríz 540 (FCME)
<i>S. puberula</i> Fernald	R. Hernández 175 (MEXU)
<i>S. pulchella</i> DC.	S. Zamudio 4967 (MEXU)
<i>S. sp.</i>	E. Martínez-Ambriz <i>et al.</i> 529 (FCME)
<i>S. stolonifera</i> Benth.	I. Fragoso & R. Middleton 227 (MEXU)
<i>S. tilantongensis</i> J.G. González & Aguilar-Santelises	E. Martínez-Ambriz <i>et al.</i> 521 (FCME)
<i>S. univerticillata</i> Ramamoorthy ex Klitg.	I. Fragoso & R. Middleton 228 (MEXU)
<i>S. venturana</i> B.L. Turner	A. Combes 1181 (HUAP)
<i>S. wagneriana</i> Pol.	M. Martínez Gordillo s.n. (FCME)

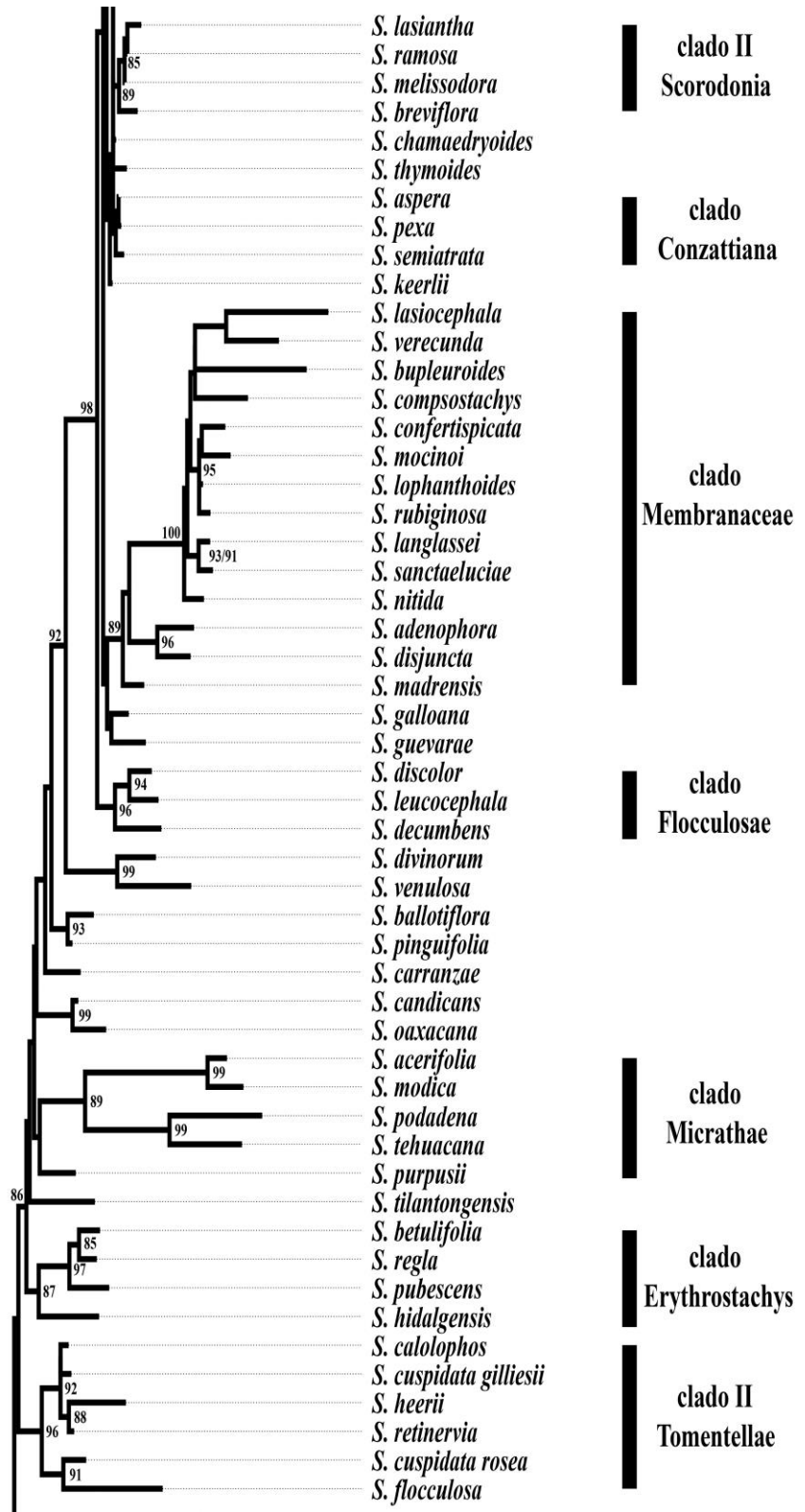
Anexo II. Filogenia subgénero *Calosphace*

