



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

Biología Experimental

**“Patrones morfológicos, químicos y de microsatélites (nSSR) del  
complejo *Zephyranthes fosteri* × *Zephyranthes alba*  
(Amaryllidaceae) en el Centro de México”**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**M. en C. LUCÍA YOSCELINA CENTENO BETANZOS**

**TUTOR PRINCIPAL:**

DR. EFRAÍN TOVAR SÁNCHEZ. INSTITUTO DE ECOLOGÍA

**COMITÉ TUTOR:**

DR. RICARDO REYES CHILPA. INSTITUTO DE QUÍMICA

DR. ZENÓN CANO SANTANA. FACULTAD DE CIENCIAS

**CIUDAD UNIVERSITARIA CD. MX. NOVIEMBRE, 2023**



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.

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ENTIDAD INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
OFICIO: CGEP/CPCB/IE/0818/2023  
ASUNTO: Oficio de Jurado

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

Me permito informar a usted, que el Comité Académico, del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su reunión ordinaria del día 13 de marzo de 2023 aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **CENTENO BETANZOS LUCÍA YOSCELINA** con número de cuenta **97199678**, con la tesis titulada: **“Patrones morfológicos, químicos y de microsátélites (SSR) del complejo *Zephyranthes fosteri* × *Zephyranthes alba* (Amaryllidaceae) en el Centro de México”**. Bajo la dirección del **DR. EFRAÍN TOVAR SÁNCHEZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. JUAN SERVANDO NÚÑEZ FARFAN  
Vocal: DRA. SILVIA LAURA GUZMÁN GUTIÉRREZ  
Secretario: DR. RICARDO REYES CHILPA  
Vocal: DRA. NATALIA IVALÚ CACHO GONZÁLEZ  
Vocal: DR. MARCO AURELIO RODRÍGUEZ MONROY

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

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 17 de octubre de 2023

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



c. c. p. Expediente del alumno

AGNS/ERR/EARR/err

**COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria  
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pbiol.posgrado.unam.mx/>

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

*Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por poner a disposición todos los medios académicos y profesionales, para realizar y concluir mis estudios de posgrado a pesar de la pandemia.*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca número 261899 (CVU 420174) otorgada para la realización de mis estudios.*

*A Becas Mixtas CONACYT 2018-2019, movilidad en el extranjero por el apoyo complementario para mi estancia de investigación en el extranjero.*

*Al Comité Académico del Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas por el apoyo PAEP 2018 para estancias de investigación y permitir concluir mis estudios.*

*Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, PAPIIT-DGAPA-UNAM, PROYECTO IG 200418 y IG 200321 por la beca otorgada durante la escritura de esta tesis.*

*A los miembros del comité tutor: por sus valiosas aportaciones, revisiones y correcciones cada semestre durante la realización de este trabajo.*

Dr. Ricardo Reyes Chilpa.

Dr. Zenón Cano Santana.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

Mi agradecimiento más profundo a mi *alma mater*, la Universidad Nacional Autónoma de México, por proporcionar y poner al alcance todo tipo de recursos y servicios académicos, para realizar y llevar a buen término mi formación integral, académica y profesional.

Al Instituto de Química, al Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC) de la Universidad de Morelos, el Instituto de Ecología e Instituto de Biología por proporcionar los recursos humanos, equipo, material e instalaciones para realizar este estudio.

A mi asesor, el Dr. Efraín Tovar Sánchez, por abrir las puertas de su laboratorio para la realización este trabajo, su asesoría, disposición y paciencia para la culminación del mismo.

Al Dr. Ricardo Reyes Chilpa, mi coasesor a quién agradezco profundamente, su atención, asesoría, dirección, confianza, disposición, crítica y paciencia indispensables para la concepción y término de este trabajo, así como para mi formación profesional y personal. Infinito agradecimiento por la amistad, tiempo, recursos y becas recibidas para culminar este proyecto.

Al Dr. Alfredo López Camal por sus constantes y valiosas asesorías y correcciones durante la realización de este trabajo. Por su excelente disposición para transmitir sus conocimientos, pero sobre todo por su apoyo y amistad incondicional.

A la Dra. Silvia Laura Guzmán Gutiérrez, por su asesoría en la parte química de este proyecto. Así mismo por el apoyo, amistad y excelente compañerismo en el laboratorio.

Al Dr. Edison Javier Osorio Durango por su buena disposición y todas las atenciones recibidas durante la estancia en el Centro de investigación de la Facultad de Química Farmacéutica. Investigación en Sustancias Bioactivas. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. A todo su equipo de trabajo, especialmente de la Dra. Natalie Cortés Rendon por su apoyo académico.

A la Dra. Gabriela Feresín por su aceptación y asesoría, en la estancia de Investigación en el Departamento de Productos Naturales, Biología vegetal y Edafología de la Facultad de Farmacia. Universidad de San Juan, Argentina. A sí mismo, agradezco sinceramente su calidez, amistad y el gran ejemplo profesional del Dr. José Zaragoza Puchol y el Dr. Javier Zarza.

A los técnicos académicos del Instituto de Química: M.C Mayra León Santiago, M.C Everardo Tapia Mendoza, por su apoyo en los protocolos analíticos de CG-EM. Al M.A David Vázquez Cuevas, M.A Gladis Edith Cortés Romero, Ing. Yan Alejandro García Hernández por su apoyo técnico para arreglar y apoyar en el funcionamiento de distintos equipos de cómputo.

A los miembros del Comité Sinodal por sus importantes correcciones y sugerencias para mejorar este trabajo. Dr. Juan Servando Núñez Farfán; Dra. Silvia Laura Guzmán Gutiérrez; Dr. Ricardo Reyes Chilpa; Dra. Natalia Ivalú Cacho González; Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy.

## **RECONOCIMIENTOS**

A mi padre José Luis Centeno por su amor, consejo, compañía, motivación, apoyo, atención, confort, empatía y comprensión, gracias por estar siempre para mí. A mi madre por su ánimo y presencia. A mi hermana por su consejo, contención, compañía, apoyo y cariño constantes sobre todo en los momentos más difíciles y afortunados durante este recorrido, mil gracias de todo corazón. A mis hermosas sobrinas por la motivación, amor y alegría brindadas siempre.

A todos los compañer@s del laboratorio del Instituto de Química y el CIByC por todo su apoyo y amistad.

A todos mis amigos, colegas y familia que de alguna u otra forma fueron apoyo, sostén o motivación para culminar este trabajo, mil gracias a cada uno de ellos.

*Dedicatoria*

*A mi padre José Luis Centeno Uvalle, mi pilar, quién por su amor, ejemplo y recuerdo continúo caminando firmemente siempre hacia adelante a pesar de las dificultades como él me enseñó.*

*Te amo, te honro y te llevo conmigo siempre.*

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	8
<b>Abstract</b> .....	11
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	14
<b>OBJETIVOS GENERALES</b> .....	17
<b>HIPÓTESIS</b> .....	18
<b>Capítulo 1: Revisión de la distribución geográfica e historia biológica de <i>Zephyranthes concolor</i>, <i>Z. fosteri</i> y <i>Z. alba</i> (Amaryllidaceae) registrada en ejemplares herborizados de México.</b>	
Resumen.....	19
Introducción.....	20
Objetivo general y particular .....	24
Materiales y métodos.....	24
Resultados.....	27
Discusión.....	41
Conclusiones.....	43
Literatura citada.....	44
<b>Capítulo 2: Caracterización morfológica, alcaloidea y microsatélites de <i>Zephyranthes fosteri</i> y <i>Z. alba</i> (Amaryllidaceae): poblaciones alopátricas.</b>	
Resumen.....	50
Introducción.....	50
Materiales y métodos.....	54
Resultados.....	55
Discusión.....	56
Conclusiones.....	60
Literatura citada.....	60
<b>Capítulo 3: Caracterización morfológica, alcaloidea y microsatélites (nSSR) de <i>Zephyranthes fosteri</i> y <i>Z. alba</i> (Amaryllidaceae): poblaciones simpátricas.</b>	
Resumen.....	62
Introducción.....	63
Objetivo general y particular .....	66
Materiales y métodos.....	67
Resultados.....	76
Discusión.....	88
Conclusiones.....	90
Literatura citada.....	91
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	97
<b>ANEXOS</b> .....	98



## RESUMEN

*Zephyranthes* (Amaryllidaceae) es un género de amplia distribución en México que además tiene importancia farmacológica debido al potencial biológico de sus alcaloides. Algunas de sus especies pueden ser taxonómicamente complejas debido a la frecuente superposición de poblaciones interespecíficas y la variación morfológica que pueden presentar. *Zephyranthes fosteri* y *Z. alba* (antes *Z. concolor*) son plantas herbáceas que cuando se distribuyen en simpatría, pueden encontrarse conviviendo con individuos de patrones complejos por variación morfológica, lo que puede provocar confusión taxonómica. Por lo tanto, es útil caracterizar estas especies en poblaciones alopátricas y simpátricas para contribuir a su identificación. En este trabajo se estudió desde un punto de vista multimarcador (morfométrico, químico y molecular) a las especies *Zephyranthes fosteri*, *Z. alba* e individuos con morfometría atípica (IMA) denominados en este trabajo como complejo *Zephyranthes fosteri* × *Zephyranthes alba* (Amaryllidaceae); localizadas en zonas de distribución alopátrida y simpátrida, con el fin de contribuir a su caracterización e identificación desde distintos marcadores. El estudio se divide en tres capítulos. En el primero, se proporciona información sobre la biología de *Zephyranthes fosteri*, *Z. alba* y *Z. concolor* en México. Se describen características morfológicas y biológicas que determinan a las especies. También se compiló la información encontrada en ejemplares de herbario consultados (MEXU, UAM, IPN, COLPOS, etc.) acerca de sus usos, nombres populares y su distribución geográfica en la República Mexicana, la cual fue representada en mapas. En el segundo capítulo se muestra el artículo científico publicado derivado de la caracterización morfológica, química y molecular de poblaciones de *Zephyranthes fosteri* y *Z. alba* en zonas alopátridas. En esta publicación se reporta que las poblaciones analizadas de *Z. fosteri* presentan mayor variación morfométrica, que las poblaciones de *Z. alba* lo cual es más perceptible morfológicamente en los verticilos florales. Así mismo, se obtuvo el perfil alcaloideo de ambas especies en dichas zonas alopátridas por medio de

cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (CG-EM). Con esta técnica se determinó que los alcaloides mayoritarios eran distintos en cada taxón y además podrían fungir como marcadores fitoquímicos para las poblaciones estudiadas. Los alcaloides mayoritarios fueron la galantamina y sanguinina para *Z. alba* y la licorina en *Z. fosteri*, en ambos casos alcaloides de importancia farmacológica. Finalmente, el análisis molecular con microsátélites (nSSR) permitió diferenciar su perfil genético y confirmar que *Z. fosteri* presenta mayor plasticidad que *Z. alba* lo que concordó con el análisis morfológico resultante del análisis cuantitativo. Por último, en el tercer capítulo se describe la morfometría, el perfil de alcaloides y un ensayo molecular preliminar analizados por individuo en una zona en simpatría entre *Zephyranthes fosteri*, *Zephyranthes alba* y el probable complejo híbrido *Zephyranthes alba* × *Z. fosteri* denominados como individuos con morfometría atípica (IMA), con el fin de documentar su caracterización. Los resultados estadísticos de la morfología por medio de los análisis de función discriminante separaron a los individuos analizados en tres grupos morfológicos bien definidos; *Z. alba*, *Z. fosteri* y un tercer grupo que aglutinó a los IMA, sugiriendo posibles eventos de hibridación en la zona. En cuanto al perfil de alcaloides de los individuos de *Z. alba* y *Z. fosteri* en condiciones de simpatría, este fue muy parecido al obtenido en zonas alopátricas (capítulo 2), siendo la galantamina el compuesto mayoritario para *Z. alba* y la licorina para *Z. fosteri*. En los IMA, es decir, los probables híbridos (*Z. fosteri* × *Z. alba*) su perfil alcaloideo al igual que su estructura morfológica, fue más diversa que la mostrada por los supuestos parentales. En los IMA 4 individuos de los 6 analizado, la tazetina fue el compuesto mayoritario. En los otros dos fue la licorina y un alcaloide desconocido con  $m/z$  55(200) los que además fueron novedosos para el complejo. Posteriormente, en el ensayo molecular preliminar, aunque hubo una separación de los individuos de *Z. alba* y *Z. fosteri* con un perfil genético bien definido al igual que se mostró en zonas alopátricas, en este análisis los IMA fueron aglutinados con los individuos de *Z. alba* y no con *Z. fosteri* como ocurrió en los análisis

morfológicos y químicos. Los análisis morfológicos, químicos y moleculares de *Z. fosteri*, *Z. alba* en poblaciones alópatridas e individuos de poblaciones simpátridas en el Centro de México permitieron concluir que presentaron diferencias bien marcadas entre ellos. Por su parte, aunque los IMA presentaron mayor plasticidad en su composición morfológica y química, tuvieron una mayor similitud con *Z. fosteri*. Por lo tanto, se sugiere ampliar este estudio a otras zonas mixtas, así como incrementar el número de individuos analizados para confirmar la probable hibridación de estas especies en sitios simpátridos.

