



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
SISTEMÁTICA

SISTEMÁTICA DEL GÉNERO *MILLA* (THEMIDACEAE)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

GUTIÉRREZ GALLEGOS JORGE ALBERTO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. TERESA MARGARITA TERRAZAS SALGADO
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. MERCEDES ISOLDA LUNA VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

DR. GERARDO ADOLFO SALAZAR CHÁVEZ
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM.

MÉXICO, D.F. ENERO, 2016



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
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
SISTEMÁTICA

SISTEMÁTICA DEL GÉNERO *MILLA* (THEMIDACEAE)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

GUTIÉRREZ GALLEGOS JORGE ALBERTO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. TERESA MARGARITA TERRAZAS SALGADO
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. MERCEDES ISOLDA LUNA VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

DR. GERARDO ADOLFO SALAZAR CHÁVEZ
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM.

MÉXICO, D.F. ENERO, 2016

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 21 de septiembre de 2015, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **GUTIÉRREZ GALLEGOS JORGE ALBERTO** con número de cuenta **99510864** con la tesis titulada: "**Sistemática del género *Milla* (Themidaceae)**", realizada bajo la dirección de la **DRA. TERESA MARGARITA TERRAZAS SALGADO**:

Presidente:	DR. ELOY SOLANO CAMACHO
Vocal:	DRA. ROSAURA GREYER GONZALEZ
Secretario:	DRA. MERCEDES ISOLDA LUNA VEGA
Suplente:	DRA. AGUSTINA ROSA ANDRÉS HERNÁNDEZ
Suplente	DR. GERARDO ADOLFO SALAZAR CHAVEZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 17 de noviembre de 2015.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas por las facilidades otorgadas para realizar mis estudios de Doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (160287).

Agradezco de manera especial a la Dra. Teresa Margarita Terrazas Salgado por dirigir esta tesis. A la Dra. Mercedes Isolda Luna Vega y Dr. Gerardo Adolfo Salazar Chávez por ser miembros del comité tutorial.

RECONOCIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A la Dra. Teresa Margarita Terrazas Salgado, por creer en mí y brindarme su confianza para ser su estudiante. El apoyo académico y moral durante la investigación fue fundamental para poder concluir esta tesis.

A la Dra. Isolda Luna Vega, por las sugerencias y comentarios durante todo el proceso de la investigación.

Al Dr. Gerardo Salazar Chávez, por las atinadas sugerencias y comentarios que permitieron enriquecer considerablemente esta tesis.

A los miembros del jurado, Dr. Eloy Solano Camacho, Dra. Rosaura Grether González, Dra. Mercedes Isolda Luna Vega, Dra. Rosa Andrés Hernández y Dr. Gerardo Salazar Chávez por las sugerencias al manuscrito.

A los curadores de los herbarios ARIZ, BH, F, FC, GH, IEB, INECOL, JEPS, MEXU, NY, RSA, SLPM, US y XAL, por las facilidades otorgadas en el préstamo de los ejemplares.

Mi reconocimiento al Biól. Eliseo Bravo Acevedo, Biól. Jesús Salgado Vázquez y M. en C. Ramiro Ríos Gómez, por su apoyo en el trabajo de campo. Eliseo y Ramiro contribuyeron considerablemente durante amplias jornadas de caminata por bosques y matorrales o hasta reconocer a *Milla* a más de 100 km/h.

Al Dr. Eduardo Estrada (UANL), por su valiosa ayuda en el trabajo de campo. Por las buenas conversaciones sobre la flora del norte de México y sobre todo por la hospitalidad y amistad.

Al personal del herbario FEZA, donde se efectuó gran parte del presente trabajo. En especial a la Dra. Alejandrina Ávila por su apoyo.

Al Biól. Azahariel Ramírez García, ¡amigo! por el apoyo brindado en momentos clave de mi vida académica y personal. Por las buenas conversaciones.

Al Dr. Eloy Solano Camacho, por haberme inspirado en el estudio de la botánica, compartir sus conocimientos, las amenas jornadas de trabajo en campo y sobre todo por su amistad.

A mis madres, Ma. Carmen Gallegos y Ma. Guadalupe Gutiérrez por su infinito amor y apoyo.

A mi esposa Isaura, la “flor” más bella que pude haber descubierto, por ser el pilar que me sostiene. Por la fortuna de compartir en familia este logro que también es tuyo, por ser paciente y suprimir diversas actividades personales para darme la oportunidad de hacer este proyecto.

A mis hijas Paola y Valentina, por su paciencia y comprensión en diversos momentos en los que solicitaban de mi presencia. Por darme ánimos en todo momento, porque son mi mejor premio y mi mayor satisfacción.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi esposa Isaura,
a mis hijas Paola y Valentina,
por ser lo más importante
en mi vida y por la
satisfacción de
formar una
familia.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Literatura citada.....	6
CAPÍTULO I. Historia taxonómica de <i>Milla</i> (Themidaceae)	8
Literatura citada.....	13
CAPÍTULO II. Morfología y anatomía foliar de los géneros del complejo <i>Milla</i> (Themidaceae)	17
Resumen.....	18
Introducción.....	18
Materiales y métodos.....	19
Resultados.....	19
Discusión.....	22
Referencias.....	26
CAPÍTULO III. Análisis morfométrico de <i>Milla biflora</i> (Themidaceae)	27
.....	27
Resumen.....	29
Introducción.....	30
Materiales y método.....	31
Resultados.....	32
Discusión.....	33
Literatura citada.....	41

CAPÍTULO IV. Phylogenetic analysis of the <i>Milla</i> complex (Themidaceae), with emphasis on <i>Milla</i>.....	54
Abstract.....	56
Introduction.....	57
Materials and methods.....	60
Results.....	64
Discussion.....	66
References.....	71
 CAPÍTULO V. <i>Milla valliflora</i> (Themidaceae), a new species from southern Mexico	
Abstract.....	94
Introduction.....	95
<i>Milla valliflora</i> J. Gut. & E. Solano.....	95
Distribution and ecology	97
Phenology	97
Etymology	97
Additional specimens examined.....	97
Literature cited.....	98
 CAPÍTULO VI. Tratamiento taxonómico del género <i>Milla</i>.....	100
<i>Milla</i>	101
Clave para la determinación taxonómica de las especies del género <i>Milla</i>	102
<i>Milla biflora</i>	107
<i>Milla bryanii</i>	107
<i>Milla delicata</i>	108
<i>Milla filifolia</i>	109

<i>Milla magnifica</i>	110
<i>Milla mexicana</i>	110
<i>Milla oaxacana</i>	111
<i>Milla potosina</i>	112
<i>Milla rosea</i>	112
<i>Milla valliflora</i>	113
<i>Milla</i> sp. nov. 1 ined.....	114
<i>Milla</i> sp. nov. 2 ined.....	115
<i>Milla</i> sp. nov. 3 ined.....	116
<i>Milla</i> sp. nov. 4 ined.....	116
<i>Milla</i> sp. nov. 5 ined.....	117
<i>Milla</i> sp. nov. 6. ined.....	118
<i>Milla</i> sp. nov. 7 ined.....	119
<i>Milla</i> sp. nov. 8 ined.....	120
<i>Milla</i> sp. nov. 9 ined.....	120
<i>Milla</i> sp. nov. 10 ined.....	121
<i>Milla</i> sp. nov. 11 ined.....	122
<i>Milla</i> sp. nov. 12 ined.....	123
<i>Milla</i> sp. nov. 13 ined.....	123
<i>Milla</i> sp. nov. 14 ined.....	124
<i>Milla</i> sp. nov. 15 ined.....	125
<i>Milla</i> sp. nov. 16 ined.....	126
<i>Milla</i> sp. nov. 17 ined.....	126

<i>Milla</i> sp. nov. 18 ined.....	127
<i>Milla</i> sp. nov.19 ined.....	128
<i>Milla</i> sp. nov. 20 ined.....	129
<i>Milla</i> sp. nov. 21 ined.....	129
<i>Milla</i> sp. nov. 22 ined.....	130
<i>Milla</i> sp. nov. 23 ined.....	131
<i>Milla</i> sp. nov. 24 ined.....	132
<i>Milla</i> sp. nov. 25 ined.....	133
<i>Milla</i> sp. nov 26 ined.....	133
DISCUSIÓN.....	135
CONCLUSIONES.....	139
LITERATURA CITADA.....	140

CUADROS, FIGURAS Y APÉNDICES

	Pág.
Capítulo I	
Cuadro 1. Géneros que conforman actualmente Brodiaeoideae (Asparagaceae) y fecha de publicación.....	12
Capítulo II	
Cuadro 1. Características anatómicas de la hoja de los géneros del complejo <i>Milla</i> . Forma de la hoja en sección transversal.....	21
Cuadro 2. Características anatómicas de la hoja de ocho especies del género <i>Milla</i>	21
Figura 1. Forma geométrica de las hojas en sección transversal de los géneros y especies del complejo <i>Milla</i>	19
Figura 2. Hojas del complejo <i>Milla</i>	20
Figura 3. Perfil de la lámina foliar de los géneros del complejo <i>Milla</i> , visto en sección transversal.....	22
Figura 4. Detalles anatómicos de la lámina foliar de los géneros del complejo <i>Milla</i> , vistos en sección-transversal.....	23
Anexo. Material examinado de los géneros del complejo <i>Milla</i>	25
Capítulo III	
Cuadro 1. Caracteres morfológicos utilizados para los análisis morfométricos de las especies de <i>Milla</i> y los grupos de <i>Milla biflora sensu lato</i>	45
Cuadro 2. Caracteres cualitativos usados en el análisis de similitud de las especies de <i>Milla</i> y los grupos de <i>Milla biflora sensu lato</i>	46
Cuadro 3. Especies del género <i>Milla</i> , morfós y los estados de la República Mexicana en donde se distribuyen.....	47

Cuadro 4. Resultados del análisis de componentes principales, para las especies del género <i>Milla</i> .	48
Cuadro 5. Caracteres de las especies del género <i>Milla</i> utilizados en el análisis canónico discriminante	49
Cuadro 6. Especies y morfós agrupadas en sus mismos grupos en el análisis discriminante.	50
Figura 1. Análisis canónico discriminante de 24 variables para ocho especies de <i>Milla</i> y 34 morfós de <i>Milla biflora s.l.</i>	51
Figura 2. Análisis de agrupamiento para las nueve especies y 27 morfós de <i>Milla</i> con el coeficiente de distancia euclidiana y UPGMA.	52
Figura 3. Caracteres florales de especies y morfós de <i>Milla</i> .	53
Capítulo IV	
Table 1. Matrix of morphological characters.	78
Table 2. General statistics of the Maximum Parsimony (MP) phylogenetic reconstruction of species within the <i>Milla</i> complex using DNA sequence and morphological data.	81
Figure 1. Strict consensus tree of the ten most parsimonious trees obtained from the MP analysis of morphological characters.	84
Figure 2. Strict consensus tree of the five most parsimonious trees obtained using the concatenated cpDNA sequence data (<i>trnL-trnF</i> and <i>psbK-psbI</i>) for species within the <i>Milla</i> complex	85

Figure 3. Strict consensus tree of the five most parsimonious trees obtained using the concatenated nDNA sequence data (ITS) for species within the *Milla* complex..... 86

Figure 4. Strict consensus tree of the ten most parsimonious trees obtained using the concatenated nDNA sequence data (ITS) for species within the *Milla* complex..... 87

Figure 5. Majority rule consensus tree obtained from the bayesian inference (BI) analysis of total evidence (*trnL-trnF*, *psbK-psbI*, ITS and morphological traits) for species within the *Milla* complex..... 88

Figure 6. Ancestral character state reconstructions of selected morphological characters under the strict consensus bayesian inference (BI) tree obtained for species within the *Milla* complex..... 89

Appendix 1. Morphological traits used in the phylogenetic reconstruction of species within the *Milla* complex..... 90

Appendix 2. Information for the samples of species of complex *Milla*. Voucher information is listed as follows: taxon, name, state except (Mor40 country, state), locality, collector name and number, (herbarium)..... 92

Capítulo V

FIG. 1. *Milla valliflora*..... 96

Table 1. Comparison of *Milla valliflora*, *M. biflora*, *M. filifolia*, and *M. oaxacana*..... 98

RESUMEN

Los objetivos de esta tesis son: 1) Conocer la historia taxonómica de *Milla*, 2) identificar los caracteres foliares que permitieran diferenciar entre los géneros del complejo *Milla*. 3) poner a prueba la utilidad de los caracteres morfológicos para apoyar la existencia de grupos morfológicos de las especies de *Milla*, particularmente de *M. biflora* s.s. y 4) evaluar la monofilia de los géneros del complejo *Milla*. Para conocer la historia taxonómica de *Milla* se hizo una revisión de literatura que contiene las descripciones originales de sus especies, particularmente de la especie tipo *M. biflora*. Se analizó la pertinencia de reconocer y proponer a Milloideae como una subfamilia de Asparagaceae. Sin embargo, Brodiaeoideae es reconocida por APG III como válida por ser un nombre conservado. El estudio de la anatomía foliar incluyó más de 55 muestras de 19 especies y reveló que *Bessera* tiene carácter anatómico que lo distingue. Los miembros de *Bessera* puede reconocerse por el metaxilema en forma de “v” en los haces vasculares, los otros miembros del complejo lo tienen en forma de “v”. Predominan las formas de la hoja deprimida obovada, elíptica y circular en sección transversal en los géneros del complejo *Milla*. *Milla biflora* presenta todas las formas descritas para los géneros del complejo, excepto la forma obtriangular. La morfología y la anatomía foliar proporcionaron caracteres útiles para distinguir algunas especies del complejo. Los análisis multivariados se hicieron con base en 24 caracteres morfológicos y revelaron que, por sí solos no permiten diferenciar a *Milla biflora* s.s. Sin embargo, la incorporación de caracteres cualitativos morfológicos y anatómicos en el análisis de agrupamiento permitió distinguir las especies nueve especies evaluadas y en forma adicional, reconocer 26 especies más, que pueden ser determinadas mediante una clave. La hipótesis filogenética del complejo *Milla* mediante secuencias de ITS (núcleo), *trnL-F* y *psbK-I* (cloroplasto) y caracteres morfológicos apoya el reconocimiento de 5 géneros (*Bessera*, *Dandya*, *Jaimehintonia*, *Petronymphe* and *Milla*). Sin embargo, *Dandya* y *Milla* necesitan recircunscribirse, porque *M. mortoniana* requiere ser transferida a *Dandya*. Se describe finalmente una especie nueva (*Milla valliflora*) y se proponen 26 más que han sido segregadas de *Milla biflora*.

ABSTRACT

The main aims of this thesis were: 1) to synthesize the taxonomic history of *Milla*, 2) to identify foliar characters that may contribute to differentiate genera within the *Milla* complex, 3) to evaluate morphological characters to support the recognition of *Milla* species, especially of *M. biflora* s.s. and 4) to evaluate the monophyly of those genera recognized within the *Milla* complex. To understand the taxonomic history of *Milla*, a search in the literature for the original descriptions of each species was conducted, especially for *M. biflora*. A proposal to recognize Milloideae as a subfamily of Asparagaceae was evaluated. However, Brodiaeaceae is recognized by AGP III as valid since it is a conserved name. Foliar anatomy study included more than 55 samples of 19 species, showing that *Bessera* leaf anatomy is unique. The members of *Bessera* share a “q” shape arrangement of metaxylem cells in the vascular bundles, all other members of the complex have a “v” shape arrangement. The depress-obovate shape lamina, as seen in transverse section, followed by elliptic and circular are the most common in the *Milla* complex. *Milla biflora* has all the shapes mentioned except for the obtriangular, which only occurred in three species. Both leaf morphology and anatomy have useful characters to distinguish among species of the complex. Multivariate analyses including 24 morphometric characters revealed that by themselves do not allow to differentiate *M. biflora* s.s. However, some morphometric characters together with the qualitative ones favor the separation of nine species evaluated plus the recognition of 26 new species, which can be recognized by a combination of characters as seen in the key. The Parsimony and Bayesian analyses of the *Milla* complex based on total evidence (ITS (nuclear), *trnL-F* y *psbK-I* (chloroplast) sequences and morphological characters) support the monophyly of five genera (*Bessera*, *Dandya*, *Jaimehintonia*, *Petronymphe* and *Milla*). However, *Dandya* and *Milla* need of a recircumscription because *M. mortoniana* needs to be transfer to *Dandya*. In the monograph a new species is described (*Milla valliflora*) and 26 are segregated from *Milla biflora*.

INTRODUCCIÓN

El género *Milla* está conformado por 11 especies (Gutiérrez y Solano, 2015). Son plantas geofitas, con raíces contráctiles y cormos cubiertos por las bases de las hojas membranáceas; hojas dispuestas en una roseta basal, lineares, aplanadas o rollizas o subrollizas; inflorescencias en pseudoumbelas, flores trímeras, erectas, hipocrateriformes, ovario sostenido por un ginóforo; fruto capsular; semillas negras y brillantes. *Milla* es un género que ha sido clasificado en diferentes familias (Pires y Systma, 2002). Por ejemplo, Fay y Chase (1996) y Kubitzki (2001) lo ubicaron en Themidaceae y recientemente Chase *et al.* (2009) en Asparagaceae. *Milla* junto con otros géneros de Themidaceae (*Bessera*, *Dandya*, *Jaimehintonia* y *Petronymphe*) presentan diferentes niveles de adnación del ginóforo y ovario al tubo floral y tienen una liberación asincrónica de los estambres en diferentes niveles del tubo floral (Gutiérrez *et al.*, 2010).

Moore (1953) clasificó a los géneros del complejo *Milla* con base en la morfología floral y consideró que tubos florales largos, connación entre los filamentos y adnación del ovario al tubo floral, son caracteres avanzados que distinguen al género *Milla*. Análisis filogenéticos apoyados en secuencias de ADN plastidial *rbcL*, *trnL-F*, *ndhF*, *rpl16*, *psbK-psbI*, y de las regiones ITS y ETS del ADN ribosomal del núcleo (Fay y Chase, 1996; Pires y Sytsma, 2002; Gándara *et al.*, 2014) y evidencia total (Pires *et al.*, 2001) han confirmado la monofilia del complejo *Milla*. Sin embargo, esta evidencia molecular también revela que la delimitación y las relaciones entre los géneros y sus especies no están resueltas (Pires *et al.*, 2001; Pires y Sytsma, 2002, Gándara *et al.*, 2009). Gándara *et al.* (2014) sugieren que las relaciones no son aclaradas debido a que en los análisis no se han incluido a la mayoría de las especies. Al incorporar un mayor número de especies e incluir secuencias de ADN

plastidial (*ndhF*, *rpl16K*, *rbcL*, *psbK-I* y *trnL-F*) y nuclear (ITS y ETS), estas autoras señalan que los géneros *sensu* Moore (1953) son polifiléticos. Sin embargo, no indican los caracteres morfológicos que apoyan dichas relaciones filogenéticas.

Por otro lado, *Milla biflora*, especie con amplia distribución geográfica, desde el sur de Estados Unidos de América hasta Honduras, carece de un estudio sistemático que permita establecer su delimitación. Cavanilles (1793) estableció el género *Milla*, pero la única revisión taxonómica fue hecha por Moore (1953), quien reconoció seis especies. Por otra parte, Howard (1999) a partir de una revisión de materiales de herbario determinados como *M. biflora*, separó y describió tres especies nuevas de *Milla* y señaló que *M. biflora* es poliploide y de taxonomía complicada. La descripción reciente de especies nuevas, separadas de *M. biflora sensu* Moore (1953) y la ausencia de un estudio sistemático para delimitar sus especies son las razones que motivaron a la realización de una investigación más amplia, basada en evidencia morfológica y su combinación con caracteres moleculares del núcleo (ITS) y del cloroplasto (*trnL-F* y *psbK-I*), para resolver los límites de *Milla* y delimitar a *M. biflora*. Por lo anterior, se plantearon los siguientes objetivos: 1) conocer la historia taxonómica de *Milla*, 2) identificar los caracteres foliares que permitan diferenciar entre los géneros del complejo *Milla* y sus especies con énfasis en *M. biflora*, 3) poner a prueba la utilidad de los caracteres morfológicos que apoyen la existencia de grupos morfológicos coherentes de las especies de *Milla* y particularmente de *M. biflora s.s.* y 4) evaluar la monofilia de los géneros del complejo *Milla*.

Para cumplir con los objetivos planteados, esta tesis fue dividida en seis capítulos. El Capítulo I presenta una revisión de literatura sobre la historia taxonómica de *Milla*. Esta revisión permitió conocer la situación nomenclatural del género. El Capítulo II incluye la morfología y anatomía foliar, para conocer los caracteres que apoyan la delimitación de los

géneros del complejo *Milla*. El Capítulo III se muestra un análisis morfológico utilizando herramientas de estadística multivariada y análisis de agrupamiento de las especies de *Milla*, con la finalidad de conocer los caracteres que apoyan la delimitación de las especies. El Capítulo IV presenta un análisis filogenético, que fue ejecutado utilizando evidencia morfológica y molecular, para conocer la posición filogenética de *Milla* y sus especies. El Capítulo V muestra la descripción de *Milla valliflora*, especie nueva para la ciencia, resultado del trabajo durante exploración botánica. El Capítulo VI contiene un tratamiento taxonómico con descripciones sucintas de las especies que conforman el género *Milla* s.s., y se describen brevemente 26 especies, que fueron delimitadas mediante el análisis morfológico.

LITERATURA CITADA

- Cavanilles, A. I. 1793. *Icones et descriptiones plantarum que aut sponte in Hispania crescunt, aut in hortis hospitantur*. Vol. 2. Madrid.
- Chase, M.W., Reveal, J.L. y Fay, M.F. 2009. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae: APG III Botanical Journal of the Linnean Society 161:132-136.
- Fay, M.F. y Chase, M.W. 1996. Resurrection of Themidaceae for the *Brodiea* alliance, and recircumscription of Alliaceae, Amaryllidaceae and Agapanthoideae. Taxon 45:441-451.
- Gándara, E., Specht, C.D. y Sosa, V. 2014. Origin and diversification of the *Milla* clade (Brodiaeoideae, Asparagaceae): A Neotropical group of six geophytic genera. Molecular Phylogenetics and Evolution 75:118-125.
- Gándara, E., Sosa, V. y León de la Luz, J.L. 2009. Morphological and molecular evidence in the delimitation of *Bheria* and *Bessera*, two genera of the *Milla* complex (Themidaceae). Boletín de la Sociedad Botánica de México 85:113-124.
- Gutiérrez, J. y Solano, E. 2015. *Milla valliflora* (Themidaceae), a new species from southern Mexico. Brittonia 67:43-47.
- Gutiérrez, J., Terrazas, T., Hernández, L. y Martínez-Cabrera, D. 2010. Anatomía floral de los géneros del complejo *Milla* (Themidaceae). Boletín de la Sociedad Botánica de México 87:1-12.
- Howard, T.M. 1999. Three new *Milla* species from Mexico. Herbertia 54:232-237.
- Kubitzki, K. 1998. The families and genera of vascular plants. Vol. III: Flowering plants. Monocotyledons. Liliae (except Orchidaceae). Berlin, Springer.

- Moore, H.E. 1953. The genus *Milla* (Amaryllidaceae-Allieae) and its allies. *Gentes Herbarum* 8:262-262.
- Pires, J.C. y Sytsma, K.J. 2002. A phylogenetic evaluation of a biosystematics framework: *Brodiaea* and related petaloid monocots (Themidaceae). *American Journal of Botany* 89:1342-1359.
- Pires, J.C., Fay, M.F., Davis, W.S., Hufford, L., Rova, J., Chase, M.W. y Sytsma, K.J. 2001. Molecular and morphological phylogenetic analyses of Themidaceae (Asparagales). *Kew Bulletin* 56:60-626.

CAPÍTULO I

Historia taxonómica de *Milla* (Themidaceae)

Historia taxonómica de *Milla* (Themidaceae)

Milla Cav. comprende 11 especies, se distribuye desde el sur de Estados Unidos de América hasta Honduras (Gutiérrez y Solano, 2015). Junto con *Bessera* Schult. f., *Dandya* H.E. Moore, *Jaimehintonia* B.L. Turner y *Petronymphe* H.E. Moore, constituyen el clado *Milla* (Pires y Sytsma, 2002). Son plantas geofitas, con raíces contráctiles y cormos cubiertos por las bases de las hojas membranáceas; hojas dispuestas en una roseta basal, lineares, aplanadas o rollizas o subrollizas; inflorescencias en pseudoumbelas, flores trímeras, erectas, hipocrateriformes, ovario sostenido por un ginóforo; fruto capsular; semillas negras y brillantes. (Moore, 1953; Gutiérrez *et al.*, 2015).

El género *Milla* fue establecido por A.I. Cavanilles en 1793, con una sola especie *Milla biflora*, a partir de plantas cultivados en el Real Jardín Botánico de Madrid (McVaugh, 1977), previamente enviados del antiguo Imperio Mexicano por Sessé y Mociño, durante la Real Expedición Botánica en la Nueva España (1787-1803). Sessé y Mociño reconocieron a *M. biflora* como *Bulbocodium stellatum* (McVaugh, 1977). Sin embargo, este nombre no fue reconocido por Cavanilles, debido a que Linneo (1753) ya había asignado el nombre *Bulbocodium* L. a otras monocotiledóneas con distribución en Europa y Norteamérica. Actualmente *Bulbocodium* se ubica en Colchicaceae (APG III, 2009). Después de su publicación, *Milla* ha sido considerado en diferentes géneros y familias.

Willdenow (1799) desconoció a *Milla biflora* Cav. y propuso la combinación *Millea biflora* Willd. Este último nombre no fue validado, por publicarse seis años después de que Cavanilles clasificó a *Milla biflora* Knowles & Westc. ex Loudon en la clase Hexandria, Orden Monoginia y posiblemente es producto de un error ortográfico. Sin mencionar la razón, Knowles y Westcott (1839) propusieron la combinación *Gyrenia biflora*, y Rafinesque (1836) transfirió *Milla* a *Askolame* Raf. Schauer (1847) describió *Diphalangium graminifolium* S. Schauer a partir de plantas

procedentes de México, por las características morfológicas del tipo, estas plantas corresponden con *Milla biflora*, razón por la que en este trabajo se considera un sinónimo.

Milla fue ubicado por Cavanilles (1793) en la clase Hexandria, orden Monoginia (Linneaus,1753). Baker (1871) incluyó a *Milla* en Liliaceae y la reconoció en la tribu Milleae Baker. Esta clasificación fue utilizada por Bentham y Hooker (1883), Melchior (1964), Cronquist (1981) y Thorne (1992). Con base en la inflorescencia en umbela y sin considerar la posición del ovario, Hutchinson (1959) ubicó a *Milla* en Amaryllidaceae; mientras que Takhtajan (1980) y Dahlgren *et al.* (1985) ubicaron a *Milla* en Alliaceae, subfamilia Allioideae Herb., que reconocieron las tribus *Allieae* Dumort. y *Brodiaeeae* Nakai. Esta última publicada por Nakai (1943), 73 años después que Baker (1871) publicó la tribu *Milleae*. Fay y Chase (1996) con evidencias moleculares del gen del cloroplasto *rbcL*, elevaron *Brodiaeeae* a la categoría de familia y la nombraron Themidaceae Salisb., al reconocer a *Themis* Salisb., que Salisbury (1866) describió en la clase Loratae, orden Themideae.

Themis ixioides Salisb., actualmente *Triteleia ixioides* (Salisb.) Greene, fue descrita a partir de individuos cultivados en el Real Jardín Botánico de Kew, procedentes de California, Estados Unidos de América. Estos materiales fueron nombrados originalmente por Aiton (1811) como *Ornithogalum ixioides*; nombre no válido, debido a que Linneo (1753) lo había empleado para designar plantas con distribución en América del norte y Eurasia que son miembros de Asparagaceae, subfamilia Scilloideae, antes Hyacinthaceae (APG III, 2009).

Sims (1823) transfirió *Ornithogalum ixioides* Aiton, al género *Brodiaea* Sm, publicando la combinación *B. ixioides* por considerar que compartía características morfológicas de los nectarios florales con otras especies del género. Lindley (1833) propuso la combinación *Calliprora lutea* Lindl., sinónimo de *Brodiaea ixioides*, diferenciándola por el pistilo ensanchado en su base y el número de estambres fértiles. Baker (1871) al hacer la revisión de los géneros y especies herbáceas, capsulares y gamófilas de Liliaceae, publica la combinación *Milla ixioides* Baker.

Watson (1879) hizo una revisión de Liliaceae de Norteamérica, con base en la disposición de los estambres en una serie, filamentos deltoides, anteras versátiles y segmentos del perianto dos veces más largos que el tubo. Recircunscribe a *Milla ixioides* y reconoce nuevamente la combinación *Brodiaea ixioides*. Greene en 1886 publicó la combinación *Triteleia ixioides*, caracterizada por la presencia de un tubo corto, segmentos del perianto rotados, filamentos ensanchados en su base, unidos por debajo del tubo y libres en la parte superior.

Actualmente *Triteleia ixioides* se mantiene (Fay y Chase, 1996; Pires et al., 2001; Pires y Sytsma, 2002). Sin embargo, después de la propuesta de Greene (1886), *T. ixioides* a presentado otros cambios nomenclaturales, entre estos, Kuntze (1891) transfirió al género *Hookera* salisb. y publicó la combinación *H. ixioides* Kuntze. En 1984 Greene considera al género *Calliphora* y transfiere a esta especie como *C. ixioides* Greene. Finalmente, Morton (1941) publica a *Brodiaea lutea* (Lindl.) Mort. como sinónimo de *C. ixioides*.

Los géneros que actualmente conforman Asparagaceae: Brodiaeoideae, (APG III, 2009) también tienen una compleja historia taxonómica. *Milla* es el género más antiguo (Cuadro 1). En 1871 Baker establece la tribu *Milleae* y de manera implícita, el nombre deriva de *Milla*, quedando como género tipo. En esta tribu, también incluyó a *Androstephium* Torrey, *Bessera* Schult f., *Brodiaea* Sm. y *Milla*, géneros actualmente reconocidos como miembros de Brodiaeoideae (Chase et al., 2009). *Milla* es el género más antiguo y tipo de la tribu Milleae. Sin embargo, las clasificaciones más recientes han optado por usar Brodiaeoideae con base en la tribu Brodiaeae por considerarlo un nombre conservado (Chase et al., 2009, Reveal, 2012).

Cuadro 1. Géneros que conforman actualmente la subfamilia Brodiaeoideae (Asparagaceae) y fecha de publicación. La clasificación se basa en la propuesta de dos complejos (Moore, 1953), *Género no conocido por Moore (1953).

Complejo <i>Milla</i>	Complejo <i>Brodiaea</i>
<i>Milla</i> Cav., 1793	<i>Brodiaea</i> Sm., 1810
<i>Bessera</i> Schult f., 1829	<i>Triteleia</i> Douglas ex Lind., 1830
<i>Petronymphe</i> H. E. Moore, 1951	<i>Dichelosthema</i> Kunt, 1843
<i>Dandya</i> H. E. Moore, 1953	<i>Androsthepium</i> Torrey, 1859
* <i>Jaimehintonia</i> Turner, 1993	<i>Bloomeria</i> Kellogg, 1863
	<i>Muilla</i> S. Watson, 1879
	<i>Triteleiopsis</i> Hoover, 1941

Literatura citada

- Aiton, W.T. 1811. Hortus Kewensis, ed. 2, 2. London.
- Chase, M.W., Reveal, J.L. y Fay, M.F. 2009. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae: APG III. Botanical Journal of the Linnean Society 161:132-136.
- Baker, J.G. 1871. Revision of the genera and species of herbaceous capsular gamophyllous Liliaceae. Journal of the Linnean Society of London, Botany 11: 383.
- Bentham, G. y Hooker J.D. 1883. Genera plantarum. London. Vol. 3, pt. 2
- Cavanilles, A. I. 1793. Icones et descriptiones plantarum que aut sponte in Hispania crescunt, aut in hortis hospitantur. Madrid. Vol. 2.
- Cronquist, A. 1988. The evolution and classification of flowering plants. ed 2. New York Botanical Garden, New York.
- Dahlgren, R.M.T. y Yeo P.F. 1985. The families of monocotyledons, structure, evolution, and taxonomy. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Fay, M.F. y Chase, M.W. 1996. Resurrection of Themidaceae for the *Brodiea* alliance, and recircumscription of Alliaceae, Amaryllidaceae and Agapanthoideae. Taxon 45:441-451.
- Galván, R. 2001. Alliaceae. En: Rzedowski, J y G. C. Rzedowski. (Ed.). Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología, Centro Regional del Bajío, Pátzcuaro, Michoacán., Comisión Nacional para Conocimiento y Uso y de la Biodiversidad. D. F. 152-154 p.
- Greene, E.L. 1886. Studies in the botany of California and parts adjacent I. Some genera which have been confused with the name Brodiaea. Bulletin of the California Academy of Sciences 2: 142.
- Greene, E.L. 1894. Manual of the botany of the region of San Francisco Bay. Cury & Company San Francisco.

- Hutchinson, J. 1959. The families of flowering plants, Volume 1: 23. Clarendon Press, Oxford.
- Kim, J.H., Kim, D.K., Forest, F., Fay, M.F. y Chase, M.W. 2010. Molecular phylogenetics of *Ruscaceae sensu lato* and related families (Asparagales) based on plastid and nuclear DNA sequences. *Annals of Botany* 106:775-790.
- Knoeles, G.B. y Westcott, F. 1839. Loudon's Hortus Britannicus: a catalogue of all the plants indigenous, cultivated in, or introduced to Britain. Part I. The Linnaean arrangement: part II. The Jussieuean arrangement./ 3rd ed. J.C. Loudon (ed.). London.
- Kubitzki, K. 1998. The families and genera of vascular plants. Vol. III: Flowering plants. Monocotyledons. Liliaceae (except Orchidaceae). Springer, Berlin.
- Kunze, O. 1891. Revisio generum plantarum: vascularium omnium atque cellularium multarum secundum leges nomenclaturae internationales cum enumeratione plantarum exoticarum in itinere mundi collectarum. Pt 2. London.
- Lindley, J. 1833. Edwards's botanical register; or, Flower Garden and Shrubbery. James Ridgway and Sons. London.
- Linnaeus, C. 1753. Species plantarum. Tomo I. Impensis G. C. N. Stockholm.
- Melchior, H. 1964. A. Engler's syllabus der pflanzenfamilien 12. Aufl., vol. 2. Borntraeger, Berlin.
- Meerow, A.W., Fay, M.F., Guy, C.L., Li, Q., Zaman, F.Q. y Chase, M.W. 1999. Systematics of Amaryllidaceae based on cladistic analysis of plastid *rbcL* and *trnL-F* sequence data. *American Journal of Botany* 86:1325-1345.
- Moore, H.E. 1953. The genus *Milla* (Amaryllidaceae-Allieae) and its allies. *Gentes Herbarum* 8:262-262.
- Morton, C.V. 1941. *Herbertia* [American Plant Life Society] 7: 81.

- Pires, J.C., Fay, M. F., Davis, W.S., Hufford, L., Rova, J., Chase, M.W. y Sytsma, K.J. 2001. Molecular and morphological phylogenetic analyses of Themidaceae (Asparagales). Kew Bulletin 56:60-626.
- Pires, J.C. y Sytsma, K.J. 2002. A phylogenetic evaluation of a biosystematics framework: *Brodiaea* and related petaloid monocots (Themidaceae). American Journal of Botany 89:1342-1359.
- Rafinesque, C. S. 1836. A life of travels and researches in North America and South Europe. Published by the author, Philadelphia. [Reprinted in Chronica Botanica (8: 298-353. 1944) with an introduction by E. D. Merrill.]
- Rudall, P.J. 2002. Homologies of inferior ovaries and septal nectaries in monocotyledons. International Journal of Plant Sciences 163:261-276.
- Reveal, J.L. 2012. An outline of a classification scheme for extant flowering plants. Phytoneuron 37:1-221.
- Salisbury, R.A. 1866. The genera of plants: a fragment containing part of Liriogamae. John van Vorst, London.
- Sims, J. 1823. *Brodiaea ixioides* p. 2382. In. Curtis, W. [1746-1799]. Botanical Magazine. Royal Botanic Gardens, Kew. vol. 1. London.
- Schauer, S. 1847. Linnaea; Ein Journal für die Botanik in ihrem ganzen Umfange. Halle. Berlin.
- Smith, J. E. 1810. Characters of a new Liliaceous genus called *Brodiaea*. Transactions of the Linnean Society 10:1-5.
- Takhtajan, A. 1980. Outline of the classification of flowering plants (Magnoliophyta). Botanical Review 46:225-359.
- Thorne, R.F. 1992. Classification and geography of the flowering plants. Botanical Review 58:225-348.

Watson, S. 1879. Revision of the North American Liliaceae. Bulletin of the California Academy of Sciences 14:213-303.

Willdenow, C.L. 1799. Species plantarum. II. 62. Nauk G.C. Berlin.

CAPÍTULO II

Morfología y anatomía foliar de los géneros del complejo

Milla (Themidaceae)



Anatomía

Morfología y anatomía foliar de los géneros del complejo Milla (Themidaceae)

Foliar morphology and anatomy of genera in the Milla complex (Themidaceae)

Jorge Gutiérrez^{a,b}, Jesús Salgado^b, Dalia Grego-Valencia^{a,c} y Teresa Terrazas^{a,*}

^a Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado postal 70-153, 04510 México, D. F., México

^b Facultad de Estudios Superiores de Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado postal 9-020, 09230 México, D. F., México

^c Unidad de Morfología y Función, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. de los Barrios Núm. 1, Los Reyes Iztacala, 54090 Tlalnepantla, Edo. de México, México

Recibido el 11 de julio de 2014; aceptado el 16 de marzo de 2015

Disponible en Internet el 19 de agosto de 2015

Resumen

Se estudió la morfología y la anatomía foliar de los géneros del complejo Milla (Themidaceae) con el objetivo de identificar los caracteres foliares que permitan diferenciar entre los géneros y sus especies con énfasis en *Milla biflora*. Las muestras procedentes de campo y de herbario se procesaron a través de la microtecnia de inclusión en parafina. Las hojas son lineares, principalmente rollizas y subrollizas, excepto en *Dandya balsensis*, *D. thadhowardii* y *Petronymphe* que son triangulares y en algunas poblaciones de *M. biflora* son planas. El perfil de la lámina, visto en corte transversal, en general tiene forma dePRESA obovada, excepto en 3 especies, en que es obtriangular. El metaxilema en forma de "t" es un estado de carácter exclusivo de *Bessera* que permite diferenciarlo de los otros géneros que tienen metaxilema en forma "v". No se encontraron caracteres exclusivos para el resto de los géneros del complejo. Con excepción de las especies *D. hanniballi*, *M. mexicana* y *M. potosina* y *M. biflora*, el mesofilo hueco es común en el resto de las especies en los diferentes géneros del complejo. La anatomía de la hoja permite reconocer, basándose en una combinación única de caracteres, a algunas especies de los diferentes géneros.

Derechos Reservados © 2015 Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons CC BY-NC-ND 4.0.

Palabras clave: Asparagales; Haz vascular; Fistuloso; Prominencias; Rolliza

Abstract

The aims of this study were to describe and compare foliar morphology and anatomy of the Milla complex genera (Themidaceae), in order to identify the foliar features that allow differentiating them. In addition, foliar variation was compared among genera and species with emphasis in *Milla biflora*. Field and herbarium samples were prepared with the paraffin microtechnique. Leaves are linear, mainly terete or subterete, except for *Dandya balsensis*, *D. thadhowardii* and *Petronymphe* with triangular shape and for some populations of *M. biflora* with flat shape. The lamina, seen in transverse section, has a depress-obovate shape, but 3 species have obtriangular. Metaxylem in a "t" shape is unique of *Bessera* and allows differentiating *Bessera* from the other genera with metaxylem in a "v" shape. Unique characters for the remainder genera of the complex were not found. With the exception of *D. hanniballi*, *M. mexicana*, *M. potosina*, and *M. biflora* mesophyll has a hollow in the other species of the Milla complex. Foliar anatomy allows to recognizing some species based make it a unique combination of characters.

All Rights Reserved © 2015 Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. This is an open access item distributed under the Creative Commons CC License BY-NC-ND 4.0.

Keywords: Asparagales; Vascular bundle; Epidermal Protuberance; Terete

Introducción

Los géneros *Bessera*, *Dandya*, *Milla*, *Jaimehintonia* y *Petronymphe* conforman el complejo Milla y junto con el complejo Brodiaea constituyen a la familia Themidaceae (Fay y

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: terrazas@ib.unam.mx (T. Terrazas).

La revisión por pares es responsabilidad de la Universidad Nacional Autónoma de México.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rmb.2015.06.008>

1870-3453/Derechos Reservados © 2015 Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons CC BY-NC-ND 4.0.

Chase, 1996; Pires et al., 2001; Pires y Sytsma, 2002). De los géneros del complejo en estudio, Milla es el que tiene un mayor número de especies, 10, algunas de ellas segregadas a partir de *M. biflora* Cav. (Gutiérrez y Solano, 2015; Howard, 1999; Ravenna, 1971), para *Bessera* se reconocen 3, para *Dandya* 4, y *Jaimehintonia* y *Petronymphe* son monotípicos. Los géneros del complejo Milla se caracterizan por ser hierbas geófitas con los cormos cubiertos por las bases membranosas de las hojas, las inflorescencias en forma de umbela con múltiples brácteas en la base y el ovario estipitado con el ginóforo adnado al tubo del perianto (Fay y Chase, 1996; Moore, 1953). Además, Moore diferenció los géneros del grupo por la forma del perianto, la longitud de los filamentos respecto al tamaño de la antera, la connación de los filamentos y el tamaño del ginóforo (Moore, 1953).