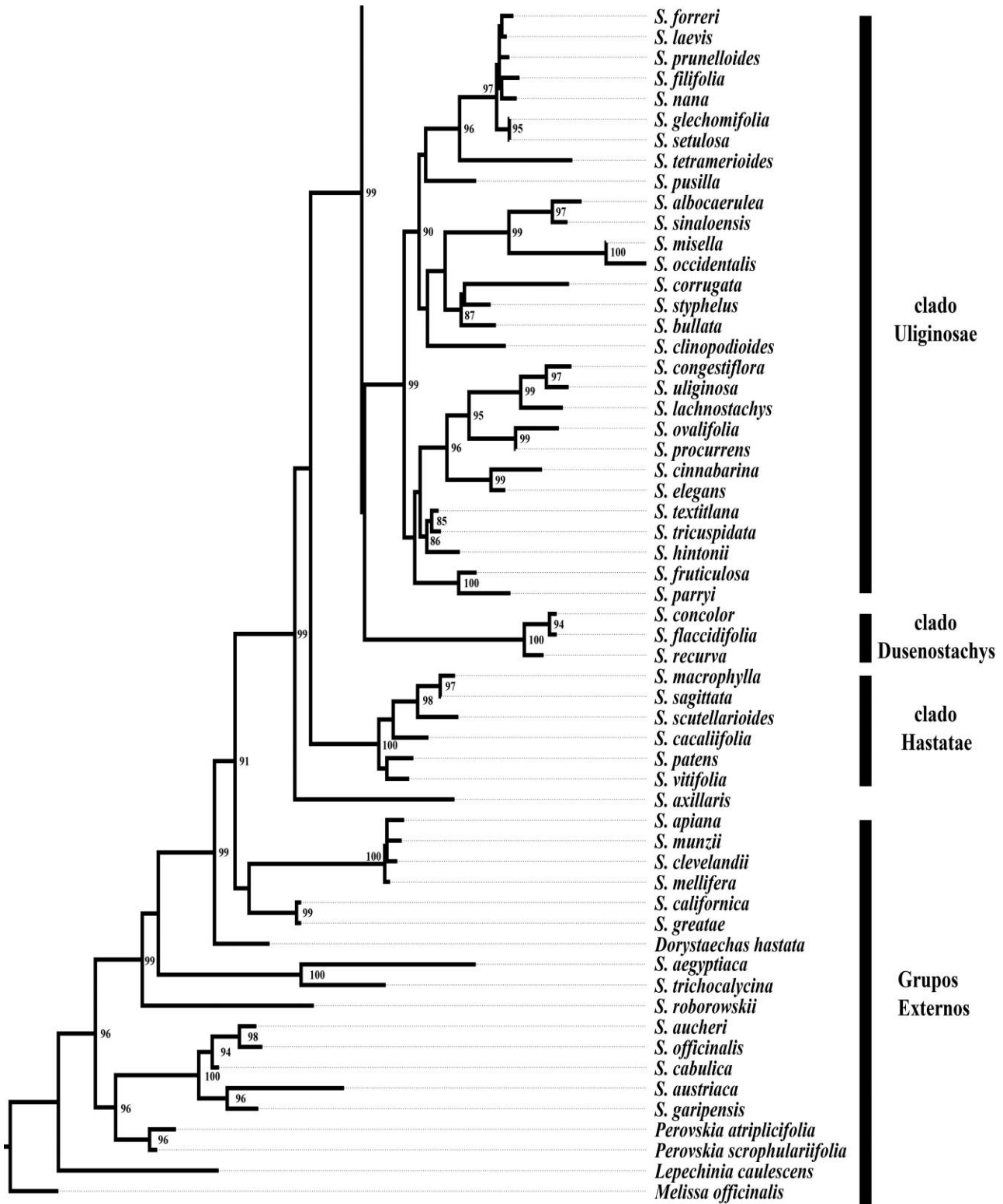




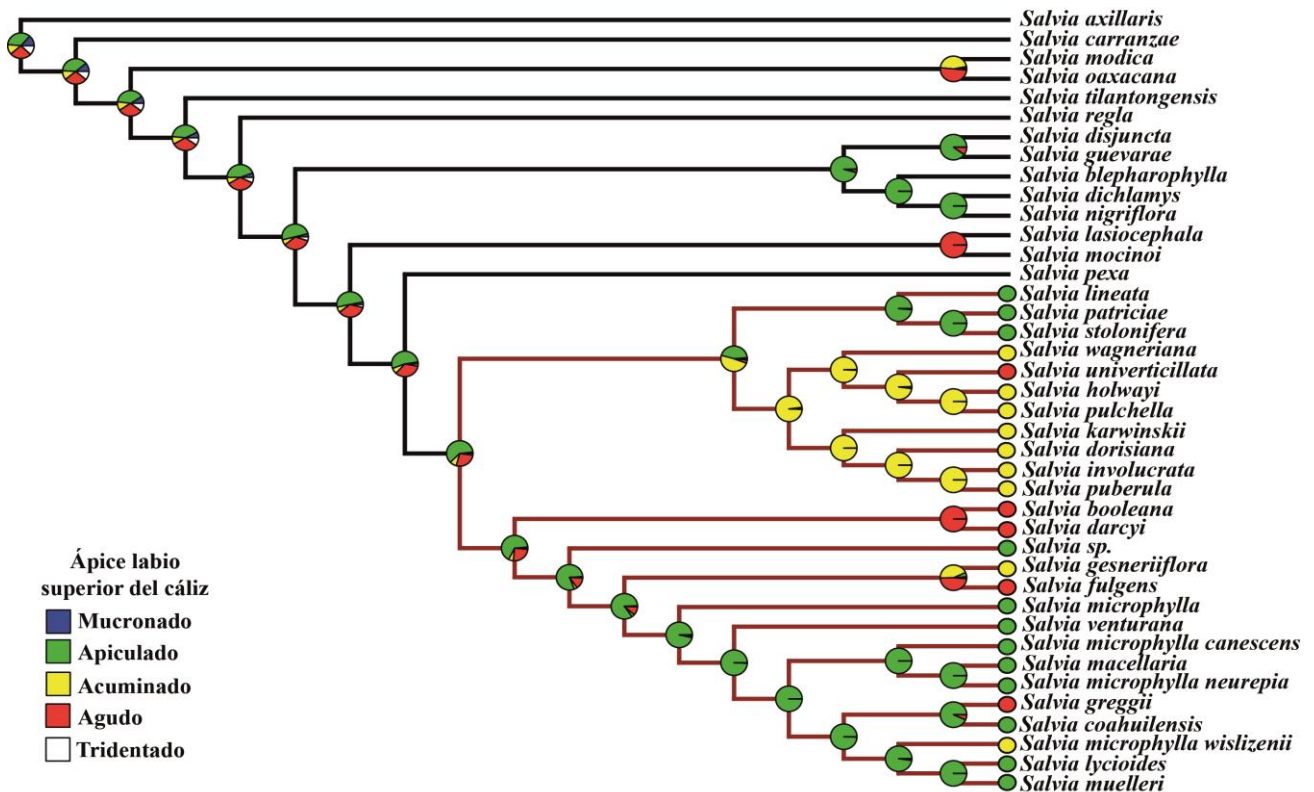
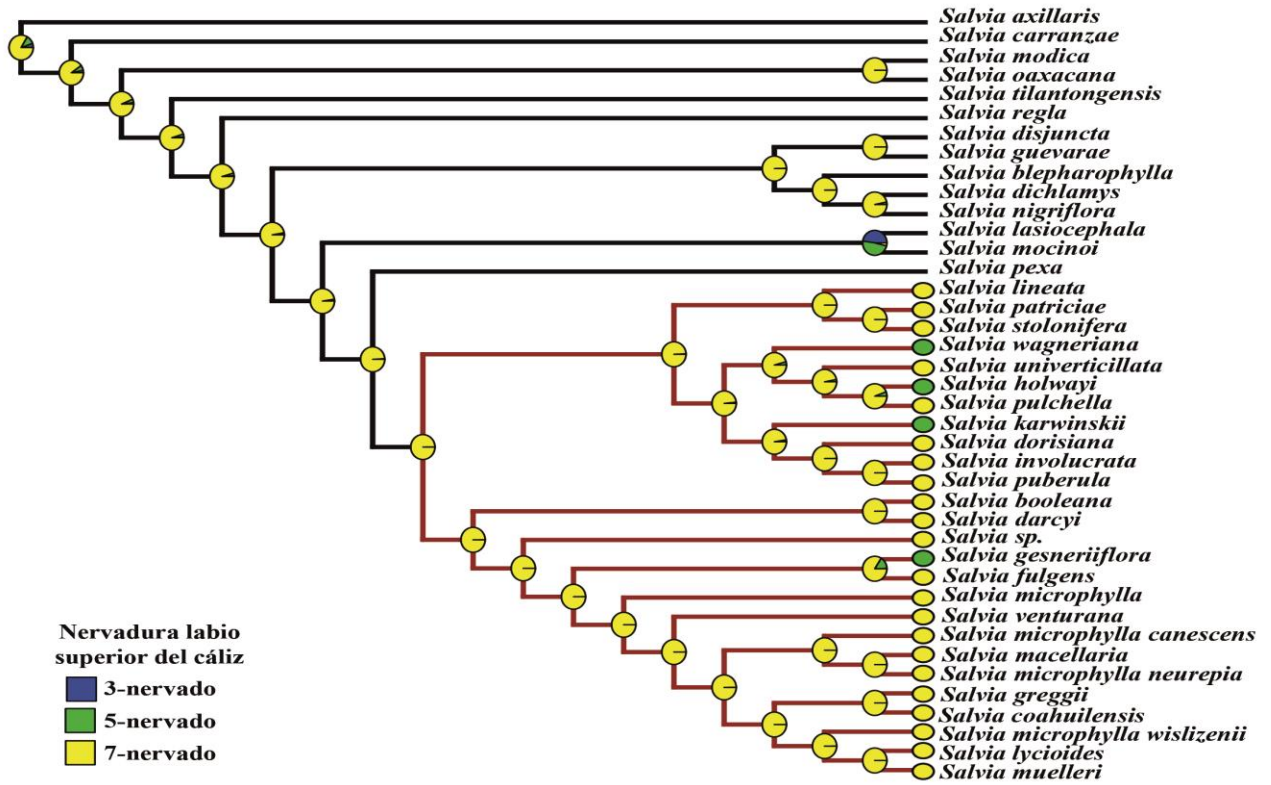