## Abstract

*Zephyranthes* (Amaryllidaceae) is a genus widely distributed in Mexico that also has pharmacological importance due to the biological potential of its alkaloids. Some of its species can be taxonomically complex due to the frequent overlap of interspecific populations and the morphological variation they can present. *Zephyranthes fosteri* and *Z. alba* (formerly *Z. concolor*) are herbaceous plants that, when distributed in sympatry, can be found coexisting with individuals with complex patterns due to morphological variation, which can cause taxonomic confusion. Therefore, it is useful to characterize these species in allopatric and sympatric populations to contribute to their identification. In this work, the species *Zephyranthes fosteri*, *Z. alba* and individuals with atypical morphometry (IMA) called in this work as the *Zephyranthes fosteri* × *Zephyranthes alba* complex (Amaryllidaceae) were studied from a multimarker point of view (morphometric, chemical and molecular); located in areas of allopatric and sympatric distribution, in order to contribute to their characterization and identification from different markers. The study is divided into three chapters. The first provides information on the biology of *Zephyranthes fosteri*, *Z. alba* and *Z. concolor* in Mexico. Morphological and biological characteristics that determine the species are described. The information found in consulted herbarium specimens (MEXU, UAM, IPN, COLPOS, etc.) was also compiled about its uses, popular names and its geographical distribution in the Mexican Republic, which was represented on maps. The second chapter shows the published scientific article derived from the morphological, chemical and molecular characterization of populations of *Zephyranthes fosteri* and *Z. alba* in allopatrid areas. In this publication it is reported that the analyzed populations of *Z. fosteri* present greater morphometric variation than the populations of *Z. alba*, which is more perceptible morphologically in the floral whorls. Likewise, the alkaloid profile of both species in these allopatric areas was obtained by means of gas chromatography coupled to mass spectroscopy (GC-MS). With this technique, it was determined that

the major alkaloids were different in each taxon and could also serve as phytochemical markers for the populations studied. The major alkaloids were galantamine and sanguinine for *Z. alba* and lycorine in *Z. fosteri*, in both cases alkaloids of pharmacological importance. Finally, molecular analysis with microsatellites (nSSR) allowed us to differentiate its genetic profile and confirm that *Z. fosteri* presents greater plasticity than *Z. alba*, which agreed with the morphological analysis resulting from the quantitative analysis. Finally, the third chapter describes the morphometry, the alkaloid profile and a preliminary molecular test analyzed per individual in an area in sympatry between *Zephyranthes fosteri*, *Zephyranthes alba* and the probable hybrid complex *Zephyranthes alba* × *Z. fosteri* named as individuals with atypical morphometry (IMA), in order to document its characterization. The statistical results of morphology through discriminant function analyzes separated the analyzed individuals into three well-defined morphological groups; *Z. alba*, *Z. fosteri* and a third group that brought together the IMA, suggesting possible hybridization events in the area. Regarding the alkaloid profile of *Z. alba* and *Z. fosteri* individuals under conditions of sympatry, this was very similar to that obtained in allopatric areas (chapter 2), with galantamine being the majority compound for *Z. alba* and lycorine for *Z. fosteri*. In the IMA, that is, the probable hybrids (*Z. fosteri* × *Z. alba*), their alkaloid profile, as well as their morphological structure, was more diverse than that shown by the supposed parents. In the IMA, 4 of the 6 individuals analyzed, tazetine was the majority compound. In the other two it was lycorine and an unknown alkaloid with m/z 55(200) that were also novel for the complex. Subsequently, in the preliminary molecular test, although there was a separation of the individuals of *Z. alba* and *Z. fosteri* with a well-defined genetic profile, as was shown in allopatric areas, in this analysis the IMA were grouped with the individuals of *Z. alba* and not with *Z. fosteri* as occurred in the morphological and chemical analyses. The morphological, chemical and molecular analyzes of *Z. fosteri*, *Z. alba* in allopatrid populations and individuals from sympatric populations in Central

Mexico allowed us to conclude that they presented well-marked differences between them. For their part, although the IMA presented greater plasticity in their morphological and chemical composition, they had greater similarity to *Z. fosteri*. Therefore, it is suggested to extend this study to other mixed areas, as well as increase the number of individuals analyzed to confirm the probable hybridization of these species in sympatric sites.

## INTRODUCCIÓN GENERAL:

---

*Zephyranthes fosteri* (Traub) y *Z. alba* (Lindl.) (Amaryllidaceae) son plantas herbáceas y bulbosas con flores vistosas que crecen en distintos puntos de la República Mexicana, especialmente hacia el centro del país. Suelen presentar sitios de distribución convergente. Uno de ellos se encuentra naturalmente en el Pedregal de San Ángel de la Ciudad de México, específicamente en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA) ubicada y resguardada en Ciudad Universitaria de la UNAM. En un análisis sobre la fenología de *Z. alba* (antes *Z. concolor* y *H. concolor*), se sugirió la existencia de un probable híbrido denominado *Habranthus aff. concolor*, producto del probable flujo genético entre *Z. alba* y *Z. fosteri* en zonas de simpatria dentro de la REPSA (Damián-Domínguez et al., 2009; Damián-Domínguez, 2010). Posteriormente, se obtuvieron evidencias anatómicas y químicas derivadas del análisis comparativo de *Z. alba* (antes *H. concolor*), *Z. fosteri* y *H. aff. concolor* (probable híbrido) que podrían apoyar dicha hipótesis (Centeno-Betanzos, 2014). En dicho estudio se compararon cortes histológicos de la hoja, donde se reportó que la epidermis de *H. aff. concolor* presentó una ornamentación tipo lisa y de un grosor intermedio en la cutícula parecidos a *Z. alba* (lisa y gruesa) a diferencia de *Z. fosteri* (acostillada y delgada). Un tamaño y forma del parénquima esponjoso más similar al de *Z. alba* que a *Z. fosteri*, además de otras características anatómicas cualitativas y cuantitativas que presentaron diferencias estadísticamente significativas, en comparación con las posibles especies parentales putativas. Por su parte, los análisis químicos también denotaron diferencias en la composición de alcaloides. *Z. alba* se caracterizó por la alta concentración de galantamina y clidantina, mientras que *Z. fosteri* por un derivado del mesembranol y licorina (Centeno-Betanzos, 2014; Centeno-Betanzos et al. 2021). En el posible híbrido (*H. aff. concolor*) hubo una mayor variabilidad de alcaloides que en los supuestos parentales, pero con mayor similitud a los descritos para *Z. fosteri*. Estas

características intermedias descritas para *H. aff. concolor* en la descripción anatómica, así como las características aditivas en el perfil de alcaloides representaron elementos fenotípicos para apoyar la hipótesis de la existencia de una probable hibridación entre *Z. fosteri* y *Z. alba* (Centeno-Betanzos, 2014; Cheng et al. 2011). Por otro lado, en un reciente trabajo taxonómico, a los individuos antes identificados como *Habranthus concolor* y/o *Z. concolor* que habitan en el Pedregal de San Ángel al Sur de la CdMx (incluyendo la REPSA), se les denominó botánicamente como *Z. alba*, una nueva especie endémica debido a que presenta características taxonómicas distintas a las de *Z. concolor*, entre las que destaca su citología y el color al interior de la corola, entre otras (Flagg et al. 2019). Esto denota por un lado la variación y plasticidad que las especies de *Zephyranthes* pueden presentar y por otro la importancia de realizar un análisis con marcadores genéticos, morfológicos, y químicos que proporcionen un análisis más robusto sobre la caracterización de las especies *Z. fosteri* y *Z. alba* en otras zonas alópatridas del centro del país que es dónde se distribuyen más abundantemente y también estudiar los posibles eventos de hibridación en otras zonas de simpatría.

Así mismo, resulta de gran interés y utilidad para el estudio y caracterización de las especies, evaluar si en los sitios de simpatría ocurre el fenómeno de hibridación y si la dirección y la frecuencia de este fenómeno varía espacialmente en diferentes sitios de simpatría entre *Z. fosteri* y *Z. alba*. Lo anterior, permitiría precisar la identificación de los individuos híbridos, estudiar los mecanismos de hibridación y evaluar las consecuencias morfológicas y químicas (alcaloides) del complejo *Z. alba* × *Z. fosteri* en diferentes sitios del centro de la República. Además, es importante explorar los patrones de hibridación y estructura genética de estas dos especies, debido a que este fenómeno ha sido menos explorado en especies herbáceas y más en especies mexicanas arbóreas. Por lo tanto, con este trabajo se pretende contribuir a su



caracterización, identificación botánica y posible aprovechamiento de los metabolitos secundarios, que pudiera tener dicho intercambio genético por su potencial farmacológico.

En este contexto es importante mencionar que el fenómeno de hibridación es considerado una fuerza evolutiva importante en plantas vasculares (Arnold, 2006). Se calcula que alrededor del 50-70% de las plantas han presentado eventos de hibridación. Asimismo, este fenómeno se encuentra ampliamente distribuido en plantas vasculares, presentándose en el 40.4% de las familias y en el 16.2% de los géneros (Whitney et al., 2010). Sin embargo, la hibridación no es un fenómeno que ocurra fácilmente puesto que existen barreras reproductivas que previenen la formación de individuos híbridos, las cuales pueden ser precigóticas (P. ej. aislamiento ecológico, incompatibilidad) y poscigóticas (P. ej. inviabilidad del híbrido) (Futuyma, 2004). No obstante, en la naturaleza de las plantas un gran número de casos estas barreras son superadas, formándose un híbrido de primera generación (F1). Si el híbrido F1 es fértil o parcialmente fértil, puede llevar a cabo retrocruzas repetidas con los individuos de las especies parentales, conduciendo al fenómeno de introgresión. Rieseberg y Ellstrand (1993) señalan que los híbridos frecuentemente pueden presentar un mosaico de caracteres morfológicos parentales e intermedios, y que por el contrario una gran proporción de los híbridos de las primeras y últimas generaciones exhiben caracteres extremos o novedosos. Por lo tanto, la hibridación es considerada una fuerza evolutiva importante debido a que puede dar origen a nuevas especies e incrementar la diversidad genética intraespecífica (Rieseberg y Ellstrand, 1993; Whitham et al., 1999).

Para facilitar el análisis de resultados derivados de este trabajo se decidió abordarlos en tres capítulos. En el primero se proporciona aspectos de la historia natural, taxonómica e información encontrada en herbarios y literatura acerca de su distribución geográfica (mapas) de *Z. concolor*, *Z. fosteri* y *Z. alba* en México. En el

segundo capítulo se buscó caracterizar la expresión morfológica (floral, foliar y bulbo), analizar la estructura genética de especies parentales (*Z. alba*, *Z. fosteri*) y química de los genotipos en sitios alopátridos, así como los alcaloides especie específicos de las especies parentales. En el capítulo tres se caracterizó la expresión morfológica (floral, foliar y bulbo), química de los genotipos (híbridos y retrocruzas) del complejo *Z. alba* × *Z. fosteri* en sitios simpátridos por individuo y se determinó con bases genéticas los posibles eventos de hibridación e introgresión entre éstos.

## OBJETIVOS

---

Los objetivos de esta tesis son los siguientes:

Caracterizar con marcadores morfológicos (foliares, florales y bulbo), químicos (alcaloides) y moleculares (nSSR), la hibridación natural del complejo *Zephyranthes alba* × *Z. fosteri* en el centro de México para obtener patrones sobre los niveles de introgresión en relación con la distribución geográfica de las zonas híbridas.

## PARTICULARES:

- Caracterizar la expresión morfológica (floral, foliar y bulbo) de *Z. alba* y *Z. fosteri* en diferentes zonas alopátridas y simpátridas encontradas en distintos puntos del Centro de México (Morelos, Hidalgo, Estado de México y Cd Mex).
- Obtener los metabolitos secundarios (alcaloides) de los individuos híbridos derivados de *Z. alba* y *Z. fosteri* en diferentes zonas alopátridas y simpátridas .
- Analizar mediante nSSR la estructura genética del complejo *Z. alba* × *Z. fosteri* en diferentes zonas alopátridas y simpátridas .
- Caracterizar el fenotipo (intermedio, de tipo parental, transgresivo) de los individuos asociados a zonas híbridas del complejo *Z. alba* × *Z. fosteri*.

- Determinar los niveles de hibridación y la dirección de la introgresión de *Z. alba* y *Z. fosteri* en zonas simpátricas.

## **HIPÓTESIS**

---

Si en las zonas simpátricas entre *Z. alba* × *Z. fosteri* se detecta el fenómeno de hibridación, se espera que estas poblaciones presenten diferencias cualitativas o cuantitativas en algunos de los caracteres morfológicos (floral, foliar y bulbo), químicos (alcaloides) y genéticos en comparación con sus especies parentales.

### **Contexto general sobre aspectos de historia natural y distribución geográfica de *Zephyranthes concolor*, *Z. fosteri* y *Z. alba* (Amaryllidaceae) con base en la literatura y ejemplares de herbario de la Ciudad de México.**

#### **Resumen:**

Las especies *Z. fosteri*, *Z. alba* y *Z. concolor* tienen un uso principalmente ornamental y un poco menos ceremonial por lo vistoso de sus flores. Contienen alcaloides tipo Amaryllidaceae considerados de importancia taxonómica para la familia, los cuales además tienen potencial farmacológico (Centeno-Betanzos et al. 2021). *Z. alba* antes circunscrita como *Z. concolor* ó *Habrantus concolor*, es una especie endémica de la Ciudad de México descrita recientemente, de la que existen pocas referencias en la literatura (Flagg et al. 2019). Por su parte *Zephyranthes concolor* se distribuye fuera de la Ciudad de México por lo tanto los registros e información de *Z. concolor* que aparecen de ésta en la Ciudad de México pertenecen en realidad a *Z. alba*. En este escrito se incluye información taxonómica de ambas especies para enmarcar las diferencias. También se analiza la información registrada en la literatura y la hallada en ejemplares herborizados de los principales herbarios de la Ciudad de México con el fin de compilar la información, determinar áreas tentativas de distribución, calcular su distribución potencial, así como describir los principales usos populares, nombres comunes y reunir algunas características botánicas. La información obtenida sobre sus usos, distribución geográfica, fenología floral y características morfológicas de las especies se compiló en tablas. Además, se realizaron mapas de su distribución geográfica y mapas de su distribución geográfica potencial con el Software Qgis. Entre los resultados se encontró que, para los tres taxa, existe más información acerca de su botánica y menos información acerca de los usos populares la que fue principalmente

de tipo ornamental, ceremonial y para *Z. fosteri* además acaricida. Se les conoce popularmente como mayitos, brujitas o flor de mayo, por su floración masiva principalmente detectada en el mes de mayo. Se propagan vegetativamente con cierta facilidad y son polinizadas por moscas, hormigas y otros insectos. En los mapas obtenidos de su distribución geográfica se muestra que los tres taxones se encuentran principalmente en el Centro de México, siendo *Z. fosteri* quien presenta una distribución geográfica más amplia en la República Mexicana en comparación con *Z. concolor* y *Z. alba*.

### **Introducción:**

El género *Zephyranthes* pertenece a las Amaryllidaceae. Familia con 70 géneros y cerca de 900 especies en el mundo (García et al. 2014; Judd et al. 2016); 4 géneros y más de 80 especies en México. Es agrupada dentro del orden Asparagales (monocotiledónea) en conjunto con otras familias como Orquídaceae e Iridaceae (Chase et al., 2000). Diversos autores como Huber (1969) y Traub (1951-1963) realizaron trabajos para delimitar la familia, pero no fue hasta 1999 y 2000 cuando Meerow y colaboradores realizaron amplios trabajos filogenéticos con el fin de proporcionar una circunscripción actualizada de la familia con base en la secuenciación de rbcL y trnL-F de cloroplasto, de ITS para las Amaryllidaceas americanas y de trnL-F e ITS para la familia entera. En dicha clasificación se separó a las Amaryllidaceas de las Agapanthaceae y Alliaceae presentándola como un grupo monofilético, sustentado principalmente por la presencia de alcaloides específicos (quimiotaxonómicos) y por la presencia de un ovario ínfero (Meerow, 1995; Ito et al., 1999).