Algunos autores estudiaron a los representantes del complejo Milla para tratar de establecer sus relaciones filogenéticas (Fay y Chase, 1996; Gándara, Sosa y León de la Luz, 2009; Gándara, Specht y Sosa, 2014; Pires et al., 2001; Pires y Sytsma, 2002), sin que hasta el momento sean claras y de acuerdo con Gándara et al. (2014), los géneros no se recuperan. Un problema recurrente es la diferente interpretación en la morfología floral para algunos géneros del complejo (Gutiérrez, Terrazas, Hernández y Martínez-Cabrera, 2010). Por ejemplo, Lenz (1971) y Turner (1993) mencionan que existe connación de los estambres en los géneros del complejo Milla, pero solo se presenta dicha connación en las especies de *Bessera* (Gutiérrez et al., 2010). Ni la morfología ni la anatomía foliar se han evaluado con el fin de conocer su utilidad en la delimitación de los géneros y de las especies de este complejo.

La anatomía foliar proporciona caracteres en la sistemática de las plantas vasculares (Anderson y Creech, 1975; Gennaro, Pozner y Morrone, 2010; Goldblatt, Rudall y Henrich, 1990; Johnson, 1980; Kocsis, Darok y Borhidi, 2004; Mota-Alves, Scatena y Trovó, 2013; Rudall y Mathew, 1990; Rudall, 1991; Solano, Terrazas y González-Becerril, 2014). Esta fuente de datos apoya el reconocimiento de grupos a diferentes niveles taxonómicos en monocotiledóneas. Así, en Hyacinthaceae, Lynch, Rudall y Cutler, 2006 reconocen subfamilias, Tanker y Kurucu (1981) apoyan la delimitación de las secciones del género *Allium*, y otros autores (Brullo, Pavone y Spampinato, 1989; Ceja-Romero, Espejo-Serna y López-Ferrari, 2009; Echevarría, Morilla y Serrano, 1988; Membries, Pedrola-Monfort y Cuajapé-Castells, 2003) apoyan el reconocimiento de especies nuevas. Según lo anteriormente señalado, este estudio tuvo como objetivos describir la morfología y la anatomía foliar de los géneros del complejo Milla e identificar los caracteres foliar que permitan diferenciar entre los géneros y sus especies; así como evaluar la variación de *M. biflora*.

Materiales y métodos

En campo se recolectaron 19 especies de los 5 géneros del complejo Milla, poniendo énfasis en los representantes de *M. biflora*, especie de amplia distribución en la República Mexicana (Anexo). En cada localidad se recolectaron 3 individuos por especie, junto con los ejemplares de respaldo correspondientes que fueron depositados en los herbarios MEXU y FEZA

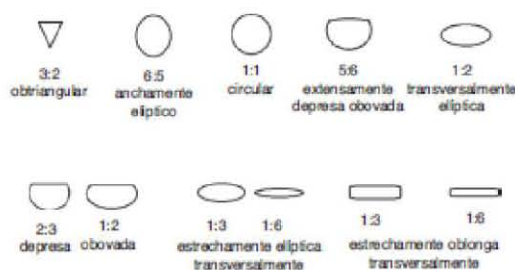


Figura 1. Forma geométrica de las hojas en sección transversal de los géneros y especies del complejo Milla. Tomadas y modificadas de Radford et al. (1974). Los números indican la proporción longitud-anchura de la lámina.

(Holmgren, Holmgren y Barnett, 1990). Únicamente *M. delicata* H. E. Moore no fue localizada en campo, ni tampoco se pudo obtener material de ejemplares de herbario. Los individuos completos colectados en campo se fijaron en formalina-ácido acético-etanol (Ruzin, 1999). Una hoja de cada individuo se disectó, y de su tercio medio, del cual se separó un fragmento de 1 cm aproximadamente, se deshidrató en un cambiador automático Leica (TP1020) con alcohol ter-butílico (20 a 100%) y se incluyó en parafina con punto de fusión de 56 °C. Para 2 especies de *B. tenuiflora* (Greene) J. F. Macbr. y *M. mertoniana* H. E. Moore se extrajo una fracción de la lámina del tercio medio de un ejemplar de herbario (Anexo) y se procesó de forma similar a lo señalado anteriormente. Una vez incluidas las láminas foliares se realizaron cortes transversales de un grosor de 10–12 µm con un microtomo rotatorio (Leica RM2125RT), se tñieron con safranina y verde rápido (Ruzin, 1999) y se montaron en resina sintética. La morfología de la hoja se describió según Moore (1953). La forma del perfil de la hoja, visto en corte transversal, se adaptó de la propuesta de Radford, Dickinson, Massey y Bell (1974) para figuras planas (fig. 1), vistas en cortes transversales. Los tejidos de la lámina foliar se describieron de acuerdo con Lynch, Rudall y Cutler (2006).

Resultados

Se presenta una descripción morfológica y anatómica de la hoja para los géneros del complejo Milla. Los nombres de los géneros o especies se mencionan solamente en los casos donde existe variación intragénica e interespecífica.

Morfología

Las hojas son lineares, mayormente rollizas y subrollizas, en *D. balsensis*, *D. thadhowardii* y *P. decora* triangulares (fig. 2), y en *M. biflora* aplanadas (poblaciones 846, 902). La base de la lámina es aplanada e incolora, el ápice de la lámina es agudo en la mayoría de las especies, excepto en *M. magnífica*, *M. mexicana* y algunas poblaciones de *B. elegans* en las que es obtuso, el margen es entero, excepto en *M. bryani*, *M. rosea*, *M. oaxacana* y algunas poblaciones de *M. biflora* (896, 898, 988) en las que es involuto. *D. balsensis*, *D. thadhowardii* y *P. decora* presentan una quilla abaxial. La longitud de la lámina va de 50 cm en *M. filifolia* y

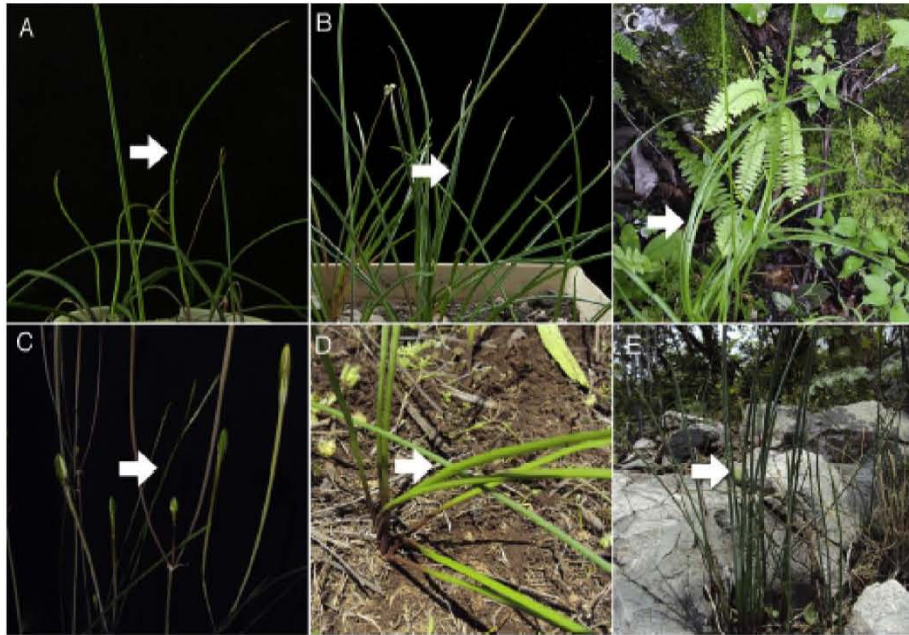


Figura 2. Hojas del complejo Milla. A) *Bessera elegans* (J. Gutiérrez et al., 1253) suberectas; B) *Dandya thadhowardii* (Gutiérrez 844) triangulares quilladas; C) *Petromyphre decora* (J. Gutiérrez y R. Ríos 1350) triangulares quilladas; D) *Milla oaxacana* (J. Gutiérrez et al., 1193) subrollizas; E) *Milla biflora* (Gutiérrez 1165) rollizas; F) *Milla magnifica* (J. Gutiérrez e I. Escalante 812) erectas subrollizas.

M. biflora (1388) hasta 100 cm en *M. magnifica*. El diámetro de las hojas rollizas fluctúa entre 1 mm en *M. filifolia* y 24 mm en *M. magnifica*. Las especies con lámina triangular o aplanada tienen una anchura que va de 2-3 mm en *D. thadhowardii* hasta 4 mm en *P. decora*. El número de hojas por planta varía entre una en *B. elegans* y 7 en *M. rosea*. En general la lámina está postrada, y en ocasiones erecta antes de antesis o decumbente en algunas poblaciones de *M. biflora* (1156, 1257, 1344) (fig. 2). La lámina es glabra, con denticulaciones sobre los nervios excepto en algunas especies de *Milla* (*M. filifolia*, *M. magnifica* y una población de *M. biflora* 1196) donde la superficie es lisa.

Anatomía

El perfil de la lámina en sección transversal varía (tablas 1 y 2; fig. 3A-D), y predomina la forma deprimida obovada, seguida de la transversalmente elíptica y la circular. *P. decora* y 2 especies de *Dandya* se distinguen por su forma obtriangular (fig. 3B y 3E), mientras que *M. biflora* presenta todas las formas descritas para los otros géneros del complejo, excepto la obtriangular (tabla 2). La cutícula es estriada y delgada (< 1.5 µm) en todos los materiales examinados. La epidermis es simple, y sus células vistas en sección transversal tienen forma cuadrada o rectangular con la pared anticlinal más larga (fig. 4A-C). En algunos puntos de la epidermis se observan 3 células que provocan un levantamiento debido a la elevación de la célula central que forma una protuberancia (figs. 3A, 3C, 3E, 4A y 4B) excepto en

algunas especies de *Milla* (*M. filifolia* y *M. magnifica*) y algunas poblaciones de *M. biflora* en las que la epidermis es uniforme. Estas protuberancias en general se asocian a los haces vasculares y son conspicuas debido al alargamiento de la célula central (fig. 4A y 4B), la cual se clasifica en corta (< 50 µm), larga (50-100 µm) y muy larga (> 100 µm). La pared periclinal externa de la epidermis es delgada o engrosada, las anticlinales generalmente delgadas, excepto en *Bessera* que tiene todas las paredes gruesas (fig. 4C). Cuando la pared es gruesa, esta siempre es de naturaleza celulósica. Los estomas se ubican en las células epidérmicas ordinarias, con prolongaciones anteriores y posteriores (fig. 4D), y vistos en superficie son paracíticos. El mesofilo es bifacial. El parénquima en empalizada es uniestratificado, con células uniformes excepto en *D. balsensis*, *D. thadhowardii* y *P. decora*, en que son más cortas en la cara abaxial. El parénquima esponjoso es compacto con células de menor a mayor tamaño hacia el centro de la hoja y de forma isodiamétrica. La parte más interna del mesofilo se colapsa o hay lisis celular y se forma un hueco (figs. 3A, 3B, 3C y 3F) excepto en 3 especies de *Dandya* (*D. balsensis*, *D. hannibalii* y *D. thadhowardii*), 3 especies de *Milla* (*M. mexicana*, *M. mertoniana* y *M. potosina*) y algunas poblaciones de *M. biflora* (fig. 3D y 3E). El mesofilo de todas las especies contiene rafidios dispersos (fig. 4E). Los haces vasculares son colaterales y se localizan subyacentes al parénquima en empalizada, se alternan grandes y pequeños, y se disponen en una fila o formando un anillo en las hojas rollizas (fig. 3). El número de haces vasculares es variable dentro y entre

Tabla 1
Características anatómicas de la hoja de los géneros del complejo *Milla*. Forma de la hoja en sección transversal.

Género/carácter	<i>Bessera</i> (3 spp.)	<i>Dandya</i> (4 spp.)	<i>Milla</i> (10 spp.)	<i>Jaimehintonia</i> (1 sp.)	<i>Petromyphie</i> (1 sp.)
Forma del perfil	C, TE, DO	OT, TE, DO	C, TE, AE, DO, EDO, EET, EOT	DO	OT
Margen involuto	Ausente	Ausente	Presente, Ausente	Ausente	Ausente
Prominencias	Presente	Presente	Presente, Ausente	Presente	Presente
Forma células epidérmicas	r	r	r, Cu	Cu	r
Número de haces vasculares	12-20	8-12	6-38	12	12
Número de fibras asociadas al haz vascular	4-13	7, 9,15	7-37	6-7	5-8
Grosor de la pared, fibras	Delgadas y gruesas	Delgadas y gruesas	Delgadas y gruesas	Delgadas	Delgadas
Estratos de parénquima esponjoso	3-4	3-16	3-17	3-4	5-8
Mesofilo	Hueco	Hueco, sólido	Hueco, sólido	Hueco	Hueco

AE: anchamiento-elíptica; C: circular; Cu: cuadradas; DO: depresa-obovada; EDO: extensamente-depresa-obovada; EET: estrechamente-elíptica-transversalmente; EOT: estrechamente-oblonga-transversalmente; OT: obtriangular; r: rectangulares; TE: transversalmente-elíptica; TO: transversalmente-oblonga.

Tabla 2
Características anatómicas de la hoja de 10 especies del género *Milla*.

Especie/carácter	Distribución geográfica en México	FHST	NSP	FCE	NHV	NFV	GCF	M
<i>M. bryani</i>	Coah.	C	16	Cu	16	8-12	D	H
<i>M. filifolia</i>	Mor.	C	0	r	10	16	G	H
<i>M. magnífica</i>	Edo. de Méx., Gro.	DO	0	r	36-40	16-26	G	H
<i>M. mexicana</i>	Pue.	TE	12-14	r	14	16-20	G	S
<i>M. mortoniana</i>	Mich.	DO	10	r	8	4-10	G	S
<i>M. oaxacana</i>	Oax.	DO	14	r	18-20	8-12	D	H
<i>M. potosina</i>	S.L.P.	DO	5	r	12	8-10	D	S
<i>M. rosea</i>	N.L.	AE	7	Cu	10-12	10-12	D	H
<i>M. valliflora</i>	Oax., Pue.	C	6	r	6	6-10	G	H
<i>M. biflora</i>	Qro. (1130), Gto (1129), Edo. de Méx. (1131, 1139, 1149, 1361, 1362), D.F. (1195), Pue. (1254, 1255, 1263), Ver. (1304)	DO	8-10	r	12	25-30	G	H
a) <i>M. biflora</i>	Edo. de Mex. (1340), Gto. (1124, 1127, 1253-A), Hgo. (1165), Jal. (S/N Cast), Nay. (1388), Oax. (1336), Qro. (1196), S.L.P. (1210), Zac. (1400)	C, AE, TE, DO, EET, EDO, EOT	8-12	r	6-12	8-24	D,G	H
b) <i>M. biflora</i>	Chih. (809), Chis. (978), Mor. (1135, 1138), Nay. (1391, 1394, 1394, 1399), Oax. (1271, 1173, 1315, 1316, 1336, 1356, 1357) Pue. (1256, 1257, 1267, 1274, 1275, 1276, 1268), Zac (1401-1407).	C, AE, TE, DO, EET, EDO, EOT	0-30	Cu, r	6-20	8-34	D,G	H,S
c) <i>M. biflora</i>	Gro. (1176, 1344), Oax. (1154, 1162)	AE, TE, DO	12-30	r	12-16,	20-34	D,G	H

a) *M. biflora* = prominencias cortas (<50 μm); b) *M. biflora* = prominencias largas (50-100 μm); c) *M. biflora* = prominencias muy largas (>100 μm).
AE: anchamiento-elíptica; C: circular; Cu: cuadradas; D: delgada; DO: depresa-obovada; EDO: extensamente-depresa-obovada; EET: estrechamente-elíptica-transversalmente; EOT: estrechamente-oblonga-transversalmente; EPE: estratos de parénquima esponjoso; FCE: forma de las células epidérmicas; FHST: forma de la hoja en sección transversal; G: gruesa; GCF: grosor de la pared celular de la fibras; H: hueco; M: mesofilo; NFV: número de fibras asociadas al haz vascular; NHV: número haces vasculares; NSP: número de series de prominencias; r: rectangulares anticlinalmente; S: sólido; TE: transversalmente-elíptica.

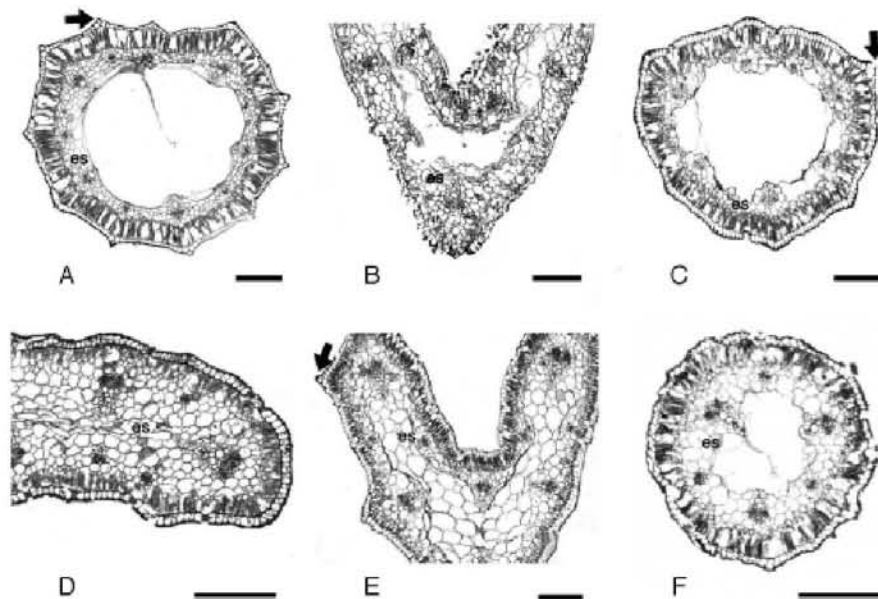


Figura 3. Perfil de la lámina foliar de los géneros del complejo Milla, visto en sección transversal. A) *Bessera tuitensis* (J. Gutiérrez et al., 1252) depresso-obovado; B) *Petronymphe decora* (Gutiérrez y R. Ríos 1350) obtriangular; C) *Milla biflora* (Castillejo s.n.) depresso-obovado; D) *Milla biflora* (J. Gutiérrez 1138) estrechamente-oblonga-transversalmente; E) *Dandya thadhowardii* (J. Gutiérrez 841) obtriangular; F) *Milla biflora* (J. Gutiérrez 1196) circular. Escala 300 μ m. es: esponjoso; flechas: protuberancias.

géneros (tabla 1) y las especies de *Milla* muestran los extremos de la variación registrada (tabla 2). El metaxilema se dispone en forma de "t" en las especies de *Bessera* o de "v" en el resto de los taxa (fig. 4F y 4G) y el floema tiene tubos cribosos y células acompañantes muy pequeños comparados con los elementos del metaxilema (fig. 4H). El esclerénquima está conformado por paquetes de fibras que se ubican exclusivamente sobre el floema, con número y grosor variables. La mayoría de los materiales presentan pocas fibras (<15) con pared delgada o gruesa, *Milla* comúnmente tiene mayor abundancia de éstas (>20) y con paredes más gruesas (tablas 1 y 2; fig. 4I).

Discusión

Con esta investigación se confirma que las hojas en los géneros del complejo Milla son lineares, pero varían en la forma tridimensional: rolliza, subrolliza, plana o triangular. Éstas 2 últimas se describieron previamente (Howard, 1999; Moore, 1953). Las formas de la lámina señaladas son comunes en diversos géneros de Asparagales (Blunden, Yi y Jewers, 1973; Lynch et al., 2006; Sandoval-Zapotilla, García-Cruz, Terrazas y Villaseñor, 2010; Tanker y Kurucu, 1981). Así, en Hyacinthaceae las hojas son rollizas, subrollizas y aplanadas. En Agavaceae y Orchidaceae con frecuencia son aplanadas, mientras que en Iridaceae son aplanadas, cuadradas, plegadas, conduplicadas o rollizas (Rudall, 1991) y en Alliaceae, familia donde previamente se había clasificado a *Milla*, son aplanadas, rollizas y subrollizas (Dahlgren, Clifford y Yeo, 1985). De las

4 formas de la lámina descritas para los géneros del complejo Milla, las hojas rollizas y subrollizas muestran amplia variación; no obstante, mediante la forma del perfil, visto en corte transversal, se distinguen grupos bien definidos. Así, las hojas rollizas se clasifican como circulares (*M. filifolia*) o anchamente elípticas (*M. rosea*), mientras que las subteretes se clasifican como extensamente-depressa-obovada (poblaciones de *M. biflora* S/N Castillejos, 1388, 1400, 1405), transversalmente-elíptica (*B. elegans* 1386, 1252, *D. hannibalii*, *M. biflora* 1176, 1257, 1399, 1407 y *M. mexicana*), depresso-obovada (*B. elegans* 802, *B. tuitensis*, *D. purpusii*, *Jaimehintonia*, *M. magnifica*, *M. oaxacana*, *M. potosina* y poblaciones de *M. biflora* 1129, 1130, 1165, 1391, 1400, 1254, 1263) y estrechamente-elíptica-transversalmente (poblaciones de *M. biflora* 1240, 1253, 1257, 1357). En este sentido la separación en diferentes estados de carácter del perfil de la hoja ofrece información adicional importante.

En los géneros del complejo Milla la epidermis es simple, similar a la de otros géneros de Asparagales (Lynch et al., 2006; Rudall, 1991); además, es habitual la presencia de protuberancias en la superficie de la epidermis, que se registran solamente en algunas especies de *Tigridieae* (Rudall, 1991) y *Paepalanthus* (Mota-Alves et al., 2013). Es de suma importancia identificar estas protuberancias en cortes transversales, ya que vistas en superficie se han descrito como denticulaciones hialinas con ayuda del microscopio estereoscópico (Moore, 1953) y pueden llegar a confundirse con papilas. Por su longitud, fue posible clasificar las protuberancias epidérmicas en 3 grupos que permiten separar a las poblaciones de *M. biflora*; además, las

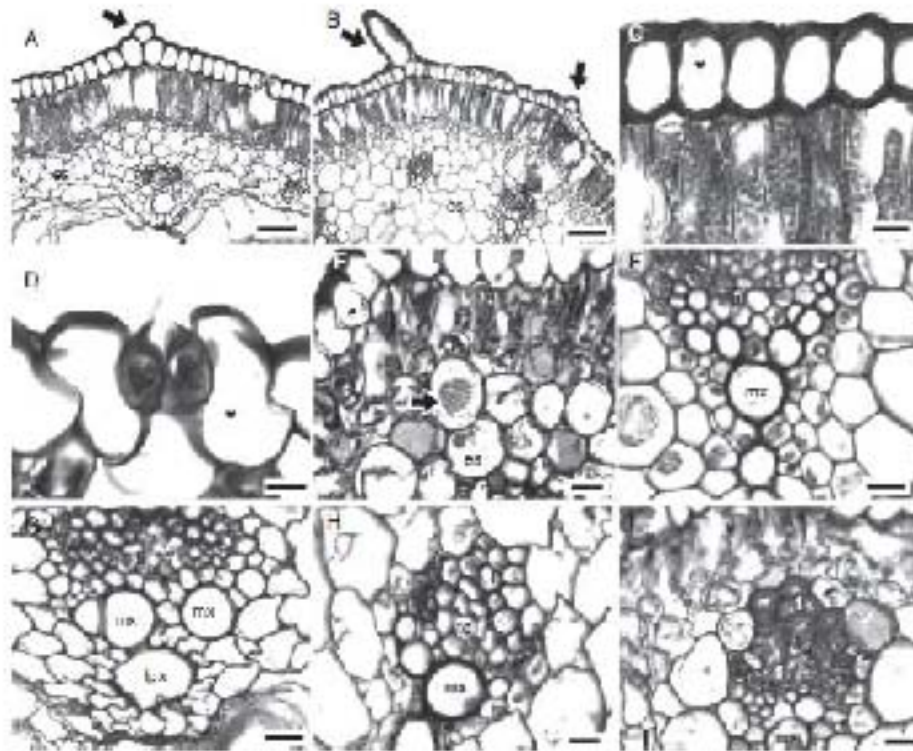


Figura 1. Detalles anatómicos de la lámina foliar de los géneros del complejo Milla, vistos en sección transversal. A) *Besleria elegans* (J. Gutiérrez y E. Bravo 1386) proteroblastos epidérmicos (flecha); B) *Milla Milla* (J. Gutiérrez et al., 1162) proteroblastos epidérmicos (flecha); C) *B. elegans* (J. Gutiérrez y E. Bravo 1386) paredes epidérmicas gruesas; D) *Duroia lufuensis* (J. Gutiérrez 791) vascular con protoxilemas anatómicos y psicófilos; E), D. kabreana (J. Gutiérrez 711) rinde (flecha); F) D. *Abalawandi* (J. Gutiérrez 791) las vascular en forma de "V"; G) *B. elegans* (J. Gutiérrez y E. Bravo 1386) las vascular en forma de "V"; H) *B. Ansellii* (J. Gutiérrez et al., 1241) forma con fibras en desarrollo; I) *M. rigida* (J. Gutiérrez 133) fibras de paredes gruesas sobre el floema. Escalas en μ m: A, B = 100 μ m; C, E, I, 1–20 μ m; D = 10 μ m; G: epidermis en esponjoso; H: fibra; E: floema; Gx: laguna del protoxilema; m: mesofilo.

proteroblastos cortos son el estado más común en el complejo Milla. La presencia de pared primaria gruesa, de naturaleza celulósica en la epidermis se interpreta como colenquimática y es habitual en las especies del complejo. Esta epidermis colenquimática probablemente le confiere a la lámina rigidez y flexibilidad; por ejemplo, las especies de *Besleria* tienen todas las paredes de su epidermis colenquimáticas y hacen que las hojas sean erectas antes de la antesis.

El desarrollo de un estrato de parénquima empalizada es común en todos los taxa, mientras que el tamaño de sus células es homogéneo en la mayoría de los géneros, excepto en *D. bolavensis*, *D. Macleanensis* y *B. deviana* que presentan células del empalizada más cortas en la cara abaxial. Es posible que el cambio de tamaño se relacione con la forma obtriangular de la lámina. En los géneros del complejo Milla, la condición más común es que el parénquima esponjoso se colapsa y forme un hueco, lo cual coincide con lo descrito para los géneros *Abuam*, *Aglyptolobos* y *Strychnium* (Goldblatt et al., 1990; Tucker y Kurucu, 1981). El colapso del parénquima esponjoso y la lisit celular son características de las hojas fistulosas (Fig. 3A–C y 3F). Este carácter también se presenta en hojas xeromórficas como en

Perseauna fistulosa (Hernández et al., 2009), *Antur* spp. (Brenes et al., 2009) y *Gynerium* (Liliaceae) (Niklas, 1991; Peruzzi, Peterson, Tian, y Peterson, 2008). La presencia de hojas fistulosas en el complejo Milla posiblemente sea una adaptación a ecosistemas secos para evitar la pérdida de agua, mantener una menor temperatura respecto al ambiente y contener mayor CO_2 para la fotosíntesis (Gibson, 1996). En los miembros del complejo Milla, la presencia de hojas bifurcadas se correlaciona con la condición fistulosa. La correlación de estos caracteres posiblemente sea una novedad evolutiva para los géneros del complejo, pero para confirmar esta hipótesis es necesario evaluar la anatomía de los géneros del complejo *Kroton* tanto con hojas espesas como subrollizas (Hoover, 1929).

Los haces vasculares colaterales presentes en los géneros del complejo Milla tienen, con excepción de *Besleria*, el metaxilema dispuesto en forma de "V" (Fig. 4F), distribución común en algunas *Ardisceae* (Goldblatt et al., 1990), donde se denomina "en forma de arco". Por otra parte, Rudall (1991) señala que la posición de las fibras en el haz vascular tiene importancia taxonómica para distinguir especies, y se ha utilizado para *Strychnium* (Cejudo-Romero et al., 2009). Sin embargo, en las

especies del complejo Milla, las fibras siempre se sitúan sobre el floema y en general son escasas; se ha observado que la presencia de abundantes fibras con paredes gruesas se relaciona con el desarrollo de hojas grandes, lo que favorece un mayor soporte. Lo anterior se presenta generalmente en los taxa que desarrollan hojas de más de 50 cm de longitud como en *B. elegans* (80 cm), *M. biflora* (75 cm), *M. magnifica* (100 cm) y *M. mexicana* (80 cm).

Diferencias entre géneros y especies

Bessera es el único género que presenta metaxilema en forma de “t” (fig. 4G) y todas las paredes de la epidermis colenquimatosas. Los otros géneros carecen de caracteres exclusivos; sin embargo, hay especies que pueden reconocerse por la combinación única de atributos foliares. Por ejemplo, *D. hannibalii* y *D. purpusii*, vistos en sección transversal, tienen el perfil de la lámina transversalmente elíptico, al igual que *Bessera* y *Milla*. En cambio, *D. balsensis* y *D. thadhowardii* presentan el perfil de la lámina obtriangular, semejante a *Petronymphe*, así como abundante tejido parenquimatoso dispuesto a lo largo de la costa (fig. 3B). *Jaimehintonia gypsophila*, *B. tuitensis*, y algunas poblaciones de *B. elegans* y de *M. biflora* (1129, 1130, 1165, 1391, 1400, 1254, 1263) comparten el perfil de la lámina deprea obovada (tabla 2). Los haces vasculares son por lo general más numerosos en *Bessera* (12–20) y *Milla* (6–38), y *Petronymphe* y *Jaimehintonia* comparten la presencia de 12 haces vasculares, mientras que *Dandya* tiene de 8–12 haces. *Bessera*, *Dandya* y *Milla* presentan fibras con paredes más gruesas y en mayor número que *Jaimehintonia* y *Petronymphe* y el mesofilo sólido agrupa a 3 especies de *Dandya* (*D. balsensis*, *D. hannibalii* y *D. thadhowardii*), *M. mexicana*, *M. potosina* y 2 poblaciones de *M. biflora* (1127 y 1271).

Diferencias interespecíficas en *Milla*

En las especies del género *Milla*, la anatomía foliar revela que existe una combinación única de caracteres que permite reconocerlas (tabla 2), excepto *M. biflora*. Esta especie, de amplia distribución geográfica, desde el sur de EUA hasta Honduras, tiene todos los estados de carácter anatómicos observables en el resto de las especies. Moore (1953) describió *M. biflora* como una especie polimórfica, con hojas estrechamente lineares, canaliculadas en la cara superior y redondeadas en la inferior, con diminutas denticulaciones hialinas en los nervios o algunas veces ausentes. Esta variación morfológica se confirma aquí y, además, se reconocen otras formas (tabla 2). Gándara et al. (2014) sugieren que *M. biflora* no presenta la misma historia evolutiva. Los resultados aquí presentados apoyan esta aseveración, ya que la anatomía foliar es variable en las poblaciones de *M. biflora*. Con base en la variación foliar de esta especie se reconocen 4 grupos, será de suma importancia poner a prueba estos caracteres foliares en un análisis de parsimonia.

Como ya se mencionó, las prominencias epidérmicas cortas es el estado de carácter más común en el complejo (*B. elegans*, *D. balsensis*, *D. thadhowardii*, *Jaimehintonia*, *Petronymphe*, *M. potosina*, *M. rosea* y poblaciones de *M. biflora* [“A”]). Las

prominencias muy largas solo se presentan en 4 poblaciones de *M. biflora* (“C”) y las prominencias largas (50–100 μm) las comparten las poblaciones *M. biflora* que se distribuyen en la Faja Volcánica Transmexicana y el grupo “B” de *M. biflora* (tabla 2).

Howard (1999) describió *M. filifolia*, *M. mexicana* y a partir de segregaciones de poblaciones de *M. biflora*, basándose en caracteres florales y vegetativos. Este autor señaló que en *M. filifolia* las hojas son subteretes diminutamente acanaladas adaxialmente y convexas abaxialmente; en *M. mexicana*, teretes o subteretes, y en *M. potosina*, cóncavo-convexas. La anatomía foliar de estas especies revela que el perfil de la lámina es transversalmente elíptico en *M. mexicana* y deprea obovada en *M. potosina* (tabla 2). *M. filifolia* exhibe las hojas más delgadas (≤ 1 mm), de forma circular en sección transversal y solo comparte con *M. magnifica* la epidermis sin protuberancias.

Milla magnifica es la especie de mayor porte con hojas de mayor longitud (100 cm) y un número de haces vasculares importante (36–40), habita en el bosque tropical caducifolio y se desarrolla en suelos ricos en materia orgánica, condiciones ecológicas que seguramente contribuyen a determinar su morfología. *M. mexicana* también se desarrolla en bosque tropical caducifolio; no obstante, difiere de *M. magnifica* en el tamaño de sus hojas (80 cm), el perfil transversalmente elíptico, la epidermis con protuberancias, el menor número de haces vasculares (14) y el mesofilo compacto (tabla 2). El mesofilo compacto y las células epidérmicas rectangulares son caracteres distintivos en *M. mexicana* y *M. potosina*; sin embargo, esta última presenta un menor número de protuberancias epidérmicas (5), haces vasculares (12), fibras asociadas al haz vascular (8–10) y fibras con paredes delgadas.

De acuerdo con Moore (1953), *M. bryani* y *M. rosea* comparten la presencia de pedicelo y un número reducido de flores, así como su distribución geográfica. La anatomía foliar reveló que también comparten la forma del perfil y el margen involuto en la cara adaxial; pero *M. bryani* presenta un mayor número de series de prominencias (16 vs. 7) y haces vasculares (16 vs. 10–12). Ravenna (1971) describió *M. oaxacana*, basándose en diferencias morfológicas florales de poblaciones que Moore (1953) reconoció como parte de *M. biflora*. Aquí se muestra que *M. oaxacana* difiere de *M. biflora* por la presencia de 14 series de prominencias epidérmicas y el margen involuto en la cara abaxial (tabla 2). La morfología y la anatomía foliar proporcionan caracteres adicionales útiles para distinguir entre algunas especies del complejo Milla mediante una combinación única de caracteres. En cuanto al género, únicamente *Bessera* tiene atributos foliares exclusivos.

Agradecimientos

Esta contribución es parte de los requisitos del primer autor para obtener el grado de Doctor en Ciencias en el Programa del Posgrado en Ciencias Biológicas (PCB) de la Universidad Nacional Autónoma de México. Este autor agradece a Conacyt por los fondos recibidos durante sus estudios de Posgrado (160287) y a la Dirección General del Personal Académico (DGAPA) por el apoyo para realizar estudios de Posgrado.

También se agradece a Silvia Aguilar por revisar una primera versión de este manuscrito, a Julio César Montero-Rojas por el arreglo digital de las figuras y a 2 revisores anónimos, así como al editor asociado por los atinados comentarios que enriquecieron el manuscrito.

Anexo.

Material examinado de los géneros del complejo *Milla*. De los ejemplares del colector Gutiérrez se recolectaron muestras de 5 individuos por sitio, pero a los ejemplares de respaldo se les asignó un número de colecta por sitio, acrónimos de los herbarios revisados o donde se depositaron los ejemplares de acuerdo con Holmgren et al. (1990). Los ejemplares utilizados para el estudio anatómico se marcan con asterisco

Bessera elegans Schultes f. Estado de México: municipio Tejupilco, J. Gutiérrez y R. Ríos 1337, 1338* (FEZA, MEXU). Guerrero: municipio Coyuca de Catalán, J. Gutiérrez et al., 1242, 1243* (FEZA, MEXU); municipio Tlapehuala, J. Gutiérrez et al., 1236 (FEZA-MEXU). Jalisco: municipio Cocula, J. Gutiérrez et al., 1253* (FEZA-MEXU). Morelos: municipio Jonacatepec, J. Gutiérrez 1136 (FEZA, MEXU). Guerrero: municipio Arcelia, J. Gutiérrez 1237 (FEZA, MEXU). Nayarit: municipio El Nayar, J. Gutiérrez y E. Bravo 1386*, 1396* (FEZA, MEXU). *Bessera tuitensis* R. Delgadillo Jalisco: municipio Cabo Corrientes R. Ríos y J. Gutiérrez 997* (FEZA-MEXU); municipio La Huerta, J. Gutiérrez et al., 1252* (FEZA, MEXU). *Bessera tenuiflora* (Greene) Machbride Baja California Sur: municipio La Paz. J. L. León 7516* (HCIB, MEXU). *Dandya balsensis* López-Ferr. y Espejo Morelos: municipio Tlaquiltenango, J. Gutiérrez 791*, 797, 839, 1115* (FEZA). *Dandya hannibali* L. W. Lenz Michoacán: municipio Huetamo, J. Gutiérrez et al., 1241* (FEZA, MEXU). *Dandya purpusii* H. E. Moore Coahuila: municipio Ramos Arizpe, J. Gutiérrez et al., 1225* (FEZA, MEXU). *Dandya thadhowardii* L. W. Lenz Guerrero: municipio Iguala, J. Gutiérrez 798*, 840, 841* (FEZA), J. Gutiérrez 840 (FEZA); municipio Coyuca de Catalán, J. Gutiérrez 804, 844* (FEZA). Michoacán: municipio San Lucas, J. Gutiérrez et al., 1225 (FEZA, MEXU); municipio Huetamo, J. Gutiérrez et al., 1240* (FEZA, MEXU). *Milla biflora* Cav. Chihuahua: municipio Basaseachi, J. Gutiérrez et al., 909* (FEZA). Chiapas: municipio Ocozocoautla, M. Ayala et al., 1000, 1012 (FEZA, MEXU); municipio Tuxtla Gutiérrez, M. Ayala et al., 978* (FEZA, MEXU); Distrito Federal: Delegación Coyoacán, J. Gutiérrez 1195* (FEZA, MEXU). Estado de México: municipio Atlacomulco, J. Gutiérrez et al., 1361* (FEZA, MEXU); municipio Bejucos, J. Gutiérrez y R. Ríos 1340* (FEZA, MEXU); municipio Huehuetoca, J. Gutiérrez y R. Ríos-Gómez 1131* (FEZA, MEXU); municipio Ixtapaluca, J. Gutiérrez et al., 1279 (FEZA, MEXU); municipio El Oro, J. Gutiérrez et al., 1362* (FEZA, MEXU); municipio Los Reyes La Paz, J. Gutiérrez 1149* (FEZA, MEXU); municipio Nepantla, J. Gutiérrez 1139* (FEZA, MEXU). Guanajuato: municipio San Luis de la Paz, J. Gutiérrez y R. Ríos-Gómez 1124*, 1127*, 1253-A (FEZA, MEXU); municipio San José Iturbide, J. Gutiérrez y R. Ríos-Gómez 1129*, 1169 (FEZA, MEXU). Guerrero: municipio Atenango del Río, J. Gutiérrez

1176* (FEZA, MEXU); municipio Xochipala, J. Gutiérrez y R. Ríos 1343, 1344* (FEZA, MEXU). Hidalgo: municipio Singuilicán, J. Gutiérrez et al., 1165* (FEZA, MEXU). Jalisco: S/N C. Castillejos* (FEZA, MEXU). Michoacán: municipio Maravatio, J. Gutiérrez et al., 1365* (FEZA, MEXU); Morelos: municipio Jantetelco, J. Gutiérrez 1138* (FEZA, MEXU); municipio Jonacatepec, J. Gutiérrez 846, 1135* (FEZA, MEXU). Nayarit: municipio El Nayar, J. Gutiérrez y E. Bravo 1387, 1388*, 1389, 1391*, 1392, 1394*, 1398, 1399* (FEZA, MEXU). Oaxaca: Dto. Cuicatlán, J. Gutiérrez et al., 1336* (FEZA, MEXU); Dto. Juchitán, municipio Asunción Ixcaltepec J. Gutiérrez et al., 1357* (FEZA, MEXU); Dto. Miahuatlán, municipio Cuixtla, J. Gutiérrez et al., 1314* (FEZA, MEXU); municipio Amatán, J. Gutiérrez et al., 1315, 1316* (FEZA, MEXU); Dto. Tlaxiaco, municipio Tlaxiaco, J. Gutiérrez et al., 1154 *, 1156 (FEZA, MEXU); Dto. Juxtahuaca, municipio Tecomaxtlahuaca, J. Gutiérrez et al., 1160* (FEZA, MEXU); Dto. Putla, municipio Putla, J. Gutiérrez et al., 1173* (FEZA, MEXU); Dto. Huajuapán municipio Santo Domingo Tonalá J. Gutiérrez y R. Ríos 1271* (FEZA, MEXU); municipio San Marcos de Arteaga J. Gutiérrez et al. 1162* (FEZA y MEXU). Dto. Yautepec, municipio Nejapa de Madero, J. Gutiérrez et al., 1356* (FEZA, MEXU); municipio Santiago Chazumba, R. Ríos y J. Gutiérrez 896 (FEZA, MEXU); municipio San Juan Bautista Suchitlpepec, R. Ríos y J. Gutiérrez 898 (FEZA, MEXU); municipio Zapotitlán Palmas, R. Ríos y J. Gutiérrez 902 (FEZA, MEXU). Puebla: municipio Azumbilla, J. Gutiérrez y R. Ríos 1263* (FEZA, MEXU); municipio Tecamachalco, J. Gutiérrez y R. Ríos 1255* (FEZA, MEXU); municipio Tepeaca, J. Gutiérrez y R. Ríos 1254* (FEZA, MEXU); municipio Tehuacán, J. Gutiérrez y R. Ríos 1267*, 1268* (FEZA, MEXU); J. Gutiérrez et al., 1354* (FEZA, MEXU); municipio Tlacoatepec, J. Gutiérrez y R. Ríos 1256*, 1257* (FEZA, MEXU); municipio Tollepepec de Guerrero, J. Gutiérrez y R. Ríos 1274*, 1275*, 1276* (FEZA, MEXU). Querétaro: municipio Cadereyta, J. Gutiérrez y R. Ríos-Gómez 1130* (FEZA, MEXU); municipio Jalpan de Serra, J. Gutiérrez 1196* (FEZA, MEXU). San Luis Potosí: municipio Santa María del Río, J. Gutiérrez 1210* (FEZA, MEXU); municipio Zaragoza, R. Ríos 898 (FEZA, MEXU). Veracruz: municipio Maltrata, J. Gutiérrez et al., 1304* (FEZA, MEXU). Zacatecas: municipio Valparaíso, J. Gutiérrez y E. Bravo 1400*, 1401*, 1402*, 1403*, 1404*, 1405, 1406* (FEZA, MEXU); municipio Zacatecas, J. Gutiérrez y E. Bravo 1407 (FEZA, MEXU). *Milla bryani* I. M. Johnst. Coahuila: municipio Cuatro Ciénegas, J. Gutiérrez et al., 1226* (FEZA, MEXU). *Milla filifolia* T. M. Howard Morelos: municipio Tenango, J. Gutiérrez 1133* (FEZA, MEXU). *Milla magnifica* H. E. Moore. Guerrero: municipio Iguala, J. Gutiérrez y R. Muñoz 823 (FEZA), J. Gutiérrez 838 (FEZA); municipio Taxco, J. Gutiérrez et al., 1235 (FEZA, MEXU); municipio Teloloapan, J. Gutiérrez e I. Escalante 812* (FEZA). *Milla mexicana* T. M. Howard Puebla: municipio Izúcar de Matamoros, J. Gutiérrez 1134* (FEZA, MEXU); municipio Huehuetlán el Chico, J. Gutiérrez 1137 (FEZA, MEXU). *Milla mortoniana* H. E. Moore Michoacán: municipio Aquila, Sánchez-Mejorada et al., 4301 (MEXU). *Milla oaxacana* Ravenna. Oaxaca: Dto. Cuicatlán, municipio Santiago Nacaltepec, J. Gutiérrez et al., 1327 (FEZA,

MEXU); municipio Oaxaca de Juárez, J. Gutiérrez et al., 1185, 1186 (FEZA, MEXU); Dto. Etla, municipio San Pablo Huitzo, J. Gutiérrez et al., 1192, 1193* (FEZA, MEXU). *Milla potosina* T. M. Howard San Luis Potosí: municipio Guadalcázar, J. Gutiérrez e I. Escalante 1414* (FEZA, MEXU). *Milla rosea* H. E. Moore Nuevo León: municipio Montemorelos, J. Gutiérrez y E. Estrada 1218* (FEZA, MEXU). *Milla valliflora* J. Gut. y E. Solano Dto. Nochistlán, municipio Suchixtlahuaca, J. Gutiérrez et al., 1150, 1151* (FEZA, MEXU). *Jaimehintonia gypsophila* Turner Nuevo León: municipio Aramberri, J. Gutiérrez y E. Estrada 1204, 1208* (FEZA, MEXU). *Petronymphe decora* H. E. Moore Guerrero: municipio Chilpancingo de los Bravo, J. Gutiérrez y R. Ríos 1350* (FEZA, MEXU).