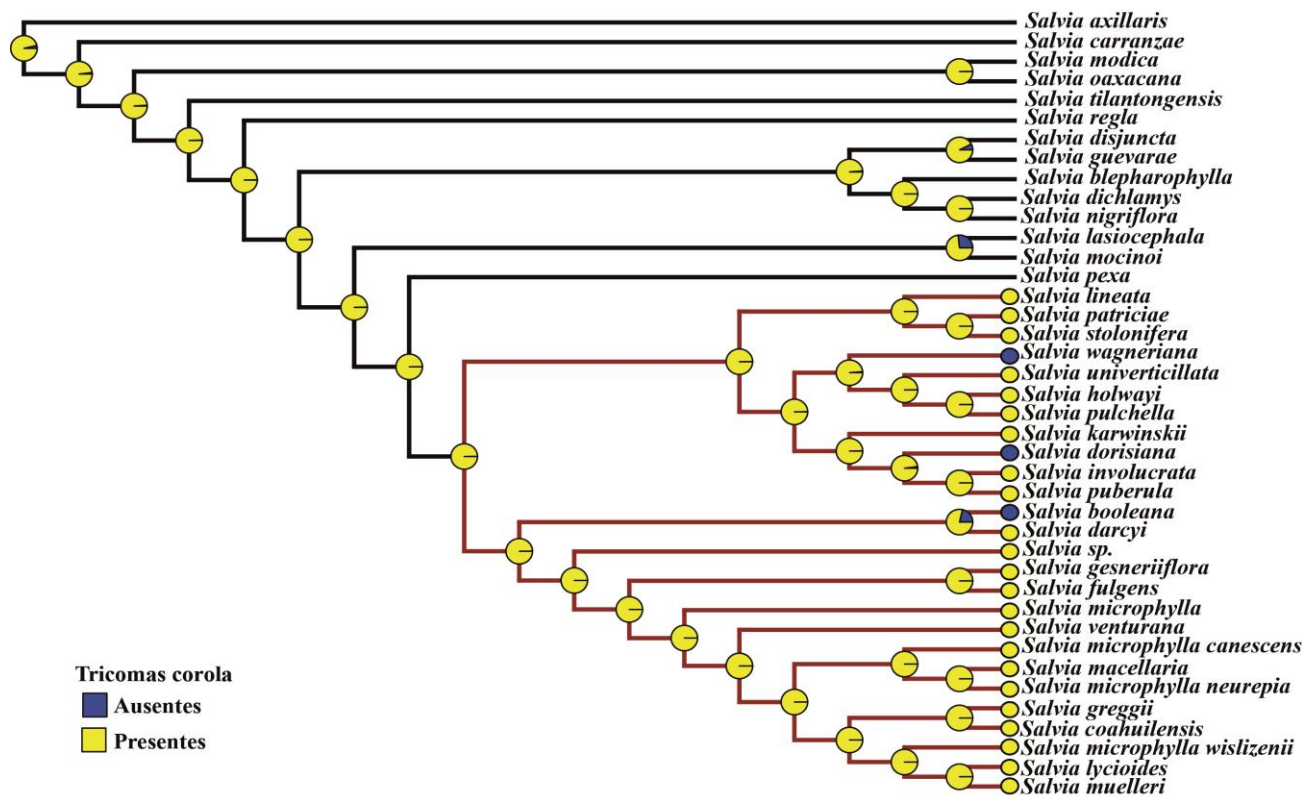
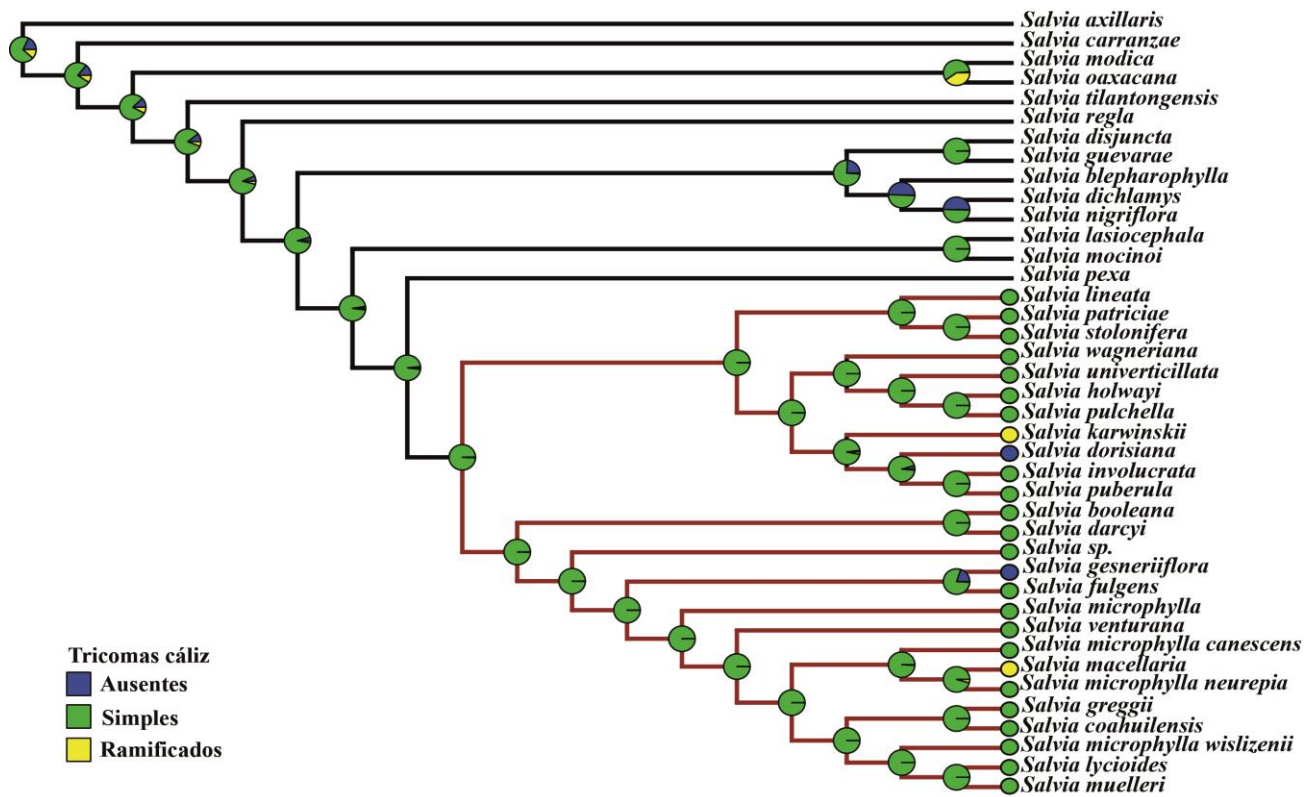