Actualmente, se reconoce que las Amaryllidaceae comprenden tres subfamilias: Agapanthoideae, Allioideae y Amaryllidoideae, de las cuales la última es la más grande. Es considerada un grupo monofilético, reconocido como familia desde el siglo XIX (Chase et al., 2009). Esta familia tiene una amplia distribución geográfica,

principalmente en los trópicos y zonas holárticas, con centros importantes de diversificación en América del sur, Sudáfrica y el Mediterráneo, (Heywood, 1993; Meerow y Snijman, 1998).

Las Amaryllidoideae americanas presentan dos grupos monofiléticos, a) el clado Hippeastroide (tribus Griffineae e Hippeastreae) y b) el clado tetraploide andino (tribus Clinantheae, Eucharideae, Eustephieae e Hymenocallideae). La tribu Hippeastroide *sensu* compuesta por 10 a 13 géneros tienen un centro de diversificación en Chile, el occidente de Argentina y otro en el oriente de Brasil y noreste de Argentina (Arroyo-Leuenberger y Dutilh, 2009; Meerow et al., 2000; Ellenbecker, 1975, Ravena, 1981). En particular, una gran riqueza de especies de la tribu Hippeastroide del Sur de América tiene su centro de distribución en México que se extiende hasta las Antillas y al Sureste de los Estados Unidos (García et al., 2014). Es considerada una de las tribus más problemáticas en cuanto a la delimitación taxonómica de entre las Amaryllidaceae neotropicales, debido a las grandes variaciones morfológicas que pueden presentar sus integrantes lo que dificulta una circunscripción definitiva (Meerow, 2000). Hippeastrinae Walp., se encuentra conformado por los géneros *Hippeastrum* Herb., muy diverso en Brasil y los Andes de Perú y Bolivia; así como *Zephyranthes* s.l. (incluidos los géneros *Eithea* Ravenna, *Habranthus* Herb., *Haylockia* Herb., *Myostemma* Salisb. y *Sprekelia* Heist.) de distribución americana (García et al. 2014, 2019; García y Meerow, 2020). Estos autores reconocen en Hippeastrinae una evolución ancestral reticulada, por hibridación, que ha favorecido la radiación genérica y proponen una nueva clasificación con base en estudios filogenéticos moleculares recientes, variación morfológica y variación citogenética. Empero, también reconocen que la amplia ocurrencia de aloploidía, especialmente en *Zephyranthes* Herb. subg. *Zephyranthes* hace que la filogenia de las Hippeastrinae sea aún más compleja y difícil de traducir en una clasificación a una escala más fina. En esta tribu se encuentra clasificado no sólo

*Zephyranthes* sino también *Habranthus* otro género hermano con quién comparte gran similitud morfológica en algunas de sus especies.

**Zephyranthes:**

El género *Zephyranthes* agrupa alrededor de 70 especies, todas americanas distribuidas desde Maryland hasta Argentina, de estas se calculan 36 se encuentran en México (Spurrier et al., 2015), y en la cuenca del Valle de México se han registrado seis especies (Calderón y Rzedowski, 2005). *Zephyranthes* (Herb.) de México ha sido descrita en detalle por Calderón y Rzedowski (2005) que según se expone: "...son hierbas perennes con bulbos tunicados, raíces-fasciculadas tallos por lo general de 1 a 3, cilíndricos, huecos; hojas agrupadas en roseta basal, lineares, casi graminiodes, contemporáneas con las flores o con un desarrollo tardío; tallos unifloros; flores infundibuliformes, erectas, de color blanco, amarillo, rosado o morado, sésiles o con un pedúnculo que sobrepasa o no a la bráctea espátácea de la flor, está tubulosa y bífida, ocasionalmente entera o trifida, a veces fenestrada, membranosa, envolviendo a la flor, en el estado de botón; tubo del perianto largo o corto, segmentos de la serie externa más anchos que los de la serie interna; 6 estambres erectos, con inserción en la garganta o en la mitad del tubo del perianto, dispuestos en dos series de longitud desigual, anteras lineares o linear-oblonga, versátiles, filamentos filiformes, ovario trilocular, óvulos numerosos, dispuestos en dos series en cada lóculo, estilo filiforme, estigma trifido, con los lóbulos lineares, capitado y trilobado, cápsula subglobosa; semillas planas o comprimidas, negras. Las especies se distribuyen en regiones templadas y tropicales y algunas se utilizan como ornamentales..."

En México se ha registrado que habitan principalmente en pastizales, matorrales, zonas abiertas, bosques de encino, de pino-encino y de coníferas (Calderón y Rzedowski, 2005). Los caracteres florales (color de la flor, longitud del perianto, del estilo y de los estambres) son muy importantes para el reconocimiento y clasificación

de las especies, esto en parte porque otras estructuras no siempre pueden apreciarse bien en el material herborizado y su identificación puede ser muy complicada en su etapa vegetativa (López-Ferrari y Espejo-Zerna, 2002; García et al. 2019).

En 1821 *Zephyranthes* Herb., fue descrita por Herbert basado en *Amaryllis atamasca* especie descrita por Linnaeus en 1757 (Meerow y Snijman, 1998). Actualmente García et al. (2019) con base en estudios filogenéticos moleculares, variación morfológica y citogenética, subdividen *Zephyranthes* s.l. en 5 subgéneros, de los cuales *Zephyranthes* subgen. *Habranthus* (que incluye especies del Sureste de Estados Unidos) y *Z.* subgen. *Zephyranthes*, se encuentran en México (Meerow & Snijman, 1998; Flagg et al. 2002, 2010). El subgénero *Zephyranthes* se diferencia por las flores erectas a casi erectas, actinomorfas y estambres de disposición radial (Flagg et al. 2010).

La circunscripción de *Zephyranthes* siempre ha causado polémica en cuanto a su clasificación taxonómica se refiere debido a la gran variación morfológica que presentan sus especies. En algunas de ellas, es común encontrar heteromorfismo cromosómico en el cariotipo, lo que comúnmente resulta en un cambio estructural morfológico (Félix et al. 2011a; Fernández-Alonso y Groenendijk, 2004). Por ejemplo, en un trabajo citológico, Félix et al., (2011b) reportaron que las especies de *Zephyranthes* presentan  $2n=24$  o una multitud de variación en términos cromosómicos ya que algunas especies del género pueden presentar desde  $2n=10$  hasta  $2n=200$  en especies como *Z. seubertii*, la cual es un híbrido hortícola. Dicha hibridación, ya ha sido descrita y reportada en varios estudios morfológicos y filogenéticos de ITS y nrDNA del género (Flagg y Smith, 2009; Flagg et al. 2019; Meerow et al., 2000; García et al., 2014; 2019).

Por otro lado, *Habranthus* y *Zephyranthes* comparten una gran similitud morfológica, lo que en algún tiempo generó controversia en si fusionar o no a ambos



géneros dificultando la clasificación de sus taxones (Oliveira y Sano, 2009; Souza, 2006; Arroyo y Cutler 1984; Arroyo, 1981). Fue descrito por primera vez por Hebert en 1824, usando a *H. gracilifolius* originaria de Maldonado Uruguay como especie tipo. Contiene aproximadamente 40 especies distribuidas en América del Sur, México y Sudoeste de Estados Unidos (Meerow y Snijman, 1998; Arroyo, 1990; Howard, 1996). En la actualidad algunas especies de *Habranthus* han sido incluidas dentro del género *Zephyranthes* Hebert, (Alvarado-Cárdenas y García-Mendoza, 2008) por ejemplo, en *Z. alba* antes *H. concolor* (Flagg et al. 2019). Hoy día las especies del subgénero *Habranthus* Herb., se reconocen en especímenes de herbario por los estambres de diferentes longitudes y anteras horizontales que se arquean en la madurez; otros caracteres observados en plantas vivas son las flores divaricadas o péndulas con simetría zigomorfa y estambres fasciculados, con el estilo declinado o curvo (Meerow & Snijman, 1998; Flagg et al. 2002, 2010; Oliveira, et al. 2010). Se caracterizan por presentar  $2n=12$  o números similares (Félix et al., 2011b).

### **Objetivo general:**

Compilar la información botánica, distribución geográfica, usos e historia natural de *Z. fosteri*, *Z. alba* (antes *Z. concolor*) y *Z. concolor* (antes *Habranthus concolor*) en la literatura y en ejemplares de los herbarios más importantes de la Ciudad de México.

### **Objetivos particulares:**

- Compilar información sobre su historia de vida, usos, localidades, floración y características morfológicas de las especies en la literatura y herbarios
- Obtener mapas sobre la distribución geográfica aproximada de *Zephyranthes fosteri*, *Z. alba* y *Z. concolor* en México.

### **Materiales y Métodos:**

Con el fin de obtener la distribución geográfica aproximada y probables sitios de colecta de *Z. alba* (antes *Z. concolor* / *H. concolor*), *Z. concolor* y *Z. fosteri* en México, se revisaron ejemplares herborizados depositados en ocho herbarios principales del país, cuatro de ellos ubicados en la CdMx, dos en el Estado de México, uno en Morelos y otro de Guadalajara (Tabla 1.1). Se tomaron fotos de cada ejemplar revisado. Con la información en los herbarios sobre las coordenadas de los distintos sitios de distribución, se construyó un mapa de la distribución geográfica de las especies, usando el programa Qgis versión 2.18.9 (Web1). El sistema de información geográfica cuántica (QGIS) es una herramienta de sistema de información geográfica (SIG) escalable de Código Abierto licenciado bajo GNU - General Public License. Este sistema podría definirse como un conjunto de varios componentes como hardware, software, datos, metodologías y personas (operadores y usuarios), que hacen posible el análisis de datos geográficos por medio de la asociación de información de atributos a los objetos (Duarte et al., 2021). Técnicamente, QGIS integra la biblioteca de abstracción de datos geoespaciales (GDAL), que le permite leer y procesar una gran cantidad de imágenes geográficas (gratuitas y/o privadas), que permite la visualización, edición y análisis de datos geográficos (Baghdadi et al., 2018). Además, permite la creación de mapas a través de capas ráster (celdas) o de capas vectoriales (líneas y polígonos), soportando numerosos formatos, Shapefile, ArcInfo, MapInfo, GRASS GIS, GeoTIFF, TIFF, JPG, etc. Una de las características más importantes son las librerías con las que es posible crear complementos enfocados a la necesidad de cada proyecto. Incluso crear nuevas aplicaciones bajo código C++ y Python. Puede trabajar bajo cualquier sistema operativo, GNU/Linux, BSD, Unix, MacOSX y Windows (<https://www.qgis.org>). Un ejemplo de ello fue el uso del software libre QGIS-FREEWAT, como una herramienta de fácil acceso para la simulación del flujo de agua subterránea, que apoya en la toma

de decisiones sobre la gestión del agua subterránea bajo diferentes escenarios de extracción (López, 2022).

De aquellas localidades y/o registros en los herbarios que no contaran con coordenadas, se hizo una búsqueda de cada sitio por Google Earth 7.1.8.3036 (32-bits) para asignarle coordenadas y poder incluir estos lugares en el análisis. Con la base de datos obtenida para la obtención de la distribución geográfica, se realizó otro mapa para estimar la distribución geográfica potencial de *Z. fosteri*, *Z. concolor* y *Z. alba* en el país, usando el mismo programa. Este análisis ayuda a determinar áreas de distribución potencial, considerando variables como el clima o la geografía como el factor de mayor peso en la distribución. Por lo que los resultados hacen referencia a áreas de distribución potencial basadas en el clima o el uso de datos geográficos digitales. El color rojo indica la mayor concentración estimada de las especies.

**Tabla 1.1** Herbarios consultados para la búsqueda de *Z. alba* y *Z. fosteri*.

<b>Siglas</b>	<b>Herbario</b>
MEXU	Herbario Nacional de México, UNAM
UAMIZ	Herbario Metropolitano de la Universidad Autónoma Metropolitana
FCME	Herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM
IPN	Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Politécnico
COLPOS	Herbario del Colegio de Postgraduados
UACH	Herbario de la Universidad Autónoma de Chapingo
UAEM	Herbario de la Universidad de Morelos
IBUG	Herbario de la Universidad de Guadalajara

Por otra parte, se realizó una lista de las especies encontradas en los herbarios para el género *Zephyranthes* y *Habranthus*. Finalmente, de los ejemplares de herbario que contenían flores, se compiló la información relacionada en una tabla con las fechas de colecta y los sitios de distribución con el objetivo de saber los tiempos de floración en

cada sitio y así poder realizar una colecta de campo con mayor probabilidad de éxito debido a que estas plantas es más fácil localizarlas e identificarlas en antesis.

## **Resultados:**

### 1) *Información sobre la Historia de vida de las especies de estudio.*

Las especies de este género a menudo se les conoce alrededor del mundo como "lirios de lluvia" ("rain lilies"), flor de lluvia, lirio de céfiro o flor de céfiro o flor de viento (Bailey, 1977), pero en México, a estas especies comúnmente se les conoce como: "mayitos", "flor de mayo" "Brujitas", "quiebra platos", por su tendencia a florecer después de las primeras lluvias que habitualmente ocurren en el mes de mayo en México, y debido a su repentina floración y rápido marchitamiento pues sus flores no suelen durar más de 2 a 3 días (Fig.1).

Sus usos en México, se ha observado son principalmente ornamentales y/o ceremoniales por el color vistoso y su floración abundante, espontánea y efímera en época de lluvias, aunque también se ha mencionado su uso popular para combatir plagas del ganado (Com. pers) y para adornar grandes extensiones en algunos panteones de Morelos.