Referencias

- Anderson, L. C. y Creech, J. B. (1975). Source comparative leaf anatomy of *Solidago* and related Asteraceae. *American Journal of Botany*, 5, 486–493.
- Blunden, G., Yi, Y. y Jewers, K. (1973). The comparative leaf anatomy of *Agave*, *Beschorneria*, *Doryanthes* and *Furcraea* species (Agavaceae). *Botanical Journal of Linnean Society*, 66, 157–179.
- Brullo, S., Pavone, P. y Spampinato, G. (1989). *Allium pentadactyli* (Liliaceae), a new species from S. Italy. *Willdenowia*, 19, 115–120.
- Ceja-Romero, J., Espejo-Serna, A. y López-Ferrari, A. R. (2009). Una nueva especie de *Sisyrinchium* (Iridaceae) del estado de Guanajuato, México. *Acta Botanica Mexicana*, 87, 83–90.
- Dahlgren, R. M. T., Clifford, H. T. y Yeo, P. F. (1985). *The families of the Monocotyledons, structure, evolution and taxonomy*. Berlín: Springer-Verlag.
- De Gennaro, D., Pozner, R. y Morrone, O. (2010). Anatomía foliar de *Sacciolepis* Nash (Poaceae). *Candollea*, 2, 197–210.
- Echevarría, C., Morilla, A. y Serrano, M. (1988). Cuatro nuevas especies con anatomía foliar tipo Kranz: *Salsola vermiculata* L., *Cyperus capitatus* Vardelli, *Sporobolus pungens* (Schreber) Kunth, *Spartina densiflora* Brongn. *Lagascaia*, 15, 527–533.
- Fay, M. F. y Chase, M. W. (1996). Resurrection of Themidaceae for the *Brodiaea* alliance, and circumscription of Alliaceae, Amaryllidaceae and Agapanthoideae. *Taxon*, 45, 441–451.
- Gándara, E., Sosa, V. y León de la Luz, J. L. (2009). Morphological and molecular evidence in the delimitation of *Bheria* and *Bessera*, two genera of the *Milla* complex (Themidaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 85, 113–124.
- Gándara, E., Specht, C. D. y Sosa, V. (2014). Origin and diversification of the *Milla* clade (Brodiaeoideae, Asparagaceae): a Neotropical group of six geophytic genera. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 75, 118–125.
- Gibson, A. C. (1996). *Structure-function relations of warm desert plants*. New York: Springer Verlag.
- Goldblatt, P., Rudall, P. y Henrich, J. E. (1990). The genera of the *Sisyrinchium* alliance (Iridaceae: Iridioideae): phylogeny and relationships. *Systematic Botany*, 15, 497–510.
- Gutiérrez, J. y Solano, E. (2015). *Milla valliflora* (Themidaceae), a new species from Southern Mexico. *Brittonia*, 67, 43–47.
- Gutiérrez, J., Terrazas, T., Hernández, I. y Martínez-Cabrera, D. (2010). Anatomía floral de los géneros del complejo *Milla* (Themidaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 87, 1–12.
- Holmgren, P. K., Holmgren, N. H. y Barnett, L. C. (1990). *Index herbariorum Part 1: the herbaria of the world (eighth edition)*. International Association for Plant Taxonomy, New York: The New York Botanical Garden.
- Hoover, R. F. (1939). A definition of the genus *Brodiaea*. *Bulletin Torrey Botanical Club*, 66, 161–166.
- Howard, T. M. (1999). Three new *Milla* species from Mexico. *Herbertia*, 54, 232–237.
- Johnson, C. T. (1980). The leaf anatomy of *Leptospermum* Forst (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany*, 28, 77–104.
- Kocsis, M., Darok, J. y Borhidi, A. A. (2004). Comparative leaf anatomy and morphology of some neotropical *Rondeletia* (Rubiaceae) species. *Plant Systematic and Evolution*, 248, 205–221.
- Lenz, L. W. (1971). Chromosome number in the genus *Milla* Cav (Liliaceae). *Aliso*, 3, 321–322.
- Lynch, A. H., Rudall, P. y Cutler, D. F. (2006). Leaf anatomy and systematics of *Hyacinthaceae*. *Kew Bulletin*, 61, 145–159.
- Members, N., Pedrola-Monfort, J. y Cuajapé-Casells, J. (2003). Leaf morphology and anatomy of genus *Androcymbium* (Colchicaceae) in Southwest Africa. *Collectanea Botanica a Barcinonensi Botanico Instituto Edita*, 26, 83–99.
- Moore, H. E. (1953). The genus *Milla* (Amaryllidaceae-Allieae) and its allies. *Genes Herbarum*, 8, 262–262.
- Mota-Alves, P. G., Scatena, V. T. y Trovó, M. (2013). Anatomy of scapes, bracts, and leaves of *Phepalanthus* sect. *Diphymene* (Eriocaulaceae, Poales) and its taxonomic implications. *Brittonia*, 65, 262–272.
- Niklas, K. J. (1991). Bending stiffness of cylindrical plant organs with a 'core-rind' construction: Evidence from *Juncus effusus* Leaves. *American Journal of Botany*, 4, 561–568.
- Peruzzi, L., Peterson, A., Tison, J. M. y Peterson, J. (2008). Phylogenetic relationships of *Gagea* Salisb. (Liliaceae) in Italy, inferred from molecular and morphological data matrices. *Plant Systematic and Evolution*, 276, 219–234.
- Pires, J. C., Fay, M. F., Davis, W. S., Hufford, L., Rova, J., Chase, M. W., et al. (2001). Molecular and phylogenetic analyses of *Themidaceae* (Asparagales). *Kew Bulletin*, 56, 601–626.
- Pires, J. C. y Sytsma, J. (2002). A phylogenetic evaluation of a biosystematic framework: *Brodiaea* and related petaloid monocots (Themidaceae). *American Journal of Botany*, 89, 1342–1359.
- Radford, A. E., Dickinson, W. C., Massey, J. R. y Bell, C. R. (1974). *Vascular plant systematic*. New York: Harper and Row.
- Ravenna, P. F. (1971). A new *Milla* species from Mexico. *Plant Life*, 27(60), 89–90.
- Rudall, P. (1991). Leaf anatomy in *Tigridaceae* (Iridaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 175, 1–10.
- Rudall, P. y Mathew, B. (1990). Leaf anatomy in *Crocus* (Iridaceae). *Kew Bulletin*, 45, 535–544.
- Ruzin, S. E. (1999). *Plant microtechnique and microscopy*. New York: Oxford University Press.
- Sandoval-Zapotilla, E., García-Cruz, J., Terrazas, T. y Villaseñor, J. L. (2010). Relaciones filogenéticas de la subtribu Oncidiinae (Orchidaceae) inferidas a partir de caracteres estructurales y secuencias de ADN (ITS y matK): un enfoque combinado. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 81, 263–279.
- Solano, E., Terrazas, T. y González-Bocerril, A. (2014). Comparative anatomy of the stem, leaf and inflorescence basal axis of *Proilanthes* L. (Asparagaceae, Agavoideae) species. *Feddes Repertorium*, 124, 105–115.
- Tanker, N. y Kurucu, S. (1981). Leaf anatomy in relation to taxonomy in species of *Allium* found in Turkey. *Quarterly Journal of Crude Drug Research*, 19, 173–179.
- Turner, B. L. (1993). *Jaimehintonia* (Amaryllidaceae: Allieae), a new genus from Northeastern Mexico. *Novon*, 3, 86–88.

CAPÍTULO III

Análisis morfométrico de *Milla biflora* (Themidaceae)

Jorge Gutiérrez^{1,2} , Teresa Terrazas¹ e Isolda Luna-Vega³

Con formato para Systematic Botany

Análisis morfométrico de *Milla biflora* (Themidaceae)

Jorge Gutiérrez^{1,2}, Teresa Terrazas¹ e Isolda Luna-Vega³

¹Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-153, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510, México, D. F., México. e-mail:

tterrazas@ib.unam.mx, jorgeg@comunidad.unam.mx

²Unidad de Investigación en Sistemática Vegetal y Suelo, Carrera de Biólogo, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Batalla 5 de mayo s/n. Ejército de Oriente, Iztapalapa, 09230. México, D. F., México.

³Laboratorio de Biogeografía y Sistemática, Departamento de Biología Evolutiva, Facultad de Ciencias, UNAM, Ciudad Universitaria, Avenida Universidad 3000, Coyoacán, México 04510, D.F., México.

Resumen. La delimitación taxonómica de *Milla biflora* es controvertida y esta asociada a su amplia variación morfológica. El objetivo de este estudio es encontrar caracteres morfológicos que permitan distinguir grupos dentro de *M. biflora* y analizar la similitud morfológica de las especies de *Milla*, con el propósito de generar una clave de identificación taxonómica. Se analizaron 24 caracteres, siete vegetativos y 17 florales de nueve especies del género, obtenidos de recolectas y de ejemplares de herbario. Nueve caracteres morfométricos que resultaron tener mayor peso en el análisis multivariados más 18 caracteres cualitativos fueron utilizados para efectuar un análisis de agrupamiento. El análisis discriminante mostró que los caracteres morfométricos seleccionados por el análisis canónico discriminante no permiten delimitar a las nueve especies estudiadas. Sólo la combinación de caracteres cualitativos y algunos cuantitativos permite separar a las especies a través del análisis de similitud. El análisis de disimilitud permitió reconocer a las nueve especies más 26 morfós que tienen una disimilitud >0.80 . Estos 26 morfós se diferencian en al menos un carácter de las otras especies de *Milla*. La clave para las especies de *Milla* separa a éstas con base en caracteres diagnósticos y permite circunscribir a *Milla biflora* s.s., por las hojas fistulosas, el pedicelo sin articulación evidente con 1.5-3.0 cm de longitud, las flores con apertura diurna y nocturna de color blanco, tres nervios en los tépalos, tépalos externos elípticos, los internos angostamente elípticos con base cuneada, filamentos menores de 1 mm de largo y anteras amarillas. Se distribuye desde el sur del Altiplano Mexicano hasta la parte central y este de la Faja Volcánica Transmexicana, donde se encuentra la localidad tipo en los alrededores de la actual Ciudad de México.

Palabras clave. Análisis multivariados, Asparagaceae, complejo *Milla*, Taxonomía, Faja Volcánica Transmexicana.

INTRODUCCIÓN

Cavanilles (1793) describió a *Milla biflora* a partir de cormos cultivados en el Real Jardín Botánico de Madrid que fueron enviados de México por Sessé y Mociño. Estos cormos corresponden a una parte de las recolectas realizadas durante la Real Expedición Botánica a Nueva España (1787-1803), en las cercanías de la actual Ciudad de México (McVaugh 1977). *Milla biflora* es la especie tipo de *Milla* y después de su descripción original, ha estado sujeta a diversos cambios taxonómicos y nomenclaturales o a una historia taxonómica compleja (Willdenow 1799; Knowles y Westcott 1839; Rafinesque-Schmaltz 1836; Schauer 1847). Son plantas herbáceas geófitas, con cormos y flores fragantes de color blanco. Se desarrollan en sitios con altitudes entre los 10 y los 2800 m, en bosques tropicales secos y templados.

Moore (1953) en su revisión del complejo *Milla*, señala que *M. biflora* presenta tres nervios en los tépalos, anteras subsésiles y filamentos no mayores que los lóbulos de las anteras. Este mismo autor indicó que las poblaciones del sur de México y Guatemala presentan variación en los caracteres diagnósticos, mismas que no consideró suficientes para hacer una segregación de dichas poblaciones. Otros autores han estudiado la diversidad morfológica de *M. biflora* y propusieron especies nuevas a partir de materiales previamente determinados como *M. biflora* (Ravenna 1971; Howard 1999; Gutiérrez y Solano 2015). Gándara et al. (2014) con base en un análisis filogenético utilizando caracteres moleculares indican que *M. biflora* oculta bajo su nombre a otras especies. En este sentido, una evaluación de la variación morfológica de *M. biflora*, permitirá delimitar su variación morfológica.

El uso de la estadística multivariada y análisis de agrupamiento, tanto de caracteres cuantitativos como cualitativos, ha permitido aclarar la delimitación de especies o complejos de especies de angiospermas con taxonomía difícil (Birch et al. 1985; Chung y Kang 1994; Thompson y Lammers 1997; Vandenberg 1998; Levin 1998; Henderson y Ferreira 2002;

Henderson et al. 2004; Ferreira Da Costa et al. 2009; Hernández-Hernández et al. 2009; Arroyo-Cosultchi et al. 2010; Martínez-Cabrera et al. 2011; Hejazi et al. 2012; Jakovljević et al. 2013; Sánchez et al. 2013). Con base en estos antecedentes, este estudio pretende descubrir caracteres morfológicos que permitan delimitar las poblaciones de *Milla biflora* y analizar la similitud morfológica de las especies de *Milla* con el propósito de generar una clave para su identificación taxonómica.

MATERIALES Y MÉTODO

Especímenes- Se analizaron 501 especímenes de herbario correspondientes a nueve de las 11 especies de *Milla* procedentes de herbario (ARIZ, BH, F, FC, GH, IEB, INECOL, JEPS, MEXU, NY, RSA, SLPM, US, XAL; 7.4%) y de ejemplares recolectados en campo (92.6%; solicitar al autor). *Milla delicata* H.E. Moore y *M. mortoniana* H.E. Moore no se incluyeron debido a que no fueron recolectadas en campo y el material de herbario está constituido por menos de tres especímenes en muy mal estado. En este estudio se conservó el nombre de *M. biflora* para incluir a todas las poblaciones que otros autores habían reconocido como tal (Moore 1953; Galván 2001).

Caracteres evaluados. Con la ayuda de una regla metálica y un microscopio estereoscópico marca Nikon SMZ-2T con reglilla milimétrica, se evaluaron 24 caracteres cuantitativos (Cuadro 1), y 18 cualitativos y sus estados. Nueve son binarios y nueve multiestado, correspondientes ahoja, escapo y flor (Cuadro 2).

Análisis multivariados. Se verificó que los 24 caracteres cuantitativos cumplieran con los supuestos de la estadística multivariada como normalidad y homogeneidad de varianza con variables transformadas en \log_{10} . Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con el propósito de detectar aquellas variables que explican el mayor porcentaje de la variación. Se

establecieron 34 grupos con base en caracteres cualitativos previamente evaluados en poblaciones observadas en el campo y especímenes herborizados, con la finalidad de poner a prueba la delimitación morfológica de *M. biflora* (Cuadro 3). Se hizo un análisis canónico discriminante (ACD) para identificar el subconjunto de caracteres que apoyan la separación de las especies y de los 34 grupos establecidos *a priori*. Además, se evaluó a través de las distancias de Mahalanobis si los grupos son estadísticamente diferentes. Un análisis discriminante canónico (AD) permitió verificar qué porcentaje de los individuos se pueden clasificar correctamente dentro de la especie o grupo. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SAS (SAS Institute 2008).

Análisis de agrupamiento. Se generó una matriz básica de datos con 18 caracteres cualitativos (Cuadro 2) y los valores de la media de los nueve caracteres cuantitativos que fueron seleccionados en el análisis ACD con el mayor peso para separar grupos. La matriz se estandarizó en unidades de desviación estándar, con el fin de asignarle a cada caracter el mismo peso (Sneath y Sokal 1973). Enseguida se se generó la matriz de similitud con el coeficiente de Distancia Euclidiana y como algoritmo de agrupamiento se usó el método de Media Aritmética no Ponderada (UPGMA, por sus siglas en inglés). Estos análisis se realizaron con el programa NTSYS versión 2.1 (Rohlf 2000).

RESULTADOS

Variación de los caracteres. El ACP reveló que 14 caracteres explican la mayor variación en los primeros cinco componentes con 60.96% de la variación acumulada (Cuadro 4). Estos 14 caracteres con los mayores valores en el ACP se usaron en el ACD para poner a prueba los 34 grupos de *M. biflora* establecidos *a priori* con base en caracteres cualitativos (Cuadro 3). El ACD permitió reconocer las variables que proporcionan la mayor información para discriminar los individuos de las especies de *Milla* y los 34 grupos de *M. biflora*. El 91.32% de la variación total

se explica con cinco funciones canónicas (Cuadro 5). La representación gráfica de las tres funciones canónicas reveló una mayor separación de las especies y morfotipos, cuando se elimina a *M. magnifica*, especie que registra órganos vegetativos y reproductivos de mayor tamaño (Fig. 1). El ACD mostró que el 80% de los individuos de cuatro especies de *Milla*, más siete morfos, pueden ser recuperados con los caracteres cuantitativos, y para el resto de las especies y morfos el porcentaje fue mucho más bajo (Cuadro 6).

Análisis de agrupamiento. Este análisis permitió separar las especies de *Milla* y la mayoría de los morfos. *Milla rosea* especie endémica de Nuevo León (NL) se separa de las demás especies y morfos y se diferencia por presentar un tubo floral <5.0 cm de largo y tépalo interno <5.8 mm de ancho. Además, se recuperaron grandes dos grupos (Fig. 2). El grupo A incluye solo tres morfos que tienen en similitud el tubo floral de 5.0-8.5 cm de largo y la base del tépalo interno abruptamente atenuado (Fig. 3A). El grupo B reúne al resto de las especies y morfos, que se agrupan por tener tubos florales >8.6 cm de largo y la base del tépalo interno atenuada o cuneada (Fig. 3B). *Milla bryanii* es la especie que presenta el valor de Distancia Euclidiana más bajo (0.80). Con base en este valor, los morfos con valores por debajo de él (0.80) fueron considerados como una sola entidad, como ocurre con el morfo 12 [Chis2, Oax8], el morfo 22 [Oax3, Oax4], el morfo 25 [Chih, Mich2, Zac2] y *Milla biflora* s.s. [Ags, Gto, Ver-Pue, Mor2, VM] (Fig. 2).

DISCUSIÓN

Variación de caracteres. Nueve caracteres son los que contribuyen en mayor medida para confirmar la existencia de grupos con ACD. De estos nueve caracteres, seis son florales y, en su mayoría, no se han utilizado en trabajos previos como caracteres diagnósticos para reconocer las especies de *Milla*, a excepción del estudio de Ravenna (1971), quien usó el tamaño del tubo floral para reconocer a *M. oaxacana* y separarla de *M. biflora*.

Las dimensiones de la anchura de la hoja, longitud y diámetro del escapo, largo del pedicelo, largo de la bráctea floral y tubo floral, ancho del tépalo interno, largo del apículo y largo de la antera permiten reconocer siete morfos de *Milla* (25%) y cuatro especies de *Milla* (ver clave) mediante una combinación única de caracteres. Sin embargo, estos caracteres cuantitativos no permiten separar al resto de los morfos y especies de *Milla* (Cuadro 5) debido a la amplia variación morfométrica, a diferencia de lo que ocurre en otros complejos de especies o géneros de otras familias (Pimentel et al. 2007; Scrivanti et al. 2013; Sousa et al. 2014).

Análisis de agrupamiento. La combinación de caracteres cualitativos y cuantitativos permitió separar los 26 morfos y las nueve especies de *Milla* a un nivel de corte igual o mayor de 0.80 de disimilitud. En este estudio se confirma lo dicho por Howard (1999), quien sugirió que los caracteres cualitativos en *Milla* tienen un alto valor diagnóstico, que le permitieron separar y describir a *M. mexicana* y *M. potosina* con base en la presencia de rizomas, denticulaciones (prominencias) de las hojas, la pubescencia del escapo y hojas, el tipo de articulación del pedicelo, el momento de apertura de las flores, la forma y base de los tépalos, y el número de nervaduras en los tépalos, caracteres que en su mayoría aquí se confirman.

Nuestro análisis también reveló que el tamaño del tubo floral es importante para reconocer los grandes grupos en *Milla* (Fig. 1). *Milla rosea* H.E. Moore es la especie más disímil del género por su tubo floral corto (<5.0 cm de largo) y el ancho del tépalo interno <5.8 mm (Fig. 3C). El análisis de agrupamiento, muestra que los grupos A y B y los subgrupos B1 y B2 también se reconocen por el tamaño del tubo floral y la forma de la base del tépalo interno. Por ejemplo, el tamaño del tubo floral de 8.0-10.0 cm de largo y los tépalos internos ovados distinguen el subgrupo B1 que contiene a *M. filifolia* T.M. Howard y el morfo 4 (Fig. 3D). Sin embargo, *M. filifolia* se diferencia del morfo 4 por la presencia de pedicelos de 1.5-2.0 cm de largo, articulados y tépalos internos de 6.5-7.0 mm ancho.

El grupo B2 presentó los tubos florales más largos (10.0-16.0 cm) y los tépalos internos angostamente elípticos o elípticos (Fig. 3E). En este subgrupo, *M. valliflora* junto con el morfo 5 (Zac3) forman el conjunto C, por la forma circular de la hoja en sección transversal y por tener una o dos flores, pero *M. valliflora* J. Gut. y E. Solano se distingue por tener prominencias cortas en la hoja, mesofilo colapsado, escapo escabroso, una flor única (Fig. 3F) y pedicelo de ca. 2.5 cm. El conjunto C1 tiene hojas subcilíndricas, haz de la hoja aplanado o hendido, un escapo liso, 2 o más flores y bráctea floral de 6.0-7.4 mm de largo. Los grupos D y D1 se reconocen por la presencia de prominencias y tricomas del escapo y el tamaño de la bráctea floral. La forma de las hojas anchamente elípticas o circulares en sección transversal y las anteras de color verde separan al grupo E que incluyó morfos de Chiapas, Oaxaca y el morfo10 de Michoacán (Fig. 3G). Las anteras de color azul o verde apoyan al grupo F con las especies *M. magnifica* H.E. Moore, *M. oaxacana* Ravenna, *M. mexicana* T.M. Howard, *M. potosina* T.M. Howard y nueve morfos con distribución en el sur de México (Fig. 3H). Las anteras amarillas están presentes en el grupo F1 que recupera a *M. biflora* Cav. s.s. y *M. bryanii* I.M. Jonst. y los morfo con distribución geográfica restringida a la Faja Volcánica Transmexicana, Altiplano Mexicano y Sierra Madre Occidental (Fig. 3I, J, K, L).

La similitud de *M. bryanii* con el morfo 24 (Nay 2) se debe a la presencia de hojas estriadas con prominencias foliares y tubo floral >10.0 cm de largo. *Milla magnifica* H.E. Moore tiene hojas con mesofilo colapsado, lisas, al igual que el escapo y tépalos internos >1.0 cm de ancho. A diferencia de la anterior, *M. mexicana* presenta hojas con mesofilo compacto al igual que el morfo 18 (Pue2). *Milla oaxacana* Ravenna y los morfos 22 (Oax3y Oax4) tienen más de 12 haces vasculares en el mesofilo de la hoja y tubo floral \leq 13.5 cm de largo (Fig. 3B, E, H). *Milla potosina* T.M. Howard y el morfo 19 (Gro) presentan pedicelos \leq 3.0 cm de largo, tubo floral 9-11 cm de largo y tépalos internos de 7-8.5 mm de ancho. *Milla rosea* tiene color rosa en

el exterior de sus tépalos (Fig. 3C), tubo floral <5.0 cm de largo y tépalo interno <5.8 mm de ancho, esta combinación apoya su delimitación.

Los resultados de este estudio permiten reconocer 26 morfós que son diferentes de las nueve especies evaluadas, incluyendo a *M. biflora s.s.* La combinación única de caracteres que cada una de ellas tiene es diagnóstica para su identificación (ver clave). El análisis de agrupamiento es congruente con la hipótesis de Gándara *et al.* (2014), quienes sugieren con base en un estudio molecular, que bajo el nombre de *Milla biflora* existen otros taxa.

Milla biflora s.s. El análisis de agrupamiento reveló que las ocho especies de *Milla* con las que se contrastó *M. biflora*, muestran una separación por arriba del nivel de 0.80 de disimilitud en la Distancia Euclidiana. En el caso particular de *M. biflora* (VM), ésta presentó un valor de disimilitud junto con las poblaciones de Ags, Gto, Pue-Ver y Mor2, menor al 0.80, lo que nos permite reconocer a estas poblaciones junto con la de la Cuenca de México como una sola entidad, *M. biflora s.s.* La ubicación geográfica precisa basada en la revisión del ejemplar tipo de *M. biflora* depositado en el Real Jardín Botánico de Madrid (McVaugh 1977), permitió evaluar los caracteres morfométricos y cualitativos aquí utilizados, como son: las hojas fistulosas, el pedicelo sin articulación evidente con 1.5-3.0 cm de longitud, flores con apertura diurna y nocturna de color blanco, tres nervios en los tépalos, tépalos externos elípticos, tépalos internos angostamente elípticos con base cuneada, filamentos menores de 1 mm de largo y anteras amarillas (Fig. 3J, K, L). Estos caracteres se corroboraron en los materiales recolectados en la cuenca de México y fueron la base para su reconocimiento morfológico. Los caracteres cualitativos observados también en el ejemplar tipo y corroborados en los materiales de herbario y organismos examinados de *M. biflora s.s.* en campo, apoyan su separación de los morfós del norte y occidente de México, Cuenca del Río Balsas y Sierra Madre del Sur.

Los análisis multivariados identificaron nueve caracteres morfométricos que, en conjunto con los caracteres cualitativos, permitieron reconocer las nueve especies de *Milla* evaluadas, así como delimitar y separar 26 morfós de *M. biflora s.s.* Nuestros resultados apoyan una nueva delimitación de esta especie, aquí tratada como *Milla biflora s.s.*, basada en una combinación única de caracteres y su distribución al sur del Altiplano Mexicano y parte central y este de la Faja Volcánica Transmexicana. En forma adicional, nuestros resultados apoyan el reconocimiento de especies nuevas que serán descritas próximamente. Las relaciones filogenéticas de las especies aquí delimitadas en el género *Milla* podrán ser evaluadas a través de análisis de parsimonia y los caracteres florales y sus estados de carácter, aquí delimitados podrán ser utilizados para entender la diversificación y la evolución floral del género *Milla* dentro del complejo *Milla*.

Clave para la determinación de especies y morfo especies del género *Milla*

1. Tubo floral <5.0 cm de largo, tépalo interno <5.8 mm de ancho.....***M. rosea***
1. Tubo floral >5.1 cm de largo, tépalo interno >5.8 mm de ancho.
 2. Tubo floral 5.0-8.5 cm de largo, base del tépalo interno atenuada abruptamente.
 3. Pedicelo ≥ 4 cm de largo, bráctea floral externa ≥ 1.2 cm de largo, tépalo interno ≥ 1.3 cm de ancho.....**Morfo 1**
 3. Pedicelo <3 cm de largo, bráctea floral externa <1.0 cm de largo, tépalo interno < 1.3 cm ancho.
 4. Hoja aplanada, escapo puberulento, pedicelo 2.5-3.0 cm de largo, tépalos con 5 nervaduras..... **Morfo 2.**
 - Hoja subcircular, escapo liso, pedicelo <1.0 cm de largo, tépalos con 3 nervaduras o nervios**Morfo 3**
 2. Tubo floral >8.5 cm de largo (excepto *M. filifolia*), base del tépalo interno atenuada o cuneada.
 5. Tubo floral 8.0-10.0 cm de largo, tépalos internos ovados.
 6. Pedicelo 1.5-2.0 cm de largo, articulado; tépalo interno 6.5-7.0 mm de ancho..... ***M. filifolia***

6. Pedicelo 2.8-3.5(-4.0) cm de largo, articulación floral inconspicua; tépalo interno 7.5-8.0 mm de ancho.....**Morfo 4**
5. Tubo floral 10.0-16.0 cm de largo, tépalos internos angostamente elípticos o elípticos.
7. Hojas rollizas, haz de la hoja redondeado; 1 ó 2 flores.
8. Prominencias largas en hoja, escapo liso, flores 2 (-3), pedicelo 1.0-1.5 cm largo.....**Morfo 5**
8. Prominencias cortas en hoja, escapo escabroso, flores 1, pedicelo 2.0- 3.5 cm de largo.....**M. valliflora**
7. Hojas subcilíndricas, haz de la hoja aplanada ó concava; ≥ 2 flores (de haber flores solitarias haz de la hoja plano).
9. Escapo liso; bráctea floral externa 6.0-7.4 mm de largo.
10. Flores solitarias, anteras amarillas, 4-6 mm de largo.....**Morfo 6**
10. Inflorescencias con dos flores, anteras verdes, 3.5-3.7(-4.5) mm de largo.....**Morfo 7**
9. Escapo escabroso o piloso; bráctea floral externa 7.5-14 mm de largo (de haber escapos lisos, bráctea externa >9.0 mm de largo).
11. Hojas anchamente elípticas o circulares en sección transversal(excepto Morfo 13 y 14, pero entonces pedicelos ≤ 1.8 cm de largo, anteras verdes)
12. Pedicelo >2.5 cm de largo; tubo floral <12.0 cm de largo.
13. Prominencias foliares largas; escapo liso; tépalos externos angostamente elípticos, 5 nervaduras, anteras verdes..... **Morfo 8**
13. Prominencias foliares cortas; escapo escabroso; tépalos externos elípticos, 7-12 nervaduras, anteras azules.....**Morfo 9**
12. Pedicelo <2.5 cm largo (excepto **Morfo 29**); tubo floral > 12.0 cm largo.
14. Hojas depresas obovadas o estrechamente elípticas en sección transversal.
15. Prominencias en hojas cortas; inflorescencia > 3 flores, tépalos 7-12 nervados.....**Morfo 10**
15. Prominencias en hojas largas; inflorescencia 2-3 flores, tépalos 5 nervados.....**Morfo 11**
14. Hojas anchamente elípticas o circulares en sección transversal.

16. Pedicelo 1.5-3.0(-5.0) cm de largo; tubo floral (10-)13-16 cm de largo; anteras 2.8-4.5 mm de largo..... **Morfo 12**
16. Pedicelo < 1.4 cm de largo; tubo floral 10.0-12.8 cm de largo; anteras 3.8- 4.2 mm de largo.
17. Rizomas presentes; tépalo externo elíptico, base tépalo interno cuneada.....**Morfo 13**
17. Rizomas ausentes; tépalo externo angostamente elíptico, base tépalo interno atenuada.....**Morfo 14**
11. Hojas en sección transversal extensamente depresas, transversalmente elípticas o depresas obovadas.
18. Anteras de color azul o verde.
19. Base de los tépalos internos cuneados.
20. Hojas elípticas en sección transversal; pedicelo 1.4-3.0(-5.0) cm largo; bráctea exterior <8.0 mm de largo; tubo floral <12.0 cm de largo, tépalos internos 6.5- 7.0 mm de ancho; anteras 3.5-3.7 (-4.0) mm de largo.....**Morfo 15**
20. Hojas extensamente depresas en sección transversal; pedicelo 4.0-4.7 cm de largo, bráctea exterior 8.0-13 mm de largo; tubo floral >12.0 cm de largo, tépalos internos 10.0 mm de ancho; anteras 4.8 mm de largo.
21. Rizomas ausentes; pedicelo <4.0 cm de largo; tubo floral 14-18(-20) cm de largo, tépalos con 7-12 nervaduras; anteras azules.....**Morfo 16**
21. Rizomas presentes; pedicelo >4.0 cm de largo, tubo floral >13.0 cm de largo, tépalos 5 nervaduras; anteras verdes.....**Morfo 17**
19. Base de los tépalos internos atenuada
22. Mesofilo de la hoja compacto.
23. Rizomas presentes; hojas extensamente depresas en sección transversal, haz redondo; tépalos con 7-12 nervaduras.....**M. mexicana**
23. Rizomas ausentes; hojas depresas obovadas en sección transversal, haz aplanado o hendido; tépalos 5 nervaduras.....**Morfo 18**
22. Mesofilo de la hoja hueco.

24. Hojas con epidermis lisa.; escapo liso; tépalos internos >1.0 cm de ancho.....**M. magnifica**
24. Hojas con superficie estriada, prominencias presentes en epidermis; escapo escabroso o piloso; tépalos internos \leq 1.0 cm ancho.
25. Pedicelo \leq 3.0 cm de largo; tubo floral 9.0-11.0 cm de largo, tépalo interno 7-8.5 mm de ancho.
26. Rizomas ausentes; tubo floral <10.0 cm de largo, tépalo interno 8.0-8.5 mm de ancho, tépalos con 3 nervios..... **M. potosina**
26. Rizomas presentes; tubo floral >10.0 cm de largo, tépalo interno 7.0 mm de ancho, tépalos con 5 nervios.....**Morfo 19**
25. Pedicelo 3.5-5.0 cm largo; tubo floral 12.0-16.0 cm de largo, tépalo interno >12.0 mm de ancho.
27. Haces vasculares en hojas 7-12; tubo floral >13.5 cm de largo.
28. Cormos con rizomas presentes; prominencias en hojas cortas; tépalos elípticos; anteras de color verde.....**Morfo 20**
28. Cormos con rizomas ausentes; prominencias en hojas largas; tépalos angostamente elípticos; anteras de color azul.....**Morfo 21**
27. Haces vasculares en hojas >12; tubo floral \leq 13.5 cm de largo.
29. Pedicelo \geq 4.6 cm de largo; bráctea <8.5 mm de largo; tubo floral 12.0-12.4 cm de largo, tépalos internos elípticos; flores con apertura nocturna.....**M. oaxacana**
29. Pedicelo 3.5-4.6 cm de largo; bráctea 10.0-12.0 mm de largo; tubo floral 12.5-13.5 cm largo; tépalos internos angostamente elípticos; flores con apertura diurna y nocturna.....**Morfo 22**
18. Anteras amarillas.
30. Base del tépalo interno atenuada
31. Hojas lisas en la superficie, prominencias epidérmicas foliares ausentes; tubo floral 9.0-10.0 cm de largo.....**Morfo 23**

31. Hojas estriadas en la superficie, prominencias epidérmicas foliares presentes; tubo floral > 10.0 cm de largo.
32. Haces vasculares en hoja >12; bráctea floral externa 6.0-10.0 mm de largo; inflorescencia con 2 flores; tépalos internos 5.5-10.0 mm de ancho.
33. Prominencias foliares cortas; articulación del tubo floral inconspicua, pedicelo ca. 2.5 cm largo; anteras 4.5 mm largo..... **Morfo 24**
33. Prominencias foliares largas; articulación del tubo floral conspicua, pedicelo hasta 4 cm largo; anteras hasta 3.0 mm largo.....**M. bryanii**
32. Haces vasculares en hoja 7-12; bráctea floral externa (0.6-)1.2-1.6 mm de largo, inflorescencia con tres o más flores; tépalos internos (16-)23-31(-35) mm de ancho..... **Morfo 25**
30. Base del tépalo interno cuneada o abruptamente atenuada.
34. Escapo liso; pedicelo ≤ 1.0 cm de largo.....**Morfo 26**
34. Escapo escabroso; pedicelo 1.5-3.0 cm de largo..... **Milla biflora s.s.**

LITERATURA CITADA

- Arroyo-Cosultchi G., Terrazas T., Arias S. y López-Mata L. 2010. Delimitación de *Neobuxbaumia mezcalaensis* y *N. multiareolata* (Cactaceae) con base en análisis multivariados. Boletín de la Sociedad Botánica de México 86: 53-64.
- Birch A. N. E., Titchcott M. T. y Bisby F. A. 1985. *Vicia johannis* and wild relatives of the faba bean: a taxonomic study. Economic Botany 39: 177-190.
- Cavanilles A. J. 1793. *Icones et descriptiones plantarum* 2:76. Madrid.
- Chung M. G. y Kang, S. S. 1994. Morphometric analysis of the genus *Hemerocallis* L. (Liliaceae) in Korea. Journal of Plant Research 107: 165-175.
- Ferreira Da Costa A., Pena-Rodríguez P. J. F. y Lapa-Wanderley M. D. G. 2009. Morphometric analysis and taxonomic revision of the *Vriesea paraibica* complex (Bromeliaceae). Botanical Journal of the Linnean Society 159: 163-181.

- Galván R. 2001. Alliaceae. Pp. 1252-1254. En: Calderón de Rzedowski G. y Rzedowski J. (eds.), Flora fanerogámica del Valle de México. 2da ed. Instituto de Ecología, A. C., Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F.
- Gándara E., Specht C. D. y Sosa V. 2014. Origin and diversification of the *Milla* clade (Brodiaeoideae, Asparagaceae): A Neotropical group of six geophytic genera. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 75: 118-125.
- Gutiérrez J. y Solano E. 2015. *Milla valliflora* (Themidaceae), a new species from southern Mexico. *Brittonia* 67: 43-47.
- Hejazi J., Bahrami A. R., Vaezi J., Memariani F. y Reza M. 2012. Morphometric and taxonomic study of the genus *Carex* L. (Cyperaceae) in Northeast of Iran. *Journal of Biology* 1: 63-81.
- Henderson A. J. 2004. A multivariate analysis of *Hyospathe* (Palmae). *American Journal of Botany* 91: 953-965.
- Henderson A. y Ferreira E. 2002. A morphometric study of *Synechanthus* (Palmae). *Systematic Botany* 27: 693-702.
- Hernández-Hernández V., Terrazas T. y Delgadillo-Moya C. 2009. The *Dryopteris patula* complex (Dryopteridaceae) in Mexico: Morphometric analyses. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 85: 103-112.
- Howard T. M. 1999. Three new *Milla* species from Mexico. *Herbertia* 54: 232-237.
- Jakovljević K., Šinžar-Sekulić J., Vukojičić S., Kuzmanović N. y Lakušić, D. 2013. Leaf anatomy of *Carex humilis* (Cyperaceae) from Central and South Eastern Europe. *Botanica Serbica* 37: 3-11.