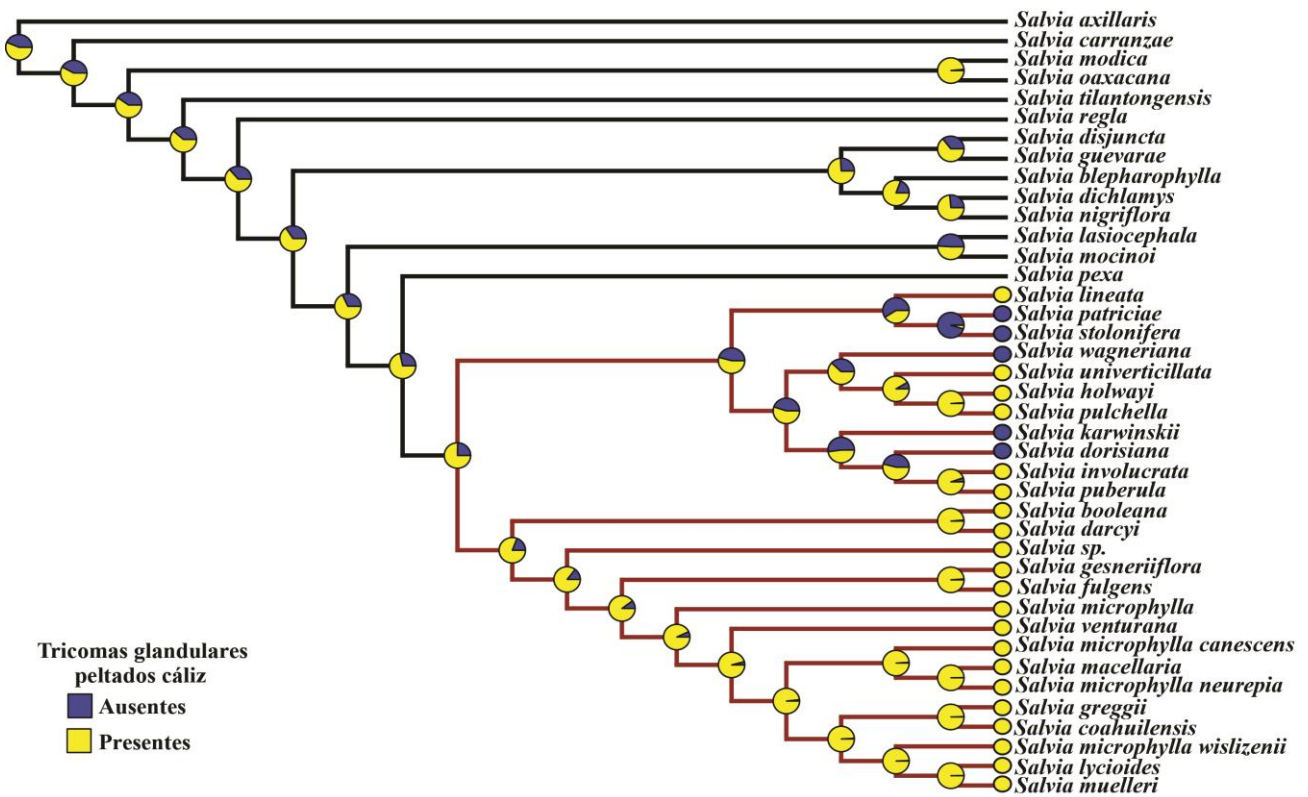
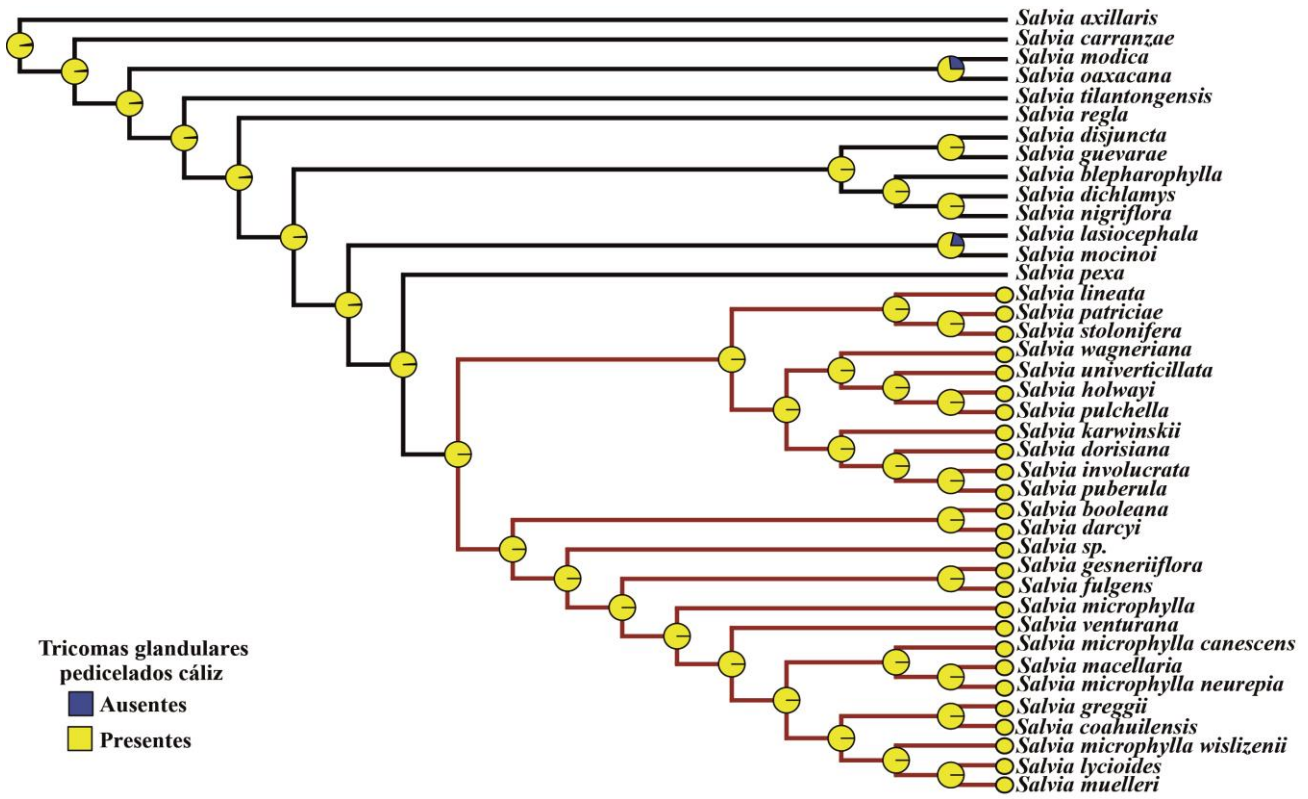