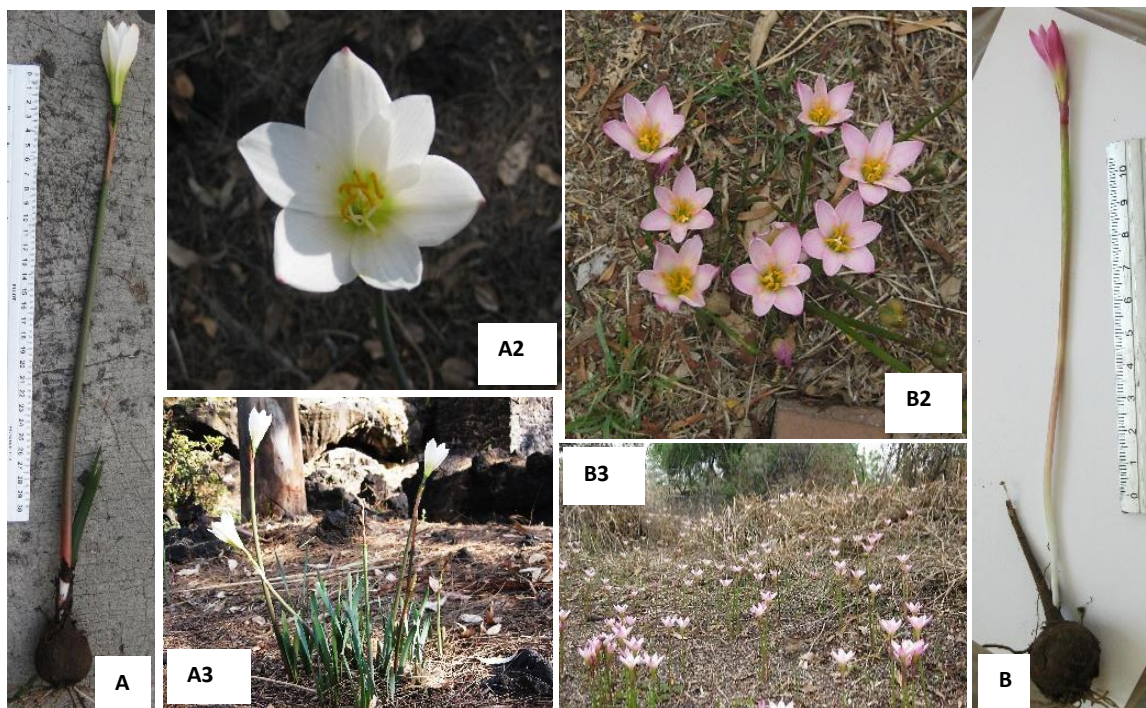
Por otro lado, se ha observado que estas especies son visitadas y tal vez también polinizadas por abejas, moscas y hormigas. Los bulbos son muy resistentes a las sequías o falta de agua, y suelen ser poco tolerantes al exceso de agua, la cual puede podrir los bulbos, lo cual se ha constatado en la propagación de invernadero. Estas plantas se reproducen vegetativamente en campo, generando pequeños bulbos a partir de la planta madre, que invaden rápidamente las zonas contiguas por lo que muchos de sus individuos podrían ser considerados clones (Obs. pers). Por otro lado, se ha documentado su gran capacidad de regeneración y propagación del bulbo si se hacen cortes transversales del bulbo cuidando de conservar un parte del tallo contraído

o achaparrado que se encuentra dentro de éste. Su propagación por semilla suele ser más lenta que la vegetativa y puede durar varios años hasta que la planta alcance su etapa reproductiva (Soriano, 2019).

La gran cantidad de alcaloides que estas plantas se distribuyen a lo largo de toda la planta, siendo los bulbos y las semillas las estructuras que registran una concentración mayor, lo que probablemente obedezca a una protección contra la herbivoría en esos verticilos florales (Centeno-Betanzos, 2014; Centeno-Betanzos et al., 2021). Las especies del género *Zephyranthes* también son conocidas por la actividad biológica e importancia farmacológica de sus alcaloides como la galantamina, un inhibidor de la acetilcolinesterasa o la licorina un alcaloide con actividad citotóxica, entre muchas otras actividades biológicas (Reyes-Chilpa, 2011; Centeno-Betanzos et al., 2021; García, 2017).

***Zephyranthes fosteri* (Lindl)** ha sido descrita en detalle por Calderón y Rzedowski (2005) como una hierba de 5 a 45 cm de altura; bulbo ovoide, de 0.8 a 2.5 cm de diámetro; tallos 1 a 3, cilíndricos, en ocasiones ligeramente comprimidos, hasta de 40 cm de longitud, de superficie estriada, hojas por lo general tardías, láminas hasta de 35 cm de longitud por 0.5 a 5 mm de longitud, agudas, ligeramente acanaladas, en algunas ocasiones sobrepasando el tallo, bráctea de 1.5 a 4 cm de largo, bífida, con los lóbulos de 0.5 a 2.5 cm de longitud; flores de 2.2 a 6 cm de largo, sésiles o con un pedúnculo hasta de 1 cm de longitud, de color rosa o blancas y con tonos rosados especialmente en la parte media y apical de los segmentos, en ocasiones con tintes verdosos; tubo del perianto de 1 a 2.5 cm de largo, segmentos de la serie externa oblanceolados u oblongo-elípticos, de 1.5 a 3.5 cm de largo por 6 a 15 mm de ancho, cuneados, ápices agudos y pilosos, los de la serie interna similares, pero más cortos y angostos; anteras lineares, de 5 a 8 mm de longitud; cápsula subglobosa, de 4 a 12 mm de longitud, trilobada; semillas semicirculares de 3.5 a 6 mm de largo por 1.8 a 3.5 mm de ancho, a menudo con la superficie brillante. En México, se le conoce popularmente

como "quebra platos", "flor de mayo" o "mayitos". Se distribuye en pastizales, matorrales, bosques de encino, de pino-encino y coníferas. Se conoce de San Luis Potosí, Colima, Michoacán, Guanajuato, Estado de México, CdMx, Morelos, Querétaro, Hidalgo, Puebla y Oaxaca.



**Figura 1.1. A.** Imágenes de *Zephyranthes alba* (flor blanca) y **B.** *Z. fosteri* (flor rosa). Fotos: Lucia Centeno.

En el Códice Cruz-Badiano "*El Libellus de medicinalibus indorum herbis*" ó Códice de la Cruz-Badiano (1552), que fue elaborado por el médico indígena tlatelolca Martín de la Cruz y traducido al latín por Juan Badiano, un indígena de Xochimilco, se menciona el uso de un *Zephyranthes*. Este libro bellamente escrito e ilustrado que contiene una amplia descripción del uso medicinal de más de 150 plantas originales de México que se empleaban en la medicina indígena, es considerado el primer libro de herbolaria medicinal azteca y una de las más importantes obras antiguas de materia médica en México (Gómez-Pompa, 1993; Bye y Linares, 2013; Reyes-Chilpa, et al. 2021). En esta obra se interpretó botánicamente al "*Huetzcanixochitl*" (Hierba que ríe o te hace reír) como *Z. fosteri* de la que si bien no se reporta su uso específico en el códice, esta

planta se encuentra ilustrada en el folio 38 ubicada entre el folio 37 y el 39, donde se encuentran ilustradas otras hierbas y árboles usados “para combatir la fatiga y el cansancio del que administra la República y desempeña un cargo público” (entiéndase para las personas con altos mandos); (Bye y Linares, 2013; Recko, 1947; De la Cruz, 1991). Así mismo en otras obras en las que se han interpretado botánicamente a las especies que aparecen ilustradas en el Códice, se propone igualmente que la ilustración pertenece a una especie de *Zephyranthes* sp. (Centeno-Betanzos et al., 2021); (Fig. 1). De esta especie se ha reportado su actividad biológica e importancia farmacológica de sus alcaloides como el 3-demetoximesembranol y la licorina (Centeno-Betanzos et al., 2021); un alcaloide con actividad citotóxica (García, 2017).

***Zephyranthes alba* (Flagg, G. Lom. Sm. y García-Mend.)** es una nueva especie descrita recientemente como endémica de la Ciudad de México, distribuida especialmente en el Pedregal de San Ángel al Sur de la Ciudad. La descripción que se transcribe a continuación corresponde a Flagg et al. (2019): “... una planta herbácea que puede medir hasta 60 cm de alto, posee un bulbo ovoide de 4-5 cm de largo y 4-5 cm de diámetro, cuello de 4.5-9 cm de largo túnica pardo oscura; láminas foliares glaucas, 7-9 mm de ancho; en ocasiones con nervios y márgenes con pequeñas papilas dispersas; flores solitarias en forma de embudo con escapo de 20-40 cm; espata de 3.5-5.5 cm; pedicelo de 4.5-8.7 cm; perianto de 5-6.2 cm, con tubo de color verdoso-amarillento oscuro a verde mostaza; segmentos principalmente blancos por dentro y por fuera, ápices apiculadas a veces rosa, generalmente amarillo verdoso o amarillo mostaza; estambres en 2 conjuntos superpuestos en tres, anteras entremezcladas en cada conjunto; 6 anteras horizontales, recurvadas, adheridas submedialmente; filamentos más largos que el tubo de perianto; polen amarillo; estigma cerca de la parte superior de las anteras, trífido con lóbulos lineales, cápsula trilocular; semillas de 8-11 x 5-7 mm...”. Al igual que *Z. fosteri*, también se le conoce como “mayitos” o “lirio de lluvia” debido a que florece de abril a junio y fructifica de mayo a julio cuando caen las

lluvias en la Ciudad de México” (Fig. 1). De esta especie se han aislado alcaloides como la galantamina, la cual presenta actividad biológica de importancia farmacológica como inhibidor de la acetilcolinesterasa, entre otras actividades biológicas (Reyes-Chilpa, 2011; Soriano, 2019; Centeno-Betanzos et al., 2021). Es importante aclarar que si bien en dichas investigaciones la identidad botánica de la planta fue considerada como *Z. concolor* en todas ellas se utilizaron individuos de la REPSA por lo que en realidad pertenecen a *Z. alba*.

***Zephyranthes concolor* (Hebert)**, ha sido descrita en detalle por Calderón y Rzedowski (2005) según se expone: Hierba hasta de 50 cm de largo; bulbo ovoide, de 1.5 a 4.5 cm de diámetro; tallos 1 ó 2, de 10 a 40 cm de longitud, de color verde oscuro, ligeramente glaucos, con tonos rojizos sobre todo hacia el tercio inferior, estriados; hojas tardías, desarrolladas en la etapa de fructificación, láminas de 10 a 40 cm de largo por 2.5 a 5.5 (7.5) mm de ancho, agudas, vainas membranosas, formando una cubierta externa hasta de 9 cm de longitud; pedúnculo hasta de 7 cm de largo, bráctea de 2.5 a 5 cm de longitud, membranosas, verde o rojiza, con lóbulos de 1 a 2 cm de largo; flores persistentes, de 4 a 5 cm de largo, de color blanco, con tintes verdosos y/o rosados, especialmente distribuidos en la porción media y apical de la cara exterior de los segmentos del perianto, tubo inconspicuo, de 3.5 a 5 mm de longitud, segmentos de la serie externa oblancheolados, de 4.2 a 5 cm de largo por 12 a 22 mm de ancho, ápice agudo y piloso, cuneados en la base, los de la serie interna similares de 8.5 a 16 mm de ancho; anteras lineares de 7 a 10 mm de longitud; cápsula de 1.3 a 1.7 cm de longitud, trilobada, verde, a menudo con tonos rojizos, de color paja al tiempo de la dehiscencia; semillas semicirculares, de 7 a 9 mm de largo por 4 a 5.5 mm de ancho, planas (Fig. 2). Se distribuye principalmente en matorral xerófilo. Se encuentra en Guanajuato Colima, Michoacán, Guanajuato, Estado de México, Querétaro, Hidalgo y CdMx.



## 2) Registros de *Zephyranthes* obtenida en los herbarios.

Con la información consultada en el año 2016 en los ejemplares de herbario se obtuvo el registro de 16 especies en total del género *Zephyranthes* y tres especies del género *Habranthus* distribuidas en el país (Tabla 1.2). Con este resultado se documenta que existe una mayor cantidad de especies de *Zephyranthes* representadas en los herbarios, en específico de las especies *Z. fosteri*, *Z. concolor*, *Z. brevipes* y *Z. alba* (antes circunscrita en *Z. concolor* o *H. concolor*). En el caso de los registros de herbario de *Z. concolor* de la Ciudad de México se tomaron en cuenta como de *Z. alba*, debido a que Flagg et al. (2019); establecieron que *Z. alba* se distribuye únicamente en la CdMx como especie endémica y *Z. concolor* por el contrario se distribuye fuera de la CdMx. Se encontraron en total, 84 registros específicamente de *Z. fosteri* y 28 de *Z. alba* (Anexo 1 y 2). Estos resultados revelan no sólo que las especies de *Zephyranthes* son más abundantes que las de *Habranthus* en el país, sino que sus especies podrían tener mayor distribución geográfica o tener poblaciones de mayor extensión o de más fácil acceso para el colector. Estos resultados también coinciden con la información bibliográfica en la que se menciona que las especies de *Zephyranthes* son abundantes en el país motivo por el que México es considerado un centro de diversificación del género por el número de especies reportadas hasta el momento, caso contrario de las especies de *Habranthus* (García et al., 2014).

Por su parte, *Z. fosteri* fue la especie de *Zephyranthes* más representada en los herbarios consultados, por lo que quizá podría ser la especie más abundante del género en México, seguida de *Z. brevipes*. Estas dos especies comparten características morfológicas muy estrechas, lo cual pudo ser comprobado directamente en la revisión de los ejemplares de herbario, dónde se indicaba en alguno de ellos continuas

sugerencias o correcciones por taxónomos que dichos ejemplares de *Z. brevipes* podrían corresponder a *Z. fosteri* y viceversa.

Por otro lado, en los herbarios de la UAM-I y MEXU fue dónde se encontraron más ejemplares de distintas especies de *Zephyranthes* y sólo en el MEXU se encontraron ejemplares del género *Habranthus*. En los herbarios de la UACH y UAEM fue dónde se encontraron menos ejemplares de especies de *Zephyranthes* con sólo 2 y 1 registros respectivamente.