- Knowles G. B. y Westcott F. 1839. Loudon's Hortus Britannicus: a catalogue of all the plants indigenous, cultivated in, or introduced to Britain. Part I. The Linnaean arrangement: part II. The Jussieuan arrangement / edited by J.C. Loudon. 3^{ra} ed. London.
- Levin G. A. 1998. Evolution in the *Acalypha gracilens*/monococca complex (Euphorbiaceae): morphological analysis. Systematic Botany 23: 269-287.
- Martínez-Cabrera D., Zavala F. y Terrazas T. 2011. Estudio morfométrico de *Quercus sartorii* y *Quercus xalapensis* (Fagaceae). Revista Mexicana de Biodiversidad 82: 551-568.
- McVaugh R. 1977. Botanical results of the Sessé & Mociño Expedition (1787-1803). Contributions from the University of Michigan Herbarium. Hunt Institute for Botanical Documentation, Carnegie Mellon University. 626 p.
- Moore H. E. 1953. The genus *Milla* (Amaryllidaceae-Allieae) and its allies. Gentes Herbarum 8: 262-294.
- Pimentel M., Estevez-Perez G. y Sahuquillo E. 2007. European sweet vernal grasses (*Anthoxanthum*: Poaceae, Pooideae, Aveneae): a morphometric taxonomical approach. Systematic Botany 32: 43-59.
- Rafinesque-Schmaltz C. S. 1836. Flora Telluriana. 2: 12. 1837 [1836 publ. Jan-Mar 1837]. Philadelphia.
- Ravenna P. F. 1971. A new *Milla* species from Mexico. *Plant Life* 27: 60, 89-90.
- Rollf F. J. 2000. NTSYS. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.1. Applied Biostatistics Inc., Rollf .New York.
- Sánchez D., Arias S. y Terrazas T. 2013. Análisis morfométrico de las especies de *Echinocereus* sección *Triglochidiati* (Cactaceae) en México. Brittonia 65: 368-385.
- SAS Institute. 2008. SAS/STAT User's Guide, Release 9.03 Edition. SAS Institute Inc., Cary.

- Schauer S. 1847. *Linnaea*; Ein Journal für die Botanik in ihrem ganzen Umfange. Berlin.
- Scrivanti L. R., Norrmann G. A., y Anton A. M. 2013. Delimiting species boundaries within the *Bothriochloa saccharoides* complex (Poaceae) through morphometric analysis. *Phytotaxa* 89: 24-42.
- Sneath P. H. y Sokal R. R. 1973. *Numerical Taxonomy. The principles and practices of numerical classification.* W.H. Freeman and Company, San Francisco. País.
- Souza I. M., Funch L. S. y De Queiroz L. P. 2014. Morphological analyses suggest a new taxonomic circumscription for *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae). *PhytoKeys* 38: 101-118.
- Thompson S. W. y Lammers T. G. 1997. Phenetic analysis of morphological variation in the *Lobelia cardinalis* complex (Campanulaceae:Lobelioideae). *Systematic Botany* 22: 315-331.
- Vandenberg R., Miller J., Ugarte M., Kardolus J., Villand J., Nienhuis J. y Spooner D. 1998. Collapse of morphological species in the wild potato *Solanum brevicaulis* complex (Solanaceae: sect. *Petota*). *American Journal of Botany* 85: 92-92.
- Willdenow C. L. 1799. *Species Plantarum* II. 62. London.

Cuadro 1. Caracteres morfológicos utilizados para los análisis morfométricos de las especies de *Milla* y los grupos de *Milla biflora sensu lato*. Medidas son en cm.

	Carácter		carácter
1	Longitud cormo	13	Ancho tépalo externo
2	diámetro cormo	14	Largo tépalo externo
3	Largo cuello túnica del cormo	15	Ancho tépalo interno
4	Largo hoja	16	Largo tépalo interno
5	Ancho hoja	17	Largo apículo en tépalo externo
6	Largo escapo	18	Largo filamento
7	Ancho escapo	19	Largo antera
8	Largo pedicelo	20	Ancho antera
9	Largo bráctea	21	Largo ovario
10	Ancho bráctea	22	diámetro ovario
11	Ancho tubo floral	23	Largo estilo
12	Largo tubo floral	24	Largo ginóforo

Cuadro 2. Caracteres cualitativos usados en el análisis de similitud de las especies de *Milla* y los grupos de *Milla biflora s.l.*

	Carácter	Estado de carácter
1.	Corno con rizomas	ausentes=0, presentes=1
2.	Pérfil hoja en sección transversal	anchamente elíptica=0, circular=1, extensamente depresa=2, transversalmente elíptica=3, depresa obovada=4, estrechamente elíptica transversalmente=5, aplanada=6
3.	Haz de la hoja	aplanado-hendido=0, redondo=1
4.	Estriaciones en hoja	presentes=0, ausentes=1
5.	Prominencias en hoja	presentes=0, ausentes=1
6.	Tamaño de prominencias en hoja	cortas=0, largas=1
7.	Número de haces vasculares hoja	seis=0, siete-doce=1, más de doce=2
8.	Mesofilo de la hoja	compacto= 0, hueco=1
9.	Paredes de las fibras	gruesas= 0, delgadas=1
10.	Tipo de superficie del escapo	escabroso=0, piloso=1, liso=2
11.	Articulación conspicua en flor	presente=0, ausente=1
12.	Número de flores	una=0, dos=1, tres o más=2
13.	Apertura de la flor	nocturna= 0, diurna-nocturna=1
14.	Forma del tépalo externo	angostamente elíptico =0, elíptico=1, anchamente ovado=2
15.	Forma del tépalo interno	angostamente elíptico=0, elíptico= 1, ovado=2
16.	Forma base tépalo interno	atenuada= 0, abruptamente atenuada= 1, cuneada= 2
17.	Número de nervios en los tépalos	tres=0, cinco= 1, siete-12=2
18.	Color de la antera	amarilla= 0, azul=1, verde= 2

Cuadro 3. Especies y morfós del género *Milla*, estados de la República Mexicana o área geográfica en donde se distribuyen. SLP=San Luis Potosí, BCS=Baja California Sur. Los estados con más de un morfo son identificados con un número arábigo.

Especie/Morfo	Distribución	Morfo	Distribución
<i>M. biflora</i>	Aguascalientes	Morfo 10	Michoacán1
<i>M. biflora</i>	Guanajuato	Morfo 11	Chiapas1
<i>M. biflora</i>	Morelos2	Morfo 12	Chiapas2
<i>M. biflora</i>	Puebla-Veracruz	Morfo 12	Oaxaca8
<i>M. biflora</i>	Valle de México	Morfo 13	Oaxaca11
<i>M. bryanii</i>	Coahuila	Morfo 14	Oaxaca12
<i>M. filifolia</i>	Edo. México-Morelos	Morfo 15	Oaxaca7
<i>M. magnifica</i>	Edo. México-Guerrero	Morfo 16	Oaxaca10
<i>M. mexicana</i>	Morelos-Puebla	Morfo 17	Oaxaca13
<i>M. oaxacana</i>	Oaxaca	Morfo 18	Puebla1
<i>M. potosina</i>	Guanajuato-SLP	Morfo 19	Guerrero
<i>M. rosea</i>	Nuevo León	Morfo 20	Oaxaca-Puebla2
<i>M. valliflora</i>	Oaxaca-Puebla	Morfo 21	Oaxaca1
Morfo 1	Oaxaca2	Morfo 22	Oaxaca3
Morfo 2	Morelos1	Morfo 22	Oaxaca4
Morfo 3	BCS	Morfo 23	Zacatecas1
Morfo 4	Oaxaca5	Morfo 24	Nayarit2
Morfo 5	Zacatecas3	Morfo 25	Chihuahua
Morfo 6	Nayarit1	Morfo 25	Michoacán2
Morfo 7	Puebla2	Morfo 25	Zacatecas2
Morfo 8	Oaxaca6	Morfo 26	Hidalgo
Morfo 9	Oaxaca9		

Cuadro 4. Análisis de componentes principales de las especies y morfós del género *Milla*. Se destacan los caracteres con mayor peso en el agrupamiento.

Componente	Prin1	Prin2	Prin3	Prin4	Prin5
Valor de Carga	7.10	3.15	1.69	1.46	1.22
Variación acumulada (%)	29.59	42.72	49.77	55.87	60.96
Largo del corno	0.081	0.205	0.047	0.047	-0.258
Diámetro del corno	0.243	-0.202	0.167	0.078	-0.061
Largo de las escamas corno	0.188	-0.069	0.331	0.253	-0.111
Largo de la hoja	0.111	0.064	0.323	0.434	0.090
Ancho de la hoja	0.245	-0.260	-0.009	0.136	-0.031
Largo del escapo	0.244	-0.340	0.054	-0.059	0.076
Diámetro del escapo	0.268	-0.166	0.067	0.209	0.075
Largo del pedicelo	0.271	-0.293	0.129	-0.050	0.074
Largo de la bráctea	0.159	-0.014	-0.176	0.131	0.624
Ancho de la bráctea	0.206	0.217	-0.002	0.198	-0.270
Ancho del tubo floral	0.193	0.056	0.113	0.100	-0.192
Largo del tubo floral	0.162	0.107	0.358	-0.407	0.081
Ancho del tépalo externo	0.183	0.162	-0.033	0.034	-0.384
Largo del tépalo externo	0.241	0.120	-0.173	-0.254	0.081
Ancho del tépalo interno	0.283	0.198	-0.210	0.040	0.048
Largo del tépalo interno	0.188	0.187	-0.068	-0.252	-0.057
Largo del apículo	0.280	0.188	-0.202	0.036	0.061
Largo del filamento	0.086	0.254	-0.276	0.293	0.295
Largo de la antera	0.184	-0.363	-0.263	-0.090	-0.096
Ancho de la antera	0.174	0.258	-0.093	0.051	-0.112
Largo del ovario	0.071	0.338	0.288	0.028	0.211
Diámetro del ovario	0.240	0.062	0.134	-0.199	0.101
Largo del estilo	0.167	0.099	0.201	-0.404	0.127
Largo del ginóforo	0.207	-0.093	-0.380	-0.086	-0.207

Cuadro 5. Caracteres de las especies del género *Milla* utilizados en el análisis canónico discriminante. Se destacan los valores con mayor peso en el grupamiento.

Variable	Can1	Can2	Can3	Can4	Can5
Valor de carga	32.62	7.94	3.03	1.70	1.24
Variación acumulada (%)	64.03	79.59	85.53	88.87	91.32
Diámetro del corno	0.621	0.189	0.189	0.196	0.015
Largo de hoja	0.002	0.316	0.209	-0.072	0.235
Ancho hoja	0.674	0.045	0.287	-0.559	0.039
Largo del escapo	0.897	0.038	0.038	-0.204	0.001
Diámetro del escapo	0.535	0.271	0.271	-0.108	0.453
Largo pedicelo	0.859	0.063	0.063	0.001	0.101
Largo bráctea	0.858	0.630	0.631	-0.157	0.249
Largo tubo floral	0.097	0.396	0.359	0.053	0.210
Ancho tépalo interno	0.204	0.175	0.593	-0.060	-0.173
Largo apículo	0.206	0.568	0.568	-0.059	-0.152
Largo antera	0.886	0.110	0.111	0.095	0.083
Largo ovario	-0.322	-0.418	0.634	0.255	-0.010
Largo estilo	0.171	0.328	0.229	0.297	-0.029
Largo ginóforo	0.537	-0.384	0.414	0.236	-0.417

Cuadro 6. Porcentaje de los individuos de las especies y morfos de *Milla* que se incluyeron en los grupos previamente reconocidos con base en el Análisis Discriminante.

Especies y Morfos	% de individuos
<i>Milla bryanii</i> , <i>M. magnifica</i> , <i>M. mexicana</i> , <i>M. rosea</i> , Morfo 1 (Oax.2), 3 (BCS), 5 (Zac3), 14 (Oax12), 17 (Oax13), 20 (Oax-Pue2), y 26 (Hgo).	>80
<i>Milla valliflora</i> , Morfo 2 (Mor1), 6 (Nay1), 7 (Pue2), 8 (Oax6), 21 (Oax1), 9 (Oax9), 10 (Mich1), 11 (Chis1), 12 (Chis2), 12 (Oax8), 13 (Oax11), 18 (Pue1), 22 (Oax3), 22 (Oax4) y 23 (Zac3).	50-79
<i>Milla biflora</i> (Ags), (Gto), (Mor2), (Pue-Ver), (VM), <i>M. filifolia</i> , <i>M. oaxacana</i> , <i>M. potosina</i> , Morfo 4 (Oax5), 15 (Oax7), 16 (Oax10), 19 (Gro), 24 (Nay2), 25 (Chih) 25 (Mich2) y 25 (Zac2).	<49

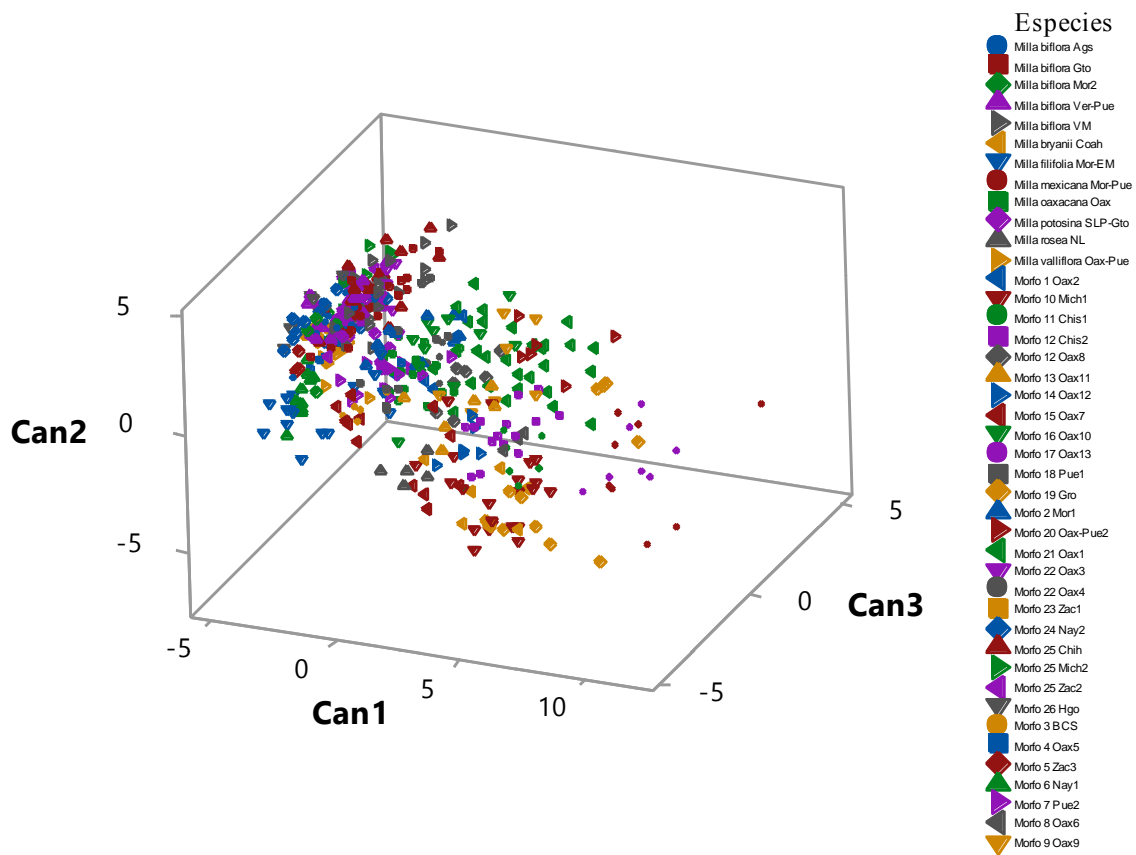


Figura 1. Representación gráfica de las tres primeras funciones canónicas del análisis canónico discriminante de 24 variables para ocho especies de *Milla* y 26 morfós de *M. biflora s.l.*

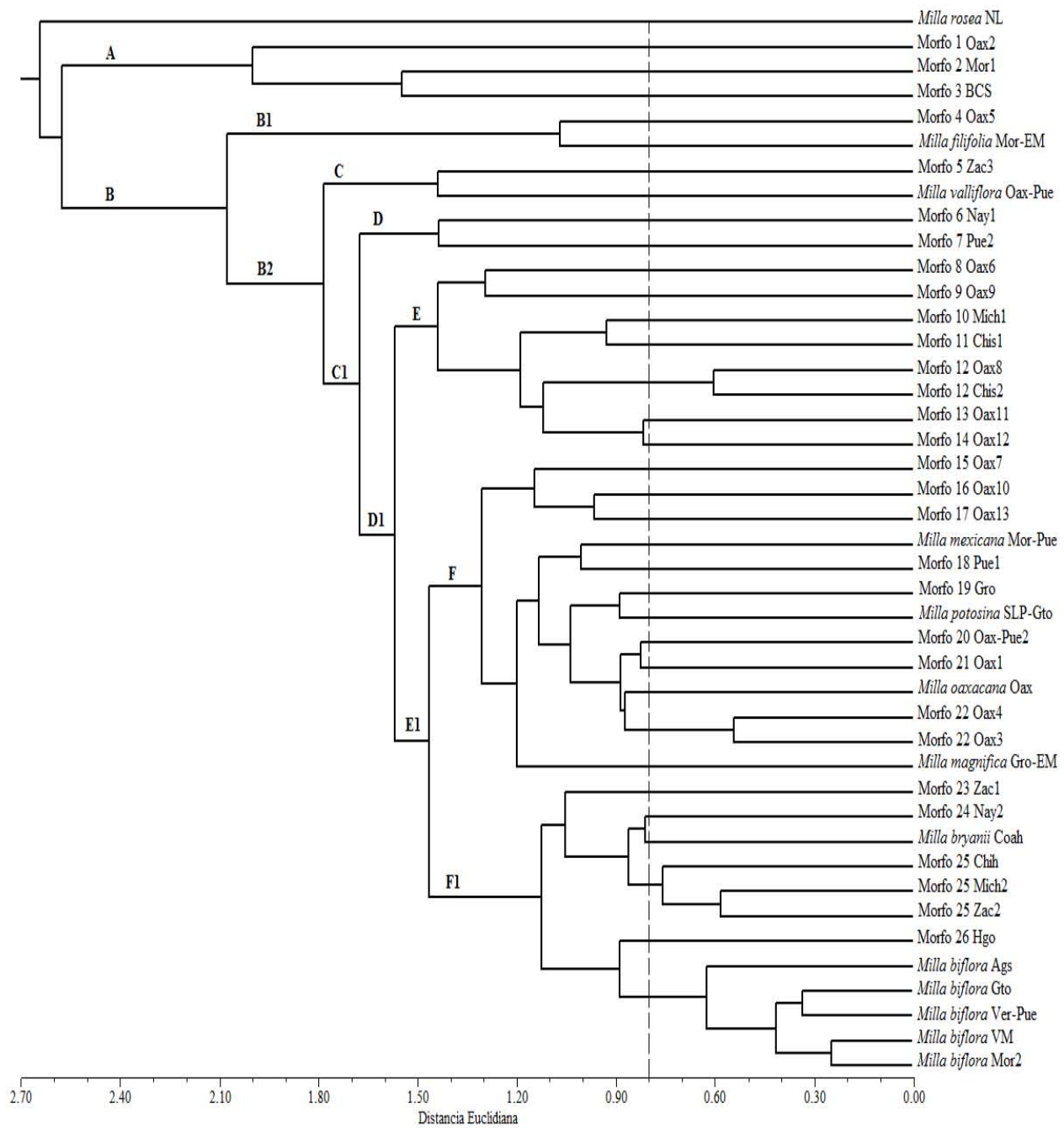


Figura 2. Análisis de agrupamiento para las nueve especies y 26 morfos de *Milla* con el coeficiente de Distancia Euclidiana y UPGMA. La Distancia Euclidiana para reconocer las especies es a partir de 0.80 (línea punteada).

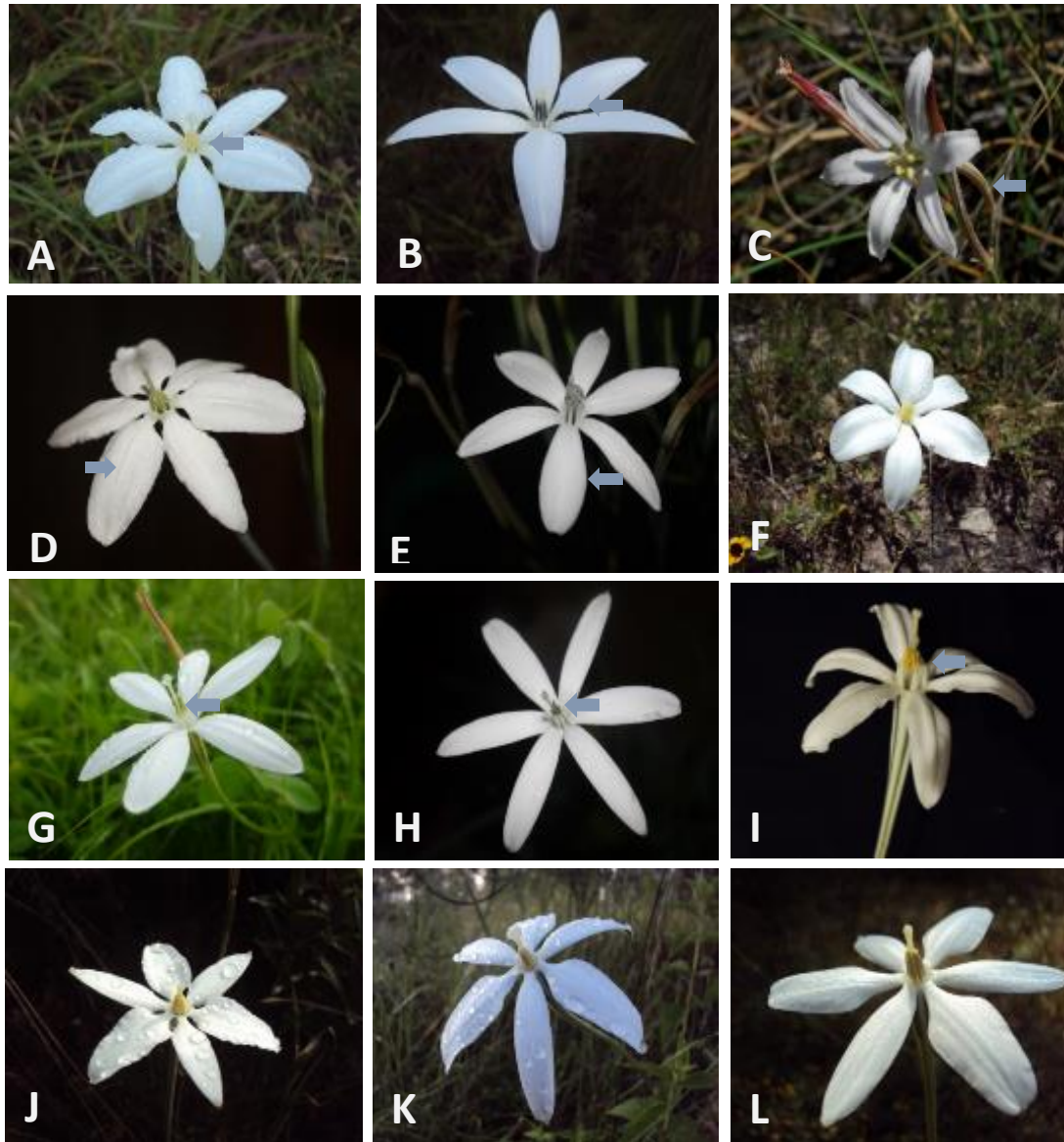


Figura 3. Variación floral de las especies y los morfos de *Milla*. A) Morfo 1 (*J. Gutiérrez et al. 1163*) base del tépalo interno cuneados; B) Morfo 21 (*J. Gutiérrez et al. 1160*) base del tépalo interno atenuado; C) *Milla rosea* (*J. Gutiérrez et al. 1218*) tubo floral <5.0 cm; D) *Milla filifolia* (*J. Gutiérrez e I. Escalante 1133*) tépalos internos ovados; E) *Milla mexicana* (*J. Gutiérrez 1144*) tépalos internos angostamente elípticos; F) *Milla valliflora* (*J. Gutiérrez et al. 1151*) flor única; G) Morfo 10 (*J. Gutiérrez y R. Rios 1342*) anteras color verde; H) Morfo 19 (*J. Gutiérrez y R. Rios 1344*) anteras de color azul; I) *Milla bryanii* (*J. Gutiérrez et al. 1226*) anteras amarillas; J) *Milla biflora* (*J. Gutiérrez et al. 1195*) flores con apertura diurna y nocturna de color blanco; K) *Milla biflora* (*J. Gutiérrez et al. 1362*) tépalos externos elípticos, tépalos internos angostamente elípticos con base cuneada; L) *Milla biflora* (*J. Gutiérrez et al. 1254*) filamentos <1 mm de largo y anteras amarillas.

CAPÍTULO IV

Phylogenetic analysis of the *Milla* complex (Themidaceae), with emphasis on *Milla*

Con formato para:

Botanical Journal of the Linnean Society

Phylogenetic analyses of the *Milla complex* (Themidaceae), with emphasis on *Milla*

Jorge Gutiérrez^{1,2}, Teresa Terrazas^{1*}, Isolda Luna-Vega³ and Gerardo A. Salazar¹

¹Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-153, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510, Mexico City, D.F., Mexico

²Unidad de Investigación en Sistemática Vegetal y Suelo, Carrera de Biólogo, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Batalla 5 de mayo s/n. Col. Ejército de Oriente, Iztapalapa, 09230, Mexico City, D. F., Mexico

³Laboratorio de Biogeografía y Sistemática, Departamento de Biología Evolutiva, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado postal 70–399, Mexico City 04510, D.F., Mexico.

* Author for correspondence: tterrazas@ib.unam.mx

Short title *Phylogeny of the Milla complex*

ABSTRACT

The delimitation and phylogenetic relationships of the genera *Bessera*, *Dandya* and *Milla* remain poorly understood. Thus, detailed phylogenetic analyses on this group of species are needed, particularly for *M. biflora* that may constitute a complex of species. The main goals of this study were to investigate the phylogenetic relationships and taxonomic delimitation of genera within the *Milla* complex and particularly of *M. biflora*. Maximum Parsimony and Bayesian Inference analyses were conducted using chloroplast (*trnL-F*, *psbK-I*) and nuclear (ITS) DNA sequence data, together with 60 morphological traits. We constructed independent data matrices that included 19 of the 20 species recognized for the *Milla* complex and five outgroup species from the *Brodiaea* complex. The evolution of some floral traits was also investigated. The phylogenetic trees showed incongruence among data matrices, resulting in different relationships among genera and species of *Milla*. The analysis of total evidence supported the monophyly of *Bessera* and *Petronymphe*. *Milla* and *Dandya* are paraphyletic showing strong support. The present results suggest that genera within the *Milla* complex have evolved long floral tubes covering the ovary and erect flowers. The *Milla* s.s. clade included three main groups allied to 1) *M. bryanii*, 2) *M. biflora* and 3) *M. oaxacana*. The present study supports the recognition of five genera within the *Milla* complex and also resolves the phylogenetic relationships within the *M. biflora* group.

ADDITIONAL KEYWORDS: Asparagales- total evidence- incongruence- gynophore- *Milla biflora*.

INTRODUCTION

Our understanding of the phylogenetic relationships among several plant groups has been greatly improved by the use of DNA sequence data. This can be appreciated through the results of the Angiosperm Phylogeny Group III (2009) system of taxonomic classification. DNA sequence data are considered the most adequate type of evidence to reconstruct the evolutionary history and phylogenetic relationships among species (Bromham, 2003; Scotland, 2003; Whitfield & Lockhart, 2007). Nevertheless, sequence data are not without limitations, which mostly involve phylogenetic incongruence among genes (Guigo *et al.*, 1996; Maddison, 1997; Wortley & Scotland, 2005). Contrary to DNA sequences, morphological data have generally been considered by some as insufficient, subjective, ambiguous and non-informative to assess phylogenetic relationships (Scotland *et al.*, 2003).

Several authors have discussed the advantages of combining both types of evidence — morphology and DNA sequence data — in phylogenetic reconstruction (Kluge, 1989; Bull *et al.*, 1993; Miyamoto & Fitch, 1994; Huelsenbeck *et al.*, 1996; Wiens, 2004; de Queiroz & Gatesy, 2006). Several recently evolved plant groups, with uncertain taxonomic relationships among species, have been analyzed using combined DNA and morphological data (total evidence), resulting in an increased phylogenetic resolution (e.g. Caddik *et al.*, 2002; Sánchez-Ken & Clark, 2010; Clennett *et al.*, 2012; Skema, 2012; Lewis *et al.*, 2013). As pointed out by Wortley & Scotland (2005), morphological evidence has had a central role for the understanding of the life cycles, evolution, geographic distribution, identification, conservation, and taxonomic delimitation of several groups of species. This has been the case of several genera (Caddik *et al.*, 2002; Pires & Sytsma, 2002; Chase, 2004; Rønsted *et al.*, 2005; Clennett *et al.*, 2012; Andrés-Hernández *et al.*, 2014). In particular, phylogenetic analyses in the order Asparagales (Chen *et*

al., 2013) have suggested a recent diversification of species. For example, a study on the *Milla* clade suggested that this group diversified during the Miocene (Gándara *et al.*, 2014), a period characterized by the origin of present-day arid conditions throughout North America.

The *Milla* complex (Moore, 1953; Pires & Sytsma, 2002) includes five genera: *Bessera* Schult. f., *Dandya* H.E. Moore, *Milla* Cav., *Jaimehintonia* Turner and *Petronymphe* H.E. Moore. These genera are composed of a small number of geophytic species with restricted distributions throughout Mexico (Moore, 1953; Pires *et al.*, 2001; Pires & Sytsma, 2002; Gándara *et al.*, 2014). The exception to this pattern is *M. biflora* Cav., which has a wide distribution ranging from Arizona to Honduras (Gutiérrez & Solano, 2015). Within the complex, *Milla* is the most diverse genus with 11 species, followed by *Dandya* with four and *Bessera* with three. The genera *Jaimehintonia* and *Petronymphe* are monospecific (Espejo-Serna, 2012). Historically, classifications based on floral morphology and molecular data (Bentham & Hooker, 1883; Melchior, 1964; Hutchinson, 1959; Dahlgren *et al.*, 1985; Fay & Chase, 1996; Chase *et al.*, 2009) have placed the members of the *Milla* complex in different families, namely Amaryllidaceae, Liliaceae, Themidaceae and, currently, Asparagaceae.

Moore (1953) reviewed the floral morphology of the *Milla* complex and outlined the tendency of these species to develop long floral tubes, connation of the filaments and adnation between ovary and floral tube. Moore considered *Dandya* as the most primitive genus, based on the presence of a short perianth and sub-campanulate flowers. On the other hand, this author considered *Milla* as the most evolved genus, which has long floral tubes and gynophores that are adnate to the perianth tube. The members of the *Milla* complex are morphologically distinguished by the presence of a membranous corm tunic and by the occasional development of rhizomes or cormels that facilitate vegetative propagation (Moore, 1953; Howard, 1999). The leaves are linear

and terete, subterete, flattened or triangular in cross-sections (Gutiérrez *et al.*, 2015). The flowers are disposed in umbels, rarely solitary, and have a gynophore supporting the ovary, and both may be adnate to the perianth tube (Pires *et al.*, 2001; Pires & Sytsma, 2002; Gutiérrez *et al.*, 2010). The species of the *Milla* complex thrive in desert scrubs, tropical deciduous forests and pine-oak forests. Plants grow in shallow soils that are frequently derived from limestone or gypsum, from near sea level up to 2800 meters elevation. Except for widespread (in Mexico) *Bessera elegans* and *Milla biflora*, the members of the *Milla* complex have restricted distributions (Gándara *et al.*, 2014).

Phylogenetic analyses using plastid (*rbcL*, *trnL-trnF*, *ndhF*, *rpl16*, *psbK-psbI*) and nuclear DNA sequence data (ITS and ETS) have confirmed the monophyly of the *Milla* complex (Fay & Chase, 1996; Pires & Sytsma, 2002; Gándara *et al.*, 2014). Monophyly is also supported by a total evidence analysis (plastid DNA combined with 25 morphological traits; Pires *et al.*, 2001). However, generic and specific delimitations and phylogenetic relationships within the complex remain poorly resolved (Pires *et al.*, 2001; Pires & Sytsma, 2002; Gándara, 2009). Recently, Gándara *et al.* (2014) pointed out that unless the species limits within *Milla s.s.* are clearly solved, especially for *M. biflora*, the delimitation of other genera within the complex will remain problematic. To date, there no analyses using total evidence have been conducted to establish generic limits within the complex and, more specifically, to establish species limits within the wide-ranging *M. biflora*. In this context, we examined the phylogenetic relationships within the *Milla* complex using DNA sequence data (*trnL-trnF*, *psbK-I* and ITS) and morphological characters. The main goals of the present study were to assess the delimitation of genera within the complex and to evaluate the limits of *M. biflora*, since it is the most variable species of this genus.

MATERIALS AND METHODS

TAXON SAMPLING

In the present analyses, the *Milla* complex was represented by 19 out of the 20 species recognized for the genera *Bessera*, *Dandya*, *Milla*, *Jaimehintonia* and *Petronymphe* (Appendix 1). We included 26 morphospecies previously classified as *Milla biflora sensu* Moore (1953) from populations distributed through most of the species range (*i.e.*, from the southern USA to Chiapas, Mexico) (Gutiérrez et al., in revision). *Milla delicata* was not included because of unavailability of material (either fresh or in herbaria). Additionally, we included 18 individuals of *Bessera elegans*, five individuals of *Dandya thadhowardii* and one individual considered as a new species of *Petronymphe*. *Androstephium caeruleum* Torr., *Bloomeria crocea* (Torr.) Coville, *Dichelostemma capitatum* (Benth.) Alph. Wood, *D. pulchelum* (Salisb.) A. Heller and *Muilla maritima* (Torr.) S. Watson were used as the outgroup (after Pires & Sytsma, 2002).

MORPHOLOGICAL CHARACTERS

Our morphological analysis of vegetative and floral characters was based on the revision of 850 from several herbaria (ARIZ, BH, F, FC, GH, IEB, INECOL, JEPS, MEXU, NY, RSA, SLPM, US, XAL) and 500 specimens newly collected in the field (a complete list is available upon request). In total, 60 morphological and anatomical characters were coded (38 binary and 22 multistate characters; Appendixes 2, 3) as primary homology hypotheses (De Pinna, 1991) and used in the analyses. The multistate characters were treated as unordered (Fitch parsimony; Fitch, 1971).

DNA EXTRACTION, AMPLIFICATION AND SEQUENCING

DNA was extracted from silica gel-dried tissue obtained directly in the field, with the exception of *Milla mortoniana*, for which DNA was extracted from a herbarium specimen. We obtained plastid DNA sequences (*trnL-trnF*) from GenBank for the outgroup species *Androstephium caeruleum* (AF508460.1), *Dichelostema multiflorum* (AJ311079.1) and *Muilla maritima* (AF508486.1).

Total DNA extraction was performed with a modified CTAB protocol (Doyle & Doyle, 1987), using 0.5-1.0 g of plant material. PCR amplifications for *trnL-trnF* and *psbK-psbI* were conducted in 25- μ L reactions containing final concentrations of 1x PCR buffer, 0.5 mM of MgCl₂, 0.2 μ M of dNTPs, 0.04% of BSA, 0.1 μ M of each primer, 0.125 units of *Taq* DNA-polymerase (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) and 0.5-1 μ l of template DNA. PCR amplifications for ITS were conducted as above but with an additional 0.2% of DMSO to reduce amplification problems associated to secondary structure (Clennet *et al.*, 2012).

The *trnL-trnF* intergenic region was amplified using the 'c' and 'f' primers of Taberlet *et al.* (1991). PCR consisted of an initial denaturation at 94°C for 2 min, 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 48°C for 1 min, extension at 72°C for 2 min, and a final extension at 72°C for 7 min. The *psbK-psbI* intergenic region was amplified using the primers of Lahaye *et al.* (2008). PCR consisted of an initial denaturation at 94°C for 2 min, 32 cycles of denaturation at 94°C for 40 s, annealing at 48°C for 40 s, extension at 72°C for 40 s, and a final extension at 72°C for 7 min. The ITS region was amplified with primers 'ITS4' and 'ITS5' of White *et al.* (1990). PCR consisted of an initial denaturation at 94°C for 2 min, 28-30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 52°C for 1 min, extension at 72°C for 2 min, and a final extension

at 72°C for 7 min. All PCR products were sent to a commercial sequencing service (High Throughput Genomics Unit, University of Washington, Seattle, Washington, USA). Bidirectional sequence reads were obtained for each accession. Sequences were assembled and edited with Sequencher 4.7 (GeneCode), Alignment was performed using MUSCLE (Edgar, 2004), followed by minor manual adjustment. Indels were treated as missing data.

PHYLOGENETIC ANALYSIS

We conducted maximum parsimony (MP) analyses of four datasets. First, a phylogenetic analysis was performed with the morphological characters for 74 terminals. Second, we analyzed the concatenated sequence data of plastid *trnL-trnF* and *psbK-psbI* for 74 terminals. In this analysis we discarded a 242 bp insertion observed in *psbK-psbI* for *Dichelostema capitatum* and *M. bryanii* to avoid problems of branch attraction (Gándara *et al.*, 2014). Third, an analysis was conducted for ITS using the 60 terminals for which sequences of that region were available; 14 samples were unable to amplify. Fourth, a total evidence analysis (plastid and nuclear sequence data plus morphology) was carried out, including the 74 terminals. The MP analyses were conducted with TNT v. 1.1 (Goloboff *et al.*, 2008) for each data matrix. Each analysis consisted of a heuristic search with 10,000 random replicates, retaining 100 trees per replicate, using the tree bisection-reconnection algorithm (TBR, Goloboff *et al.*, 2008). Node support was estimated by 10,000 bootstrap (BS, Felsenstein, 1985) and 10,000 jackknife (JK) replicates (Farris *et al.*, 1996).

Based on the results by parsimony, a Bayesian Inference (BI) analysis was only conducted using the total evidence matrix with MrBayes v. 3.2 (Ronquist *et al.*, 2012). We employed a model with six different substitution rates (LSET nts=6). For each partition of

molecular data (*trnL-F*, *psbK-I*, ITS), base frequencies estimated from the sequence data and a Gamma-shaped distribution was used for the morphological data. The rate variation for the morphological data was enforced with `lset applyto=(1)` and `rates=gamma` as mentioned by Ronquist *et al.* (2015). For rate heterogeneity among sites, because this model includes the best fit to the data analysed. Molecular (*trnL-trnF*, *psbK-psbI*, ITS) and morphological (60 characters) data were treated as independent partitions. The posterior probability (PP) was calculated running simultaneously four Monte Carlo Markov chains (MCMC). Two independent runs were performed for five million generations, sampling trees every 1250000 generations. The first 25% generations were discarded as 'burn-in'. For each node, the PP was determined by a 50% majority consensus among the retained trees. The resulting MP and Bayesian phylogenetic trees were edited with Winclada V.1.00.08 (Nixon, 1999-2002) and FigTree v. 1.3.1 (Rambaut, 2009), respectively.

FLORAL CHARACTER EVOLUTION

The BI analysis of the combined data set (morphology and sequence data) was used to investigate four floral traits evolution across species of the *Milla* complex using Mesquite v. 3.01 (Maddison & Maddison, 2010). The floral characters size, shape, color and time when flowers were selected because they have been related to pollination syndromes. Some of these characters had already been used to establish evolutionary and phylogenetic hypotheses (Moore, 1953; Pires *et al.*, 2001; Pires & Sytsma, 2002). Gándara *et al.* (2014) suggest that a pollinator change may originate isolation and speciation.

RESULTS

PHYLOGENETIC ANALYSES

The analysis of morphological data included 56 terminals and 60 informative characters, resulting in ten equally parsimonious trees with a length of 342 steps (CI=0.26, RI=0.75). The strict consensus tree (Fig. 1) recovered *Dandya* (BRB) as paraphyletic, including a clade consisting of *D. thadhowardii* and *D. balsensis*, but with *D. purpusii* and *D. hannibalii* being successive sisters to another clade formed by *Milla*, *Bessera*, *Jaimehintonia* and *Petronymphe*. In this tree, *Milla* is polyphyletic because *M. mortoniana* did not group with the other morphospecies of *Milla*. Monophyletic *Bessera*, monotypic *Jaimehintonia* and *Petronymphe* form a grade in which the remaining species of *Milla* form a well-supported clade (BS: 87, JK: 93).

The analysis of plastid DNA sequences included the same 56 terminals as the morphological analysis and 1,223 aligned characters, of which 84 are informative to parsimony, resulting in five equally parsimonious trees with a length of 153 steps (CI=0.85, RI=0.91). The consensus tree recovered the monophyly of *Bessera*, whereas the species of *Dandya*, *Milla*, *Jaimehintonia* and *Petronymphe* are intermingled. As in the morphological analysis, *Milla mortoniana* groups with species of *Dandya* (Fig. 2).