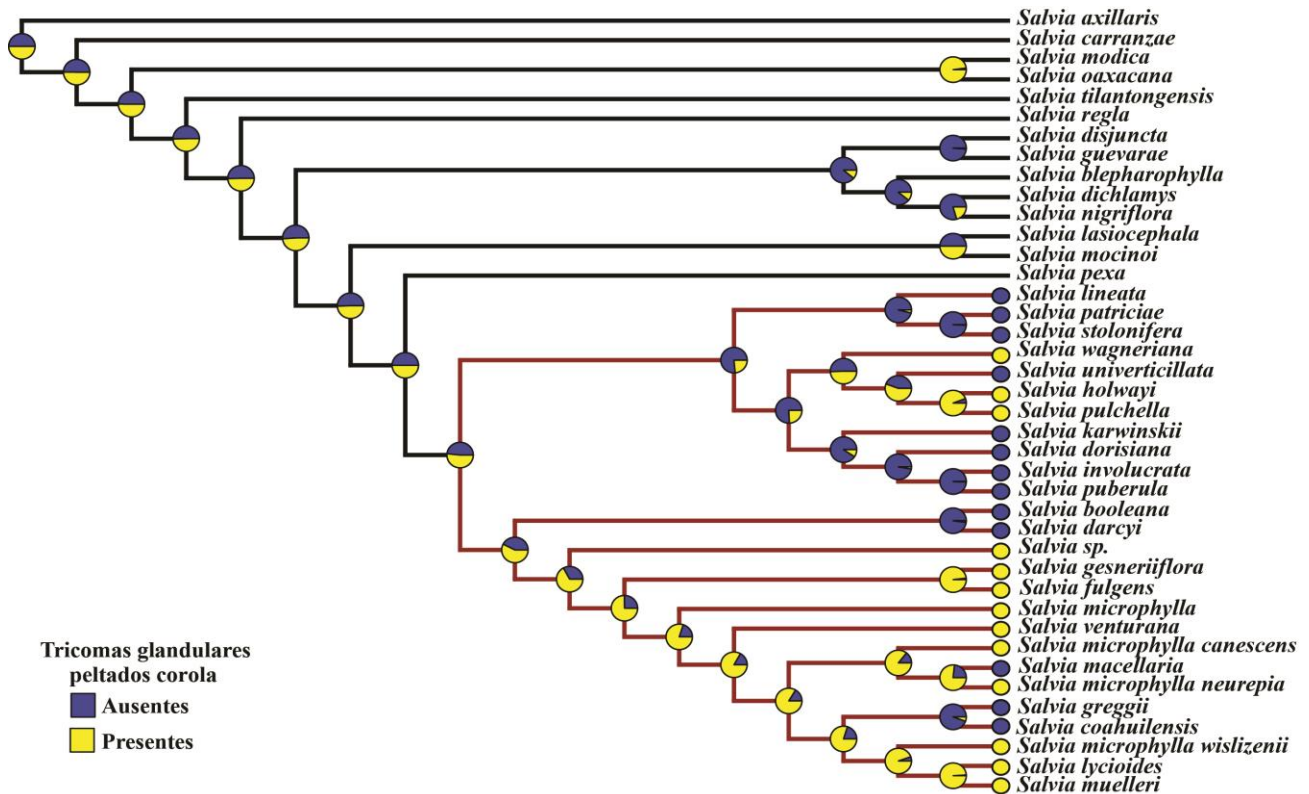
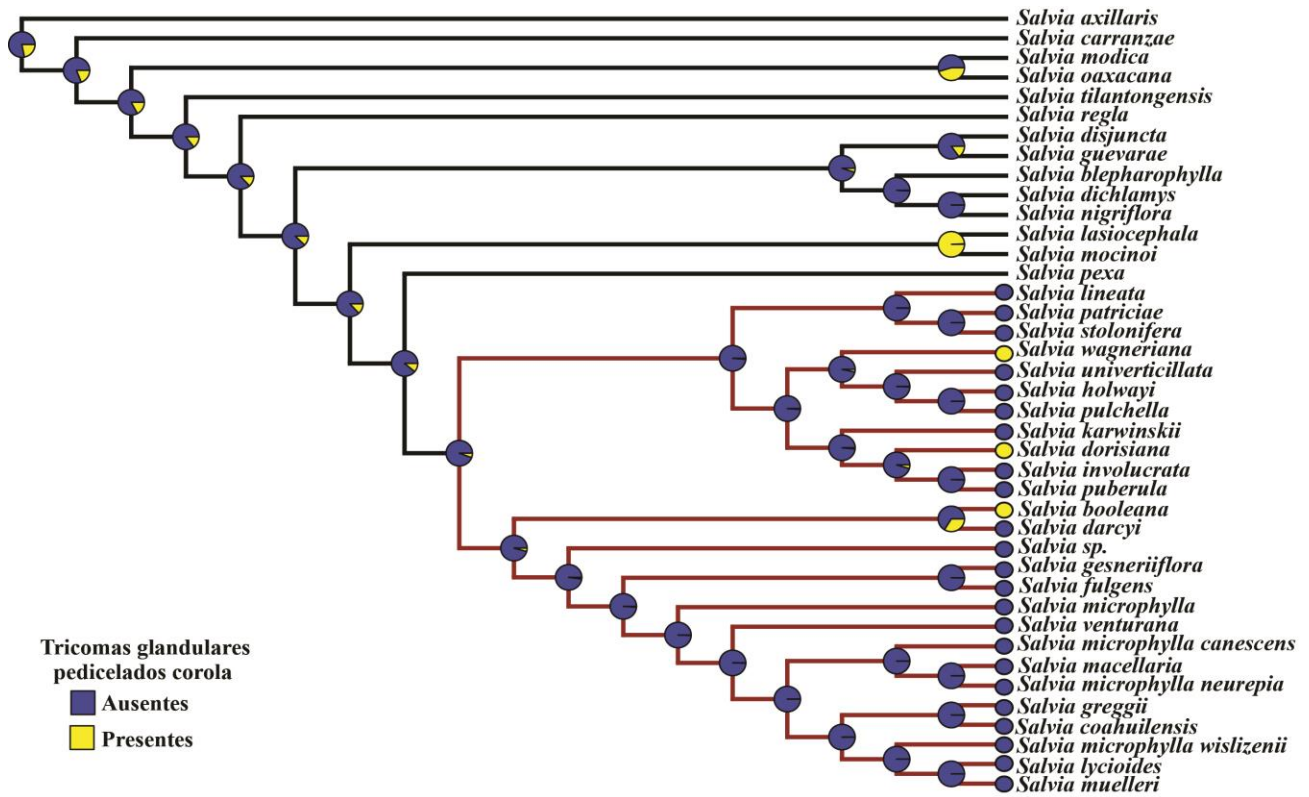