**Tabla 1.2.** Especies de *Zephyranthes* y *Habranthus* registradas en los herbarios visitados

No.	Especie	UAM-I	MEXU	IPN	COLPOS	UACH	UAEM
1	<i>Z. brevipes</i>	X	-	X	X	X	-
2	<i>Z. carinata</i>	X	-	-	X	X	-
3	<i>Z. clintiae</i>	X	-	-	-	-	-
4	<i>Z. concolor</i>	X	X	X	X	-	-
5	<i>Z. drumondii</i>	-	-	X	-	-	-
6	<i>Z. fosteri</i>	X	X	X	X	-	-
7	<i>Z. grandiflora</i>	-	X	X	-	-	-
8	<i>Z. latissimifolia</i>	X	X	-	-	-	-
9	<i>Z. lindleyana</i>	X	X	X	X	-	-
10	<i>Z. longifolia</i>	X	X	X	-	-	-
11	<i>Z. nelsoni</i>	X	-	-	-	-	-
12	<i>Z. pulchella</i>	-	-	X	-	-	-
13	<i>Z. sessilis</i>	X	-	X	X	-	-
14	<i>Z. striata</i>	X	-	-	-	-	-
15	<i>Z. tubispata</i>	-	X	-	X	-	-
16	<i>Z. verecunda</i>	X	-	-	X	-	X
1	<i>H. carinata</i>	-	X	-	-	-	-
2	<i>H. konzatti</i>	-	X	-	-	-	-
3	<i>H. oaxacanus</i>	-	X	-	-	-	-
	Total de especies por herbario	<b>12</b>	<b>10</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>1</b>

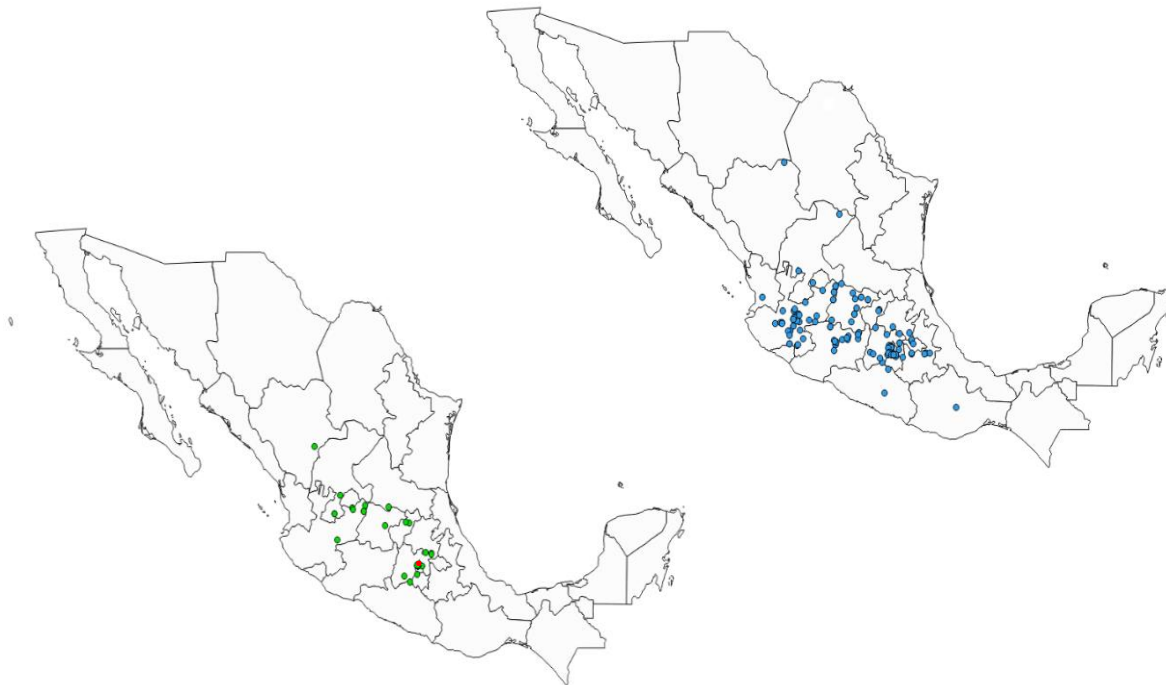
2) *Mapas de distribución de Z. fosteri, Z. concolor y Z. alba obtenida de los registros en los herbarios.*

Con los datos de las coordenadas descritas en los herbarios (Anexo 1 y 2), se obtuvieron tres mapas; a) de *Z. fosteri*; b) de *Z. alba* y *Z. concolor* y c) con la distribución fusionada de las tres especies (Fig. 2 y 3). Un aspecto relevante es que los ejemplares de herbario registrados como *Z. concolor* para la CdMx, si bien fueron identificados botánicamente como tal en el 2016, actualmente estos ejemplares se asume corresponden a *Z. alba*, en virtud de que esta nueva especie es endémica de la CdMx y se distribuye al Sur de la Ciudad, mientras que *Z. concolor* se distribuye fuera de la CdMx (Flagg et al., 2019). Por esta razón el mapa los sitios de *Z. alba* y *Z. concolor* fueron fusionados y únicamente el sitio de distribución de la CdMx correspondería para *Z. alba* (Fig. 2).

En ambos mapas de la figura 2, se puede observar que la distribución de los ejemplares de herbario de *Z. fosteri*, *Z. concolor* y *Z. fosteri* es coincidente en varios estados. Específicamente en el mapa de *Z. fosteri* (Fig. 2, lado derecho), se observa que su distribución abarca 15 estados (Puebla, CdMx, Edo. Mex., Tlaxcala, Morelos, Jalisco, Hidalgo, Michoacán, Guanajuato, Aguascalientes, Nayarit, Oaxaca, Querétaro, Guerrero y Zacatecas) por lo que se observa una distribución más extendida hacia el Norte (Zacatecas y Nayarit) y Sur (Guerrero y Oaxaca) del país en comparación con el mapa de distribución de *Z. concolor* y *Z. alba* (lado izquierdo). Dicha distribución de *Z. fosteri* compilada de los herbarios consultados, concuerda, pero se incrementa el número de estados de su distribución reportada por (Calderón y Rzedowski, 2005).

En el mapa de *Z. concolor* y *Z. alba* (Fig. 2, lado derecho), se puede observar que la distribución de *Z. concolor* abarca 10 estados (Edo. Mex., Morelos, Hidalgo, Jalisco, Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, Zacatecas, Durango, San Luis Potosí) y *Z. alba* únicamente en la CdMx. La distribución de *Z. concolor* obtenida en este trabajo si bien

concuera con la distribución en algunos estados reportada por Calderón y Rzedowski, (2005)., también se ve incrementada en este análisis.



**Figura 1.2.** Distribución de los registros de las especies de *Z. concolor* y *Z. alba* (punto rojo) (izquierda) y *Z. fosteri* (derecha) en México, de acuerdo con los ejemplares registrados en los herbarios visitados. Se observa la abundancia y distribución de las especies.

Por otro lado, en el mapa dónde se fusionó la distribución de *Z. fosteri*, *Z. alba* y *Z. concolor* (Fig. 1.3), se puede observar que existe una concentración en la distribución de todas las especies hacia el centro del país, presentando algunos sitios de simpatría entre ellas. Uno de ellos muy evidente en la CdMx (*Z. fosteri* y *Z. alba*) y otros dos en Jalisco y Aguascalientes (*Z. fosteri* y *Z. concolor*). También se puede observar y comparar gráficamente los sitios de distribución en los que coinciden y en los que no, así como la abundancia comparativa que se observa es mayor en *Z. fosteri* (puntos azules) que en *Z. concolor* y *Z. alba* (puntos verdes).

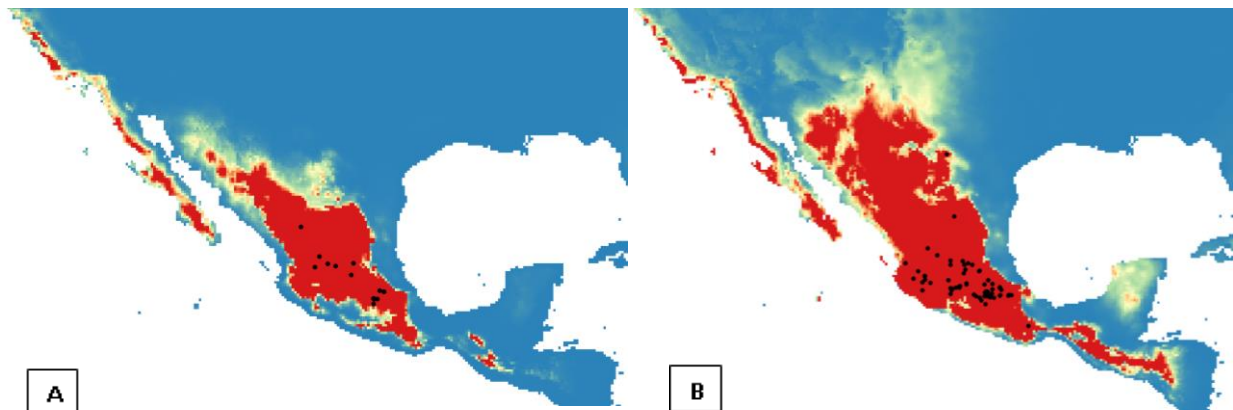


**Figura 1.3.** Mapa fusionado con todos los registros de los ejemplares de herbario consultados (2016), de las especies de *Z. fosteri* (puntos azules), *Z. alba* (puntos rojos) y *Z. concolor* (puntos verdes). Se observan zonas alopátridas y simpátridas entre las especies.

3) *Mapas predictivo de distribución geográfica potencial de Z. concolor y Z. fosteri a partir de los registros obtenidos en los herbarios.*

Cuando se habla de distribución deben distinguirse dos categorías diferentes: la real y la potencial. La distribución real se refiere a los sitios en los que se han observado o colectado individuos y la potencial hace alusión a las áreas que tienen condiciones ambientales muy similares a los sitios donde se encuentran las especies y que tienen muy altas probabilidades de estar ocupadas por estas mismas (Gámez, 2010). El concepto de distribución potencial resulta ser sumamente útil debido a que permite enfrentar el problema de que, en países tan grandes y complejos como México, resulta prácticamente imposible disponer de información para todo el territorio, tal es el caso de los *Zephyranthes*. En el mapa predictivo de distribución geográfica potencial obtenido puede notarse que *Z. concolor* (Fig. 1.4 A) presentaría una menor extensión de sus poblaciones en comparación con *Z. fosteri* (Fig. 1.4 B), la cual concentraría su distribución hacia el centro y norte del país, extendiendo hacia ambas fronteras.

Al respecto hay que considerar que, si bien la distribución de los seres vivos es consecuencia de la combinación de múltiples factores como los ambientales, geológicos, entre otros, algunas especies solo se encuentran en determinados ambientes a los que se han adaptado, es así que existen especies que solo se presentan en climas templados, otras en lugares cálidos y húmedos, etc. Y aunque la presencia de una especie depende de muchos factores tanto abióticos (temperatura, precipitación, tipo de suelo, etc.) como bióticos (alimento, depredadores, polinizadores, etc.), el clima es uno de los más importantes debido a que condiciona de forma importante la ausencia o la presencia de los seres vivos (Gámez, 2010). Es por ello que, en este tipo de análisis, el clima es un factor determinante para estimar la distribución potencial que podrían tener estas especies.



**Figura 1.4.** Mapas predictivos Qgis de la distribución geográfica potencial de las especies (zona de color rojo) con base en las coordenadas obtenidas en los ejemplares de herbario revisados. A) *Z. concolor* y B) *Z. fosteri*.

### 3) *Relación mensual de la floración en cada localidad encontrada en los ejemplares de herbario.*

Con la información de los ejemplares de herbario, se obtuvo una tabla en la que se compiló el estado de floración en cada sitio de colecta, estimando con ello el

tiempo de la temporada de antesis de *Z. fosteri*, *Z. concolor* y *Z. alba* para cada localidad (Fig. 1.5; Tabla 1.3 y 1.4).

**Tabla 1.3.** Relación de los Estados de la República y los meses de colecta registrado en los herbarios visitados de *Z. concolor* y *Z. alba* (antes *Z. concolor* y *H. concolor*) endémica de la CdMx.

Mes	CdMx ( <i>Z. alba</i> )	Edo. Mex.	Mor.	Hgo.	Jalisco	Aguas- calientes	Gto.	Qro.	Zac.	Dgo.	S.L.P
marzo	CU Insurgentes y Periférico										
abril	Pedregal de SA San Francisco Tlaltengo. (Tláhuac)							Bucareli			
mayo	CU San Francisco Tlaltengo. (Tláhuac) Cuicuilco		UAEM	Tepeapul- co	Lagos de Moreno					Villa Unión	
junio	Pedregal de SA Cuicuilco	Tezontepec				Calvillo El salitre			Villa nueva Santa Rosa		Joyita
julio	CU				Encarna- ción de Díaz						
sept							San Juan de Iturbide				

Como puede observarse, para cada sitio distinto de colecta, cambian los meses de floración, lo que responde a las distintas condiciones ambientales que presenta cada localidad, como la disponibilidad de agua, radiación solar, etc.

**Tabla 1.4.** Relación de los Estados de la República y los meses de colecta registrado en los herbarios visitados de *Z. fosteri*.