The analysis of ITS sequences included 44 terminals and 696 aligned characters, 63 of them informative to parsimony, resulting in five equally parsimonious trees with a length of 273 steps (CI=0.83, RI=0.89). This consensus tree recovered *Bessera*, *Dandya* and *Milla* as polyphyletic (Fig. 3).

The MP analysis of all the data combined included 1,981 characters, the 60 morphological characters and 147 molecular characters were informative (Table 1). The analysis of total

evidence resulted in nine equally parsimonious trees with a length of 889 steps (CI=0.50, RI=0.74).

The strict consensus trees from the MP and BI analyses were dissimilar (Figs. 4, 5). The MP trees resolved the phylogenetic relationships between *Dandya purpusii*, *Bessera*, *Jaimehintonia*, *Petronymphe* and *Milla*. Both trees recovered *Dandya* (BRB) + *M. mortoniana* as sister to *D. purpusii*. There is good support for a monophyletic *Bessera* (JK 95, BS 98) and *Jaimehintonia* + *Petronymphe* are recovered as sister to *Milla s.s.* Overall, there is good support for *Dandya* (BRB) + *M. mortoniana*, *Bessera*, *Milla s.s.*, and *Petronymphe* (Fig. 4). Moreover, each of the large clades are supported by synapomorphic characters (see tree values in parenthesis) that will be discussed later.

The BI tree gives higher supported monophyletic groups and the sister relationships among genera of the *Milla* complex. This analysis recovers *Dandya* (BRB) + *M. mortoniana* with high support. *Dandya purpusii* is sister to the remainder taxa. *Bessera*, *Jaimehintonia* and *Petronymphe* are grouped in a clade with high support (PP:0.99), in which *Bessera* and *Petronymphe* are sister taxa and both are monophyletic with the highest support (Fig. 5). *Milla s.s.* has the highest support (PP:1) and it is sister to the clade of *Bessera*, *Jaimehintonia* and *Petronymphe*.

Floral characters evolution is shown in Figure 6. Flowers with the shorter tubes have the plesiomorphic state within the *Milla* complex (Fig.6A), whereas the subcampanulate flowers are plesiomorphic, the hypocrateriform ones appeared independently three times in *Jaimehintonia*, *Milla mortoniana* and *Milla s.s.* Flower color and time of anthesis do not support monophyletic groups and are highly homoplasious.

DISCUSSION

PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS

Both analysis of total evidence recovered *Bessera*, *Jaimehintonia*, *Petronymphe* and *Milla s.s.* as monophyletic (Figs. 4, 5). The clade A, which includes three species of *Dandya* distributed in the Balsas river basin (BRB) + *M. mortoniana* is supported as sister to the remaining genera. This phylogenetic relationship is also observed in the plastid DNA tree (Fig. 2). A complete stigma and external tepals without apicules are synapomorphic to clade A. Gándara *et al.* (2014) uncovered evidence of a clade constituted by species of *Dandya* (BRB), *M. potosina*, *M. mexicana*, *M. oaxacana*, and *M. magnifica*. Likewise, the results of our cpDNA and ITS tree topologies reveal differences in the phylogenetic position of *B. tenuiflora*, *M. potosina*, *M. magnifica*, and *Petronymphe* spp. Nevertheless, the inclusion of morphological traits in the phylogenetic reconstruction resulted in well-supported clades which are consistent with previously established genera, except for the strongly supported embedding of *Milla mortoniana* in *Dandya* (Figs. 4, 5). Our total evidence analyses thus allow us to circumscribe the genera and to establish their phylogenetic position within the *Milla* complex.

The phylogenetic position of *Dandya purpusii* has not been previously evaluated. The present results fail to group *D. purpusii* with other species of *Dandya* (BRB) plus *M. mortoniana*. However, there is weak support for this relationship in MP and thus we prefer to consider *D. purpusii* as part of *Dandya*, pending further study that clearly demonstrates otherwise (Fig. 5).

Our BI analysis recovers a well-supported clade in which *Jaimehintonia* is sister to *Petronymphe* and *Bessera* (Fig.5). Gándara *et al.* (2014) showed a clade with *Jaimehintonia* and species of *Milla* and *Dandya*. However, our total evidence BI analysis does not support their

findings. The phylogenetic position of *Petronymphe* has been controversial ever since Moore's (1951, 1953) interpretation on the fusion of floral whorls. Both *Petronymphe* and *Milla* have long floral tubes but differ in the position of the flowers, which are erect in *Milla* but pendulous in *Petronymphe*. The latter genus is further differentiated by the presence of nastic movements of the fruit pedicel and the depression of the floral tube. These two characters and the transversally ovoid shape of the filament are synapomorphies of *Petronymphe* and are shared by *P. decora* and a new species of this genus included in our analyses. The phylogenetic relationships among genera are evidence of a progression towards the development of longer floral tubes, as previously suggested by Moore (1953).

Bessera sister to *Petronymphe* is monophyletic with the highest support including *B. tenuiflora* as the earliest derived taxon of this genus. Moreover, *Bessera* shows almost all the floral morphologies present in the *Milla* complex, with the exception of the hypocateriform flowers characteristic of *Jaimehintonia* and *Milla*. The flowers of *Bessera* are odourless, brightly coloured and are the only members of the complex with connate stamens. Species of this genus diversified throughout the Mexican Pacific coast, except for *B. tenuiflora* that is distributed in southern Baja California. This disjunct distribution is probably the result of a vicariant event produced by the separation of the southern tip of Baja California from the continent (Ferrusquía-Villafranca, 1993). The phylogenetic position of *B. tenuiflora* has been controversial. Some authors have proposed that this species should be classified within a monotypic genus (*Behria*) based on the morphological traits (tubular flowers; Greene, 1886; Lenz, 1971; León de la Luz & Pérez-Navarro, 2004) and sequence data (*rbcL*, *trnL-trnF*, *ndhF*, *rpl16*, *psbK-psbI*, ITS, and ETS; Gándara *et al.*, 2009, 2014). Our results in both total evidence analyses (BS: 80; JK: 84; Fig. 4 and PP: 1; Fig. 5) supported *B. tenuiflora* as a member of *Bessera*. Gutiérrez *et al.* (2010)

suggested several apomorphies in floral morphology supporting the monophyly of *Bessera*. The present results confirm those hypotheses. However, our analyses show that there are probable cryptic species within *B. elegans*, some of which are more closely related to *B. tuitensis*. Further studies are needed to evaluate the limits of *B. elegans*.

The *Milla s.s.* clade, *i.e.* to the exclusion of *M. mertoniana*, is the most derived group within the complex. The position of *M. mertoniana* turns *Milla s.l.* paraphyletic and in need of a new circumscription to achieve monophyly. This result contrasts with the polyphyletic *Milla* proposed by Gándara *et al.* (2014). Our MP revealed a poor resolution within the *Milla s.s.* clade. Further analysis including only the *Milla* with other markers probably will allow a better understanding the species relationships.

FLORAL CHARACTER EVOLUTION OF THE *MILLA* COMPLEX

The occurrence of hypocrateriform flowers in *Jaimehintonia gypsophila*, which are also present in the species of *Milla*, is probably the morphological trait responsible for the controversy surrounding the recognition of the genus *Jaimehintonia*. The sister relationship between *Petronymphe* and *Bessera* has a good support (PP: 1.0). The phylogenetic position of *Petronymphe* has been controversial ever since Moore's (1951, 1953) interpretation on the fusion of floral verticils. Both *Petronymphe* and *Milla* have long floral tubes but differ in the position of the flowers, which are erect in *Milla* but pendulous and the presence of nastic movements of the fruit pedicel in *Petronymphe* character shared with *Bessera*. *Petronymphe* is further differentiated by and the depression of the floral tube. These characters and the transversally ovoid shape of the filament are synapomorphies of *Petronymphe*.

The present study shows that the genera of the *Milla* complex develop longer floral tubes and larger gynophores, which is the case of *Bessera*, *Jaimehintonia*, *Petronymphe* and *Milla s.s.* (Fig. 6A). Members of *Dandya* have short floral tubes that facilitate the pollination by butterflies and flies. Species of *Bessera* have a great variability in the length of the floral tube (e.g., *B. tuitensis* has a short tube similar that of *Dandya*; *B. tenuiflora* develops long tube that completely surrounds the ovary, similar that of *J. gypsophila*; *B. elegans* has a medium-sized tube that partly surrounds the ovary). The progression in flower size observed among species of *Bessera* is the possible result of the tendency to develop longer floral tubes in order to protect the ovary and to attract hummingbirds for pollination. In *B. elegans*, the floral tube does not cover completely the ovary, it is substituted by connation of the filaments. Filament connation has also been described in species of *Dandya* and *Jaimehintonia* (Lenz, 1971; López-Ferrari & Espejo-Serna, 1992; Turner, 1993; Gándara *et al.*, 2009). However, anatomical studies of these two genera have allowed us to discard that such connation exists (Gutiérrez *et al.*, 2010). Thus, filament connation is a unique trait for *Bessera* within the *Milla* complex. *Milla s.s.* has the longest floral tubes among clades of the *Milla* complex. The elongation of the floral tube and the secretion of aromatic compounds probably evolved to attract sphingids, which perform nocturnal pollination. The development of a longer floral tube is correlated with an increasing size of the gynophore, which elevates the fertile portion to facilitate pollination.

Our results also show that subcampanulate flowers are plesiomorphic in the *Milla* complex, as in the case of *Dandya*. The campanulate, descending and tubular flowers of *Bessera*, which also occur in *Petronymphe*, have developed independently, probably as an adaptation for hummingbird pollination. Species of *Milla s.s.* and *Jaimehintonia* evolved hypocrateriform flowers (Fig. 6B). Moore (1953) stated that this flower shape was exclusive to *Milla*. However,

this particular floral morphology is the result of parallel evolution. The color of the flower is variable among species of the *Milla* complex [e.g., red, purple, violet in *Bessera*; blue, white in *Dandya* + *M. mortoniana*; pink, purple in *Jaimehintonia*; white or pink in *Milla s.s.*; red, yellow in *Petronymphe* (Fig. 6C)]. Our analysis revealed that white flowers are plesiomorphic and evolved independently in the clade of *Dandya* + *M. mortoniana* and in *Milla s.s.* as a probable adaptation to attract sphingids. The production of aromatic compounds and the hypocrateriform flowers support this hypothesis. The opening of flowers during daylight hours is a plesiomorphic character. Flowers opening exclusively during the night are present in nearly 50% of species of *Milla s.s.*, which are mainly distributed in southern Mexico.

In conclusion, the inclusion of structural traits in the phylogenetic analyses allowed us to support the monophyly of *Bessera*, *Milla s.s.*, *Jaimehintonia* and *Petronymphe*. We propose a new circumscription of *Dandya* by the inclusion of *M. mortoniana*, which is therefore excluded from *Milla s.s.* We recognize *D. purpusii* as part of *Dandya* until new evidence gives further support however, new evidence is needed to understand its phylogenetic position. However, the presence of a dissected stigma supports the close relationship between *D. purpusii* and *Bessera*. The phylogenetic hypothesis proposed in this study gives more clarity on the phylogenetic relationships among species of the *Milla* complex. This study also supports the position of *Bessera tenuiflora*, which should be recognized as part of *Bessera*. *Jaimehintonia gypsophyla* is sister to the clade *Petronymphe-Milla s.s.* *Petronymphe* needs to be recircumscribed to include two species, one of which is newly described (Gutiérrez *et al.*, in revision). The relationships among the species and subclades of *Milla s.s.*, however, are not fully resolved. In this respect, the combined study of DNA sequences data, chromosome data and the biochemistry of aromatic compounds may provide further clarity on the relationships among these species.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the curators of the herbaria ARIZ, BH, F, FC, GH, IEB, INECOL, JEPS, MEXU, NY, RSA, SLPM, US and XAL, for the loan of museum specimens. This paper is a requirement of the first author to get his PhD degree at the graduate program Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), who thanks the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología for financial support (grant no. 160287). We also thanks the facilities of the Systematic Laboratory at Instituto de Biología.

REFERENCES

- Andrés-Hernández AR, Terrazas T, Salazar G, Ochoterena H. 2014.** Phylogenetic analysis based on structural and combined analyses of *Rhus* ss (Anacardiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **176**: 452–468.
- APG III. 2009.** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**: 105–121.
- Bentham G, Hooker JD. 1883.** Ordo CLXXVIII. Liliaceae. In: *Genera Plantarum* 3 (pt. 2): 748–836.
- Bromham L. 2003.** Molecular clocks and explosive radiations. *Journal Molecular Evolution* **57**: S13–S0.
- Bull JJ, Huelsenbeck JP, Cunningham CW, Swofford DL, Waddell PJ. 1993.** Partitioning and combining data in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* **42**: 384–397.

- Caddick LR, Rudall PJ, Wilkin P, Hedderson TAJ, Chase MW. 2002.** Phylogenetics of Dioscoreales based on combined analyses of morphological and molecular data. *Botanical Journal of the Linnean Society* **138**: 123–144.
- Chase MW. 2004.** Monocot relationships: an overview. *American Journal of Botany* **91**: 1645–1655.
- Chase MW, Reveal JL, Fay MF. 2009.** A subfamily classification for the expanded asparagales families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**: 132–136.
- Chen S, Kim D-K, Chase MW, Kim J-H. 2013.** Networks in a large-scale phylogenetic analysis: reconstructing evolutionary history of Asparagales (Liliales) based on four plastid genes. *PloS one* **8(3)**: e59472.
- Clennett JCB, Chase MW, Forest F, Maurin O, Wilkin P. 2012.** Phylogenetic systematics of *Erythronium* (Liliaceae): morphological and molecular analyses. *Botanical Journal of the Linnean Society* **170**: 504–528.
- Dahlgren RMT, Clifford HT, Yeo PF. 1985.** *The families of monocotyledons. Structure, evolution, and taxonomy*. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg.
- De Pinna MGG. 1991.** Concepts and tests of homology in the cladistic paradigm. *Cladistics* **7**: 367–394.
- de Queiroz A, Gatesy J. 2007.** The supermatrix approach to systematics. *Trends in Ecology & Evolution* **22**: 34–41.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987.** A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**: 11–15.

- Edgar RC. 2004.** MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**: 1792–1797.
- Espejo-Serna A. 2012.** El endemismo en las Liliopsidas Mexicanas. *Acta Botanica Mexicana* **100**: 195–257.
- Fay MF, Chase MW. 1996.** Resurrection of Themidaceae for the *Brodiea* alliance, and recircumscription of Alliaceae, Amaryllidaceae and Agapanthuses. *Taxon* **45**: 441–451.
- Farris JS, Källersjö VA, Lipscomb M, Kluge D. 1996.** Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. *Cladistics* **12**: 99–124.
- Felsenstein J. 1985.** Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783–791.
- Ferrusquía-Villafranca I. 1993.** Geology of Mexico: a synopsis. In: Ramamoorthy TP, Bye R, Lot A, Fa J, eds. *Biological diversity of Mexico: origins and distribution*. New York: Oxford University Press, 3–107.
- Fitch WM. 1971.** Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology* **20**: 406–416.
- Gándara E, Sosa V, León de la Luz JL. 2009.** Morphological and molecular evidence in the delimitation of *Behria* and *Bessera*, two genera of the *Milla* complex (Themidaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **85**: 113–124.
- Gándara E., Specht CD, Sosa V. 2014.** Origin and diversification of the *Milla* clade (Brodiaeoideae, Asparagaceae): A Neotropical group of six geophytic genera. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **75**: 118–125.
- Goloboff P, Farris S, Nixon K. 2008.** TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* **24**: 774–786.

- Greene EL. 1886.** Genera confused under *Brodiaea*. *Bulletin of the California Academy of Science* **2**: 125–144.
- Guigo R, Muchnik I, Smith TF. 1996.** Reconstruction of ancient molecular phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **6**: 189–213.
- Gutiérrez J, Solano E. 2015.** *Milla valliflora* (Themidaceae), a new species from southern Mexico. *Brittonia* **67**: 43–47.
- Gutiérrez J, Terrazas T, Hernández L, Martínez-Cabrera D. 2010.** Anatomía floral de los géneros del complejo *Milla* (Themidaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **87**: 1–12.
- Gutiérrez J, Salgado J, Grego-Valencia D, Terrazas T. 2015.** Morfología y anatomía foliar de los géneros del complejo *Milla* (Themidaceae). *Revista Mexicana de Biodiversidad* **86**: 652–660.
- Howard TM 1999.** Three new *Milla* species from Mexico. *Herbertia* **54**: 232–237.
- Huelsenbeck JP, Bull JJ, Cunningham CW. 1996.** Combining data in phylogenetic analysis. *Trends in Ecology and Evolution* **11**: 152–158.
- Hutchinson J. 1959.** *The families of flowering plants*, Vol. 1. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press.
- Kazemi M, Kazempour Osaloo S, Asghar Maassoumi A, RastegarPouyani E. 2009.** Molecular phylogeny of selected Old World *Astragalus* (Fabaceae): incongruence among chloroplast *trnL-F*, *ndhF* and nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *Nordic Journal of Botany* **27**: 425–436.
- Kluge AG. 1989.** A concern for evidence and a phylogenetic hypothesis of relationship among *Epicrates* (Boidae, Serpents). *Systematic Zoology* **38**: 7–25.

- Lahaye R, Savolainen V, Duthoit S, Maurin O, van der Bank M. 2008.** A test of *psbK-psbI* and *atpF-atpH* as potential plant DNA barcodes using the flora of the Kruger National Park (South Africa) as a model system. *Nature Proceedings* **105**: 2923–2928.
- Lenz LW. 1971.** Chromosome number in the genus *Milla* Cav. (Liliaceae). *Aliso* **7**: 221–234.
- León de la Luz JL, Pérez-Navarro JJ. 2004.** Neotipificación de *Behria tenuiflora* Greene (Alliaceae). *Acta Botanica Mexicana* **67**: 59–66.
- LPWG. 2013.** Legume phylogeny and classification in the 21st century: progress, prospects and lessons for other species-rich clades. *Taxon* **62**: 217–248.
- López-Ferrari AR, Espejo-Serna A. 1992.** Una nueva especie de *Dandya* (Alliaceae) de la Cuenca del Río Balsas, México. *Acta Botanica Mexicana* **18**: 11–15.
- LPWG. 2013.** Legume phylogeny and classification in the 21st century: progress, prospects and lessons for other species-rich clades. *Taxon* **62**: 217–248.
- Maddison WP. 1997.** Gene trees in species trees. *Systematic Biology* **46**: 523–536.
- Maddison WP, Maddison DR. 2010.** *Mesquite: a modular system for evolutionary analysis*. Version 2.75 <http://mesquiteproject.org>
- Melchior H. 1964.** *A. Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien*, vol. 2. 12th ed. Aufl. Berlin: Borntraeger.
- Miyamoto MM, Fitch WM. 1995.** Testing species phylogenies and phylogenetic methods with congruence. *Systematic Biology* **44**: 64–76.
- Moore HE. 1951.** *Petronymphe*, a new genus of Amaryllidaceae. *Gentes Herbarum* **8**: 258–260.
- Moore HE. 1953.** The genus *Milla* (Amaryllidaceae-Allieae) and its allies. *Gentes Herbarum* **8**: 262–294.
- Nixon KC. 1999-2002.** WinClada ver. 1.0000. NY: Published by the author.

- Pires JC, Sytsma KJ. 2002.** A phylogenetic evaluation of a biosystematic framework: *Brodiaea* and related petaloid monocots (Themidaceae). *American Journal of Botany* **89**: 1342–1359.
- Pires JC, Fay MF, Davis WS, Hufford L, Rova J, Chase MW, Sytsma KJ 2001.** Molecular and analyses of Themidaceae (Asparagales). *Kew Bulletin* **56**: 601–626.
- Rambaut A. 2009.** FigTree v1.3.1: Tree figure drawing tool. Website:
<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- Rønsted N, Law S, Thornton H, Fay MF, Chase MW. 2005.** Molecular phylogenetic evidence for the monophyly of *Fritillaria* and *Lilium* (Liliaceae; Liliales) and the infrageneric classification of *Fritillaria*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **35**: 509–527.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003.** MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572–1574.
- Sánchez-Ken JG, Clark LG. 2010.** Phylogeny and a new tribal classification of the Panicoideae *s.l.* (Poaceae) based on plastid and nuclear sequence data and structural data. *American Journal of Botany* **97**: 1732–1748.
- Scotland RW, Olmstead RG, Bennett JR. 2003.** Phylogeny reconstruction: the role of morphology. *Systematic Biology* **52**: 539–548.
- Skema C. 2012.** Toward a new circumscription of *Dombeya* (Malvales: Dombeyaceae): a molecular phylogenetic and morphological study of *Dombeya* of Madagascar and a new segregate genus, *Andringitra*. *Taxon* **61**: 612–628.
- Swofford DL. 2002.** PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods), Version 4.0b10. MA, Sinauer Associates.
- Sytsma KJ, Hahn WJ. 2001.** Molecular systematics: 1997–1999. *Progress in Botany* **62**: 307–339.

- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J. 1991.** Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* **17**: 1105–1109.
- Turner BL. 1993.** *Jaimehintonia* (Amaryllidaceae: Allieae), a new genus from northeastern Mexico. *Novon* **3**: 86–88.
- Wendel JF, Doyle JJ. 1998.** Phylogenetic incongruence: window into genome history and molecular evolution. In: Soltis PS, Doyle JJ, eds. *Molecular systematics of plants II*. NY: Springer, 265–296.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, 315–322.
- Whitfield JB, Lockhart PJ. 2007.** Deciphering ancient rapid radiations. *Trends in Ecology and Evolution* **22**: 258–265.
- Wiens JJ. 2004.** The role of morphological data in phylogeny reconstruction. *Systematic Biology* **53**: 653–661.
- Wortley AH, Scotland RW. 2005.** The effect of combining molecular and morphological data in published phylogenetic analyses. *Systematic Biology* **55**: 677–685.

Table 1. Matrix of morphological characters.

Taxon	Characters											
	1....5	6....10	11....15	16....20	21....25	26....30	31....35	36....40	41....45	46....50	51....55	56....60
<i>Androsthephium coeruleum</i> TX	00001	001??	??201	10112	12031	00002	1?211	0001?	?0001	012?0	?0?02	00?0?
<i>Brodiaea crocea</i> BC	00001	001??	??001	100-0	12001	11000	1?-01	0000?	?1122	021?0	?0100	01?0?
<i>Dichelostema capitatum</i> BC	00001	001??	??201	101-1	12031	00002	1?000	0110?	?0000	002?0	?010[02]	00?0?
<i>Dichelostema pulchelum</i> CA	00?0?	--??	??-01	101-1	12031	00---	1?-00	0110?	?0000	0-2?0	?010(02)	00?0?
<i>Muilla maritima</i> CA	00002	001??	??001	10000	12001	31010	0?000	0?00?	?1122	111?0	?0?00	01?0?
<i>Bessera elegans</i> Jal	10211	00020	11000	00111	02111	20012	01111	21101	11112	12101	01121	11100
<i>Bessera elegans</i> Gro1	10501	00010	11000	00101	02111	20112	01111	21101	11112	12101	01121	01100
<i>Bessera elegans</i> Gro2	10501	00020	11000	00101	02111	20012	01111	21101	11112	12101	01121	11100
<i>Bessera elegans</i> Nay1	10?01	00020	11?00	00111	02111	20010	01111	21101	11112	12101	01121	11100
<i>Bessera elegans</i> Nay2	10412	00020	11200	00111	02111	20012	01111	21101	11112	12101	01121	11100
<i>Bessera tenuiflora</i> BCS	10501	000??	11200	00102	02131	20112	01111	21101	11112	12101	01121	10100
<i>Bessera tuitensis</i> Jal	10501	00020	11000	00000	12111	00002	01111	21101	11112	12100	01121	01100
<i>Dandya balsensis</i> Mor	10001	00011	01010	00000	12101	31112	01110	10000	00002	01100	11010	01011
<i>Dandya hannibalii</i> Mich	11411	00111	01011	00000	12001	01002	01110	10100	01122	11100	11010	01111
<i>Dandya purpusii</i> Coah	10210	00111	10001	10000	02001	01012	1?110	10100	01002	01103	01010	01001
<i>Dandya thadhowardii</i> Gro	10001	00011	01010	00000	12101	31112	01110	10000	00002	01100	11010	01011
<i>Dandya thadhowardii</i> Mich	10001	00011	01010	00000	12101	31112	01110	10000	00002	01100	11010	01011
<i>Jaimehintonia gypsophila</i> NL	10500	00011	11201	00111	02021	00012	11110	11101	11002	111?3	01022	20100
<i>Milla biflora</i> DF	10501	00111	10011	10322	02021	31012	10110	10010	00000	00213	01032	20101
<i>Milla bryanii</i> Coah	10501	00121	10011	10322	01021	31000	10110	10010	00000	01213	01032	20101
<i>Milla filifolia</i> Mor	10210	10111	10111	00321	02021	31022	10210	10010	00000	00213	01032	20101
<i>Milla magnifica</i> Gro	10502	10-21	10211	00322	02020	31000	10210	10010	00011	02213	01032	20101
<i>Milla mexicana</i> Pue	11412	00121	00011	00322	02020	31000	10310	10010	00021	01213	01032	20101
<i>Milla mortoniana</i> Mich	10411	010?2	0?001	10112	12021	01112	0?210	10000	00002	01002	010?2	10111
<i>Milla oaxacana</i> Oax	10501	00121	11011	10322	02020	31010	10210	10010	00020	01213	01032	20101

<i>Milla potosina</i> SLP	10501	00001	01211	00322	02020	31010	10110	10010	00010	01213	01032	20101
<i>Milla rosea</i> NL	10210	00011	01011	00221	01021	31001	10210	10010	00001	01213	01032	20101
<i>Milla valliflora</i> Oax	11210	00001	10011	10322	00021	31010	10(23)10	10010	00000	00213	01032	20101
Mor1 Oax	10701	00121	10111	10322	01021	31011	10210	10010	00000	01213	01032	20101
Mor2 Mor	10701	00111	11111	10322	02021	31111	10210	10010	00001	00213	01032	20101
Mor3 BCS	10500	000?1	??211	00212	01021	31011	10110	10010	00000	00213	01032	20101
Mor4 Oax	11301	00011	11111	10322	02020	31000	10210	10010	00020	01213	01032	20101
Mor5 Zac	10211	00111	00211	10322	01020	31010	10110	10010	00000	00213	01032	20101
Mor6 Nay	10500	00101	10211	10322	00021	31010	10110	10010	00000	00213	01032	20101
Mor7 Pue	1050-	00001	01211	10322	00020	31010	10110	10010	00020	01213	01032	20101
Mor8 Oax	10212	00121	01211	00322	02020	31000	10210	10010	00021	01213	01032	20101
Mor9 Oax	10212	000?1	??011	00322	02020	31110	10310	10010	00011	01213	01032	20101
Mor10 Mich	10601	00011	11011	10322	02020	31010	10310	10010	00021	01213	01032	20101
Mor11 Chis	11501	00111	10011	10322	01020	31010	10210	10010	00021	01213	01032	20101
Mor12 Chis	11301	00011	11011	00322	02020	31000	10210	10010	00021	01213	01032	20101
Mor13 Oax	11??1	000?1	??011	10322	02020	31121	10210	10010	00020	01213	01032	20101
Mor14 Oax	10211	000?1	??011	10322	02020	31010	10210	10010	00021	01213	01032	20101
Mor15 Oax	10501	00111	10011	10312	0(01)021	31002	10210	10010	00021	01213	01032	20101
Mor16 Oax	10412	00121	10111	10322	02020	31002	10310	10010	00010	01213	01032	20101
Mor17 Oax	11412	00111	00011	00322	02020	31002	10210	10010	00021	01213	01032	20101
Mor18 Pue	10501	00121	01011	00322	02021	31000	10210	10010	00021	01213	01032	20101
Mor19 Gro	11602	00021	10011	00322	02020	31000	10210	10010	00021	01213	01032	20101
Mor20 Pue	11602	00011	10011	00322	02020	31110	10(12)10	10010	00021	01213	01032	20101
Mor21 Oax	10601	00111	10011	10322	02020	31000	10310	10010	00011	01213	01032	20101
Mor22 Oax	10502	00121	10011	10312	02021	31000	10210	10010	00020	01213	01032	20101
Mor23 Zac	10501	00021	11011	10322	01021	31010	10110	10010	00000	00213	01032	20101
Mor24 Nay	10??0	11001	10011	10322	01021	31011	10110	10010	00000	00213	01032	20101
Mor25 Chih	10501	00111	10011	10322	02021	31000	10110	10010	00000	00213	01032	20101
Mor26 Hgo	10501	00111	10211	10322	02021	31012	10110	10010	00000	00213	01032	20101
<i>Petronymphe decora</i>	10002	00011	11000	01222	02131	10112	10110	11011	10011	11002	01022	20101

<i>Petronymphe sp. nova</i>	10501	00111	10000	01102	02131	20112	10110	11001	10011	11002	01022	00101
-----------------------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Table 2. General statistics of the Maximum Parsimony (MP) phylogenetic reconstruction of species within the *Milla* complex using DNA sequence and morphological data. Chloroplast DNA intergenic spacers: *psbK-psbI*, *trnL-trnF*. Nuclear DNA internal transcribed spacer: ITS. Total evidence: combined DNA sequence and morphological data matrix. Length: number of steps of the most parsimonious tree. See Appendix 1 for a list of morphological traits used in the analysis.

	<i>Morphology</i>	<i>psbK-psbI</i>	<i>trnL-trnF</i>	ITS	Total evidence
Length	60	217	1006	698	1981
Invariable traits	0	193	953	635	1781
Variables traits	60	27	57	63	206
Informative traits (%)	100	12.27	5.64	9.03	10.41

Figure Legends

Figure 1. Strict consensus tree of the ten most parsimonious trees obtained from the MP analysis of morphological characters. Tree length = 342 steps, IC = 0.26, IR = 0.75. Bootstrap and Jackknife values are indicated below and above the branches, respectively. See Appendix 1 for a list of morphological traits used in the analysis.

Figure 2. Strict consensus tree of the five most parsimonious trees obtained using the concatenated cpDNA sequence data (*trnL-trnF* and *psbK-psbI*) for species within the *Milla* complex. Tree length = 153 steps, IC = 0.85, IR = 0.91. Bootstrap and Jackknife values are indicated below and above the branches, respectively.

Figure 3. Strict consensus tree of the five most parsimonious trees obtained using the concatenated nDNA sequence data (ITS) for species within the *Milla* complex. Tree length = 273 steps, IC = 0.83, IR = 0.89. Bootstrap and jackknife values are indicated below and above the branches, respectively.

Figure 4. Strict consensus tree of the ten most parsimonious trees obtained using the concatenated cpDNA sequence data (*trnL-trnF* and *psbK-psbI*) and nDNA sequence data (ITS) for species within the *Milla* complex. Tree length = 889 steps, IC = 0.50, IR = 0.74. Bootstrap and Jackknife values from the Maximum Parsimony (MP) analysis are shown underneath each branch. A = *Dandya* (CRB) + *Milla mortoniana*; B = *Dandya purpusii*; C = *Jaimehintonia gypsophila*, D = *Petronymphe*. See Appendix 1 for a list of morphological traits used in the analysis.

Figure 5. Majority rule consensus tree obtained from the bayesian inference (BI) analysis of total evidence (*trnL-trnF*, *psbK-psbI*, ITS and morphological traits) for species within the *Milla* complex. Posterior probabilities are given for each branch.

Figure 6. Ancestral character state reconstructions of selected morphological characters under the strict consensus bayesian inference (BI) tree obtained for species within the *Milla* complex. A = length of the floral tube; B = flower shape; C= flower colour; D = timing of flower opening. See Appendix 1 for a list of morphological traits used in the analysis.

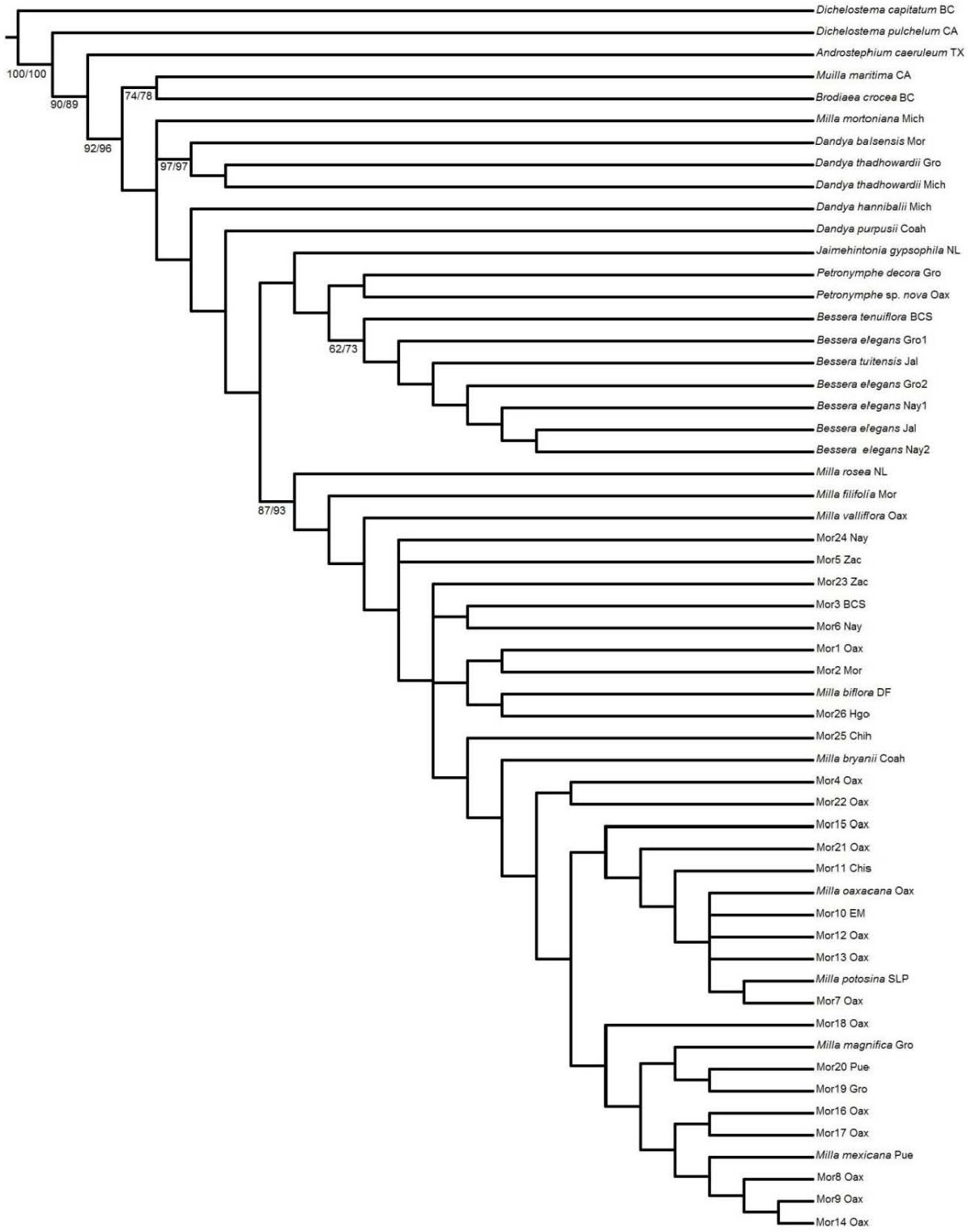


Figure 1.

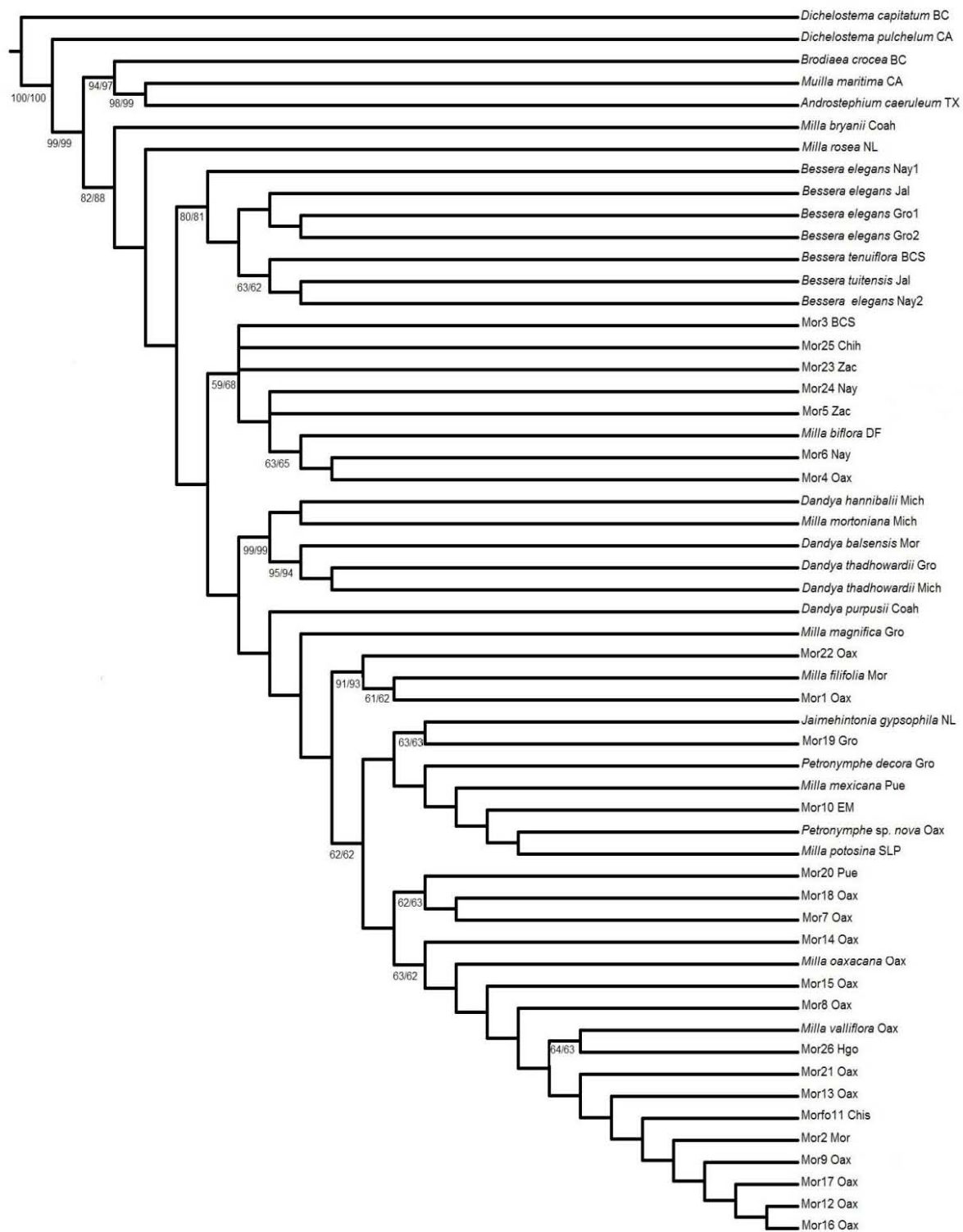


Figure 2

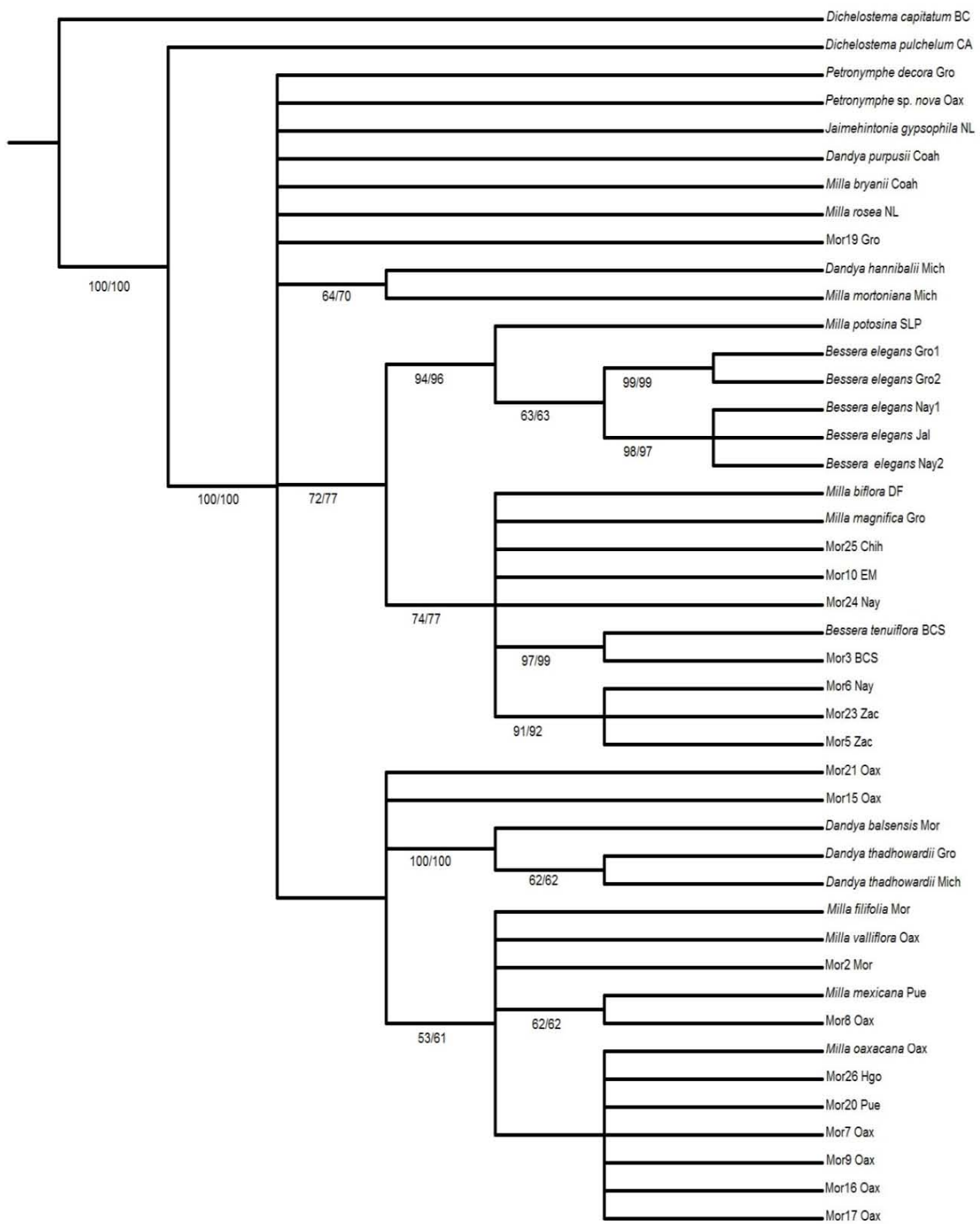


Figure 3.