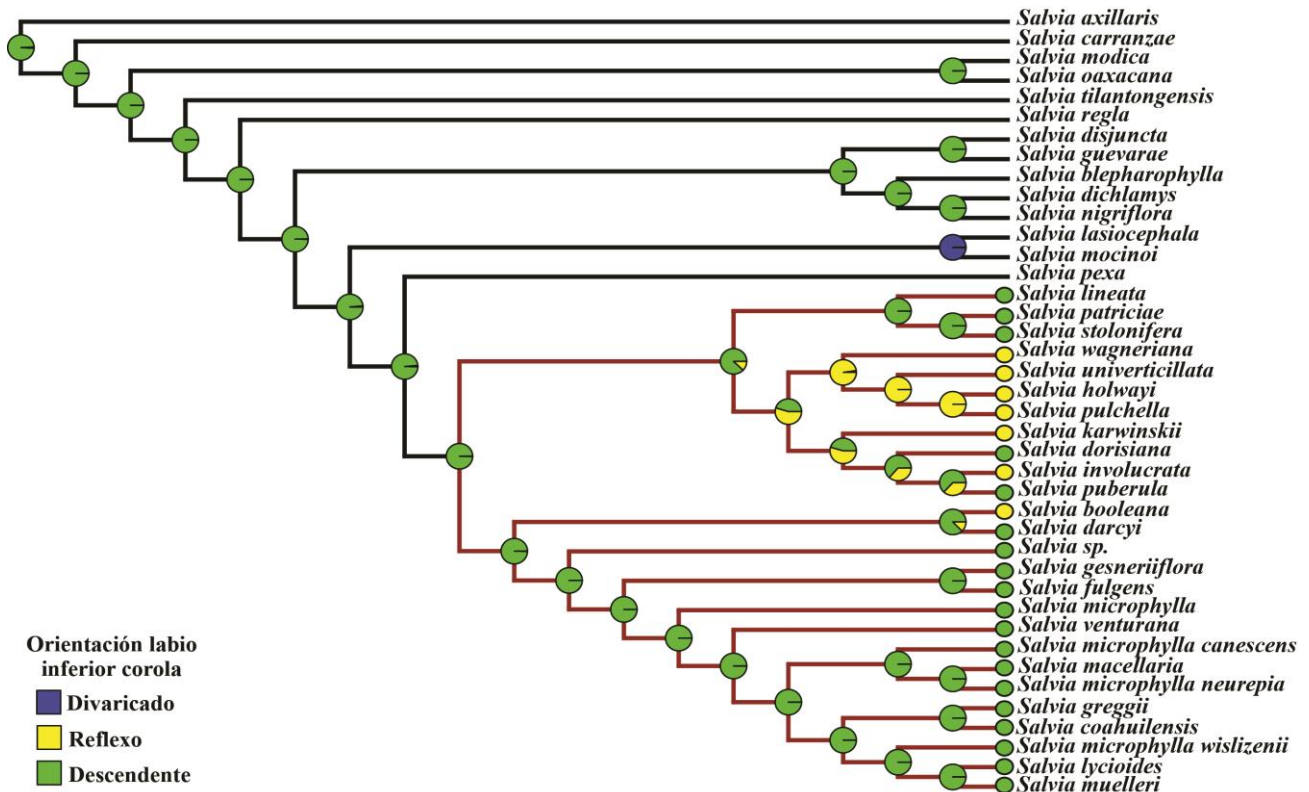
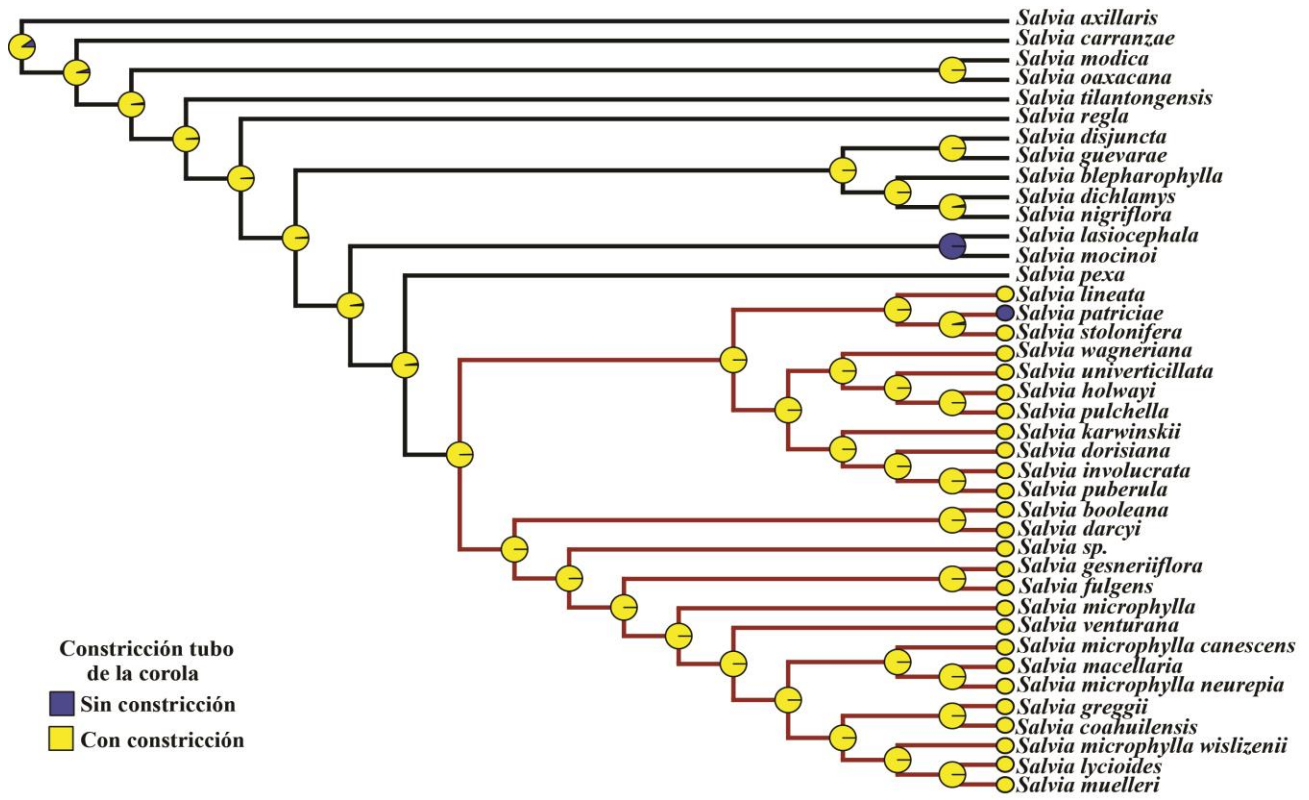
Anexo III. Optimización de caracteres morfológicos.