Mes	Puebla	CdMx	Edo. Mex	Tlaxcala	Morelos	Jalisco	Michoacán	Hidalgo
febrero					Tlalnepantla			
marzo						Zapotitlán		

<b>abril</b>	Acatzingo Cholula Aljojula	CU			Tetela del volcán		Morelia Erongaricuaró	Tezontepec
<b>mayo</b>	Acatzingo Sn Salvador	Desierto de los leones Pedregal de SA Cuicuilco Magdalena Contreras Parque ecológico	Texcoco Temamatla Valle de Bravo		Tepoztlán Tetela del volcan UAEM La cascada del salto		Zinapécuaro (laguna verde) Tzentzen- guaro	Tezontepec
<b>junio</b>		Desierto de los leones CU Cuajimalpa		Muñoz de Obledo	Tepoztlán Tlalnepantla Tilzapotla	Tlajomulco Tapalpa La cañada	Morelia Nuevo urecho	Tula de Allende
<b>julio</b>			Ocuilan Lagunas de Zempoala		Tepoztlán Huitzilac	Tlajomulco Tapalpa Sta. Cruz de las F	Zinapécuaro (laguna verde) La Piedad Sta. Cruz del cobre	Pachuca
<b>agosto</b>						Hostotipaqu i-Ilo		

Mes	Guanajuato	Aguascalientes	Nayarit	Oaxaca	Querétaro	Guerrero	Zacatecas
<b>mayo</b>	S.L. de la Paz						
<b>junio</b>	San Miguel Los Pozos León	Calvillo				Ixtapan de la Sal-Taxco	Santa Rosa
<b>julio</b>	Penjamillo San Diego de la Unión		Composte- la		Cadereyta		
<b>agosto</b>	S.L. de la Paz Victoria			San Pedro Ayutla	Ezequiel Montes		

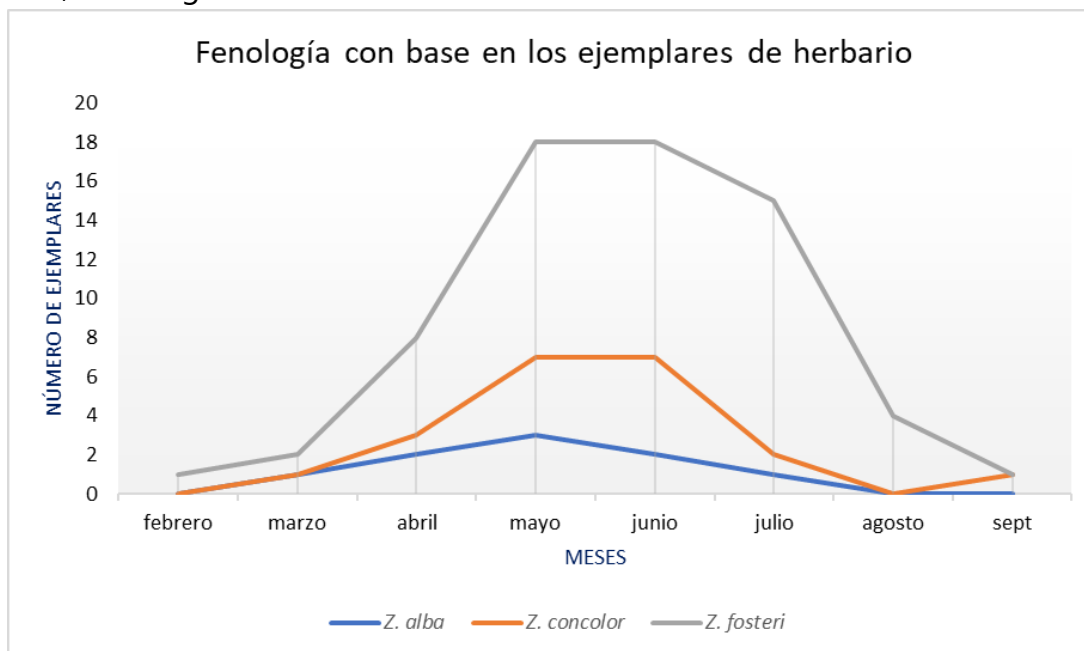
Para el caso de *Z. fosteri*, (Tabla 1.3) la floración se presenta en distintas localidades en un rango total desde el mes de febrero hasta el mes de agosto. Mientras que para *Z. concolor* y *Z. alba* (Tabla 1.3) va desde el mes de marzo al mes de septiembre, es decir el tiempo de floración para cada especie se extiende a lo largo de 6 meses en las distintas localidades y *Z. concolor* iniciaría su floración después que *Z. fosteri* (Fig. 1.5). Sin embargo *Z. fosteri* tiene un tiempo de floración más extendida en comparación con las otras especies. Esto concuerda con los mapas obtenidos en este trabajo en donde



se muestra *Z. fosteri* tiene una mayor distribución en el país con respecto a las otras dos especies analizadas, así como la información de la literatura.

**Figura 1.5.** Meses de floración de *Z. fosteri*, *Z. alba* y *Z. concolor* con base en el número de ejemplares con flor para cada especie en los herbarios consultados en el 2016.

Además, los registros de herbario consultados fueron mucho más numerosos



notablemente en los meses de mayo a junio que es cuándo suele haber más precipitación asociada a la época de lluvias en México (Fig. 1.5) Por otro lado, en 10 estados se reporta la presencia de *Z. concolor*; 1 para *Z. alba* (sólo en la CdMx) y 15 para *Z. fosteri*.

### Discusión:

Entre los resultados encontrados en la bibliografía sobre los *Zephyranthes* se encontró que si bien su circunscripción taxonómica ha sido compleja ésta ha sido estudiada y analizada desde distintas disciplinas para definir su clasificación como: la anatómica,

genética, morfométrica, fitoquímica, citológica (Reyes-Chilpa, 2011; Centeno-Betanzos 2014; Soriano, 2019; Centeno-Betanzos et al., 2021; Alva-Sandoval, 2023), entre otras. Por lo tanto, tal como lo afirma García et al. (2019), las especies del subgénero típico requieren una revisión taxonómica crítica para una mejor delimitación. En dichos trabajos taxonómicos, los autores tomaron en cuenta la variación morfológica, molecular y cromosómica, debido a que mencionan que las complejas relaciones taxonómicas entre ellas parecen haber sido influenciadas por una evolución reticular; además, la hibridación y la poliploidía (Flagg et al. 2019). Las cuales son consideradas como las principales fuerzas de evolución en el grupo, influidas también por la apomixis y autocompatibilidad. Sin embargo, es importante hacer hincapié en que es necesario estudiar las consecuencias de estos eventos que hasta ahora no han sido investigados en relación con la diversificación del grupo.

Para los tres taxa, existe más información acerca de su botánica y menos información acerca de los usos populares. Su uso fue principalmente de tipo ornamental, ceremonial y para *Z. fosteri* el polvo de los bulbos desecados se menciona en algunas personas como un acaricida, actividad que podría explicarse debido a la composición alcaloidea mayoritaria que se encuentra en ese tejido. Esto podría deberse en parte a que las flores de este género, aunque son vistosas, son pequeñas y su floración suele ser muy efímera durando apenas unos días con lo cual se dificultaría un tanto la disposición puesto el resto del año la planta se mantiene en estado vegetativo y es difícil de identificar. También en algunos casos la salvia que desprenden los bulbos al trocearlos puede irritar la piel. Sin embargo no deja de llamar la atención que los usos probablemente de tipo "ceremonial" que se menciona en el código de la Cruz-Badiano de *Z. fosteri*, se disminuyeron o perdieron a través del tiempo (Bye y Linares, 2013).

Por otro lado, en los mapas de la distribución geográfica realizados con base en la información registrada en los herbarios en el 2016. Se obtuvo que los tres taxones se distribuyen principalmente en el Centro de México, siendo *Z. fosteri* quién presenta una

distribución geográfica más amplia en la República Mexicana en comparación con *Z. concolor* y *Z. alba*. Esto concuerda en parte con la distribución de estas especies en Calderón y Rzedowski (2005), sin embargo en este estudio se amplió a más estados de la república en dónde se ha encontrado distribuidas *Z. fosteri*, *Z. concolor* y *Z. alba*. Por otro lado cabe señalar que De *Z. alba* aún se encontrado pocos registros acerca de su distribución, que en principio porque es una especie de reciente denominación taxonómica y también por que se encuentra delimitada a la Ciudad de México como especie endémica. En cuanto a la fenología preliminar que se pudo realizar tomando en cuenta las fechas de montaje de los ejemplares de herbario con flor consultados, pudo observarse que el pico de floración para la tres taxas analizadas mayoritariamente y coincidente fue durante los meses de mayo a julio. Por lo tanto la mejor temporada para para posteriores colectas tendría que hacerse durante estos meses. Además, también es cuándo más probabilidad habría de localizar sitios de simpatria entre *Z. fosteri*, *Z. concolor* y *Z. alba* debido a su floración. Por otro lado con este análisis también puede notarse que el tiempo de floración es más extendido en *Z. fosteri*, que para *Z. concolor* y *Z. alba*.

Finalmente como perspectiva se sugiere realizar una base de datos más grande incorporando los datos más actualizados disponibles en los principales herbarios de la República Mexicana así como los datos de distribución disponibles en medios digitales como Tropicos, Sermarnat, etc. Con el fin de obtener un mapa de distribución más amplio y detallado para delimitar mejor la distribución no sólo de las especies *Z. fosteri*, *Z. concolor* y *Z. alba* sino en general de las especies de *Zephyranthes* de México.

### **Conclusiones:**

- La especie *Z. fosteri*, *Z. concolor* y *Z. alba* se encuentran concentradas principalmente en el centro del país

- La especie *Z. fosteri* se encuentra mayormente representada en el número de ejemplares de herbario, número de registros en total y extensión geográfica ocupada en comparación con *Z. concolor* y *Z. alba* en los ejemplares de herbario consultados.
- Los eventos de floración registrados para *Z. fosteri*, *Z. concolor* y *Z. alba* abarca un período de 6 meses aproximadamente siendo *Z. fosteri* quien empezaría primero.
- Para las tres especies se encontraron mayor número de registros y ejemplares de herbario en la CdMx.
- Se encontraron más especies del *Zephyranthes* (17) que de *Habranthus* (3) representados en los herbarios consultados.

**Literatura citada:**

- (Web 1). QGIS Development Team, <YEAR>. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project.

- (Web 2). <https://www.qgis.org/es/site/>
- Alva Sandoval A., K. 2023. Análisis morfológico floral de *Zephyranthes alba* (Amaryllidaceae) en distintas poblaciones del Pedregal de San Ángel de la Ciudad de México desde una perspectiva de morfometría geométrica. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México, CdMx.
- Alvarado-Cárdenas, L. y García-Mendoza, A. 2008. Una especie nueva de *Habranthus* (Amaryllidaceae, Hippeastreae) para la flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Novon* 18: 283-238.
- Arroyo, S. 1981. Systematic anatomical studies on Amaryllidaceae. Tesis de Doctorado. Universidad de Reading. Reading, Berkshire.
- Arroyo, S. y Cutler, D. 1984. Evolutionary and taxonomic aspects of the internal morphology in Amaryllidaceae from South America and southern Africa. *K. Bul.* 39: 467-498.
- Arroyo, S. 1990. *Habranthus* (Amaryllidaceae) en Argentina y Uruguay. *Parodiana* 6(1): 11-30.
- Arroyo-Leuenberger, S., y Dutilh, B. 2009. Revision of *Zephyranthes andina* (Amaryllidaceae) including five new synonyms. *Willdenowia* 39: 145–159.
- B. P. Recko. 1947. 'Nombres Botánicos del Manuscrito Badiano', *Bol. Soc. Bot. Mex.* 5, 23–43.
- Bailey, L. 1977. Manual of cultivated plants. Macmillan. Nueva York.
- Baghdadi, N., Mallet C., Zribi, M. 2018. QGIS and Generic Tools. (Vol. 1). John Wiley & Sons.
- Bye, R. y Linares, E., 2013. Arqueología mexicana. Edición especial 50 y 51. Códice De la Cruz-Badiano. Medicina Prehispánica.
- Calderón, G. y Rzedowski, J. 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. Co-edición entre el Instituto de Ecología, A. C. y la Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán.

- Centeno-Betanzos, L. 2014. Estudio anatómico, químico y actividad biológica de *Zephyranthes fosteri*, *Habranthus concolor* y *Habranthus aff. concolor*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México, CdMx.
- Centeno-Betanzos, L. Y., Reyes-Chilpa, R., Pigni, N. B., Jankowski, C. K., Torras-Claveria, L., & Bastida, J. 2021. Plants of the '*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*' from Mexico, 1552. *Zephyranthes fosteri* (Amaryllidaceae) Alkaloids. *Chemistry & Biodiversity*, 18(3).
- Chase, M. W., Soltis, D. E., Rudall, P. J., Fay, M. F., Hahn, W. H., Sullivan, S. Joseph, J., Moluray, M., Kores, P. J., Giunish, T. J., Sytsma, K. J., Pires, A. J. C. 2000. Systematic of Monocotyledons: an assessment of current knowledge and a new classification. In: Wilso, L., Morrison, D. A. (eds.). *Monocot: Systematics and Evolution*. CSIRO. Publishing Australia.
- Chase, M. W., Reveal, J. L., & Fay, M. F. 2009. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 132-136.
- De la Cruz, M. 1991. '*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*, Manuscrito Azteca de 1552', Vol. 1, Fondo de Cultura Económica y Instituto Mexicano del Seguro Social, México.
- Duarte, L., Queirós, C. y Teodoro, A.C. (2021). Analisis comparativo de cuatro plugins de QGIS para la creación de mapas web. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*. Vol. 34(2):8-26.
- Ellenbecker, M. 1975. Geographical distribution of the Amaryllidaceae. *Pl. Li.* 31: 37-39.
- Felix, W., Felix, L., Melo, N., Oliveira, M, Dutilh, J y Carvalho, R. 2011a. Karyotype variability in species of the genus *Zephyranthes* Herb. (Amaryllidaceae–Hippeastreae). *Plant Systematics and Evolution*. 294:263-271.

- Felix, W., Felix, L., Melo, N., Dutilh, J y Carvalho, R. 2011b. Cytogenetics of Amaryllidaceae species: heterochromatin evolution in different ploidy levels. *Plant Systematics and Evolution*. 292:215-221.
- Fernández-Alonso, J. y Groenendijk, J. 2004. A new species of *Zephyranthes* Herb. s.l. (Amaryllidaceae, Hippeastreae), with notes on the genus in Colombia. *Rev. Acad. Colo. de Cien. Exac.* 28: 177-186.
- Flagg, R.O., G.L. Smith & W.S. Flory. 2002. *Habranthus* Herb. y *Zephyranthes* Herb. In: Flora of North America Editorial Committee (ed.). Flora of North America and North of Mexico 26: 281-282; 296-303.
- Flagg, R. y Smith, G. 2009. A new mexican *Habranthus* (Amaryllidaceae) and a key to the *Habranthus* of México and Southwestern USA. *Herbertia* 63: 174-180.
- Flagg, R. O., Smith, G. L., & Meerow, A. W. 2010. New combinations in *Habranthus* (Amaryllidaceae) in Mexico and southwestern USA. *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature*, 20(1), 33-34.
- Flagg, R. O., Smith, G. L., & García-Mendoza, A. J. 2019. Two New White-flowered Mexican *Zephyranthes* Species (Amaryllidaceae: Amaryllidoideae) with Different Breeding Systems. *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature*, 27(4), 222-230.
- Gámez Pastrana R. 2010. Guía para la elaboración de mapas de distribución potencial. Universidad Veracruzana. México.
- García Mendoza, Abisai J. 2021. Amaryllidaceae. En: Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fonseca Juárez, Rosa María; Arias Montes, Salvador; Grether González. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- García Cruz, K. P. 2017. Análisis químico y efecto citotóxico de extractos metanólicos y fracciones alcaloides de *Zephyranthes fosteri* (Amaryllidaceae) sobre las líneas tumorales humanas HeLa y SKLU-1 /. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México, CdMx.