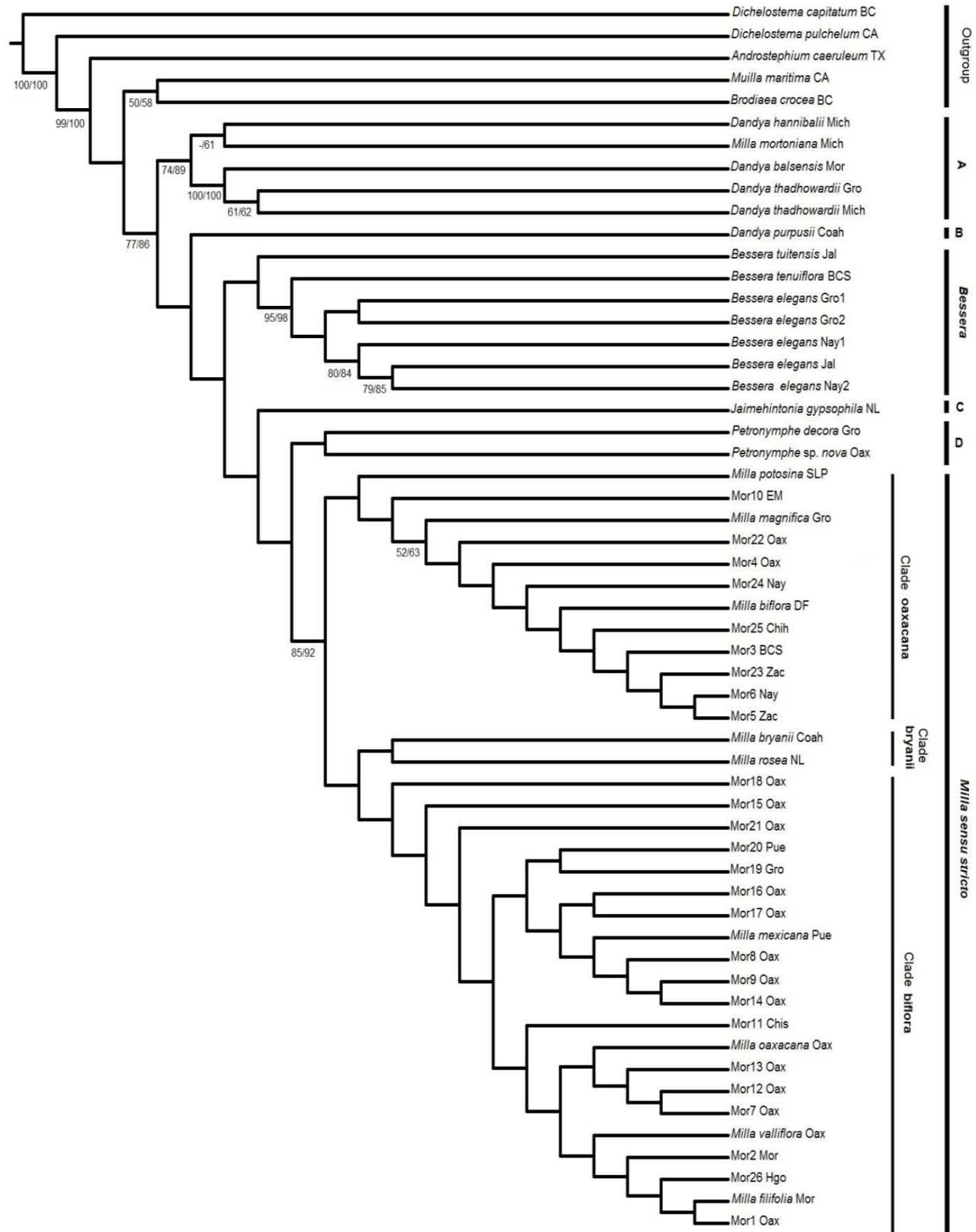


Figure 4.

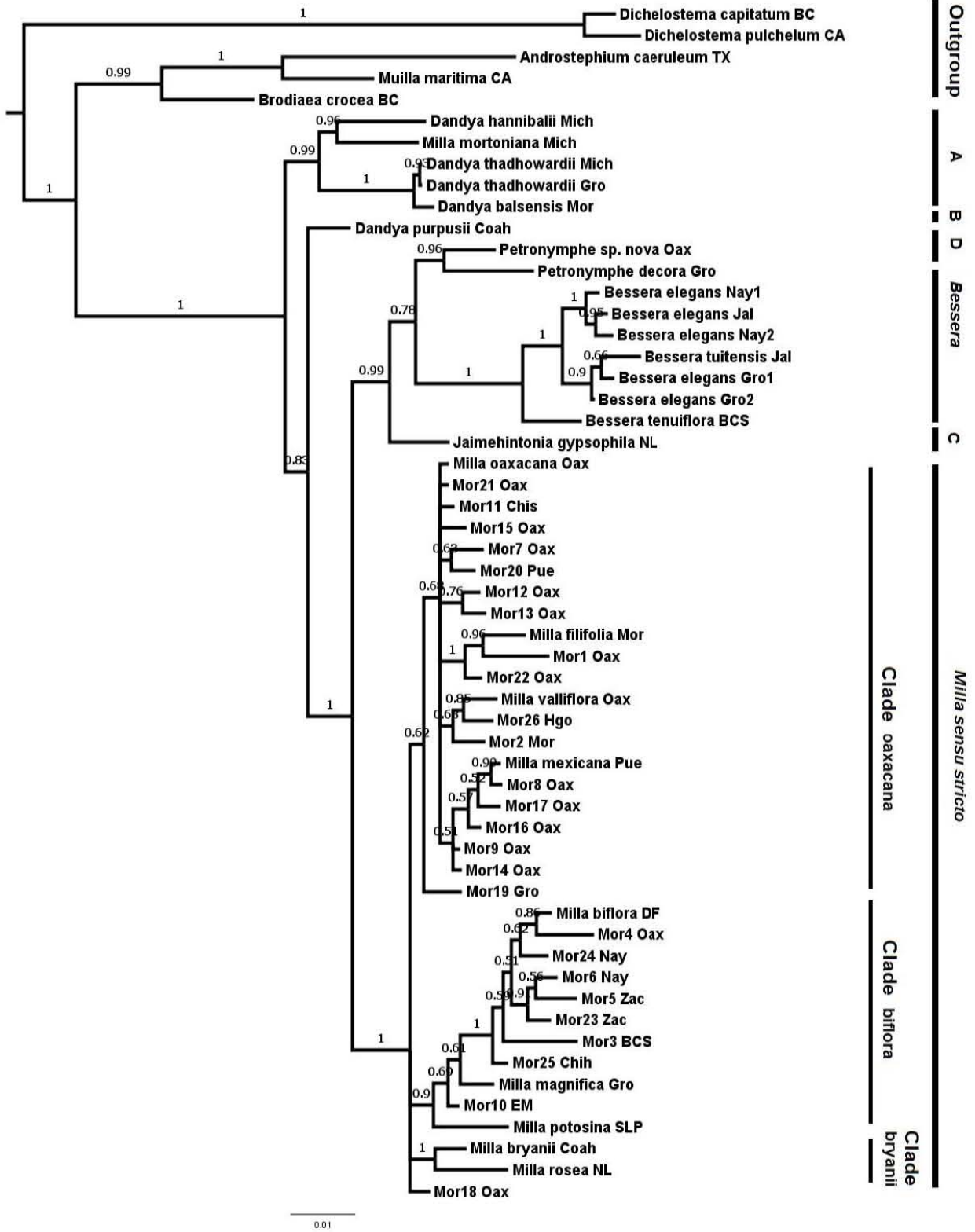


Figure 5

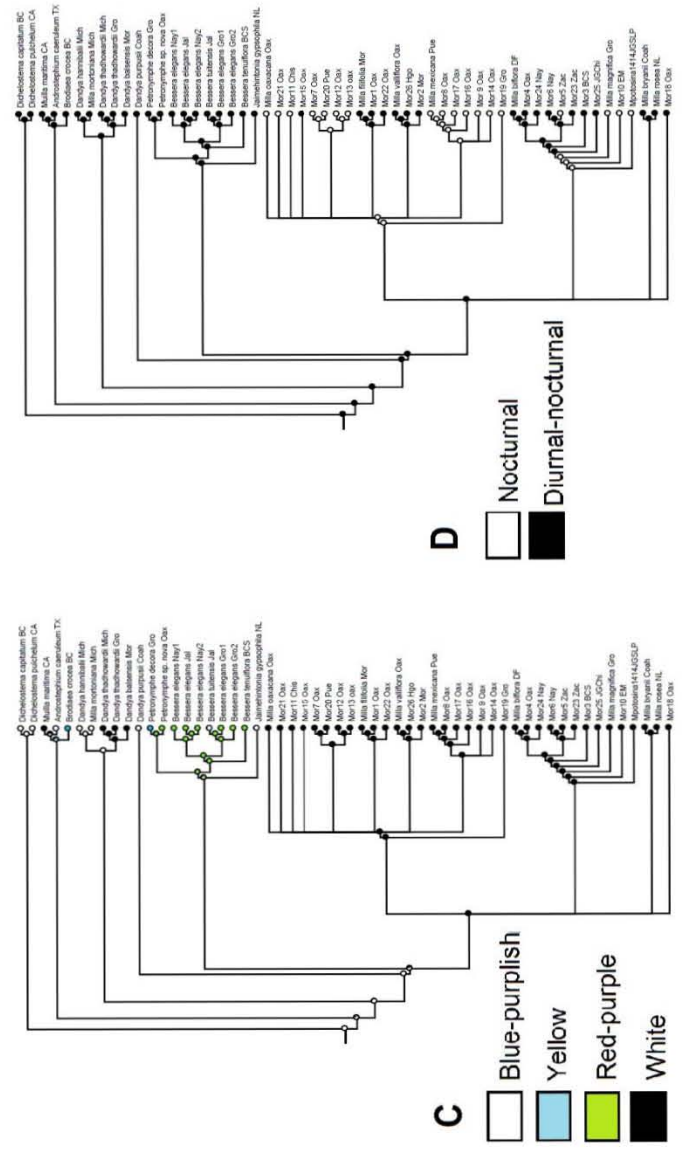
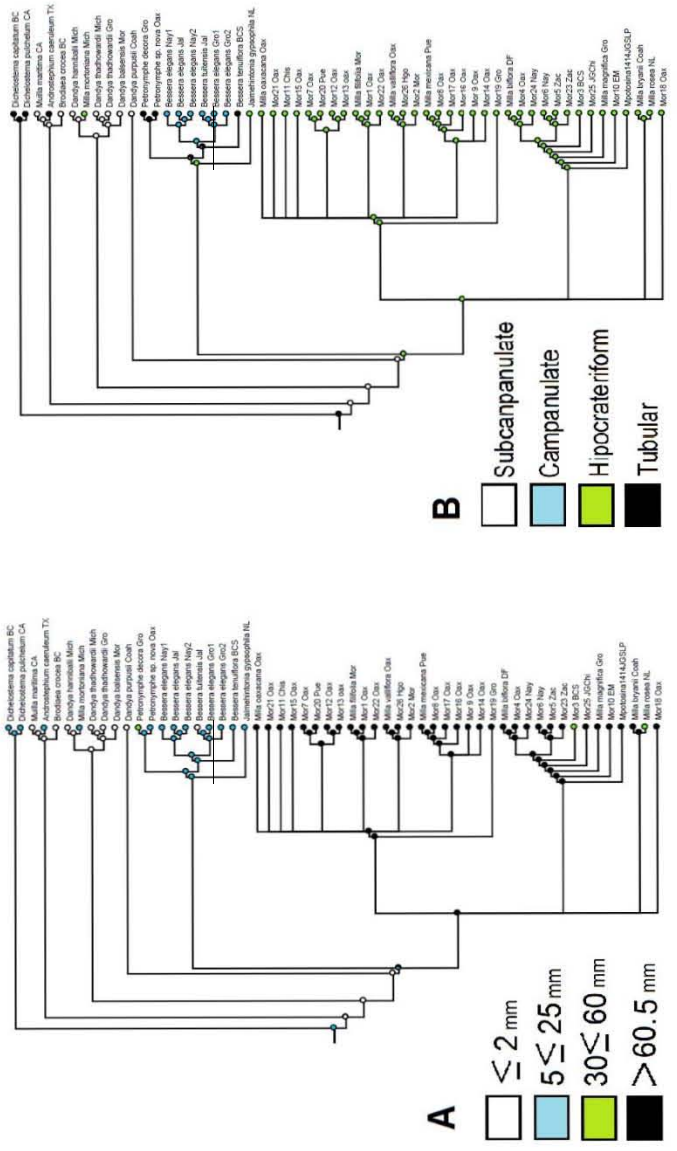


Figure 6

Appendix 1. Morphological traits used in the phylogenetic reconstruction of species

within the *Milla* complex. Traits were coded as binary (0, 1) or multi-state.

1. Corm tunic: fibrous = 0, membranous = 1.
2. Corm rhizomes: absent = 0, present = 1
3. Leaf profile (trasversal section): flattened = 0, broadly elliptic = 1, circular = 2, extensively depressed = 3, transversally elliptic = 4, ovate-depressed = 5, narrowly elliptic = 6, triangular = 7.
4. Adaxial surface of the leaf: flattened = 0, rounded = 1.
5. Leaf length (cm) ($p \leq 0.05$): 12-20 cm = 0, 21-50 = 1, 51-120 = 2.
6. Leaf grooves: presente = 0, absent = 1.
7. Leaf protuberances: presentes = 0, absent = 1.
8. Length of leaf protuberances: short = 0, long = 1.
9. Number of vascular bundles in the leaf: 6 = 0, 7-12 = 1, >12 = 2.
10. Vascular bundle shape: "t" shaped = 0, arc or "v" shaped = 1.
11. Leaf mesophyll: compact = 0, collapsed = 1.
12. Fibre walls: thick = 0, thin = 1.
13. Surface of flower scape: scabrous = 0, pilose = 1, smooth = 2.
14. Pedicel thickness: thin = 0, thick = 1.
15. Nastic fruit pedicel: present = 0, absent = 1.
16. Conspicuously articulate flower: presente = 0, absent = 1.
17. Depressed floral tube: absent = 0, present = 1.
18. Length of floral tube (mm): $\leq 2 = 0$, $5 \leq 25 = 1$, $30 \leq 60 = 2$, $> 60 = 3$.
19. Width of floral tube (mm): $1.5 \leq 3 = 0$, $4 \leq 4.5 = 1$, $5 \geq 7 = 2$.
20. Floral tube / tepal size ratio (%): 10-35% = 0, 40-70 = 1, 71-90 = 2.
21. Gynophore / free portion of the ovary ratio (%): $\geq 50 = 0$, $\leq 51 = 1$.
22. Number of flowers in the inflorescence: one = 0, two = 1, three or more = 2.
23. Flower position: erect = 0, descending-reclined = 1.
24. Flower shape: subcampanulate = 0, campanulate = 1, hipocraterimorphous = 2, tubular = 3.
25. Flower opening: nocturnal = 0, diurnal-nocturnal = 1.
26. Flower color: blue-violet = 0, yellow = 1, red-purple = 2, white = 3.
27. Tepal position in opened flowers: erect-suberect = 0, Divaricate = 1.
28. External tepal: narrowly elliptic = 0, elliptic = 1.
29. Internal tepal: narrowly elliptic = 0, elliptic = 1, ovoid = 2.
30. Tepal base: attenuate = 0, abruptly attenuate = 1, cuneate = 2.
31. Apicule of external tepal: absent = 0, present = 1.
32. Cuticule of tepals: smooth = 0, grooved = 1.
33. Number of vascular bundles of tepals: one to three = 0, five to twelve = 1.
34. Insertion of the filaments to the tube: first-second third = 0, neck of the tube = 1.
35. Connation of filaments: absent = 0, present = 1.
36. Base of the filament: alate = 0, sub-alate = 1, filiform = 2.
37. Filament epidermis: smooth = 0, pilose = 1.
38. Filament colour: white-yellow = 0, red-blue-violet = 1.
39. Length of the anther (mm): $1 \leq 2.5 = 0$, $3 \geq 5 = 1$.
40. Internal epidermis of the receptacle: smooth = 0, papilose = 1.

41. Epidermis cells of the nectary: smooth = 0, papilose = 1.
42. Anther shape: lanceolate = 0, narrowly oblong = 1, deltoid = 2.
43. Base of the anther: sagitate = 0, rounded = 1.
44. Anther colour: yellow = 0, blue-green = 1.
45. Filament / anther size ratio: $\frac{1}{2}$ = 0, $\frac{2}{3}$ -2 = 1, >2 = 2.
46. Anther insertion: basal-sub-basal = 0, dorsal = 1.
47. Filament length (mm): 0.5-1 = 0, 2-6 = 1, >7 = 2.
48. Shape of the filament (transversally): ovoid-orbicular = 0, rounded = 1, elliptic = 2.
49. Anther's vascular bundle: colateral = 0, bicolateral = 1.
50. Length of the gynophore (mm): 0.5-2 = 0, 3-7 = 1, 8-25 = 2, >30 = 3.
51. Gynophore pith: present = 0, absent = 1.
52. Adnate gynophore: presente = 0, absent = 1.
53. Epidermis of the ovary: smooth = 0, pilose = 1.
54. Portion of the ovary adnate to the floral tube (%): absent = 0, 5-10 = 1, 15-20 = 2, 20-30 = 3.
55. Release of stamens and floral tube relative to the ovary: base = 0, first third = 1, second third = 2.
56. Length of the ovary (mm): 2-4 = 0, 5-6 = 1, 8-12 = 2.
57. Excered ovary (in relation to the tube): absent = 0, present = 1.
58. Style epidermis: smooth = 0, papilose = 1.
59. Type of stigma: dissected = 0, entire = 1.
60. Cuticule of stigma buds: grooved = 0, smooth = 1.

APPENDIX 2

Information for the samples of species of Complex *Milla* Voucher information is listed as follows: taxon name, state except (Mor40 country, state), collector name and number, (herbarium). Abbreviations of herbaria according to Holmgren *et al.* (1981).

Bessera elegans Schultes f. GUERRERO: Mpio. Tlapehuala, *J. Gutiérrez et al. 1236* (FEZA, MEXU). Mpio. Arcelia, *J. Gutiérrez et al. 802* (FEZA, MEXU). JALISCO: Mpio. La Magdalena, *R. Ríos y J. Gutiérrez 971* (FEZA, MEXU). NAYARIT: Mpio. Nayar, *J. Gutiérrez y E. Bravo 1382, 1386* (FEZA, MEXU). **Bessera tenuiflora** (Greene) Macbride BAJA CALIFORNIA SUR. Mpio. La Paz. *J. Gutiérrez y R. Ríos* (FEZA, MEXU). **Bessera tuitensis** R. Delgadillo JALISCO. Mpio. Cabo Corrientes *R. Ríos y J. Gutiérrez 977* (FEZA-MEXU).

Dandya balsensis López-Ferr. & Espejo MORELOS: Mpio. Tlaquiltenango, *J. Gutiérrez 1115* (FEZA, MEXU). **Dandya hannibalii** L. W. Lenz MICHOACÁN: Mpio. Huetamo, *J. Gutiérrez et al. 1241* (FEZA, MEXU). **Dandya purpusii** H.E. Moore. COAHUILA: Mpio. Ramos Arizpe, *J. Gutiérrez et al. 1225* (FEZA, MEXU). **Dandya thadhowardii** L. W. Lenz GUERRERO: Mpio. Eduardo Neri, *J. Gutiérrez 1118* (FEZA, MEXU). MICHOACÁN: Mpio. San Lucas, *J. Gutiérrez et al. 1223* (FEZA, MEXU).

Jaimehintonia gypsophila Turner NUEVO LEÓN: Mpio. Aramberri, *J. Gutiérrez y E. Estrada 1204* (FEZA, MEXU).

Petronymphe decora H. E. Moore GUERRERO. Mpio. Chilpancingo de los Bravo, *J. Gutiérrez y R. Ríos 1350* (FEZA, MEXU). **Petronymphe sp. nova** Oaxaca. Mpio. Santo Domingo Tonalá, *J. Gutiérrez y R. Ríos 1272* (FEZA, MEXU).

Milla biflora Cav DISTRITO FEDERAL: Delegación. Coyoacán, *J. Gutiérrez 1195* (FEZA, MEXU). **Milla bryanii** I.M. Johnst. COAHUILA: Mpio. Cuatro Ciénegas, *J. Gutiérrez et al. 1226* (FEZA, MEXU). **Milla filifolia** T.M. Howard MORELOS: Mpio. Tenango, *J. Gutiérrez 1133* (FEZA, MEXU). **Milla magnifica** H. E. Moore. GUERRERO: Mpio. Eduardo Neri, *J. Gutiérrez y R. Ríos 1346* (FEZA, MEXU). **Milla mexicana** T.M. Howard PUEBLA: Mpio. Tepexco, *J. Gutiérrez 1134* (FEZA, MEXU). **Milla mortoniana** H.E. Moore MICHOACÁN. Mpio. Aguila, *Sánchez-Mejorada et al. 4301* (MEXU). **Milla oaxacana** Ravenna OAXACA: Dto. Cuicatlán, Mpio. San Pablo Huitzo, *J. Gutiérrez et al. 1193* (FEZA, MEXU). **Milla potosina** T.M. Howard SAN LUIS POTOSÍ: Mpio. Guadalcázar, *J. Gutiérrez e I. Escalante 1414* (FEZA, MEXU). **Milla rosea** H. E. Moore NUEVO LEÓN: Mpio. Montemorelos, *J. Gutiérrez y E. Estrada 1218* (FEZA, MEXU). **Milla valliflora** J. Gut & E. Solano OAXACA: Dto. Nochixtlán, Mpio. Suchixtlahuaca *J.*

Gutiérrez et al. 1151 (FEZA, MEXU). **Mor1** OAXACA: Dto. Huajuapán, Mpio. Zapotitlán Palmas, *R. Ríos y J. Gutiérrez 902* (FEZA, MEXU). **Mor2** MORELOS: Mpio. Jonacatepec, *J. Gutiérrez 1135* (FEZA, MEXU). **Mor3** BAJA CALIFORNIA: Mpio. Los Cabos *J. Gutiérrez, M. Hernández & R. Ríos 1443* (FEZA, MEXU). **Mor4** OAXACA: Mpio. Santiago Chazumba, *R. Ríos y J. Gutiérrez 898*. (FEZA, MEXU). **Mor5** ZACATECAS: Mpio. Zacatecas, *J. Gutiérrez y E. Bravo 1407* (FEZA, MEXU). **Mor6** NAYARIT: Mpio. Nayar, *J. Gutiérrez y E. Bravo 1388* (FEZA, MEXU). **Mor7** PUEBLA: Mpio. Tepanco de López, *J. Gutiérrez y R. Ríos 1262* (FEZA, MEXU). **Mor8** OAXACA: Dto. Huajuapán Mpio. Santo Domingo Tonalá *J. Gutiérrez y R. Ríos 1271* (FEZA, MEXU). **Mor9** OAXACA: Mpio. Amatlán, *J. Gutiérrez et al. 1315* (FEZA, MEXU). **Mor10** MICHOACÁN: Mpio. Huetamo, *R. Ríos y J. Gutiérrez 961* (FEZA, MEXU). **Mor11** CHIAPAS: Mpio. Tuxtla Gutiérrez, *M. Ayala et al. 978* (FEZA, MEXU). **Mor12** CHIAPAS: Mpio. Ocozocoautla, *M. Ayala et al. 1011* (FEZA, MEXU). **Mor13** OAXACA: Mpio. Santiago Laollaga, *R. Ríos y J. Gutiérrez 924* (FEZA y MEXU). **Mor14** OAXACA: Mpio. Salina Cruz, *R. Ríos y J. Gutiérrez 936* (FEZA y MEXU). **Mor15** OAXACA: Mpio. Putla, *J. Gutiérrez et al. 1174* (FEZA, MEXU). **Mor16** OAXACA: Mpio. San Marcos de Arteaga, *J. Gutiérrez et al. 1162* (FEZA y MEXU). **Mor17** OAXACA: Dto. Yautepec, Mpio. Nejapa de Madero, *J. Gutiérrez et al. 1356* (FEZA, MEXU). **Mor18** PUEBLA: Mpio. Tehuacán, *J. Gutiérrez y R. Ríos 1268* (FEZA, MEXU). **Mor19** GUERRERO: Mpio. Eduardo Neri, *J. Gutiérrez y R. Ríos 1344* (FEZA, MEXU). **Mor20** PUEBLA: Mpio. Tlacotepec, *J. Gutiérrez y R. Ríos 1257* (FEZA, MEXU). **Mor21** OAXACA: Dto. Juxtlahuaca, Mpio. Tecomaxtlahuaca, *J. Gutiérrez et al. 1160* (FEZA, MEXU). **Mor22** OAXACA: Mpio. Huajuapán, *R. Ríos y J. Gutiérrez 901* (FEZA, MEXU). **Mor23** ZACATECAS: Mpio. Valparaíso, *J. Gutiérrez y E. Bravo 1402* (FEZA, MEXU). **Mor24** NAYARIT: Mpio. Nayar, *J. Gutiérrez y E. Bravo 1399* (FEZA, MEXU). **Mor25** CHIHUAHUA: Mpio. Basaseachi, *J. Gutiérrez et al. 809* (FEZA). **Mor26** HIDALGO: Mpio. Singuilicán, *J. Gutiérrez et al. 1167* (FEZA, MEXU).

CAPÍTULO V

Milla valliflora (Themidaceae), a new species from southern Mexico

Milla valliflora (Themidaceae), a new species from southern Mexico

JORGE GUTIÉRREZ^{1,2} AND ELOY SOLANO²

¹ Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-153, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510, México, D. F., Mexico; e-mail: jorgeg@comunidad.unam.mx

² Unidad de Investigación en Sistemática Vegetal y Suelo, Carrera de Biólogo, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, Batalla 5 de mayo s/n. Col. Ejército de Oriente, Iztapalapa, 09230, México, D. F., Mexico

Abstract. *Milla valliflora*, a new species from the states of Oaxaca and Puebla, Mexico, is described and illustrated. Its morphology is compared to *M. biflora*, *M. filifolia* and *M. oaxacana*. The new species is distinguished by the presence of a rhizome, shorter leaves, an inconspicuous pedicel joint, a long floral tube, narrowly elliptic tepals and yellow anthers.

Key Words: Asparagaceae, corm, gynophore, *Milla*, taxonomy.

Resumen. Se describe e ilustra *Milla valliflora*, especie nueva de los estados de Oaxaca y Puebla, México. Se compara morfológicamente con *M. biflora*, *M. filifolia* y *M. oaxacana*. Se distingue por la presencia de un rizoma, hojas cortas, pedicelo con articulación inconspicua, tubo floral largo, tépalos angostamente elípticos y anteras amarillas.

Milla was described by Cavanilles (1793) from plants cultivated in the Madrid botanical garden collected by Sessé and Mociño in the Distrito Federal, Mexico. Bentham and Hooker (1883) placed the genus in Liliaceae based on the position of the ovary (see also Melchior, 1964). Because of the umbellate inflorescence, Hutchinson (1959) transferred *Milla* to Amaryllidaceae s.l., disregarding the ovary position, whereas Takhtajan (1980) and Dahlgren et al. (1985) placed it in Alliaceae, due to the superior ovary, steroidal saponins, and absence of alkaloids. Dahlgren et al. (1985) divided Alliaceae into three subfamilies: Agapanthoideae, Allioideae and Guilliesioideae. Allioideae included two subtribes: Allieae and Brodiaeae. Based on analysis of *rbcL* sequence data, Fay and Chase (1996) elevated Brodiaeae to family status, recognizing it as Themidaceae, which contains 12 genera. Fay and Chase (1996) also found Alliaceae *sensu* Takhtajan (1980) and Dahlgren et al. (1985) to be polyphyletic whereas Themidaceae are monophyletic. Pires et al. (2001) and Pires and Sytsma (2002) also resolved a monophyletic Themidaceae using morphological and molecular evidence.

Themidaceae are distinguished from Alliaceae by the presence of corms, floral bracts on each pedicel that do not envelop the flower, the

presence of a gynophore, and the absence of sulphuric compounds (Pires et al., 2001). *Milla* has been included in Themidaceae (Rahn, 1998; Pires & Sytsma, 2002) or in subfamily Brodiaeaceae when Themidaceae are included in Asparagaceae (APG III, 2009). Phylogenetic relationships between the genera of Asparagaceae s.l., are poorly understood (Kim et al., 2010). Reveal (2012) confirmed the validity of Themidaceae, and thus we recognize *Milla* as part of that family.

Milla comprises six to ten species (Espejo-Serna & López-Ferrari, 2003; McNeal, 2003). *Milla biflora* Cav., the type species, occurs from the southwestern United States to Honduras. The remaining nine species are endemic to Mexico (Espejo-Serna, 2012) and are distributed throughout the Mexican plateau, the Balsas river basin, and the Sierra Juárez mountain range in Oaxaca.

During a systematic study of *Milla*, individuals morphologically distinct from known species were collected from the Mixteca Alta region of Oaxaca. Additional specimens (at MEXU), previously identified as *Milla biflora*, were also detected and we concluded that they belong to a new taxon, described below.

***Milla valliflora* J. Gut. & E. Solano, sp. nov.**

Type: Mexico. Oaxaca: Dist. Coixtlahuaca, Mun. Suchixtlahuaca, on the Suchixtlahuaca–

Tejupan highway, 26 Aug 2010 [fl],
J. Gutiérrez, E. Solano & R. Rios 1151 (holo-
 type: MEXU; isotypes: FEZA, NY, UAMIZ).
 (Fig. 1)

Herba perennis, rhizomatica, cormo subgloboso; folia 3 vel
 4, cylindrica 14.5–28.5 cm longa, 0.5 mm lata; flos unicus, tubo
 (8–)11–13.5 cm longo, nervis usque 5(–11), apiculo fusco-viridi,
 1–1.5 mm longo, papilloso; stamina exserta, filamentis 0.8–

2 mm longis, antheris 3.5–5 mm longis; gynophorum 9–
 12.6 cm longum; semina 4–5 × 2–2.5 mm longa.

Herbaceous perennial, to 40 cm high. Roots
 fibrous, some fleshy. Corm (1–)5–1.9 × 1.5 cm,
 subglobose, compressed, succulent, covered with
 membranous persistent leaf bases, leaf bases
 brown to dark-brown, covering up to 8 cm of
 the base of the scape. Rhizomes originating from

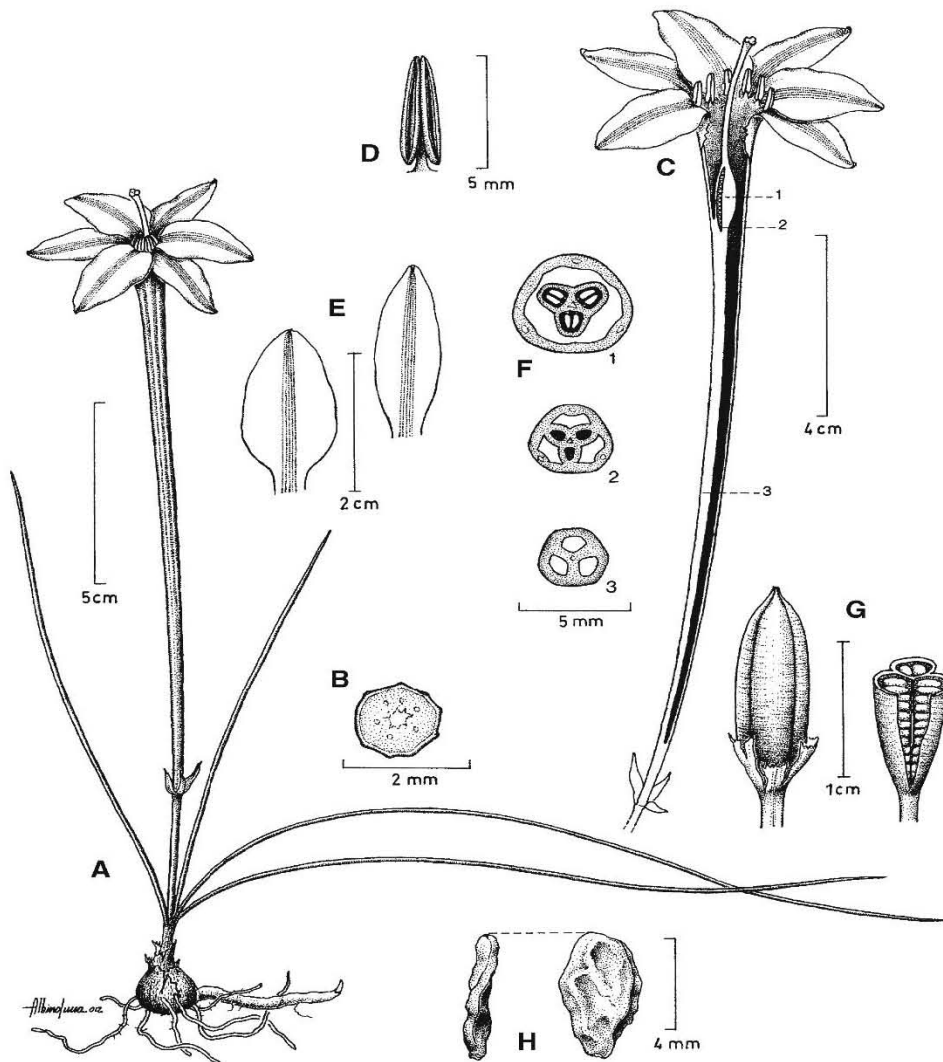


FIG. 1. *Milla valliflora*. A. Habit. B. Leaf, transverse section. C. Flower. D. Stamen. E. Tepals. F. Flower, in transverse sections: 1 median ovary, 2 base of the ovary, and 3 tube and gynophore with three cavities. G. Fruit. H. Seed. (Drawn from the holotype).

lateral buds of the corm, 2–5 × 1–1.5 cm, scales brown. Leaves terete, 3 or 4, 14.5–28.5 cm × 0.5 mm, linear, glabrous, veins with hyaline papillae; base truncate, white, first reddish then green dark; apex sharp. Scape 4–21 cm long, (0.6–)1–1.6 mm diam., shorter than the leaves, fistulous, glabrous or papillose. Floral bract 1, triangular, 7–13 × 3.0–5.5 mm, 5-veined; bracteoles 5–10 × 3 mm. Flower solitary, white, aromatic, hypocrateriform, pedicel 2(–3.5) cm, filiform, articulation inconspicuous, perianth tube (8–)11–13.5 cm × (0.7–)1–1.5 mm; lobes 6, shorter than the tube; in 2 series, the outer tepals (1.7–)2.5 (–3.1) × 0.8 cm, elliptic, with 5(–11) veins, abaxial surface with a central green line, bluish-violet toward the margin; apex 1–1.5 mm, apiculate, cucullate, papillose, dark green; base cuneate, margin entire; inner tepals (1.7–)2.6 (–2.8) × (0.5–)1.1 cm, ovate, apex obtuse, papillose; stamens 6; filaments 0.8–2 mm long, filiform, widening towards the base, inserted in the mouth of the tube, white; anthers 3.5–5 × 0.8–1 mm, lanceolate, yellow, basifixed, connective green; gynophore 9.0–12.6 cm long, adnate to the ovary nearly halfway, forming three cavities in the tube; ovary ovate, 7(–11) × 1–2 mm, adnate to the tube; style 10–14 mm long, filiform, papillose; stigma trilobed, papillose. Capsules (13–)18 × 5–7 mm, loculicidal, oblong, glabrous, brown, with traces of the persistent perianth; seed 4–5 × 2–2.5 mm, oblong, compressed, black, shiny, testa papillose.

Distribution and ecology.—Distributed in the municipalities of Caltepec, Puebla, and the districts of Juxtaluaca and Nochixtlán, Oaxaca, Mexico. This species grows in desert scrub in an ecotone with *Juniperus* and tropical deciduous forests at 1668–2439 m.

Phenology.—Flowering from July to the beginning of September; fruiting from August to September.

Etymology.—The specific epithet is from the náhuatl-derived name of the municipality where the type was collected, Suchixtlahuaca, in the Mexican state of Oaxaca. Suchixtlahuaca means "in the valley of flowers" (*xochitl*: flower; *ixtlahuaca*: valley or plain; *huaca*: around or close to).

Additional specimens examined. MEXICO. Oaxaca: Dist. Juxtaluaca: Mun. San Miguel Tlacotepec, senda para el tanque de agua de San Miguel Tlacotepec, 2 Sep 1995, *Calzada 20190* (MEXU); Dist. Coixtlahuaca: Mun. Suchixtlahuaca, ca. 1.5 km sobre la carretera Suchixtlahuaca–Tejupam, 27 Sep 2010, *Solano & Ríos 3531* (FEZA); Mun. Tepelmeme, al E de las Flores, antiguo camino a Tepelmeme,

25 Jul 2001, *Tenorio 20262* (MEXU). Puebla: Mun. Caltepec, La Laguna, Faldas del Cerro el Gavilán, 2 km al E de Caltepec, 14 Jul 1986, *Salinas et al. s.n.* (MEXU); La Laguna, Cerro el Gavilán al SE de Caltepec, 24 Jul 1984, *Tenorio & Romero 6716* (MEXU); 1–2 km south of Acatepec, 10 Jul 1968, *Howard 250* (RSA); Alrededores de Acatepec, 27 Jul 2012, *Ríos & Gutiérrez 894* (FEZA).

Milla valliflora is morphologically similar to *M. biflora*, *M. filifolia* Howard and *M. oaxacana* Ravenna, but differs from those species in the vegetative and floral characteristics presented in Table I. Moore (1953) noted that *Milla biflora* s.l. is a polymorphic species distributed from Arizona and New Mexico to Guatemala. The variation observed in *M. biflora* is mainly in plant size (20–80 cm), number of flowers per inflorescence (2–6), and floral tube length (11.5–22 cm). The northern populations in this species have three veins in the tepals, and the anthers are sessile. However, Moore noted that populations from southern Mexico to Guatemala, had 5–7 veins in the tepals, and filaments were 3–6 mm long, but these characters are not sufficient to separate it in subspecific entities. groupa

Howard (1999) described the internal tepals of *Milla biflora* as ovate-oblongate, whereas Moore (1953) described them as elliptical, and thus he included diverse populations in this species. He also indicated that some populations have nocturnal flowers and are rhizomatous. Howard (1999) utilized other characters to diagnose species, such as the presence of rhizomes with distal cormules, trichomes on the scape, leaf and tepal shape, form of the tepal base, the number of veins in the perianth segments, flowers open or closed during the day, and chromosome number. Differences in these characters are useful for separating some populations of the *Milla biflora* complex, including those corresponding to the new species described here (Table I). *Milla filifolia* is distinguished by the lack of a rhizome; pubescence of the scapes, pedicel, and floral tube; the conspicuously articulated pedicel; and a floral tube that is 4–7 cm long. Although Rahn (1998) noted that the pedicel in *Milla* is not jointed, this does occur in several species (Moore, 1953).

Ravenna (1971) described *Milla oaxacana* using the shape of the tepals and the size of

TABLE 1
Comparison of *Milla valliflora*, *M. biflora*, *M. filifolia*, and *M. oaxacana*.