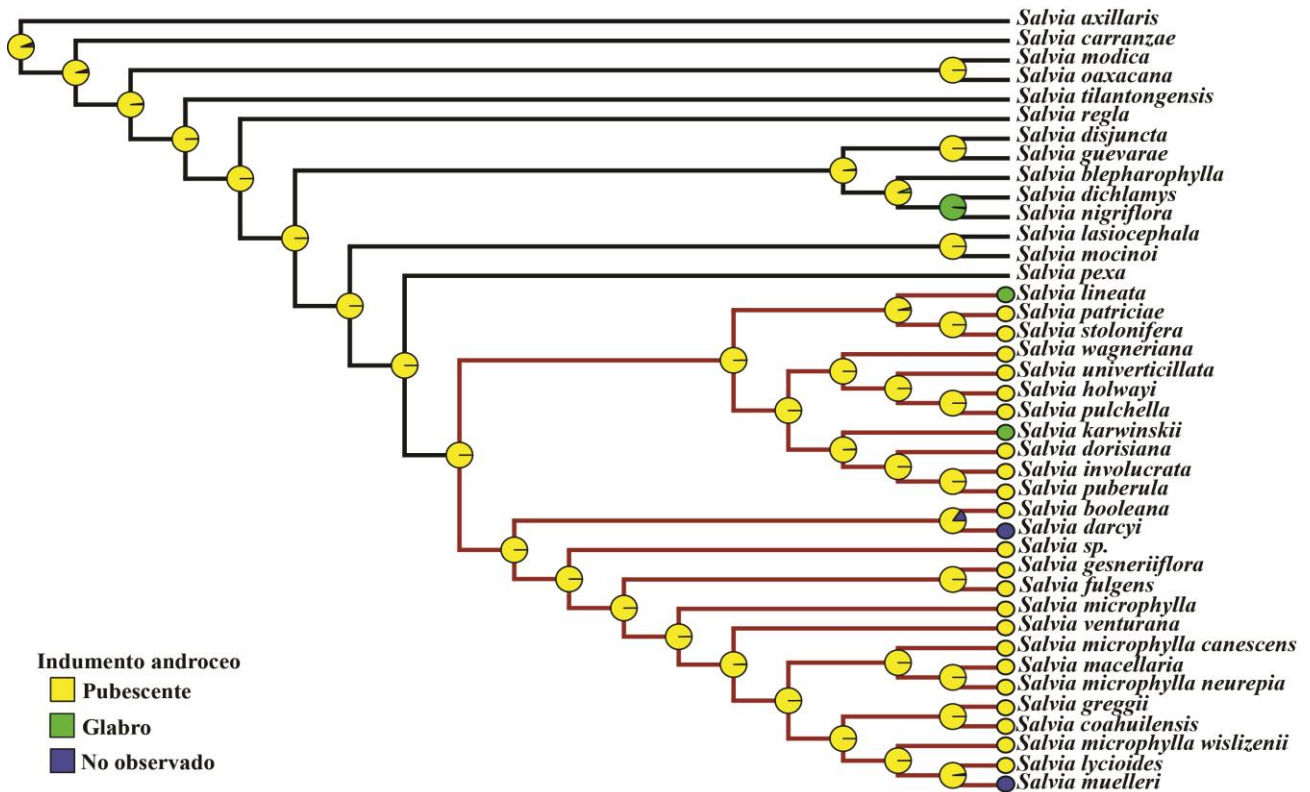
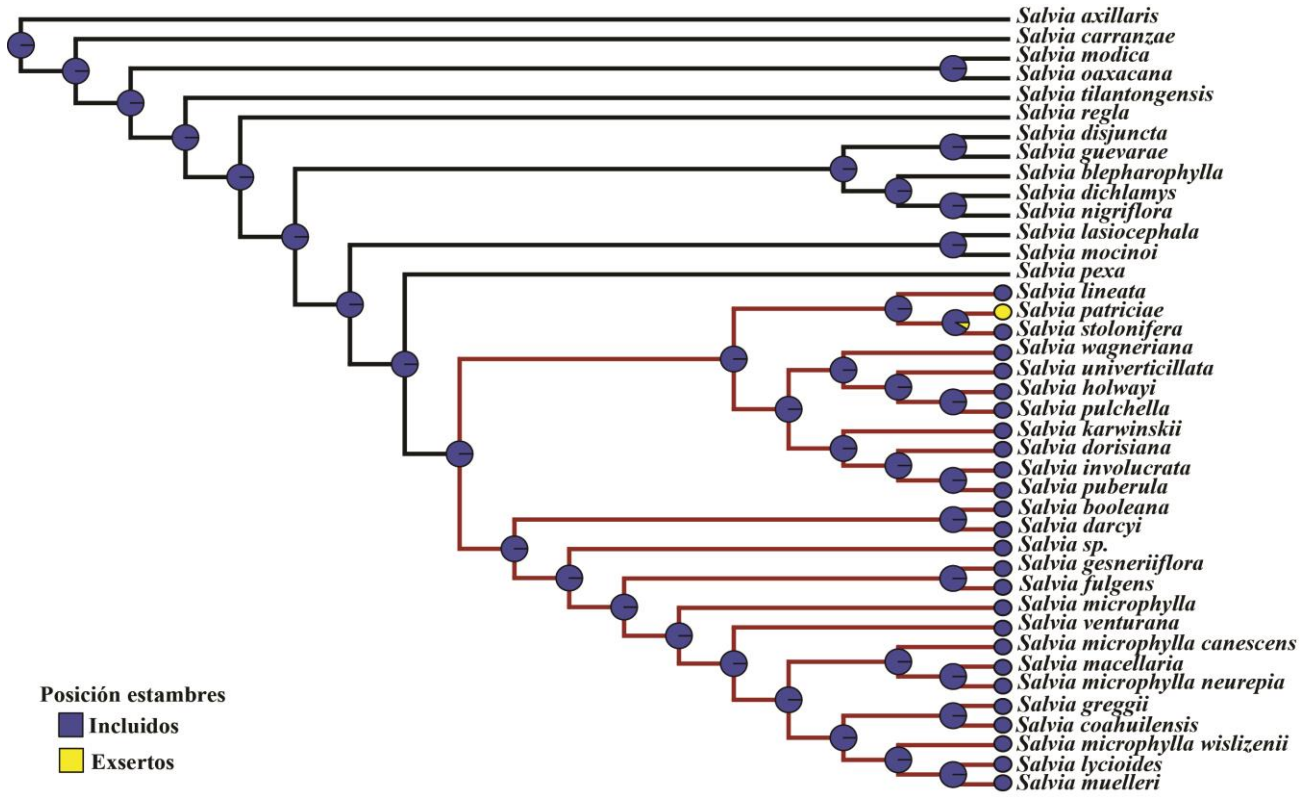


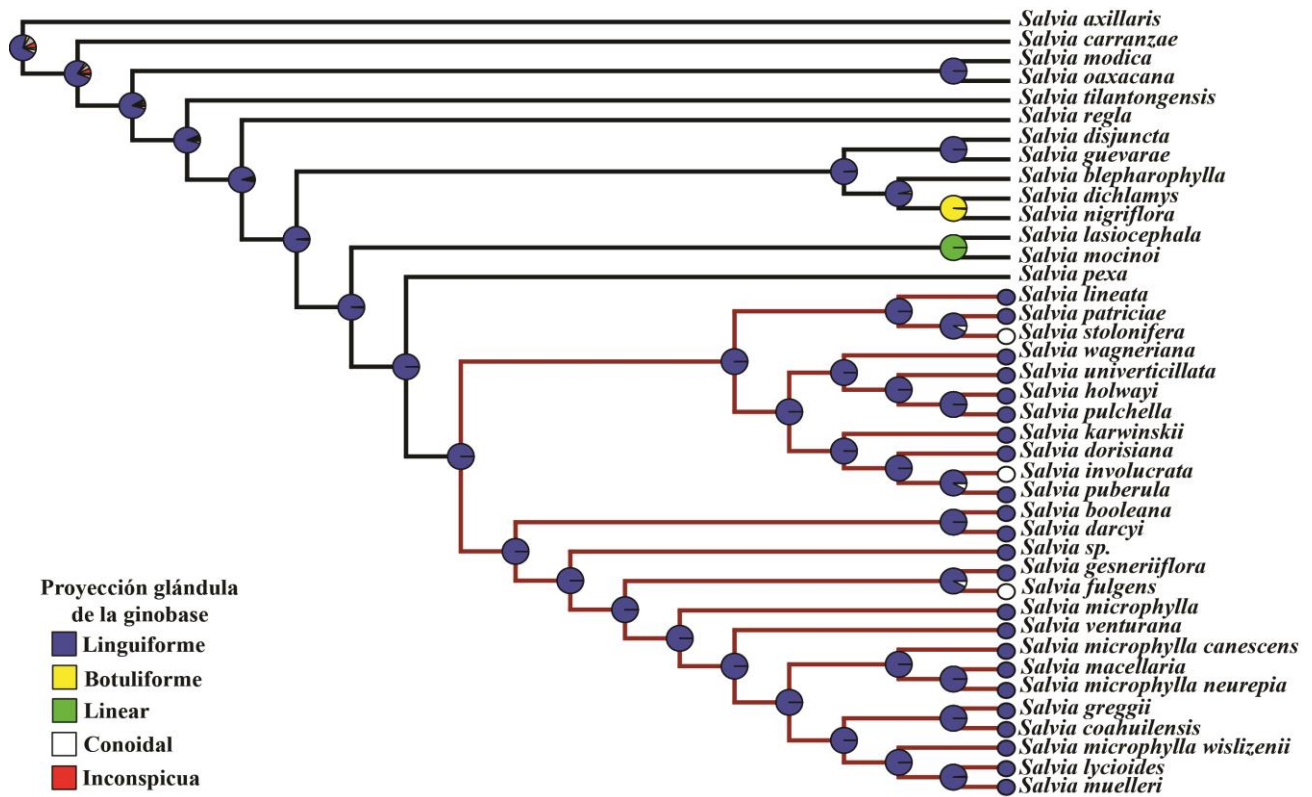
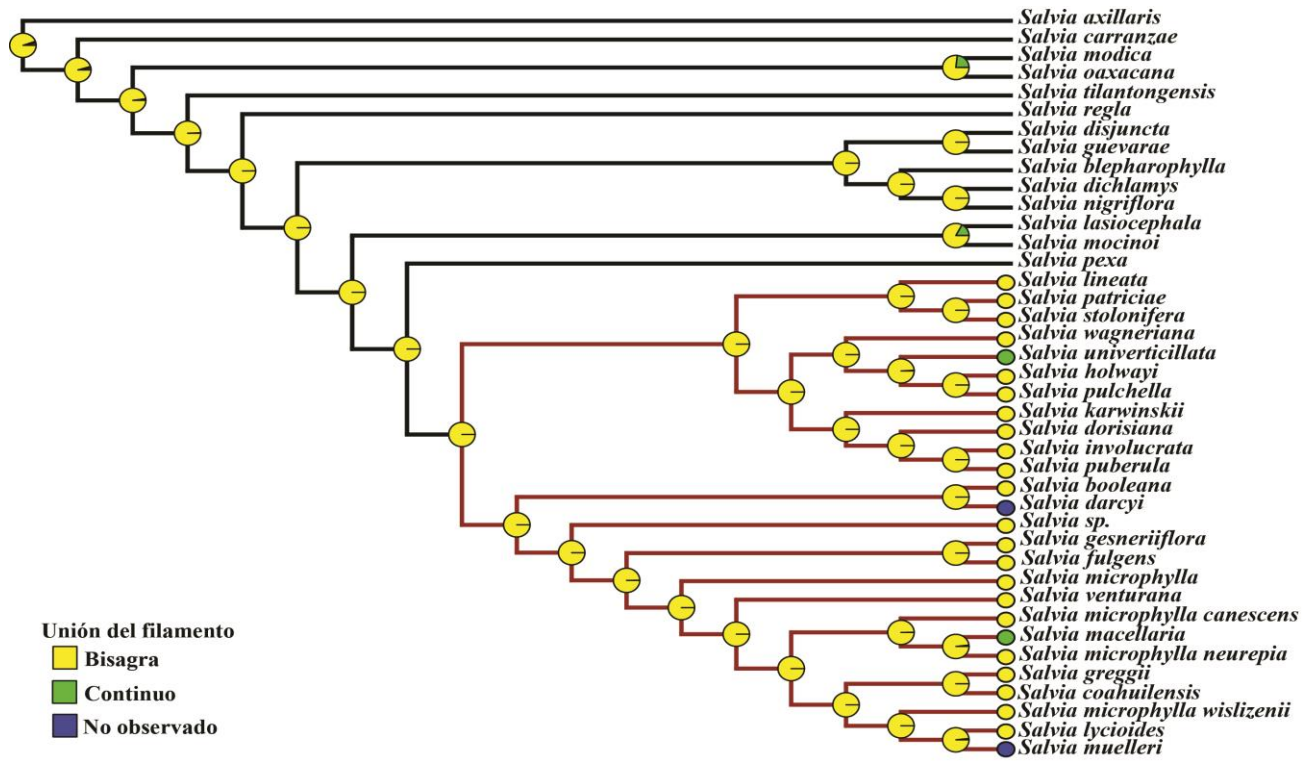