- García, N., Meerow, A. Soltis, D., y Soltis, P. 2014. Testing Deep Reticulate Evolution in Amaryllidaceae Tribe Hippeastreae (Asparagales) with ITS and Chloroplast Sequence Data. *Syst. Bot.* 39(1):75-89.
- García, N., Meerow, A. W., Arroyo-Leuenberger, S., Oliveira, R. S., Dutilh, J. H., Soltis, P. S., & Judd, W. S. 2019. Generic classification of Amaryllidaceae tribe Hippeastreae. *Taxon*, 68(3), 481-498.
- García, N., y Meerow, A. W. 2020. Corrigendum to: García y al., Generic classification of Amaryllidaceae tribe Hippeastreae [in *Taxon* 68: 481–498. 2019]. *Taxon*, 69(1), 208-209.
- Gómez-Pompa, A. 1993. Las raíces de la etnobotánica mexicana. En: S. Guevara, P. Moreno-Casasola y J. Rzedowski (compiladores). Logros y Perspectivas del Conocimiento de los Recursos Vegetales de México en vísperas del Siglo XXI. Instituto de Ecología A, C. y Sociedad Botánica de México. pp. 26-37.
- Hebert, W. 1821. An Appendix. Bot. Mag. James Ridway and Sons. Londres.
- Herbert, W. 1824. *Habranthus gracilifolius*. Slender-leaved *Habranthus*. Bot. Mag. 51: t. 2464. Londres.
- Heywood, V. 1993. Flowering plants of the world. Oxford University. New York.
- Howard, T. 1996. Two new Mexican *Habranthus* species and a review of the Mexican *Habranthus*. *Hebertia* 51: 42-48.
- Huber, H. 1969. Die Samenmerkmale und Verwandtschaftsverhältnisse der Lilliifloren. *Mitt. Bot. Staat. Munch.* 8:219-538.
- Ito, M. Kawamoto, A. Kita, Y. Yukawa, T., y Kurita, S. 1999. Phylogeny of Amaryllidaceae based on matK sequence data. *J. Pln. Res.* 112: 207–216.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., & Donoghue, M. J. 1999. Plant systematics: a phylogenetic approach. *Ecología mediterránea*, 25(2), 215.
- López-Ferrari, A. y Espejo-Zerna, A. 2002. Flora de Veracruz. Amaryllidaceae. Fascículo 128. Edit. Instituto de Ecología, A. C. Xalapa, Veracruz.



- López Roblero Genaro Alfonso. 2022. Modelación numérica del acuífero “La Muralla (Clave 1111)” ubicado en el estado de Guanajuato mediante Software Libre Qgis-Freewat. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma De México. México.
- Meerow, A. W. 1995. Towards a phylogeny of Amaryllidaceae. In P.J. Rundall, P.J. Cribb, D.F. Cutler y C.J. Humphries (Editors). *Monocotyledons: systematics and evolution*, pp. 169-179. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Meerow, A. y Snijman, D. 1998. Amaryllidaceae. En: Kubitzki, K., Huber, H., Rudall, P., Stevens, P. y Stützel, T. *The families and genera of vascular plants. Vol. III. Flowering plants*, Mo Meerow, A. W., M. F. Fay, C. L. Guy, Q.-B. Li, F. Q. Zaman, and M. W.
- Meerow, A. Fay, M. Guy, C. Li, Qin. Zaman, Q y Chase, M. 1999. Systematics of Amaryllidaceae based on cladistic analysis of plastid rbcL and trnL-F sequence data. *Ame. J. of Bot.* 86: 1325–1345.
- Meerow, A. W., Guy, C. L., Li, Q. B. y Yang, S. L. 2000. Phylogeny of the American Amaryllidaceae based on nrDNA ITS sequences. *Syst. Bot.* 25: 708-726.
- Oliveira, R. y Sano. P. 2009. Two new species of *Habranthus* (Amaryllidaceae) from the Espinhaco Range, Brazil. *K. Bull.* 64: 537-541.
- Oliveira, R. Henriette, J y Takeo, P. 2010. *Habranthus* (Amaryllidaceae) de Cadeia do Espenhaco, Minas Gerais e Bahia, Brasil. *Rodriguesia* 61(3): 491-503.
- Soriano García, A. B. 2019. Propagación y perfil fitoquímico de *Habranthus concolor* Lindl. (Amaryllidaceae). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. CdMx.
- Spurrier, M., Smith, G., Flaggs R., Espejo, A. 2015. A new species of *Zephyranthes* (Amaryllidaceae) from Mexico. *J. Bot. Nom.* 24 (3): 289-295.
- Ravena, P. 1981. Contributions to South American Amaryllidaceae VII. *Pl. Li.* 37:57-83.

- Reyes-Chilpa, R., Berkov, S., Hernández-Ortega, S., Jankowski, C. K., Arseneau, S., Clotet-Codina, Bastida, J. 2011. Acetylcholinesterase-inhibiting Alkaloids from *Zephyranthes concolor*. *Molecules*, 16(11).
- Reyes-Chilpa, R., S. L. Guzmán-Gutiérrez, M. Campos-Lara, E. Bejar, R. Osuna-Fernández, G. Hernández-Pasteur. 2021. 'On the First Book of Medicinal Plants Written in the American Continent, the *Libellus Medicinalibus Indorum Herbis* from Mexico, 1552. A Review', *BLACPMA*, 20, 1–27.
- Souza, O. 2006. Flora de Cadeia do Espinhaco: *Zephyranthes* Herb. y *Habranthus* Herb. (Amaryllidaceae). Tesis de maestría. Instituto de Biociencias da Universidade de Sao Paulo. Sao Paulo.
- Traub, H. 1951. Amaryllidaceae Notes. *Pl. Li.* 7:41-44.
- Traub, H. 1963. The genera of Amaryllidaceae. Ed. 1. The American Plant Life Society. Jolla, California.

## CAPÍTULO 2

**Caracterización morfológica, de alcaloides y microsátélites de *Zephyranthes fosteri* y *Z. alba* (Amaryllidaceae): poblaciones alopátridas.**



Contents lists available at ScienceDirect

## Biochemical Systematics and Ecology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biochemsyseco](http://www.elsevier.com/locate/biochemsyseco)

## Microsatellites, morphological, and alkaloids characterization of *Zephyranthes fosteri* and *Z. alba* (Amaryllidaceae): Allopatric populations

Lucía Y. Centeno-Betanzos<sup>a</sup>, Alfredo López-Caamal<sup>b</sup>, Natalie Cortés Rendon<sup>c</sup>,  
Mayra León Santiago<sup>b</sup>, Edison Osorio<sup>d</sup>, Jaume Bastida Armengol<sup>e</sup>, Zenón Cano-Santana<sup>f</sup>,  
Ricardo Reyes-Chilpa<sup>b,\*,\*\*</sup>, Efraín Tovar-Sánchez<sup>g,\*</sup>

<sup>a</sup> Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, 04510, Ciudad de México, Mexico

<sup>b</sup> Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, 04510, Ciudad de México, Mexico

<sup>c</sup> Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad de Ibagué, Ibagué, Tolima, Colombia

<sup>d</sup> Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Universidad de Antioquia, Calle 70 No. 52-21, Medellín, Colombia

<sup>e</sup> Departament de Biologia, Sanitat i Medi Ambient, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII, #27-31, E-08028, Barcelona, Spain

<sup>f</sup> Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, 04510, Ciudad de México, Mexico

<sup>g</sup> Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, Mexico

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
*Zephyranthes*  
Amaryllidaceae  
Alkaloids  
Morphology  
nSSR  
Mexico

## ABSTRACT

*Zephyranthes* (Amaryllidaceae) is a taxonomically complex genus due to the frequent overlap of interspecific morphological variation. In Mexico, *Z. alba* and *Z. fosteri* are herbaceous plants that, when distributed in sympatry, generate individuals with complex patterns of morphological variation, leading to taxonomic confusion. Therefore, it is necessary to first characterize these species in allopatric populations. In this contribution, molecular, morphological, and alkaloid profiles were used to characterize both species in allopatric sites. Our results show that *Z. alba* and *Z. fosteri* allopatric populations are two well-defined genetic and morphological groups. Flower-related characters were the ones that best allowed us to distinguish between species. In a similar fashion, the alkaloid profile showed remarkable differences among species: four alkaloids were specific to *Z. alba* and five to *Z. fosteri*. Lycorine (43.3–88.8%) and galanthamine (87.7–91.4%) were the most abundant alkaloids for each species, respectively. In conclusion, *Z. fosteri* and *Z. alba* exhibit noticeable differences when distributed in allopatry. In addition, *Z. fosteri* has greater genetic and phenotypic plasticity compared to *Z. alba*, which could be related to the former's ability to colonize new habitats. Finally, the molecular, genetic and chemical markers developed here will provide a framework to further studies aiming to explore if hybridization among *Z. alba* and *Z. fosteri* occurs in sympatric populations.

## 1. Introduction

Traditionally, species delimitation relies on the identification of morphological discontinuities among putative species. However, a number of plant species (including those within Amaryllidaceae) exhibit high levels of morphological variation, thus hindering their taxonomic differentiation. Morphological variation may be the result of both differential environmental pressures among populations and interspecific gene flow (i.e., hybridization), thus leading to taxonomic confusion through the exclusive use of traditional morphological characters

(Gaskin and Schaal, 2002; Arnold, 2006). Therefore, recent studies that aim to delimit species complexes use additional markers, such as genetic markers and secondary metabolite profiling, to establish their boundaries (multiple markers) and thus obtain more precise discrimination between species. Neutral genetic markers have been recognized as one of the most useful tools for species delimitation, particularly as they are not influenced by environmental conditions, their inheritance is under Mendelian segregation ratios, and are found in large numbers across the genome (Rieseberg and Wendel, 1993). Another advantage is their high mutation rates, which allows the differentiation between closely related

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [chilpa@unam.mx](mailto:chilpa@unam.mx) (R. Reyes-Chilpa), [efrain\\_tovar@uaem.mx](mailto:efrain_tovar@uaem.mx) (E. Tovar-Sánchez).

<https://doi.org/10.1016/j.bse.2022.104398>

Received 12 October 2021; Received in revised form 1 March 2022; Accepted 3 March 2022

Available online 15 March 2022

0305-1978/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

taxa, given by the differences in allelic frequencies and the presence of species-specific variants, which are useful characters for the identification of different genetic classes (Harrison and Larson, 2014). However, genetic markers also have some disadvantages, for example, the low polymorphism found in some loci, incomplete lineage sorting, as well as the presence of homoplasy in some markers (i.e., microsatellites [SSR]) may complicate discrimination between taxa (Avice, 2004). Additionally, diverse studies have suggested secondary metabolites as an effective tool in taxonomic delimitation, and in some cases, these markers have shown a better performance than genetic markers to identify recombinant individuals (Georgescu et al., 2016). Furthermore, unlike morphological characters, the expression of secondary metabolites is more predictable, since they show an oligogenic inheritance with a dominant/recessive pattern (Rieseberg and Ellstrand, 1993; Cheng et al., 2011). For example, some alkaloids (i.e., galanthamine) with chemotaxonomic value within Amaryllidaceae have been proposed (Herrera et al., 2001). Therefore, the complementary use of morphological, genetic, and chemical markers allows to establish more realistic hypotheses for differentiation between species.

Mexico is considered one of the main centers of diversification of the *Zephyranthes* genus (Amaryllidaceae), with 51% of the 70 species reported worldwide (Chowdhury and Hubstenberger, 2006; Spurrier et al., 2015), many of which are considered endemic (Tapia-Campos et al., 2012). The genus *Zephyranthes* is recognized for its ornamental value, and applications in traditional medicine (Katoch and Singh, 2015). The bulbs and leaves have been used for treating several diseases

(Kornienko and Evidente, 2008; Bastida et al., 2011; Quattrocchi, 2012). Phytochemical research into the genus *Zephyranthes* have reported secondary metabolites as alkaloids, flavonoids, sterols, and terpenoids (i. e., Mutsuga et al., 2001; Herrera et al., 2001; Wu et al., 2009a). Pharmacological effects of this genus are mainly due to alkaloids reported as antibacterial (Wu et al., 2009b), antiviral (Oluyemisi et al., 2015), anticancer (Pettit et al., 1990), antimitotic (Furmanowa and Oledzka, 1978), cytotoxic (Mutsuga et al., 2001) and neuroprotective activities (Cortes et al., 2019).

*Zephyranthes fosteri* (Traub) and *Z. alba* Flagg, G. Lom. Sm. & García-Mend. are two perennial herbaceous species with a wide geographical distribution in Mexico, mainly at the central and northern regions of the country (Calderón and Rzedowski, 2005; Flagg et al., 2019). *Z. alba* has a challenging taxonomic history and has been previously treated as *Z. concolor* (Lindl.) S. Wats (see Rzedowski and Rzedowski, 2001), and *Habranthus concolor* (Lindl.) (Damián-Domínguez et al., 2009).