	<i>Milla valliflora</i>	<i>M. biflora</i> ^A	<i>M. filifolia</i> ^B	<i>M. oaxacana</i> ^C
Rhizome	present	absent	absent	absent
Leaves	3 or 4, 14.5–28.5 cm × 0.5 mm diam, terete	2 or 7, 70–75 cm × 0.3–1.0 (–1.5) mm diam, subterete	4 or 8, 20–26 cm × 1 mm diam, subterete	2, ca. 40 cm × 2 mm diam, terete
Scape	4–21 cm × (0.6–) 1(–1.6) mm diam, glabrous or papillose	(3.5–)5–5.5 cm long, smooth or denticulate on lower 1/3	10–23 cm × 1–1.5 diam, pubescent	ca. 23 cm long, glabrous
Number of flowers per scape	1	2–4 (–6)	1–6	2–4
Pedicel articulation	Present, inconspicuous	Present, inconspicuous	Present, conspicuous	Present, conspicuous
Floral tube, length	(8–)11–13.5 cm	11.5–19.5(22) cm	4–7 cm	ca. 14 cm
Outer tepals	Elliptical, (1.7–)2.5 (–3.1) × 0.8 cm	Elliptical-oblong or elliptical, 2–3.3 (–4) × 0.4–0.8 (–1) cm	Elliptical, 1.5–2.5 × 0.6 cm	Oblanceolate, 1.7–1.8 × 0.3 cm
Tepal number veins	5(–11)	3	5	6 or 7
Filaments	0.8–2 mm long, subulate	2–3 mm long, subulate	1 mm long, subulate	1.7 mm long, oblong- lanceolate
Anthers	3.5–5 mm long, yellow, lanceolate	4–6 mm long, yellow, oblong	2–6 mm long, yellow, oblong	2.7–3 mm long, green, oblong
Chromosome number ^D	2n = 32	n = 7	n = 9	n = 8

Data sources: ^A Galván, 2001; ^B Howard, 1999; ^C Ravenna, 1971; ^D Lenz, 1971.

the filaments as the diagnostic characters. The description indicates that *M. oaxacana* has yellow anthers, similar to those of *M. valliflora*. The type of *M. oaxacana*, deposited in Ravenna's private herbarium, was not available for examination for this study; therefore, it was not possible to compare anther color. Other specimens from the type locality of this species, matching the description provided by Ravenna (1971), have green anthers; this color was verified in the field. *Milla oaxacana* is endemic to the Sierra de San Felipe, Oaxaca, and has subterete leaves, a conspicuous pedicel articulation, yellow anthers, and flowers that open only at night, all characteristics that separate it from *M. valliflora*, which has open flowers during day and night.

Lenz (1971) studied the chromosome number of 18 populations of *Milla*. *Milla biflora* collected from the Mexican Volcanic Belt exhibited $n = 7$, and cultivated individuals were both tetraploids and hexaploids. *Milla filifolia* had $2n = 18$, and *M. oaxacana* $2n = 16$ (Howard, 1999; 2001). Lenz also examined a population from Puebla located 1–2 km south of Acatepec (identified as *Milla* sp.), with a chromosome number of $2n = 32$. Herbarium specimens of this material (Howard 250, RSA) were examined for the present study. In

addition, we collected individuals around Acatepec, Puebla and confirmed that these individuals belong to *M. valliflora*.

Acknowledgments

The authors thank Ramiro Ríos Gómez for his help during field work. Raquel Galván revised the manuscript in Spanish; Fernando Chiang revised the English and the Latin diagnosis; and two anonymous reviewers substantially improved the manuscript. Albino Luna drew the illustration. The research was funded by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, agreement IN2252103. This contribution is a requirement for the first author's Ph.D. program in Science Postgraduate Biological Sciences, UNAM. This author is also grateful to CONACYT for the funds received during his graduate studies (160282).

Literature Cited

- APG, III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105–121.

- Bentham, G. & J. D. Hooker.** 1883. Ordo CLXXVIII. Liliaceae. *In: Genera plantarum* 3 (pt. 2): 748–836.
- Cavanilles, A. J.** 1793. Icones et descriptiones plantarum. Vol. 2. Typographia Regia, Madrid.
- Dahlgren, R. M. T., H. T. Clifford & P. F. Yeo.** 1985. The Families of monocotyledons. Structure, evolution, and taxonomy. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Espejo-Serna A. & A. R. López-Ferrari.** 2003. Alliaceae. Flora de Veracruz. Fascículo 132. Instituto de Ecología, A. C. and University of California, Riverside, California.
- . 2012. El endemismo en las Liliopsidas Mexicanas. *Acta Botanica Mexicana* 100: 195–257.
- Fay, M. F. & M. W. Chase.** 1996. Resurrection of Themidaceae for the *Brodiaea* alliance, and recircumscription of Alliaceae, Amaryllidaceae and Agapanthoideae. *Taxon* 45: 441–451.
- Galván, R.** 2001. Alliaceae. Pp. 1252–1254. *In: G. C. Rzedowski & J. Rzedowski* (eds.), *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2nd ed. Instituto de Ecología, A. C., Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D. F.
- Howard, T. M.** 1999. Three new *Milla* species from Mexico. *Herbertia* 54: 232–237.
- . 2001. *Bulbs for warm climates*. University of Texas Press, Austin.
- Hutchinson, J.** 1959. *The Families of Flowering Plants*, Vol. 1. 2nd ed. Clarendon Press, Oxford.
- Kim, J. H., D. K. Kim, F. Forest, M. F. Fay & M. W. Chase.** 2010. Molecular phylogenetics of Ruscaceae *sensu lato* and related families (Asparagales) based on plastid and nuclear DNA sequences. *Annals of Botany* 106: 775–790.
- Lenz, L. W.** 1971. Chromosome numbers in the genus *Milla* Cav. (Liliaceae). *Aliso* 3: 321–324.
- McNeal, D. W.** 2003. *Milla*. *In: Flora of North America* Editorial committee, (eds). *Flora of North America* 26: 346–347. Oxford University Press, Oxford. http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=120721
- Melchior, H.** 1964. Reihe Liliiflorae. Pp. 513–542. *In: H. Melchior* (ed.), *A Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien*, 12. Aufl., 2. Band., Berlin-Nikolassee: Gerbrüder Borntraeger.
- Moore, H. E.** 1953. The genus *Milla* (Amaryllidaceae-Allieae) and its allies. *Gentes Herbarum* 8: 262–294.
- Pires, J. C., M. F. Fay, W. S. Davis, L. Hufford, J. Rova, M. W. Chase & K. J. Sytsma.** 2001. Molecular and morphological analyses of Themidaceae (Asparagales). *Kew Bulletin* 56: 601–626.
- & **K. J. Sytsma.** 2002. A phylogenetic evaluation of a biosystematic framework: *Brodiaea* and related petaloid monocots (Themidaceae). *American Journal of Botany* 89: 1342–1359.
- Rahn, K.** 1998. Themidaceae. Pp. 436–441. *In: K. Kubitzki* (ed.), *The families and genera of vascular plants.*, Vol. III: Flowering plants. Monocotyledons. Liliaceae (except Orchidaceae). Springer, Berlin.
- Ravenna, P. F.** 1971. A new *Milla* species from Mexico. *Plant Life* 27: 60, 89–90.
- Reveal, J. L.** 2012. An outline of a classification scheme for extant flowering plants. *Phytoneuron* 37: 1–221.
- Takhtajan, A.** 1980. Outline of the classification of flowering plants (Magnoliophyta). *Botanical Review* 46: 225–359.

CAPÍTULO VI

Tratamiento taxonómico del género *Milla*

Tratamiento taxonómico del género *Milla*

En esta sección se presenta un tratamiento taxonómico de *Milla* basado en los resultados del análisis morfométrico y filogenético. Se incluye una descripción morfológica amplia del género y breve para cada especie. La información del tipo y distribución geográfica es mostrada. Las especies nuevas son segregadas de *Milla biflora* s.l. Sin embargo, algunas especies nuevas tienen mayor similitud morfológica con especies diferentes de *Milla biflora* s.l.

Milla Cav. Icon. Pl. ii, 76 1793 emend. *J. Gut.* TIPO. MÉXICO. Imperio Mexicano.

Millea biflora (Cav.) Willd., Sp. Pl. ii: 76 1799. *Gyrenia biflora* Knowles & Westc. ex Loudon., Hort. Brit. [Loudon], 3: 639 1839. *Askolame biflora* Raf., Fl. Tellur. ii: II 1836 [1837]. *Diphalangium graminifolium* (Cav.) S. Schauer, Linnaea 19: 703 1847.

Hierbas perennes, de hasta 120 cm de alto. Raíces fibrosas, algunas carnosas. Cormo subgloboso o comprimido, suculento, cubierto por las bases membranáceas persistentes de las hojas, de color pardo a castaño oscuro, que cubren hasta 3.0-4.0 cm la base del escapo. Cormos y rizomas ausentes o presentes, procedentes de yemas laterales del cormo o estos desarrollándose en el extremo distal de los rizomas. Hojas 2-7(-10), subrollizas, rollizas, planas, lineares, glabras o escabrosas, epidermis con prominencias hialinas sobre las nervadura, prominencias rectas o retrorsas, de 0.5-3.0 mm largo, ausentes en *Milla filifolia* y *M. magnifica*; base de la hoja truncada, ápice agudo o redondeado. Inflorescencia en umbela; escapo 4.0-120.0 cm largo, generalmente más cortos que las hojas, fistuloso, glabro, hispido o con prominencias. Brácteas florales 1-2, linear-lanceoladas, triangulares;

3, 5 ó 7-nervaduras; bractéolas una por flor. Flores(1-)2-30, blancas, blanco-rosado, aromáticas, hipocrateriformes, pediceladas, articulación engrosada o no engrosada, tubo periantal hasta 22.0 cm largo, con apertura floral nocturna o diurna-nocturna; lóbulos 6, más cortos que el tubo, en 2 series, tépalos externos angostamente elípticos, elípticos o anchamente ovados, con 3-12-nervaduras, cara externa con una banda central verde en el exterior, azul-violáceos hacia el margen; ápice apiculado, papiloso, cuculado, verde oscuro, base cuneada, margen entero; tépalos internos, ovados, ápice papiloso, obtuso, base atenuada, cuneada, cara externa con una banda central verde. Estambres 6; filamentos filiformes, ensanchando hacia la base, insertos en la boca del tubo, blancos; anteras lanceoladas, linear-oblongas, amarillas, basifijas a subasifijas, conectivo blanco o verde. Ginóforo adnado al ovario hasta casi la mitad, formando tres cavidades en el tubo; ovario ovado a elíptico, adnado al tubo hasta un 40 por ciento de la porción fértil; estilo exerto filiforme, papiloso; estigma trilobado, papiloso. Fruto una cápsula, loculicida, oblonga, glabra, de color pardo, con restos del perianto persistentes. Semillas numerosas, planas, irregulares, testa negra, opacas o brillantes, rugosas o granulosas.

Clave para la determinación de especies especiesdel género *Milla*

1. Tubo floral <5.0 cm de largo, tépalo interno <5.8 mm de ancho
 2. Tubo floral de 1.5-1.6 cm largo, tépalos tres nervados.....*M. delicata*
 2. Tubo floral 2.0-5.0 cm de largo, tépalos cinco nervados*M. rosea*
1. Tubo >5.1 cm de largo, tépalo interno >5.8 mm de ancho.
 3. Tubo floral 5.0-8.5 cm de largo, base del tépalo interno atenuado abruptamente.
 4. Pedicelo ≥ 4 cm de largo, bráctea floral externa ≥ 1.2 cm de largo, tépalo interno ≥ 1.3 cm de ancho.....*Milla* sp. nov. 1
 4. Pedicelo <3 cm de largo, bráctea floral externa <1.0 cm de largo, tépalo interno <1.3 cm ancho.

5. Hoja aplanada, escapo puberulento, pedicelo 2.5-3.0 cm de largo, tépalos con 5 nervaduras..... **Milla sp. nov. 2**
5. Hoja subcircular, escapo liso, pedicelo <1.0 cm de largo, tépalos con 3 nervaduras o nervios**Milla sp. nov. 3**
3. Tubo floral >8.5 cm de largo (excepto *M. filifolia*), base del tépalo interno atenuada o cuneada.
6. Tubo floral 8.0-10.0 cm de largo, tépalos internos ovados.
7. Pedicelo 1.5-2.0 cm de largo, articulado; tépalo interno 6.5-7.0 mm de ancho..... **M. filifolia**
7. Pedicelo 2.8-3.5(-4.0) cm de largo, articulación floral inconspicua; tépalo interno 7.5-8.0 mm de ancho.....**Milla sp. nov. 4**
6. Tubo floral 10.0-16.0 cm de largo, tépalos internos angostamente elípticos o elípticos.
8. Hojas rollizas, haz de la hoja redondeado; 1 ó 2 flores.
9. Prominencias largas en hoja, escapo liso, flores 2 (-3), pedicelo 1.0-1.5 cm largo..**Milla sp. nov. 5**
9. Prominencias cortas en hoja, escapo escabroso, flor 1, pedicelo 2.0-3.5 cm de largo..**M. valliflora**
8. Hojas subcilíndricas, haz de la hoja aplanada o concava; ≥ 2 flores (de haber flores solitarias haz de la hoja plano).
10. Escapo liso; bráctea floral externa 6.0-7.4 mm de largo.
11. Flores solitarias, anteras amarillas, 4-6 mm de largo.....**Milla sp. nov. 6**
11. Inflorescencias con dos flores, anteras verdes, 3.5-3.7(-4.5) mm de largo.....**Milla sp. nov. 7**
10. Escapo escabroso o piloso; bráctea floral externa 7.5-14 mm de largo (de haber escapos lisos, bráctea externa >9.0 mm de largo).
12. Hojas anchamente elípticas o circulares en sección transversal(excepto Morfo 13 y 14, pero entonces pedicelos ≤ 1.8 cm de largo, anteras verdes)
13. Pedicelo >2.5 cm de largo; tubo floral <12.0 cm de largo.
14. Prominencias foliares largas; escapo liso; tépalos externos angostamente elípticos, 5 nervaduras, anteras verdes..... **Milla sp. nov. 8**
14. Prominencias foliares cortas; escapo escabroso; tépalos externos elípticos, 7-12 nervaduras, anteras azules.....**Milla sp. nov. 9**
13. Pedicelo <2.5 cm largo (excepto **Morfo 29**); tubo floral > 12.0 cm largo.

15. Hojas depresas obovadas o estrechamente elípticas en sección transversal.
16. Prominencias en hojas cortas; inflorescencia > 3 flores, tépalos 7-12
nervados.....**Milla sp. nov. 10**
16. Prominencias en hojas largas; inflorescencia 2-3 flores, tépalos 5
nervados.....**Milla sp. nov. 11**
15. Hojas anchamente elípticas o circulares en sección transversal.
17. Pedicelo 1.5-3.0(-5.0) cm de largo; tubo floral (10-)13-16 cm de largo; anteras 2.8-4.5 mm
de largo.....**Milla sp. nov. 12**
17. Pedicelo < 1.4 cm de largo; tubo floral 10.0-12.8 cm de largo; anteras 3.8- 4.2 mm de
largo.
18. Rizomas presentes; tépalo externo elíptico, base tépalo interno
cuneada.....**Milla sp. nov. 13**
18. Rizomas ausentes; tépalo externo angostamente elíptico, base tépalo interno
atenuada.....**Milla sp. nov. 14**
12. Hojas en sección transversal extensamente depresas, transversalmente elípticas o depresas
obovadas.
19. Anteras azules o verdes.
20. Base de los tépalos internos cuneados.
21. Hojas elípticas en sección transversal; pedicelo 1.4-3.0(-5.0) cm largo; bráctea exterior
<8.0 mm de largo; tubo floral <12.0 cm de largo, tépalos internos 6.5- 7.0 mm de ancho;
anteras 3.5-3.7 (-4.0) mm de
largo.....**Milla sp. nov. 15**
21. Hojas extensamente depresas en sección transversal; pedicelo 4.0-4.7 cm de largo,
bráctea exterior 8.0-13 mm de largo; tubo floral >12.0 cm de largo, tépalos internos 10.0 mm
de ancho; anteras 4.8 mm de largo.
22. Rizomas ausentes; pedicelo <4.0 cm de largo; tubo floral 14-18(-20) cm de largo,
tépalos con 7-12 nervaduras; anteras azules.....**Milla sp. nov. 16**

22. Rizomas presentes; pedicelo >4.0 cm de largo, tubo floral >13.0 cm de largo, tépalos 5 nervaduras; anteras verdes.....**Milla sp. nov. 17**
20. Base de los tépalos internos atenuada
23. Mesofilo de la hoja compacto.
24. Rizomas presentes; hojas extensamente depresas en sección transversal, haz redondo; tépalos con 7-12 nervaduras.....**M. mexicana**
24. Rizomas ausentes; hojas depresas obovadas en sección transversal, haz aplanado o hendido; tépalos 5 nervaduras.....**Milla sp. nov. 18**
23. Mesofilo de la hoja hueco.
25. Hojas con epidermis lisa, escapo liso; tépalos internos >1.0 cm de ancho.**M. magnifica**
25. Hojas con superficie estriada, prominencias presentes en epidermis; escapo escabroso o piloso; tépalos internos ≤1.0 cm ancho.
26. Pedicelo ≤3.0 cm de largo; tubo floral 9-11 cm de largo, tépalo interno 7-8.5 mm de ancho.
27. Rizomas ausentes; tubo floral <10.0 cm de largo, tépalo interno 8.0-8.5 mm de ancho, tépalos con 3 nervios.....**M. potosina**
27. Rizomas presentes; tubo floral >10.0 cm de largo, tépalo interno 7.0 mm de ancho, tépalos con 5 nervios.....**Milla sp. nov. 19**
26. Pedicelo 3.5-5.0 cm largo; tubo floral 12.0-16.0 cm de largo, tépalo interno >12.0 mm de ancho.
28. Haces vasculares en hojas 7-12; tubo floral >13.5 cm de largo.
29. Cormos con rizomas presentes; prominencias en hojas cortas; tépalos elípticos; anteras color verde.....**Milla sp. nov. 20**
29. Cormos con rizomas ausentes; prominencias en hojas largas; tépalos angostamente elípticos; anteras color azul.....**Milla sp. nov. 21**
28. Haces vasculares en hojas >12; tubo floral ≤13.5 cm de largo.

30. Fibras del mesófilo con paredes delgadas; pedicelo ≥ 4.6 cm de largo; bráctea < 8.5 mm de largo; tubo floral 12.0-12.4 cm de largo, tépalos internos elípticos; flores con apertura nocturna.....***M. oaxacana***
30. Fibras del mesofilo con paredes gruesas; pedicelo 3.5-4.6 cm de largo; bráctea 10-12 mm de largo; tubo floral 12.5-13.5 cm largo; tépalos internos angostamente elípticos; flores con apertura diurna y nocturna.....***Milla sp. nov. 22***
19. Anteras amarillas.
31. Base del tépalo interno atenuada
32. Hojas lisas en la superficie, prominencias epidérmicas foliares ausentes; tubo floral 9.0-10.0 cm de largo.....***Milla sp. nov. 23***
32. Hojas estriadas en la superficie, prominencias epidérmicas foliares presentes; tubo floral > 10.0 cm de largo.
33. Haces vasculares en hoja > 12 ; bráctea floral externa 6.0-10.0 mm de largo; inflorescencia con 2 flores; tépalos internos 5.5-10.0 mm de ancho.
34. Fibras del mesófilo foliar con paredes gruesas, prominencias foliares cortas; articulación del tubo floral inconspicua, pedicelo ca. 2.5 cm largo; anteras 4.5 mm largo..... ***Milla sp. nov. 24***
34. Fibras del mesofilo foliar con paredes delgadas, prominencias foliares largas; articulación del tubo floral conspicua, pedicelo hasta 4 cm largo; anteras hasta 3.0 mm largo.....***M. bryanii***
33. Haces vasculares en hoja 7-12; bráctea floral externa (0.6-)1.2-1.6 mm de largo, inflorescencia con tres o más flores; tépalo interno (16-)23-31(-35) mm de ancho..... ***Milla sp. nov. 25***
31. Base del tépalo interno cuneada o abruptamente atenuada.
35. Escapo liso; pedicelo ≤ 1.0 cm de largo.....***Milla sp. nov. 26***
35. Escapo escabroso; pedicelo 1.5-3.0 cm de largo..... ***Milla biflora***

***Milla biflora* Cav. Icon. Pl. ii, 76 1793.**

Millea biflora (Cav.) Willd., Sp. Pl. ii: 76 1799. *Gyrenia biflora* Knowles & Westc. ex Loudon., Hort. Brit. [Loudon], 3: 639 1839. *Askolame biflora* Raf., Fl. Tellur. ii: II 1836 [1837]. *Diphalangium graminifolium* (Cav.) S. Schauer, Linnaea 19: 703 1847. Tipo: México. Imperio Mexicano, Distrito Federal (Holotipo MA!).

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo subgloboso; hojas 2-4, subrollizas, prominencias hialinas sobre las nervaduras; escapo escabroso cerca de la base (9.5-)17-43(-63) cm largo; bráctea floral linear-lanceolada (0.45-)1.0-1.5(-2.2) cm largo; flores 2-4(6) en la umbela, apertura diurna y nocturna; pedicelos 1.5-3(-5) cm largo, articulación no engrosada; tubo floral (6.5-)11.0-17.0(-22.0) cm largo, tépalos angostamente elípticos, 1.7-3.5 cm largo, 3-nervados, con una banda central verde en cara externa, azul-violáceo hacia el margen; filamentos 0.5-1.5 mm largo, anteras 4.0-6.0 mm largo, lanceoladas, amarillas, basifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perigonio, ginóforo (4.5-)10.0-14.0(-19.0) cm largo; fruto una cápsula; semillas numerosas, irregulares, testa rugosa.

Distribución. Aguascalientes, Distrito Federal, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Michoacán, Morelos, Veracruz.

Hábitat. Matorral xerófilo, bosque de coníferas, bosque de encino.

Paratipo— MÉXICO, DISTRITO FEDERAL: Delegación Coyoacán, *J. Gutiérrez 1195* (FEZA, MEXU).

***Milla bryanii* I.M. Johnst., J. Arnold Arbor. 24: 90. 1943.**

Tipo: México: Coahuila, rocky slopes and crest of limestone ridgeat head of canyon, Cañon del Cuervo Chico, a large canyon cut into the western escarpment of the tableland about 16

km N of Cuesta Zozaya, abao 27° 25' N, 27-sep-1941, *I. M. Johnston 8529* (GH, MEXU, MO! 1627975).

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo subgloboso; hojas 2, subrollizas, prominencias epidérmicas hialinas sobre las nervaduras; escapo escabroso cerca de la base, 20.0-30.0 cm largo; bráctea floral linear lanceolada 5.0-7.0 mm largo; flores 1-6 en umbela, apertura diurna y nocturna; pedicelos 2.0-4.0 cm largo, articulación conspicua; tubo periantal 11.0-13.0 cm largo, tépalos angostamente elípticos, 1.5-2.0 cm largo, 5-nervados, blancos, con banda central verde en cara exterior; filamentos 3.5-4.0 mm largo, anteras 2.5-3.0 mm largo, lanceoladas, amarillas, basifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perianto, ginóforo 9.0-13.0 cm largo; fruto una cápsula; semillas numerosas, irregulares, testa rugosa.

Distribución. Coahuila.

Hábitat. Matorral xerófilo.

Paratipo— COAHUILA: Mpio. Cuatro Ciénegas, *J. Gutiérrez et al. 1226* (FEZA, MEXU).

***Milla delicata* H.E. Moore Gentes Herbarum 8: 291. 1953.**

Tipo: México: Guerrero, District Mina, oak and pine forest, Laguna, 1900 m., 29-11-1936, *Hinton 9920* (US!).

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo no observado; hojas 3-5 subrollizas, prominencias epidérmicas hialinas sobre las nervaduras, 25.0-30.0 cm largo; escapo escabroso cerca de la base, 33.0-45.0 cm largo; bráctea floral linear lanceolada 4.0-8.0 mm largo; flores 4-8 en la umbela, apertura diurna y nocturna; pedicelos 1.2-2.0 cm largo, articulación conspicua; tubo periantal 1.5-1.6 cm largo; tépalos angostamente elípticos, 7.0 mm largo, 3-nervados, con banda central verde en cara exterior, filamentos 1.5 mm largo,

anteras 2.5-3.0 mm largo, elípticas, amarillas, basifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perigonio, ginóforo 9.0-10.0 mm largo; fruto y semillas no observadas.

Distribución. Guerrero.

Hábitat. Bosque de encino y pino.

Tipo— México: Guerrero, District Mina, oak and pine forest, Laguna, 1900 m., 29-11-1936, *Hinton 9920* (US!).

***Milla filifolia* T.M. Howard *Herbertia* 54: 235. 2000.**

Tipo: México: Morelos, east of Cuernavaca, near Yautepec and Cuatla, on Mexico 11 S. Also southern state of Mexico, near Guerrero border, Mexico 55, in volcanic hillside in short grasses, ca. 5250 feet altitude, 07-1964, *Howard 64-79* (Holotipo MO!, Isotipo MEXU!).

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo 1.0-1.5 cm diametro, cormos en yemas axilares presentes; hojas 4-8, rollizas, 14.0-36.0 cm largo; escapo puberulo, (5.0-)10.0-31.0 cm largo; bráctea floral linear-lanceolada, 5.0-9.0 mm largo; flores 1-6 en la umbela, apertura diurna y nocturna; pedicelos 1.5-2.0(-2.5) cm largo, articulación engrosada; tubo periantal 6.0-10.0 cm largo; tépalos elípticos 1.8-2.5 cm largo, 5-nervados, blancos, tépalos con banda central verde en la cara exterior, apículo 1.0-2.0 mm largo; filamentos 1.3 mm largo, anteras 3.5-4.0 mm largo, elípticas, amarillas, basifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perigonio, ginóforo 5.0-8.0(-10.0) cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas numerosas, negras opacas.

Distribución. Estado de México, Morelos.

Hábitat. Bosque tropical caducifolio.

Paratipo— MORELOS: Mpio. Tenango, *J. Gutiérrez 1133* (FEZA, MEXU).

***Milla magnifica* H.E. Moore Gentes Herbarum 8: 282. 1953.**

Tipo: México: Guerrero, slopes above Río de los Sabinos near Los Sabinos, 36-38 km. From Iguala on road to Teloloapan; corms collected November 1949, flowered at Ithaca, New York, October 1951, *Moore 5974* (Holotipo BH!).

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo 2.5-3.5 cm diámetro; hojas 1-2, subrollizas, 70.0-120.0 cm largo; escapo liso, (50.0-)80.0-110.0 cm largo; bráctea floral linear-lanceolada 0.5-1.0(-1.5) cm largo; flores 15-30 en umbela, apertura nocturna; pedicelos (2.0-)4.0-6.0 cm largo, articulación conspicua; tubo periantal 12.0-15.0 cm largo, tépalos angostamente elípticos 3.0-3.7 cm largo, los internos 1.0-1.3 cm ancho, 5-nervados, blancos, con banda central verde en cara exterior, rojizos hacia los márgenes, apículo 0.5-1 mm largo; filamentos 1.3 mm largo, anteras 5.0-7.0(-10) mm largo, lanceolada, azules, subasifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perigonio, ginóforo (8.5-)11.0-13.5 cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas numerosas, testa negra opaca, granulares.

Distribución. Guerrero, Morelos.

Hábitat. Bosque tropical caducifolio.

Paratipo—GUERRERO: Mpio. Eduardo Neri, *J. Gutiérrez y R. Rios 1346* (FEZA, MEXU).

***Milla mexicana* T.M. Howard *Herbertia* 54: 234. 2000.**

Tipo: México: Puebla, About 30 miles south of Izucar de Matamoros, 07-1964, *Howard 64-44* (Holotipo MO!, Isotipo MEXU!).

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo 2.0-2.5 cm diámetro, produciendo rizomas y cormos; hojas 3-4, subrollizas, (40.0-)60.0-80.0 cm largo; escapo escabroso, (30.0-)40.0-50.0 cm alto; bráctea floral linear-lanceolada, 1.0-1.5 cm largo; flores 3-7(-11)

en umbela, apertura nocturna; pedicelos 3.0-5.5 cm largo, articulación engrosada; tubo periantal 11.0-15.0 cm largo, tépalos angostamente elípticos 2.5-3.0 cm largo, 7-12-nervaduras, blancos, con banda central verde en cara exterior, márgenes púrpuras, apículo 1.0 mm largo; filamentos 4.0-6.0 mm largo, anteras 4.0-5.0 mm largo, lanceoladas, azules o verdes, subasifijas; ovario elíptico, ginóforo 8.0-11.0 cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas numerosas, testa negra opaca, granulares.

Distribución. Puebla.

Hábitat. Bosque tropical caducifolio.

Paratipo—PUEBLA: Mpio. Tepexco, *J. Gutiérrez 1134* (FEZA, MEXU).

***Milla oaxacana* Ravenna Pl. Life 27: 89-90, 60. 1971.**

Tipo: México: Oaxaca, *Culta in Bonaria ex bulbis ad meridionem Mexicii ad Sierra de San Felipe civit. Oaxacae collectis*; leg. Ravenna 403, aest 1965, *P. Ravenna 403* (Herb Ravenna).

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo 1.0-1.5 cm diámetro; hojas 2, subrollizas, 27.0-50.0 cm largo; escapo escabroso en la base, 25.0-38.0(-45.0) cm alto; bráctea floral linear-lanceolada (0.5-)1.0-1.5 cm largo; flores(1-)2-5 en umbela, apertura nocturna; pedicelos (4.0-) 4.6-6.0 cm largo, articulación no engrosada; tubo periantal 12.0-12.4(-14.0) cm largo, tépalos externos angostamente elípticos, los internos elípticos, 2.2-2.8 cm largo, 5-7-nervados, blancos, con banda central verde en la cara exterior, márgenes azul-violáceo, apículo verde oscuro, 1.0-1.4 mm largo; filamentos 1.5-2.0 mm largo, anteras 3.7-5.0 (-7.0) mm largo, lanceolada, verdes, subasifijas; ovario elíptico; ginóforo 9.0-12.0(-13.5) cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas numerosas, testa negra opaca, granular.

Distribución. Oaxaca.

Hábitat. Bosque de encino y pino.

Paratipo—OAXACA: Dto. Cuicatlán, Mpio. San Pablo Huitzo, *J. Gutiérrez et al. 1193* (FEZA, MEXU).

***Milla potosina* T.M. Howard *Herbertia* 54: 234. 2000.**

Tipo: México: San Luis Potosí, 30 miles north of San Luis Potosí. 09-1967, *Howard 67-84* (Holotipo MO!).

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo 1.5-2.0 cm diámetro; hojas 4-8, subrollizas, 35-40 cm largo; escapo escabroso en la base, (10-)15-25 cm alto; bráctea floral linear-lanceolada 5.0-10.0 mm largo; flores (1-)2-6 en umbela, apertura nocturna; pedicelos 2.0-4.0 cm largo, articulación no engrosada; tubo periantal 7.0-12.0(-14.0) cm largo, tépalos externos angostamente elípticos, los internos elípticos, 2.4-2.8 cm largo, 3-nervados, blancos, con banda central verde en la cara exterior, márgenes azul-violáceo, apículo verde oscuro, 1.0-1.4 mm largo; filamentos 0.5 mm largo, anteras 3.0-3.5 mm largo, lanceolada, verdes, subasifijas; ovario elíptico, ginóforo 6.0-10.0(-12.5) cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas irregulares numerosas, testa negra opaca, granular.

Distribución. Guanajuato, Nuevo León, San Luis Potosí.

Hábitat. Matorral xerófilo.

Paratipo—SAN LUIS POTOSÍ: Mpio. Guadalcázar, *J. Gutiérrez e I. Escalante 1414* (FEZA, MEXU).

***Milla rosea* H.E. Moore *Gentes Herbarum* 8. 284 1953.**

Tipo: México: Nuevo León; Cerro del Obispado, Monterrey, alt. 1600 m., 26-10-1946, *Lacás 91* (Holotipo F!).

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo 1.5-2.0 cm diámetro, produciendo rizomas y cormelos; hojas 5-7, subrollizas, 20.0-32.0 cm largo; escapo escabroso en la base, 25-30 cm alto; bráctea floral linear lanceolada 3.5-5.0 mm largo; flores 4-6 en umbela, apertura diurna-nocturna; pedicelos 1.5-2.5 cm largo, articulación engrosada; tubo periantal (3.5-)4.0-5.0 cm largo, tépalos externos angostamente elípticos 1.6-2.0 cm largo, 5-nervados, blanco-rosados, con banda central verde en cara exterior, rojizos-rosados hacia los margenes, apículo 0.5 mm largo; filamentos 2.5-3.0 mm largo, anteras 2.5-3.0(-4.0) mm largo, lanceoladas, amarillas, subasifijas; ovario elíptico, ginóforo 3.5-4.0 cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas irregulares, numerosas, testa negra opaca, granular.

Distribución. Nuevo León.

Hábitat. Matorral xerófilo.

Paratipo—NUEVO LEÓN: Mpio. Montemorelos, *J. Gutiérrez y E. Estrada 1218* (FEZA, MEXU).

***Milla valliflora* J. Gut. & E. Solano Brittonia 67: 43-47. 2015.**

Tipo: México: Oaxaca: Dto. Coixtlahuaca, Mpio. Suchixtlahuaca, on the Suchixtlahuaca–Tejupan highway, 26-8-2010, *J. Gutiérrez, E. Solano & R. Rios 1151* (Holotipo: MEXU!; Isotipos: FEZA!, NY!, UAMIZ!).

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas, algunas carnosas; cormo 0.5-1.9 cm diámetro, produciendo rizomas y cormos laterales; hojas 3-4, rollizas, 14.5-28.5 cm largo, prominencias cortas en epidermis; escapo liso, 4.0-21.0 cm alto; bráctea floral linear-lanceolada 7.0-13.0 mm largo; flor única, con apertura diurna y nocturna; pedicelos 2.0(-3.5) cm largo, articulación no engrosada; tubo periantal (8.0-)11.0-13.5 cm largo, tépalos elípticos (1.7-)2.5(-3.1) cm largo, 5(-11)-nervados, blancos, con banda central verde cara

externa, márgenes azul-violáceo, apículo 1.0-1.5 mm largo, verde oscuro; filamentos 0.8-2.0 mm largo, anteras 3.5-5.0 mm largo, lanceoladas, amarillas, basifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perigonio, ginóforo 9.0-12.6 cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas irregulares numerosas, testa negra opaca, granular.

Distribución. Puebla y Oaxaca.

Hábitat. Matorral xerófilo.

Isotipo—México: Oaxaca: Dto. Coixtlahuaca, Mpio. Suchixtlahuaca, on the Suchixtlahuaca–Tejupan highway, 26-8-2010, *J. Gutiérrez, E. Solano & R. Ríos 1151* (Isotipos: FEZA!, NY!, UAMIZ!).

Milla sp. *nov.* 1 ined.

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas y carnosas; cormo 1.0-2.0 cm diámetro; hojas 6(-8), aplanadas, 16-25 cm largo, prominencias largas en epidermis; escapo puberulento, 4.0-10.0 (-35.0) cm alto; bráctea floral lanceolada 1.0-1.5 cm largo; flores 3-4 en umbela, flores con apertura diurnay nocturna; pedicelos 3.5-4.5(-5.0) cm largo, articulación no engrosada, tubo floral (4.0-)5.0-8.0 cm largo, puberulento, tépalos externos angostamente elípticos, los internos elípticos, 2.1-3.0 cm largo, 7-nervados, cara interna blanca, banda central verde en cara externa, maculas violáceas en los márgenes, apículo 0.7-1.5 mm largo; filamentos 1.5-2.0 mm largo, anteras 3.5-4.0(-4.5) mm largo, lanceoladas, amarillas, basifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perinato, ginóforo 4-7 cm largo; fruto cápsula elipsoide; semillas irregulares numerosas, testa negra opaca, granular.

Tipo: México: OAXACA: Dto. Huajuapán, Mpio. Zapotitlán Palmas, 27-07-2012, *R. Ríos y J. Gutiérrez, 902*. Por distribuir.

Distribución. Oaxaca.

Hábitat. Matorral xerófilo.

Discusión. *Milla* sp. nov. 1 difiere de *M. biflora*, por sus hojas aplanadas, escapo puberulento y número de nervaduras en los tépalos.

***Milla* sp. nov. 2** ined.

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas y carnosas; cormo 1.5 cm diámetro; hojas 4, aplanadas, 26.0-30.0(-34.0) cm largo, prominencias cortas en epidermis; escapo puberulento (12.0-)15.0-22.0 cm alto; bráctea floral lanceolada 0.7-1.0 cm largo; flores 3-5 en umbela; pedicelos (1-)2.5-3.0(-4) cm largo, articulación no engrosada, tubo periantal (5.5-)7.0-10.0 cm largo, flores con apertura diurna y nocturna, tépalos elípticos 2.3-2.8 cm largo, 7-nervados, cara interna blanca, banda central verde en cara externa, apículo 1.0-1.5 mm largo; filamentos 1.5-2.0 mm largo, anteras 4.0-5.0 mm largo, lanceoladas, amarillas, basifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perigonio, ginóforo (4.5-)6.0-8.5 cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas irregulares numerosas, testa negra opaca, granular.

Tipo: México: MORELOS: Mpio. Jantetelco, 12-08-2010, *J. Gutiérrez*, 1135. Por distribuir

Distribución. Morelos.

Hábitat. Bosque tropical caducifolio.

Discusión. *Milla* sp. nov. 2 se relaciona con *Milla* sp. nov. 1 por la presencia de hojas aplanadas y número de nervaduras de los tépalos, pero difiere en el tamaño del ginóforo y las anteras.

Milla sp. nov. 3 ined.

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo 1.0-1.5 cm diámetro; hojas 3-4, circulares, 17.0-25.0 cm largo, prominencias cortas en peidermis; escapo liso, 8.0-28.0 cm alto; bráctea floral linear lanceolada, 4.0-5.0 mm largo; flores 5-7 en umbela apertura diurna y nocturna; pedicelos 0.5-1.0 (-1.2) cm largo, articulación engrosada, tubo periantal 4.5-6.5 cm largo, tépalos externos angostamente elípticos, los internos elípticos 1.6-1.8 cm largo, 3-nervados, cara interna blanco-rosada, cara externa con banda central verde, apículo 0.2-0.5 mm largo; filamentos 1.5 mm largo, anteras 2.3-3.5 mm largo, lanceoladas, amarillas, basifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perigonio, ginóforo 2.5-4.0 cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas irregulares, numerosas, testa negra opaca, granular.

Tipo: México: BAJA CALIFORNIA SUR: Mpio. Los Cabos, 13-04-2013, *J. Gutiérrez, M. Hernández & R. Rios 1443*. Por distribuir.

Distribución. Baja California Sur.

Hábitat. Matorral xerófilo.

Discusión. *Milla sp. nov. 3* se diferencia de *Milla sp. nov. 2*, por el tamaño de las hojas, escapo liso, articulación del pedicelo engrosada, color de los tépalos, tamaño de las anteras y ginóforo.

Milla sp. nov. 4 ined.

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo 1.0-1.8 cm diámetro; hojas 2-3, subrollizas, 30.0-50.0(-60.0) cm largo, prominencias largas; escapo hispido, 24.0-34.0 cm alto; bráctea floral lanceolada, 2.4-3.4 cm largo; flores 2-4 en umbela, apertura diurna y

nocturna; pedicelos 2.8-4.0 cm largo, articulación engrosada, tubo floral 9.0-12.0 cm largo, tépalos externos angostamente elípticos, los internos elípticos, 7.5-8.0 mm largo, 5-nervados, blancos internamente, banda central verde en la cara externa, violáceo hacia los márgenes, apículo 0.8 mm largo; filamentos 0.8-1.0 mm largo, anteras 4 mm largo, lineares, verdes, basifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perigonio, ginóforo 7.0-8.6 cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas irregulares numerosas, testa negra, opaca, granular.

Tipo: México: OAXACA: Mpio. Santiago Chazumba, 27-07-2012, R. Ríos y J. Gutiérrez 898. Por distribuir.

Distribución. Oaxaca.

Hábitat. Bosque tropical caducifolio y matorral xerófilo.

Discusión. *Milla* sp. nov. 4 difiere de *M. filifolia* por el número y tamaño de hojas, largo de los pedicelos y tamaño de los filamentos.

***Milla* sp. nov. 5 ined.**

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo 1.0-1.5 cm diámetro; hojas 2-3, subrollizas, 22.0-32.0 cm largo, prominencias largas en epidermis; escapo liso, 22.0-30.0 cm alto; bráctea floral lanceolada 0.7-1.0 cm largo; flores 2-3 en umbela, apertura diurnas-nocturnas; pedicelos (0.8-)1.0-1.5(-1.8) cm largo, articulación no engrosada, tubo perianto 11.0-15.0 cm largo, tépalos externos angostamente elípticos, los internos elípticos 2.0-2.3 cm largo, 3-nervados, blancos internamente, banda central verde en la cara externa, violáceo hacia los márgenes, apículo 1 mm largo; filamentos (0.8-)1.0 mm largo, anteras 3.5-5.0 mm largo, lanceoladas, amarillas, basifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del

perigonio, ginóforo 9.0-13.5 cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas irregulares numerosas, testa negra opaca, granular.

Tipo: México: ZACATECAS: Mpio. Zacatecas, 03-09-2012, *J. Gutiérrez y E. Bravo 1407*.

Por distribuir.

Distribución. Zacatecas.

Hábitat. Matorral xerófilo.

Discusión. *Milla* sp. nov. 5 difiere de *M. valliflora* por presentar prominencias largas en hoja, escapo liso, flores en mayor número y pedicelo más corto.