## Anexo IV. Especie descrita durante el presente trabajo.



## Article



<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.362.2.2>

### *Salvia ozolotepecensis*, *S. patriciae* and *S. sirenis* (Lamiaceae), three new species from Miahuatlán district, Oaxaca, Mexico

JESÚS GUADALUPE GONZÁLEZ-GALLEGOS<sup>1,2</sup>, ITZI FRAGOSO-MARTÍNEZ<sup>3,4\*</sup>, GABRIEL GONZÁLEZ-ADAME<sup>5</sup>, EMMANUEL MARTÍNEZ-AMBRIZ<sup>3,6</sup> & IRMA LORENA LÓPEZ-ENRÍQUEZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Cátedras CONACYT

<sup>2</sup>Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (IPN-CIIDIR-COFAA-EDD), Unidad Durango, Sigma 119, Fraccionamiento 20 de Noviembre II, 34234 Durango, Durango, Mexico.

<sup>3</sup>Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, 04510 Coyoacán, Mexico City, Mexico; E-mail: i.fragoso@ciencias.unam.mx

<sup>4</sup>Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Coyoacán, A.P. 70-367, Mexico City, Mexico.

<sup>5</sup>Universidad de la Sierra Juárez, Av. Universidad s/n, 68725 Ixtlán de Juárez, Oaxaca, Mexico.

<sup>6</sup>Herbario de la Facultad de Ciencias (FCME), Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Coyoacán, A.P. 70-181, Mexico City, Mexico.

\*author for correspondence

#### Abstract

*Salvia ozolotepecensis*, *S. patriciae* and *S. sirenis* (Lamiaceae) from Oaxaca, Mexico, are described and illustrated as three new species. The first one is characterized by its glandular-capitate pubescence in stems, leaves and inflorescences, mostly persistent floral bracts, entire and 5-veined upper calyx lip, red corolla, epipillate inside, included stamens, and connective ornate with opposed retrorse and antrorse teeth bordering an incision. It is most similar to *S. perlonga* and *S. praestans* to which it is compared. The second can be distinguished in having ovate to ovate-deltoid leaf blades, entire, acute and 7-veined upper calyx lips, red corollas, internally ornate near the base with two slender linguiform papillae, upper corolla lip shorter than the lower one, exerted stamens and glabrous style. This new taxon is morphologically similar to the species belonging to *Salvia* sections *Cardinales*, *Charantia*, *Incarnatae*, *Flexuosa*, *Fulgentes*, *Iodophyllae* and *Pedunculata*, although, it cannot be unambiguously assigned to one of these. In contrast, *S. sirenis* clearly belongs to *S.* sect. *Scorodonia*; amongst the species therein, the new species can be differentiated by the concolorous leaves, rounded to slightly oblique at base, 6–8-flowered floral nodes, longer floral bracts, pedicels, calyces and corollas, and 5 or 7-veined upper calyx lip. Also, it represents an addition to Mexican *Salvia* with white corollas. The molecular markers ITS, *trnL-trnF* and *trnH-psbA* were sequenced for two of the three new species, and their phylogenetic position is discussed.

#### Resumen

Se describe e ilustra como tres especies nuevas a *Salvia ozolotepecensis*, *S. patriciae* y *S. sirenis*, provenientes de Oaxaca, México. La primera de ellas se caracteriza por la presencia de pubescencia glandular-capitada en tallos, hojas e inflorescencias, brácteas florales generalmente persistentes, labio superior del cáliz entero y 5-nervado, corola roja y epipilada en el interior, estambres incluidos y conectivo ornamentado con un par de dientes opuestos entre sí al borde de una pequeña hendidura. Esta especie es más similar a *S. perlonga* y *S. praestans*, contra las que se compara. La segunda puede distinguirse por sus láminas foliares ovadas a ovado-deltoides, labio superior del cáliz entero, agudo y 7-nervado, corolas rojas, ornamentadas en el interior con un par de papilas delicadas, labio superior de la corola más corto que el inferior, estambres exertos y estilo glabro. El taxon nuevo es semejante por su morfología a las especies de las secciones *Cardinales*, *Charantia*, *Incarnatae*, *Flexuosa*, *Fulgentes*, *Iodophyllae* y *Pedunculata*, aunque, no puede asignarse sin ambigüedad a alguna de ellas. En contraste, *S. sirenis* pertenece con claridad a la sect. *Scorodonia*, entre las especies que abarca, la especie nueva puede diferenciarse por las hojas concoloras, redondeadas a poco oblicuas en la base, nodos florales con 6–8 flores, brácteas florales, pedicelos, cáliz y corolas más largos, y el labio superior del cáliz con 5 o 7 venas. Además, ésta representa una adición a las salvias mexicanas con corolas blancas. Los marcadores moleculares ITS, *trnL-trnF* y *trnH-psbA* fueron secuenciados para dos de las tres especies nuevas, y su posición filogenética es discutida.

Accepted by Fabrizio Bartolucci: 12 Jun. 2018; published: 24 Jul. 2018

143

Licensed under a Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>