***Milla* sp. nov.** 6 ined.

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo 0.8-1.2 cm diámetro; hojas 3-4, subrollizas, (5.0-)11.0-25.0 cm largo, prominencias cortas en epidermis; escapo escabroso, 3.0-9.0(-15.0) cm alto; bráctea floral lanceoladas 6.0-9.0 mm largo; flor única; pedicelos 0.2-1.0 cm largo, articulación no engrosada, tubo floral 10.0-12.0(-14.5) cm largo, apertura flores diurna y nocturna, tépalos externos angostamente elípticos, los internos elípticos 1.8-2 (-2.5) cm largo, 3 nervados, blancos, banda central verde en la cara externa, tintes violáceos en los márgenes, apículo 0.3-0.6 mm largo; filamentos 1 mm largo, anteras 4-6 mm largo, lanceoladas, amarillas, basifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perigonio, ginóforo 9-12 cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas irregulares, numerosas, testa negra, opaca, granular.

Tipo: México: NAYARIT: Mpio Del Nayar, 02-09-2012, *J. Gutiérrez y E. Bravo 1388*. Por distribuir

Distribución. Nayarit.

Hábitat. Bosque de pino.

Discusión. *Milla* sp. nov. 6 es similar a *Milla* sp. nov. 7 por presentar un escapo liso, tamaño de bráctea floral. Pero difiere en la presencia de flores solitarias, en color amarillo de las anteras y su tamaño.

***Milla* sp. nov. 7** ined.

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo 1.0-1.8 cm diámetro; hojas 3-4, subrollizas, (13.0-)19.0-33.0 cm largo, prominencias cortas en epidermis; escapo liso, (-5.0)7.0-17.0(-25.0) cm alto; bráctea floral lanceolada, 4.5-1.0 cm largo; flores 1-2, en umbela, apertura de las flores nocturna; pedicelos (0.8-)1.3-3.0 cm largo, articulación engrosada, tubo perianto 9.0-12.0(-14.0) cm largo, rojizo, tépalos externos angostamente elípticos, los internos elípticos 2.2-2.6(2.9) cm largo, 5-nervados, blancos, banda central verde en cara externa, violáceo hacia los márgenes, apículo 0.5-0.7 mm largo; filamentos 1.3-2.0 mm largo, anteras 3.5-3.7(-4.5) mm largo, lanceoladas, verdes, basifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perigonio, ginóforo 7.0-10.0(-12.0) cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas irregulares numerosas, testa negra opaca, granular.

Tipo: México: PUEBLA: Mpio Tehuacán, 25-07-2012, *J. Gutiérrez* y *R. Ríos* 1262. Por distribuir

Distribución. Puebla.

Hábitat. Matorral xerófilo.

Discusión. *Milla* sp. nov. 7 es similar a *Milla* sp. nov. 6 por presentar un escapo liso, tamaño de bráctea floral. Pero difiere en la presencia de dos flores en la umbela, en color verde de las anteras y su tamaño.

Milla sp. nov. 8 ined.

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo 1.5-2.0 cm diámetro; hojas 2, subrollizas, 40.0-75.0 cm largo, prominencias largas en epidermis; escapo liso, 39.0-50.0 cm alto; bráctea floral lanceolada, 1.0 cm largo; flores 3-5 en umbela, apertura nocturna; pedicelos 1.5-4.5 cm largo, articulación engrosada, tubo perianto 9.5-13.0 cm largo, tépalos externos angostamente elípticos, 2.5-3.0 cm largo, 5-nervados, blancos, con banda central verde en cara externa, márgenes rojizos, apículo 0.5 mm largo; filamentos 5.0 mm largo, anteras 4.0-4.5 mm largo, lineares, verdes, basifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perigonio, ginóforo 7.0-11.0 cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas irregulares, numerosas, testa negra opaca, granular.

Tipo: México: OAXACA: Mpio. Santo Domingo Tonalá, 28-07-2012, *J. Gutiérrez y R.*

Ríos 1471. Por distribuir.

Distribución. Oaxaca.

Hábitat. Bosque tropical caducifolio.

Discusión. *Milla sp. nov. 8* es similar a *Milla sp. nov. 9* por presentar apertura de la flor nocturna. Pero difiere por la presencia de prominencias foliares cortas, pedicelos engrosados y cinco nervaduras en los tépalos.

Milla sp. nov. 9 ined.

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo 1.0-2.0 cm diámetro; hojas 3-4, subrollizas, 35.0-50.0 cm largo, prominencias cortas en epidermis; escapo escabroso, (17.0-26.0-42.0 cm alto; bráctea floral lanceolada, 0.6-1.0 cm largo; flores 4-7 en umbela, apertura nocturna; pedicelos (2.0-)2.6-5.0 cm largo, articulación no engrosada, tubo floral 11.0-14.0 cm largo, violáceos, tépalos elípticos, 2.3-3.0 cm largo, 7-12 nervados, con banda

central color verde en la cara externa, violáceos hacia los márgenes; filamentos 2.5-3.0 mm largo, anteras 4.0-4.5 mm largo, linear-lanceolada, azules, subasifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perigonio, ginóforo 7.0-10.5 cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas irregulares numerosas, testa negra opaca, granular.

Tipo: México: OAXACA: Mpio. San Luis Amatlán, 13-08-2012, *J. Gutiérrez, M.*

Hernández y R. Ríos 1315. Por distribuir.

Distribución. Oaxaca.

Hábitat. Matorral xerófilo.

Discusión. *Milla* sp. nov. 9 es similar a *Milla* sp. nov. 8. Pero difiere por la presencia de prominencias foliares largas, pedicelos no engrosados y 7-12 nervaduras en los tépalos.

***Milla* sp. nov. 10 ined.**

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo 1.0-2.0 cm diámetro, cormo y rizomas presentes lateralmente; hojas 4-7, subrollizas, 25.0-45.0(-55.0) cm largo, prominencias cortas; escapo hirsuto, 25.0-40.0(-50.0) cm alto; bráctea floral lanceolada, 0.9-1.5 cm largo; flores 3-5 en umbela, apertura nocturna; pedicelos 2.0-4.0 mm largo, articulación engrosada; tubo floral (10.0-)12.0-18.0(-21.0) cm largo, hirtulo, tépalos externos e internos angostamente elípticos, 2.0-2.8(-3.3) cm largo, cara interna blanca, cara externa con banda central verde, violáceos hacia los márgenes, apículo 0.5-1.0 mm largo, 7-12-nervados, blancos en cara interna; filamentos (2.5-)3.3-4.0 mm largo, anteras (2.6-)3.5-4 mm largo, lanceoladas, verdes, basifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perigonio, ginóforo (8.0-)11.0-16.0(-19.0) cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas irregulares, numerosas, testa negra, opaca, granular.

Tipo: México: MICHOACÁN: Mpio Huetamo, 18-08-2012, *R. Ríos y J. Gutiérrez 961*.

Distribución. Estado de México y Michoacán. Por distribuir

Hábitat. Bosque tropical caducifolio.

Discusión. *Milla* sp. nov. 10 difiere de *Milla* sp. nov. 11 por la presencia de prominencias foliares cortas, más de tres flores en la inflorescencia y presentar 7-12 nervaduras en los tépalos.

***Milla* sp. nov. 11 ined.**

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo 1.0-1.5 cm diámetro, rizomas presentes; hojas 2, subrollizas, 30.0-40.0(-45.0) cm largo, prominencias largas en pidermis; escapo liso, 20.0-40.0(-47.0) cm alto; bráctea floral lanceolada, 6.0-9.0 mm largo; flores 2-3 en umbela, apertura nocturna; pedicelos 0.5-3.0 mm largo, articulación engrosada, tubo floral 12.0-14.5 cm largo, tépalos externos angostamente elípticos, los internos elípticos 2.0-2.5 cm largo, 5-nervados, cara interna blanca, cara externa con banda central verde, violáceo hacia los márgenes, apículo 0.5-0.7 mm largo; filamentos 3.5-4.0 mm largo, anteras 4.5-5.0 mm largo, lanceoladas, verdes, basifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perigonio, ginóforo 10.5-13.0 cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas irregulaes numerosas, testa negra opaca, granular.

Tipo: México: CHIAPAS: Mpio. Tuxtla Gutiérrez, 11-08-2012, *M. Ayala, R. Ríos y J. Gutiérrez 978*. Por distribuir.

Distribución. Chiapas.

Hábitat. Bosque tropical caducifolio.

Discusión. *Milla* sp. nov. 11 difiere de *Milla* sp. nov. 10 por la presencia de prominencias foliares largas y tépalos cinco nervados.

Milla sp. nov. 12 ined.

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo 1.0-1.5 cm diámetro, rizomas presentes; hojas 2, subrollizas, 25.0-60.0(-90.0) cm largo, prominencias cortas; escapo escabroso, 21.0-45.0(-50.0) cm alto; bráctea floral lanceolada, 0.5-1.2 cm largo; flores 5-7 en umbela, nocturnas; pedicelos 1.5-3.0(-5.0) cm largo, articulación engrosada, tubo perianto (10.0-13.0-16.0 cm largo, tépalos angostamente elípticos 2.0-2.8(-3.5) cm largo, 9-12-nervados, blancos internamente, banda central verde en cara externa, violáceo hacia los márgenes, apículo 0.5-1.0 mm largo; filamentos 2-4 mm largo, anteras 2.8-4.5 mm largo, lanceoladas, verdes, basifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perigonio, ginóforo 8-14 cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas irregulares numerosas, testa negra opaca, granular.

Tipo: México: CHIAPAS, Mpio Ocozocoautla, 11-08-2012, *M. Ayala, R. Ríos y J.*

Gutiérrez 1011. Por distribuir.

Distribución. Chiapas.

Hábitat. Bosque tropical caducifolio y bosque de encino.

Discusión. *Milla sp. nov. 12* es similar a *Milla sp. nov. 13* en articulación del pedicelo engrosada y anteras color verde. Pero difiere en el largo del pedicelo, tubo floral y antera.

Milla sp. nov. 13 ined.

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo 2.0 cm diámetro, rizomas presentes; hojas 3-4, subrollizas, 30.0-50.0(-55.0) cm largo, prominencias cortas; escapo liso, (11.5-13.0-25.0 cm alto; bráctea lanceolada, 6-8 mm largo; flores 2 en umbela, apertura nocturna; pedicelos 0.5-1.2 cm largo, articulación engrosada, tubo floral (11.0-12.5-15.0 cm largo, tépalos elípticos 2.1-2.7(-3.1) cm largo, base cuneada, 7-nervados, blancos internamente, cara externa con banda central verde, márgenes violáceos, apículo 0.5 mm

largo; filamentos 4.0-4.5 mm largo, anteras 4.0-4.5 mm largo, linear-lanceolada, verdes, subasifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perigonio, ginóforo 9.5-12(-14) cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas irregulares numerosas, testa negra opaca, granular.

Tipo: México: OAXACA: Mpio Santiago Laollaga, *R. Ríos* y *J. Gutiérrez* 924. Por distribuir

Distribución. Oaxaca.

Hábitat. Bosque tropical caducifolio.

Discusión. *Milla* sp. nov. 13 difiere de *Milla* sp. nov. 14 por la presencia de rizomas, articulación del pedicelo engrosada y tépalos siete nervados.

***Milla* sp. nov. 14 ined.**

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo 2.0 cm diámetro, rizomas ausentes; hojas 4-6, subrollizas, (30.0-)34.0-46.0 cm largo, prominencias cortas en epidermis; escapo escabroso, 32.0-33.0(-40.0) cm alto; bráctea floral lanceolada 7.5-1.0 mm largo; flores 3-4, en umbela; apertura nocturna; pedicelos 1.0-2.0(-2.7) cm largo, articulación no engrosada, tubo perianto (7.5-)8.5-12.0 cm largo, tépalos externos angostamente elípticos, los internos elípticos, base atenuada, 2.0-2.7 cm largo, 5-nervados, blancos internamente, banda central verde en cara externa, márgenes violáceos, apículo 0.5 mm largo; filamentos 3.0-3.5 mm largo, anteras 3.2-4.5 mm largo, linear-lanceolada, verdes, subasifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perigonio, ginóforo (5.6-)7.0-10.0 cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas irregulares, numerosas, testa negra, opaca, granular.

Tipo: México: OAXACA: Mpio. Salina Cruz, *R. Ríos* y *J. Gutiérrez* 936. Por distribuir

Distribución. Oaxaca.

Hábitat. Matorral xerófilo.

Discusión. *Milla* sp. nov. 14 difiere de *Milla* sp. nov. 13 por la ausencia de rizomas, escapo escabroso, articulación del pedicelo no engrosada y tépalos cinco nervados.

***Milla* sp. nov. 15 ined.**

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo 1.0-1.7 cm diámetro; hojas 2, elípticas en sección transversal 15-35(-52) cm largo, prominencias cortas; escapo escabroso, 25.0-45.0(-50.0) cm alto; bráctea floral lanceolada 0.55-1.2 cm largo; flores (1-)3-4 en umbela, apertura diurna y nocturna; pedicelos 1.4-3.0(-5.0) cm largo, articulación engrosada, tubo perianto (8.7-)10.0-13.0 cm largo, tépalos angostamente elípticos blanco-rojizos, 1.8-2.4 cm largo, 5-nervados, cara interna blanca, banda central verde en cara externa, apículo 0.5-1.0 mm largo; filamentos 1.5-3.0 mm largo, anteras 3.5-3.7(-4.0) mm largo, lineares, verdes, basifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perigonio, ginóforo (7.2-)8.5-11.5(-12.5) cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas irregulares numerosas, testa negra opaca, granular.

Tipo: México: OAXACA: Mpio Putla, 17-06-2011, *J. Gutiérrez, E. Solano y R. Ríos 1174.*

Por distribuir.

Distribución. Oaxaca.

Hábitat. Bosque mesófilo de montaña y bosque de encino.

Discusión. *Milla* sp. nov. 15 morfológicamente es diferente de *Milla* sp. nov. 16 por la presencia de prominencias cortas en la epidermis de las hojas, articulación engrosada y apertura de la flor diurna y nocturna.

Milla sp. nov. 16 ined.

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo 1.5-2.5 cm diámetro; hojas 3-5, subrollizas, 35.0-65.0 cm largo, prominencias largas en epidermis; escapo escabroso, (14-)18-50 cm alto; bráctea floral lanceolada, 1.0-1.6 cm largo; flores 5-8 en umbela, apertura nocturna; pedicelos 1.4-4.0(-6.5) cm largo, articulación no engrosada, tubo perianto 14-18(-20) cm largo, tépalos externos angostamente elípticos apículo 0.5-1.0(-1.5) mm largo, banda central verde en cara externa, márgenes violáceos, los internos elípticos, 2.2-3.2(-3.7) cm largo, 7-12-nervados, blancos internamente; filamentos 2.0-2.5 mm largo, anteras 4.0-4.5 mm largo, linear-lanceolada, azules, subasifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perigonio, ginóforo 9-13 cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas irregulares, numerosas, testa negra opaca, granular.

Tipo: México: OAXACA: Mpio. San Marcos de Arteaga, 29-08-2010, *J. Gutiérrez, E. Solano y R. Ríos 1162*. Por distribuir.

Distribución. Oaxaca.

Hábitat. Matorral xerófilo.

Discusión. *Milla sp. nov.* 16 morfológicamente es diferente de *Milla sp. nov.* 17 por la ausencia de rizomas, tépalos con 7-12 nervaduras y anteras azules.

Milla sp. nov. 17 ined.

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo 1.5-1.8 cm diámetro, rizomas laterales presentes, cormos presentes en los extremos distales del rizoma; hojas 2-4, subrollizas, 40.0-57.0 cm largo, prominencias cortas en epidermis; escapo liso o algo escabroso, (15.0-)21.0-39.0 cm alto; bráctea floral lanceolada 7.0-10.0 mm largo; flores 1-3 apertura nocturna; pedicelos (3.0-)4.0-6.0 cm largo, articulación engrosada, tubo floral 14.0-18.0(-

20.0) cm largo, tépalos externos angostamente elípticos, los internos elípticos, 2.5-3.2 cm largo, 5-nervados, blancos en cara interna, cara externa con banda central verde, márgenes violáceos, apículo 0.5-1.0 mm largo; filamentos 4.5-5.0 mm largo, anteras 4.5-5.0 mm largo, linear-lanceolada, verdes, subasifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perigonio, ginóforo 13.5-17.0 cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas irregulares numerosas, testa negra opaca, granular.

Tipo: México: OAXACA: Mpio Nejapa de Madero, *J. Gutiérrez, M. Vázquez y T. Terrazas 1356*. Por distribuir.

Distribución. Oaxaca.

Hábitat. Bosque tropical caducifolio.

Discusión. *Milla* sp. nov. 17 difiere morfológicamente de *Milla* sp. nov. 16 por la presencia de rizomas y cormos en las yemas distales de los rizomas, tépalos con 5 nervaduras y anteras verdes.

***Milla* sp. nov. 18 ined.**

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo 1.5-2.5 cm diámetro, rizomas ausentes; hojas 2-3, hojas depresas obovadas en sección transversal, haz aplanado o hendido, (25.0-30.0-45.0 cm largo, prominencias largas; escapo escabroso, 22.0-45.0 cm alto; bráctea floral lanceolada 0.6-1.2 cm largo; flores 2-4 en umbela, apertura nocturna; pedicelos 2.0-3.8 cm largo, articulación engrosada, tubo perianto 11.0-14.0 cm largo, rojizo, tépalos externos angostamente elípticos, los internos elípticos 2.0-3.5 cm largo, 5-nervados, blancos, banda central verde cara externa, violáceos hacia los márgenes, apículo 0.5-1.0 mm largo; filamentos 1.5-2.0 mm largo, anteras 3.0-4.5 mm largo, lanceoladas, verdes,

basifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perigonio, ginóforo 10.0-12.0 cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas irregulares numerosas, testa negra opaca, granular.

Tipo: México: PUEBLA: Mpio Tehuacán, 26-07-2012, *J. Gutiérrez y R. Ríos 1268.*

Distribución. Puebla. Por distribuir.

Hábitat. Matorral xerófilo.

Discusión. *Milla* sp. nov. 18 es similar *M. mexicana* por la presencia de mesofilo compacto de la hoja. Sin embargo, difiere por la ausencia de rizomas, hojas no circulares en sección transversal y tépalos con cinco nervaduras y violáceos hacia los márgenes.

***Milla* sp. nov. 19 ined.**

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo 1.0-2.0(-2.5) cm diámetro, cormos y rizomas laterales presentes; hojas 1-2, subrollizas, 85.0-120.0 cm largo, prominencias largas; escapo escabroso, 20-40 cm alto; bráctea floral lanceolada, 0.9-1.2 cm largo; flores 2-5 en umbela; pedicelos 2.0-5.0 cm largo, articulación engrosada, tubo perianto (5.5-)10.0-13.0(-15.0) cm largo, nocturnas, tépalos angostamente elípticos (1.6-)2.0-3.0 cm largo, 5-nervados, cara interna blanca, cara externa con banda central verde, márgenes rojizos, apículo 0.5 mm largo; filamentos 4.0-5.5 mm largo, anteras 3.5-4.5 mm largo, lanceoladas, verdes, basifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perigonio, ginóforo (5.3-)7.0-11.0(-14.0) cm largo; fruto cápsula elipsoide; semillas irregulares numerosas, testa negra opaca, granular.

Tipo: México; GUERRERO: Mpio Eduardo Neri, 19-08-2012, *J. Gutiérrez y R. Ríos 1344.*

Distribución. Guerrero.

Hábitat. Bosque tropical caducifolio.

Discusión. *Milla* sp. nov. 19 es similar a *M. potosina* por la presencia de flores con apertura nocturna, anteras de color verde. Pero difiere en la presencia de rizomas articulación engrosada del pedicelo y márgenes de los tépalos con tintes rojizos.

***Milla* sp. nov. 20** ined.

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas, algunas carnosas; cormo con rizomas 1.5-2.0 cm diámetro; hojas 2-4, subrollizas, 40.0-60.0 cm largo, prominencias cortas; escapo escabroso, 35-45 cm alto; bráctea floral lanceolada, 5.0-7.0 mm largo; flores 4-6 en umbela; pedicelos 4.5-6.0 cm largo, articulación engrosada, tubo periantal 14.0-16.0 cm largo, rojo, apertura nocturna, tépalos elípticos, 2.4-3.2 cm largo, 7-nervados, blancos, cara externa con banda central verde, tintes rojizos en los márgenes, apículo 1.0 mm largo; filamentos 3.0-4.0 mm largo, anteras 4.0-5.0 mm largo, lanceoladas, verdes, basifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perianto, ginóforo 12.0-14.0 cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas numerosas, testa negra opaca, granular.

Tipo: México: PUEBLA: Mpio Tehuacán, 25-07-2012, *J. Gutiérrez y R. Ríos 1257*.

Distribución. Puebla y Oaxaca. Por distribuir

Hábitat. Matorral xerófilo.

Discusión. *Milla* sp. nov. 20 es similar a *Milla* sp. nov. 21 por la presencia siete nervaduras en los tépalos y flores con apertura nocturna. Pero difiere por la presencia de rizomas, prominencias de las hojas cortas, anteras de color verde.

***Milla* sp. nov. 21** ined.

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo 1.0-2.0 cm diámetro; rizomas ausentes; hojas 2, subrollizas, 30.0-60.0(-70.0) cm largo, prominencias largas en epidermis; escapo

hirsuto, 20.0-60.0 cm alto; bráctea floral lanceolada (0.6-)1.0-2.0 mm largo; flores (1-)2-3 en umbela; pedicelos 3.0-5.0(-6.5) cm largo, articulación no engrosada, tubo floral 12.0-15.0(-17.0) cm largo, apertura nocturna, tépalos angostamente elípticos, (2.5-)3.0-4.0 cm largo, 7-nervados, cara interna blanca, cara externa con banda central verde, tintes violáceos en los márgenes, apículo 1.5-2.0 mm largo; filamentos 2.0-4.0 mm largo, anteras 4.0-6.0 mm largo, lanceoladas, azules, basifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perigonio, ginóforo (7.5-)10.0-14.0(-16.0) cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas irregulares numerosas, testa negra opaca, granular.

Tipo: México: OAXACA: Dto. Coixtlahuaca, Mpio Suchixtlahuaca, 26-8-2010, *J.*

Gutiérrez, E. Solano y R. Ríos 1155. Por distribuir.

Distribución. Oaxaca.

Hábitat. Matorral xerófilo, bosque de pino.

Discusión. *Milla sp. nov.* 21 difiere de *Milla sp. nov.* 20 por la ausencia de rizomas, prominencias de las hojas largas, márgenes de los tépalos con tintes violáceos y anteras de color azul.

***Milla sp. nov.* 22 ined.**

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo 1.0-2.0 cm diámetro, cormos presentes en yemas axilares; hojas 2, subrollizas, lisas, 40.0-60.0 cm largo; escapo hispido, 40.0-62.0(-70.0) cm alto; bráctea floral lanceolada, 1.0-1.2(-1.6) cm largo; flores 2-3 en umbela, apertura nocturna; pedicelos (2.5-)3.5-4.6(-6.5) cm largo, articulación no engrosada, tubo perianto (10.5-)12.5-13.5(-15.0) cm largo, tépalos externos angostamente elípticos 2.6-3.2 cm largo, 5-nervados, blancos, cara externa con banda central verde, violáceo hacia los márgenes, apículo 1.0-1.5 mm largo, tépalos internos angostamente elípticos; filamentos

1.0-2.0 mm largo, anteras 4.0-6.0 mm largo, lineares, verdes, basifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perigonio, ginóforo 10.0-13.0 cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas irregulares numerosas, testa negra opaca, granular.

Tipo: México: OAXACA: Dto. Huajuapán, Mpio. Huajuapán de León, 27-07-2012, R. Ríos y J. Gutiérrez 901. Por distribuir

Distribución. Oaxaca.

Hábitat. Matorral xerófilo.

Discusión. *Milla* sp. nov. 22 es similar anatómicamente a *M. oaxacana* por la presencia de >12 haces vasculares en hojas; y tubo floral ≤ 13.5 cm de largo. Pero difiere por la presencia de pedicelo 3.5-4.6 cm de largo; bráctea 10-12 mm de largo; tubo floral 12.5-13.5 cm largo y flores con apertura diurna y nocturna.

***Milla* sp. nov. 23 ined.**

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo 1.0-1.5 cm diámetro; hojas 8-10, subrollizas, (13.0-)16.0-30.0(-37.0) cm largo, lisas; escapo hispido (6.0-)9.0-15.0(-37.0) cm alto; bráctea floral lanceolada, 0.5-1.0 cm largo; flores 2 en umbela, apertura diurna y nocturna; pedicelos 1.5-3.2(-3.8) cm largo, articulación engrosada, tubo perianto (7.5-)9.0-10.5(-11.2) cm largo, tépalos externos angostamente elípticos, los internos elípticos 2.2-2.8 cm largo, 3-nervados, cara interna blancos, cara externa con banda central verde, violáceo hacia los márgenes, apículo 0.5-0.8 mm largo; filamentos 0.7-1.0 mm largo, anteras 2.5-3.5 mm largo, lanceoladas, amarillas, basifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perigonio, ginóforo 6.5-9.5(-10.5) cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas numerosas, testa negra opaca, granular.

Tipo: México: ZACATECAS: Mpio Valparaíso, 03-09-2012, J. Gutiérrez y E. Bravo 1402.

Distribución. Zacatecas. Por distribuirse.

Hábitat. Matorral xerófilo.

Discusión. *Milla* sp. nov. 23 difiere de *M. bryanii* por la ausencia de prominencias epidérmicas en las hojas y un tubo floral menor de 10 cm de largo.

***Milla* sp. nov. 24 ined.**

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo 1.5-2.0 cm diámetro; hojas 1(-2), subrollizas, (17.0-)21.0-50.0(-54.0) cm largo, prominencias cortas; escapo liso, (-9.0)12.0-34.0(-50.0) cm alto; bráctea floral lanceolada, 0.7-1.2 cm largo; flores 1-3 en umbela, apertura diurna y nocturna; pedicelos (0.5-)1.8-2.5(-4.5) cm largo, articulación no engrosada, tubo perianto 10.0-15.0(-17.0) cm largo, tépalos externos angostamente elípticos, los internos elípticos 2.0-3.2 cm largo, 3-nervados, cara interna blanca, cara externa con banda central verde, violáceo hacia los márgenes, apículo 0.5-1.0 mm largo; filamentos 4.0-5.5 mm largo, anteras 4.5 mm largo, lanceoladas, amarillas, basifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perigonio, ginóforo 8.0-13.0(-15.0) cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas numerosas, testa negro opaca, granular.

Tipo: México: NAYARIT: Mpio. El Nayar, 03-09-2012, *J. Gutiérrez y E. Bravo 1399.*

Distribución. Nayarit.

Hábitat. Bosque de pino.

Discusión. *Milla* sp. nov. 24 difiere anatómicamente de *M. bryanii* por presentar fibras del mesofilo foliar con paredes gruesas, prominencias foliares cortas; articulación del tubo floral inconspicua, pedicelo menor de 4 cm de largo y anteras mayores de 4.5 mm de largo.

***Milla* sp.** nov. 25 ined.

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo 1.0-2.0 cm diámetro; hojas 2-4, subrollizas, (18-)25-40 cm largo, prominencias epidérmicas largas; escapo escabroso, 18.0-40.0(-60.0) cm alto; bráctea floral lanceolada (0.6-)1.2-1.6 cm largo; flores (2-)3-4 en umbela; pedicelos 0.5-4.0 cm largo, articulación no engrosada, apertura diurna y nocturna, tubo floral 8.0-16.0(-18.0) cm largo, tépalos angostamente elípticos, (1.6-)2.3-3.1(-3.5) cm largo, 3-nervados, cara interna blanca, cara externa con banda central verde, tintes azules en los márgenes, apículo 0.5-1.0 mm largo; filamentos 0.7-1.0 mm largo, anteras 3.3-5.0 mm largo, lanceoladas, amarillas, basifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perigonio, ginóforo (5.5-)8.0-14.0 cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas irregulares numerosas, testa negra opaca, granular.

Tipo: México: CHIHUAHUA: Mpio Basaseachi, 30-07-2006, *J. Gutiérrez, E. Solano & R. Ríos 809*. Por distribuir.

Distribución. Chihuahua, Michoacán, Zacatecas.

Hábitat. Bosque de pino.

Discusión. *Milla* sp. nov. 25 se diferencia de *M. bryanii* por presenta articulación no engrosada, filamentos menores de 1.0 mm y tépalos tres nervados.

***Milla* sp.** nov. 26 ined.

Hierbas geófitas perennes. Raíces fibrosas; cormo 1.5-2.0 cm diámetro; hojas 5-7, subrollizas, 18.0-37.0 cm largo, prominencias epidérmicas largas; escapo liso, 15.0-25.0 cm alto; bráctea floral lanceolada, 1.0-1.5 cm largo; flor 1-3 en umbela; pedicelos 0.2-1.0 cm largo, articulación no engrosada, tubo floral 12.5-16.0 cm largo, apertura diurna y nocturna, tépalos angostamente elípticos, 2.1-3.5 cm largo, 3-nervados, blancos, cara externa con

banda central verde, tintes azules en los márgenes, apículo 0.5-1.0 mm largo; filamentos 0.5 mm largo, anteras 4.0-5.0 mm largo, lanceoladas, amarillas, basifijas; ovario elíptico, adnado al tubo del perigonio, ginóforo 11.0-14.0 cm largo; fruto una cápsula elipsoide; semillas irregulares numerosas, testa negra opaca, granular.

Tipo: México: HIDALGO: Mpio Singuilucán, 18-08-2010, *J. Gutiérrez 1165*. Por distribuir.

Distribución. Hidalgo.

Hábitat. Matorral xerófilo.

Discusión. *Milla* sp. nov. 26 es similar a *M. biflora* por la presencia flores con apertura diurna-nocturna, tépalos tres nervados y anteras color amarillo. Pero difiere en presentar 5-7 hojas, escapo liso y pedicelo ≤ 1.0 cm de largo.

DISCUSIÓN

La delimitación de las especies es una actividad primordial de la sistemática y para lograrla el uso de la morfología es fundamental. O'Meara (2010) señala que la sistemática tiene dos objetivos: dividir la diversidad biológica en especies y descubrir sus relaciones filogenéticas. Este estudio tiene estas dos características para los géneros del complejo *Milla* y particularmente en el género *Milla*.

Los resultados obtenidos en el estudio de la anatomía foliar resultaron poco informativos para diferenciar entre los géneros del complejo *Milla*. Sin embargo, resultaron ser útiles para reconocer las especies y particularmente las del género *Milla*. La presencia de prominencias en las células epidérmicas de la hoja es un carácter común en *Milla*. El tamaño de este atributo permitió separar las especies y diferenciar las poblaciones de *M. biflora* en tres grupos: prominencias pequeñas, grandes y muy grandes. La hoja vista de perfil, ayudó a diferenciar seis formas y generó más información taxonómica útil, que utilizar los términos teretes o subteretes como lo señaló Moore (1953). El número haces vasculares y la cantidad de fibras que los rodean también ofrecen información valiosa. Estos caracteres fueron utilizados en el análisis morfométrico y filogenético, apoyando la delimitación de las especies. La utilidad de los caracteres anatómicos de la hoja en el nivel de especie se confirma en este estudio como ocurre en otras monocotiledóneas (Tanker y Kurucu 1981; Echevarría et al. 1988; Tanker y Brullo et al. 1989; Membries et al. 2003; Lynch et al. 2006; Ceja-Romero et al. 2009).

Con frecuencia el uso de los caracteres morfológicos para hacer reconstrucciones filogenéticas son considerados insuficientes, subjetivos y poco informativos (Scotland et al. 2003). Sin embargo, Bayer et al. (1999), Endress y Stevens (2001) y Nyffeler y Egli

(2010) han demostrado que las evidencias morfológicas bien analizadas permiten resolver una filogenia como ocurre en este estudio.

El estudio morfológico permitió establecer que *Milla* está conformado por casi tres veces más especies que las propuestas con anterioridad. El rizoma, la longitud del ginóforo y el tubo floral, la forma de los tépalos, el número de nervios y el color de la antera, son algunos caracteres que permiten delimitar las especies. La morfometría se ha utilizado para distinguir especies en complejos de la subfamilia Brodiaeoideae (Preston 2013). En este estudio cinco especies y siete morfós pudieron distinguirse por caracteres morfométricos. Sin embargo, el mayor número de morfó y la mitad de las especies muestran una sobreposición morfométrica en los caracteres evaluados. No obstante, la incorporación de caracteres cualitativos en el análisis de agrupamiento fueron relevantes para diferenciar las especies de *Milla* y reconocer 26 especies nuevas.

Por otro lado, el análisis filogenético con datos morfológicos y moleculares resuelve que *Milla* es parafilético por la exclusión de *M. mortoniana*, especie que se incluye en el clado *Dandya* con distribución en la Cuenca del Río Balsas. Este análisis también confirma que *M. biflora s.l.* oculta bajo su nombre diferentes especies como lo sugirieron Gándara *et al.* (2014). Lenz (1971), mediante estudios cromosómicos sentó las bases sobre la diversificación del complejo *M. biflora sensu* Moore (1953), al mostrar los números cromosómicos para algunas poblaciones. Esta información fue utilizada por Howard (1999) quien escribió tres especies nuevas a partir de poblaciones de *M. biflora*.

Hasta antes de este estudio, *Milla* era poco conocido desde el punto de vista taxonómico y aún es necesario conocer diversos aspectos sobre las relaciones interespecíficas. Asimismo, la posición filogenética de *Bessera tenuiflora*, *Jaimehintonia gypsophila*, *Dandya purpusii* y las especies de *Petronymphe*, no es estable en los árboles

obtenidos con ITS y cpADN. Sin embargo, la incorporación de los datos morfológicos permitió recuperar clados con mayor soporte y resolver la posición filogenética de los géneros. Es importante mencionar que *Bessera*, *Milla s.s.* y *Petronymphe*, son monofiléticos apoyados por caracteres morfológicos y moleculares. *Bessera tenuiflora* se reconoce como parte *Bessera* y no un género monotípico como lo sugiere Gándara *et al.* (2009, 2014). *Dandya* es parafilético por la inclusión de *M. mertoniana*. Además, el débil apoyo de *Dandya purpusii* como hermana de *Bessera* permite suponer que es un taxón que evolucionó de manera independiente a las especies del sur de México. Este estudio permitió redescubrir a *Petronymphe*, un género poco estudiado deja de ser monotípico.

Jaimehintonia comparte con *Milla* la forma de la flor y la disposición erecta de ésta. Los resultados obtenidos demuestran que es un taxón monotípico que evolucionó de manera paralela en ambientes áridos con suelos yesosos en el norte de México. *Milla s.s.* es el más derivado del complejo. Las relaciones filogenéticas entre sus especies no están del todo resueltas. La filogenia reveló tres clados: *biflora* y *bryanii* con distribución principalmente en el centro y norte de México. El clado *oaxacana* está conformado por especies y morfos con distribución principalmente en el sur de México. Las especies con distribución en el norte de México, principalmente presentan flores con apertura diurna y nocturna, anteras de color amarillo y tres nervios en los tépalos, en contraste, las especies del sur tienen en su mayoría flores que abren exclusivamente por la noche, presentan anteras de color verde o azul y tépalos con más de cinco nervios.

Una suposición de la sistemática molecular es que los árboles filogenéticos contruidos con datos de los genomas de plástidos (cpDNA) o mitocondrial (mDNA) no representan necesariamente la filogenia de las especies (Pires y Sytsma 2002; Kazemi *et al.* 2009). Menos cuando las topologías derivadas por separados resultan diferentes como

ocurre en este estudio. Wiens y Penkrot (2002) indican que los resultados morfológicos y moleculares con frecuencia producen resultados contradictorios y Maddison (1997) sugiere que estos resultados son causados por la hibridación, retención de polimorfismo ancestral o transferencia horizontal de genes. En los géneros del complejo *Milla* parece estar presente una baja sustitución y un origen reciente que podrían apoyar la baja señal filogenética de los marcadores utilizados y la incongruencia entre las topologías obtenidas por separado. Sin embargo, para probar esta suposición es necesario abordar otras técnicas como el uso AFLP, RAPDS y microsatélites que ayuden a resolver las relaciones de parentesco intra e interespecíficos de las especies de *Milla* y apoyar una posible hipótesis sobre probables híbridos naturales. Asimismo, un estudio cariológico de las especies, incluidas las aquí propuestas, sería de utilidad y puede ofrecer información taxonómica valiosa como lo demostró Howard (1999) y lo sugiere Tapia-Pastrana *et al.* (2014).

CONCLUSIONES

Los caracteres morfológicos son de valor taxonómico y son útiles para separar especies en el análisis de agrupamiento y permiten reconocer grupos naturales en el análisis filogenético, en el nivel genérico y específico.

Los caracteres morfológicos cualitativos, en su mayoría reproductivos, apoyan la separación y reconocimiento de las especies de *Milla* y, particularmente, las segregadas de *M. biflora*. Además, fueron la base para elaborar la clave de determinación.

La delimitación taxonómica de los géneros fue posible al recuperar grupos naturales mediante la combinación de evidencia morfológica y molecular. En cuanto a *Milla biflora* s.s. se delimitó geográficamente al sur del Altiplano Mexicano y centro-oriente de la Faja Volcánica Transmexicana, apoyada por una combinación única de caracteres.

LITERATURA CITADA

- Brullo, S., P. Pavone y G. Spampinato. 1989. *Allium pentadactyli* (Liliaceae), a new species from S. Italy. *Willdenowia* **19**:115-120.
- Ceja-Romero, J., A. Espejo-Serna y A. R. López-Ferrari. 2009. Una nueva especie de *Sisyrinchium* (Iridaceae) del estado de Guanajuato, México. *Acta Botanica Mexicana* **87**:83-90.
- Echevarría, C., A. Morilla y M. Serrano. 1988. Cuatro nuevas especies con anatomía foliar tipo Kranz: *Salsola vermiculata* L. *Cyperus capitatus* Vandélli, *Sporobolus pungens* (Schreber) Kunth, *Spartina densiflora* Broung. *Lagascalia* **15**:527-533.
- Endress, M. E. y W. D. Stevens. 2001. The renaissance of the Apocynaceae s.l.: recent advances in systematics, phylogeny, and evolution: introduction. *Annals of Missouri Botanical Garden* **88**:517-522.
- Gándara E., C.D. Specht y V. Sosa. 2014. Origin and diversification of the *Milla* clade (Brodiaeoideae, Asparagaceae): A Neotropical group of six geophytic genera. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **75**:118-125.
- Gándara, E., V. Sosa y J. L. León de la Luz. 2009. Morphological and molecular evidence in the delimitation of *Bheria* and *Bessera*, two genera of the *Milla* complex (Themidaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **85**:113-124.
- Howard, T. M. 1999. Three new *Milla* species from Mexico. *Herbertia* **54**:232-237.
- Kazemi, M., S. K. Osaloo, A. A. Maassoumi y E. R. Pouyani. 2009. Molecular phylogeny of selected Old World *Astragalus* (Fabaceae): incongruence among chloroplast *trnL-F*, *ndhF* and nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *Nordic Journal of Botany* **27**:425-436.

- Lenz, L. W. 1971. Chromosome number in the genus *Milla* Cav. (Liliaceae). *Aliso* **3**:321-322.
- Lynch, A. H., P. Rudall y D. F. Cutler. 2006. Leaf anatomy and systematics of Hyacinthaceae. *Kew Bulletin* **61**:145-159.
- Maddison, W. P. 1997. Gene trees in species trees. *Systematic Biology* **46**:523-536.
- Membrives, N., J. Pedrola-Monfort y J. Cuajapé-Castells. 2003. Leaf morphology and anatomy of genus *Androcymbium* (Colchicaceae) in Southwest Africa. *Collectanea Botanica a Barcinonensi Botanico Instituto Edita* **26**:83-99.
- Moore, H. E. 1953. The genus *Milla* (Amaryllidaceae-Allieae) and its allies. *Gentes Herbarum* **8**:262-262.
- Nyffeler, R. y U. Eggli. 2010. Disintegrating Portulacaceae: A new familial classification of the suborder Portulacineae (Caryophyllales) based on molecular and morphological data. *Taxon* **59**:227-240.
- O'Meara, B. C. 2010. New heuristic methods for joint species delimitation and species tree inference. *Systematic Biology* **59**:59-73.
- Pires, J. C. y K. J. Sytsma. 2002. A phylogenetic evaluation of a biosystematics framework: *Brodiaea* and related petaloid monocots (Themidaceae). *American Journal of Botany* **89**:1342-1359.
- Preston, R. E. 2013. A revision of *Brodiaea coronaria* (Asparagaceae: Brodiaeoideae): Morphometric analysis and recognition of new and emended taxa. *Systematic Botany* **38**:1012-1028.
- Scotland, R.W., R. G. Olmstead y J. R. Bennett. 2003. Phylogeny reconstruction: the role of morphology. *Systematic Biology* **52**:539-548.

- Tanker, N. y S. Kurucu. 1981. Leaf anatomy in relation to taxonomy in species of *Allium* found in Turkey. *Quarterly Journal of Crude Drug Research* **19**:173-179.
- Tapia-Pastrana F. 2014. Los rompimientos cromosómicos y translocaciones modelan el cariotipo trimodal de una población hexaploide de *Milla biflora* (Asparagaceae) de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, Distrito Federal, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **85**:598-605.
- Wiens J. J. y T. A. Penkrot. 2002. Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). *Systematic Biology* **51**:69-91.