*Z. alba* bears white flowers and is endemic to Mexico City, which is located at the central and southern region of the Mexican valley. (Flagg et al., 2019) (Fig. 1). *Z. fosteri* individuals are smaller than *Z. alba*, and frequently exhibit pink corollas (Fig. 2). The former is distributed in central and northern Mexico, mainly from Jalisco to Guerrero, Puebla and Oaxaca States. It is distributed in the center of the country. The traditional morphological characters used to distinguish these species are the flower color, the perianth length, the style, and the stamens (López-Ferrari and Espejo-Zerna, 2002; Flagg et al., 2019). Interestingly, individuals with atypical morphology have been observed when both

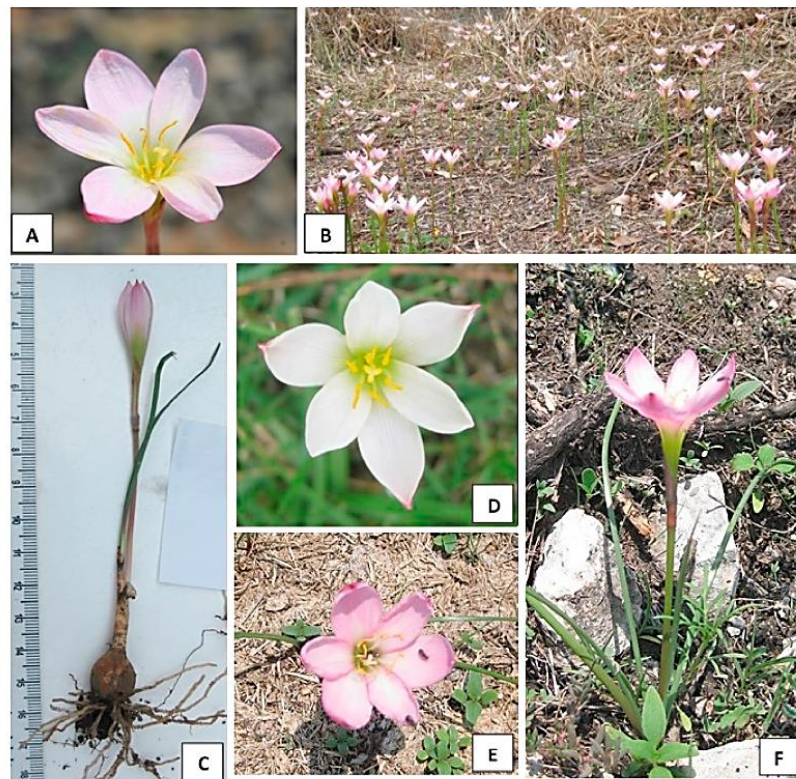


Fig. 1. *Zephyranthes fosteri* from Mexico. A) Detail of the flower and B) Grouping of plants in "Universidad de Morelos" "UM". C) Detail of complete plant with flower, scape, leaves, bulb, and roots. D) Detail of the flower of "San Miguel Huepalcalco" "SM". E) Detail of the flower with a pollinator and F) Habit of "Mixquihuala" "MI".

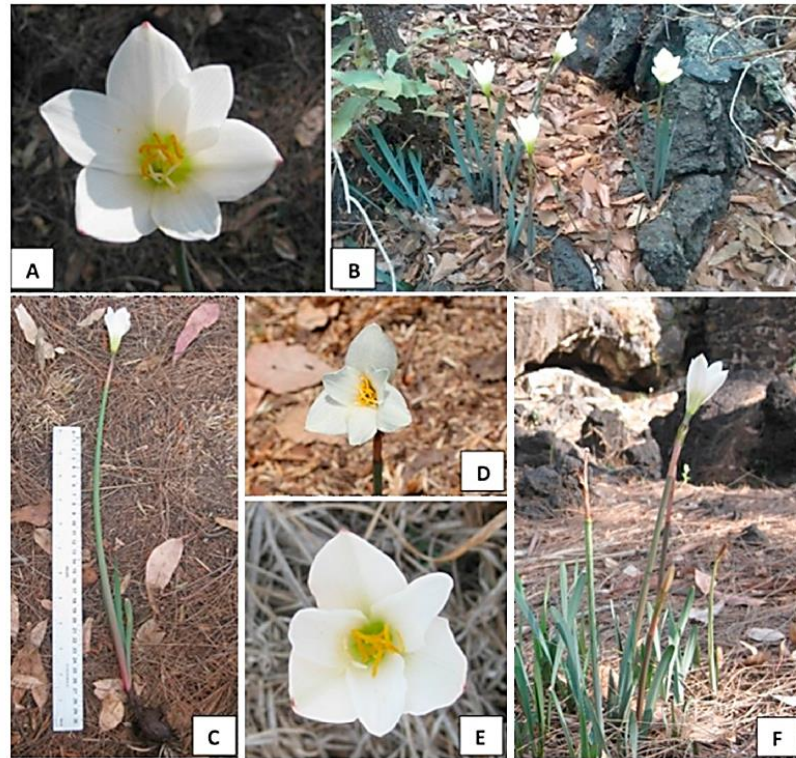


Fig. 2. *Zephyranthes alba*, Mexico. A) Detail of the flower and B) Grouping of plants in "Bosque de Tlalpan" "BT". C) Detail of complete plant with flower, scape, leaves, bulb and roots and D) Detail of the flower of "Zona Arqueológica de Cuicuilco" "ZA". E) Detail of the flower and F) Grouping of plants of "Instituto de Química" "IQ".

species occur in sympatry (Fig. 3), suggesting that hybridization events may explain the observed variation (Damián-Domínguez, 2010; Centeno-Betanzos, 2014). For example, even though *Z. fosteri* generally has pink corollas, in some localities it has white flowers, which has made taxonomic discrimination difficult (Calderón and Rzedowski, 2005). The problematic delimitation within *Zephyranthes* is associated with their great phenotypic plasticity, intra- and interspecific hybridization (Chowdhury and Hubstenberger, 2006; Knox, 2009), and its possible intergeneric hybridization (Tapia-Campos et al., 2012).

Due to the difficult determination of individuals as either *Z. alba* or

*Z. fosteri* in sympatric areas, a study with a multi-marker approach (genetic, morphological and chemical) is required to robustly document the differences between these species. In this paper, we used nuclear microsatellites (nSSR), plant secondary metabolites (alkaloids), and morphological characters (bulbs, flowers, scape, and leaves) to (1) determine if the genetic groups are in concordance with the phenotypic species previously recognized (*Z. alba* and *Z. fosteri*), (2) evaluate if morphological characters permit a clear distinction between *Z. alba* and *Z. fosteri* through multivariate analysis, and (3) establish the alkaloid chemical profiles of pure genetic individuals of *Z. alba* and *Z. fosteri*. This

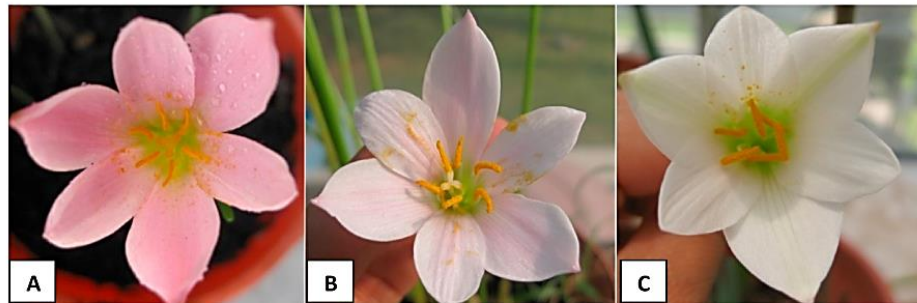


Fig. 3. Floral morphological variation of the *Zephyranthes fosteri* × *Z. alba* complex in central Mexico. A) *Zephyranthes fosteri* flower. B) Probable hybrid *Zephyranthes fosteri* × *Z. alba*. C) *Zephyranthes alba* flower.

work is the basis to evaluate the levels of hybridization and introgression between both species in areas of sympatric distribution in future studies.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study species and collection of plant material

*Zephyranthes fosteri* (Fig. 1) and *Z. alba* (Fig. 2) (Amaryllidaceae: Amaryllidoideae) belong to the Hippeastreae tribe, which contains 10–13 genera and 180 species. In America, several diversification centers have been identified in Chile, Argentina, Brazil (Meerow et al., 2000; Arroyo-Leuenerberger and Dutilh, 2008; Arroyo-Leuenerberger and Leuenerberger, 2009) and Mexico (García et al., 2014). *Z. fosteri* (Fig. 1) is a perennial herb with a height between 5 and 45 cm with bulbs between 1.5 and 4.5 cm. The leaves are narrow (0.5 cm) and can measure up to 35 cm in length. Generally, the petals are pink, however, they can have white or whitish corolla (Calderón and Rzedowski, 2005). *Z. fosteri* flowers from April and is distributed in a wide variety of environments, ranging from very dry environments (grasslands, scrubs) to very humid (oak forest, oak pine, and conifers). As for *Z. alba* (Fig. 2), it can measure up to 50 cm in height with bulbs 10–40 cm in length and leaves of 2 cm in width and 10–40 cm in length. The petals are white (Calderón and Rzedowski, 2005). *Z. alba* is endemic to Mexico City and flowers from April through June, and fruits from May through July (Flagg et al., 2019). It is distributed in dry environments, such as the xerophilous scrub in the Valley of Mexico, although occasionally it occurs in more humid environments. Both species are pollinated and/or visited by bees, flies and ants (Damián-Domínguez, 2010), the seeds are dispersed by wind, showing a high germination capacity (Soriano, 2019). Its flowering peaks are closely related to precipitation events (Damián-Domínguez, 2010).

To minimize the effects of the environmental factors on both the morphological and chemical expression, and to minimize the inter-specific gene flow (i.e. hybridization), we chose six localities with the following characteristics: same geological history (all localities situated in the Transmexican Volcanic Belt), dominant populations (*Zephyranthes* population with abundant individuals), presence of a taxonomically well-defined population without the presence of another *Zephyranthes* species, climate temperate sub-humid, and soil of volcanic origin. In each allopatric site, 20 adult individuals of each species were randomly sampled (*Z. alba* n = 60, *Z. fosteri* n = 60). The study sites were: *Z. alba* = Zona Arqueológica de Cuicuilco “ZA” (19°18′06″N–99°10′54″W; 2294 m a.s.l.), Bosque de Tlalpan “BT” (19°17′34.9″N–99°12′39.6″W; 2451 m a.s.l.) and Instituto de Química “IQ” (19°19′33.4″N–99°10′42.9″W; 2259 m a.s.l.) in Mexico City; *Z. fosteri* = San Miguel Huepalcalco “SM” (18°54′23.4″N–98°45′09.8″W; 2299 m a.s.l.) and Universidad de Morelos “UM” (18°59′0.8″N–99°14′14.5″W; 1962 m a.s.l.) in the state of Morelos, and Mixquiahuala “MI” (20°16′56.8″N–99°09′44.9″W; 2018 m a.s.l.) in the state of Hidalgo.

### 2.2. DNA extraction and PCR amplification of nSSR

Leaves with no apparent damage were collected from 15 individuals of *Zephyranthes* in each study site; two sites for *Z. fosteri* localities (UM and MI), and two for *Z. alba* (BT and ZA). Leaf tissue was preserved at –20 °C until DNA extraction. Total DNA was extracted following a CTAB protocol with some modifications (Doyle and Doyle, 1987). DNA quantification was done through spectrophotometric analysis using a BioPhotometer (Eppendorf, Germany). DNA quality was visually assessed by comparing the intensity of bands with known standards of lambda DNA on agarose gels at 0.8%. All DNA samples were diluted to a final volume of 10 ng/μL.

A total of six primers for nuclear microsatellite loci (nSSR) –OC11, OE09, CO8 and, OA01, (Aldrich et al., 2002), ZAG110 and, ZAG 46 (Steinkellner et al., 1997)–, were initially tested for the presence of amplification products, reproducibility, and polymorphism in six

individuals from different populations. Three primers (ZAG 46, ZAG 110 and OA01) yielded the most successful results and were used for the analysis of all samples. Forward primers were then labeled with either HEX, NED or 6-FAM fluorophores and PCR reactions were set up as Wills et al. (2005) in a final volume of 8 μL. PCR products were resolved on polyacrylamide gels at 6% (7 M urea) at 60 W for 3 h to determine the polymorphic primers. We measured the length of the amplified microsatellite fragments by running an aliquot of each PCR product on an automatic sequencer ABI 3100 (Applied Biosystems, CA, USA) at 35 W for 80–90 min using gene scan ROX-2500 (Applied Biosystems, CA, USA) as size standard. Alleles were scored using the Gene Mapper ver. 3.7 software (Applied Biosystems, CA, USA).

The genetic assignment of individuals collected at allopatric populations as distinct species was performed in STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). This program uses Bayesian grouping to infer the structure of populations from genotypic data, and individuals are probabilistically assigned to *K* populations based on their multilocus genotypes (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003; Hubisz et al., 2009). To determine the number of genetic groups (*K*) with the highest posterior probability, the STRUCTURE program was run at *K* values (*K* = 1 to 4) with six independent repetitions each. For all runs, a burn-in period of 10,000 repetitions was used, followed by 300,000 iterations of the Markov Chain Monte Carlo, which was confirmed to be satisfactory for the parameters to reach convergence. For the analysis of the genetic assignment of the individuals to either *Z. alba* or *Z. fosteri*, the no-mix model with correlated frequencies without any prior population information was used. Finally, each individual was classified based on the model proposed by Vähä and Primmer (2006), in which all individuals with an assignment coefficient  $Q \geq 0.9$  are considered pure individuals of *Z. alba* or *Z. fosteri*. The  $\Delta K$  statistic was used to evaluate the change in the probability value of *K* (Evanno et al., 2005) with Structure Harvester (Earl and vonHoldt, 2012).

### 2.3. Morphological characterization

For morphological analyses, 60 individuals collected from three allopatric sites for each species were used (n = 120 individuals). The floral whorls, as well as the other reproductive structures (stamens, pistil, etc.) were carefully separated. These parts were attached by adhesive tape to paper, where the characters were measured. In total, 20 morphological traits, including flower, bulb, leaf and scape characters were measured in each individual plant. These characters were selected because taxonomic surveys suggest that these structures are highly variable among species of Amaryllidaceae (López-Ferrari and Espejo-Zerna, 2002; Calderón and Rzedowski, 2005; García et al., 2014; Flagg et al., 2019).

Variance analyses (ANOVA) were conducted to determine the effects of species and locality on each of the 20 studied characters (Table 1). ANOVAs were performed to determine the effects of locality on the 20 studied characters per species (within species). Significant mean differences between taxa were determined with a Tukey multiple range test. Discontinuous data were transformed as  $\sqrt{(x + 0.5)}$  (Zar, 2010).

Discriminant function analysis (DFA) was carried out using all morphological variables. Locality was established as the predictor variable. We performed a separate DFA for flower, bulb, and scape morphological characters including all populations without considering their geographic origin. The purpose of this analysis was to determine the most useful characters to discriminate between *Z. alba* and *Z. fosteri*, and to visually assess the separation of individuals into groups. All analyses were performed using the STATISTICA 8.0 program (StatSoft, 2007).

### 2.4. Phytochemical analysis

The bulb of three plants with an assignment coefficient  $Q \geq 0.9$  according to the STRUCTURE software (Fig. 5) were randomly selected

**Table 1**

List of the leaf, flower, bulb, and scape characters examined for the *Zephyranthes alba* and *Z. fosteri* in Mexico.

Character	Description	Units
<i>Flower</i>		
IPL	Internal petal length	mm
GwIP	Greater width of internal petal	mm
MwIP	Minor width of internal petal	mm
OPL	Outer petal length	mm
GwOP	Greater width of outer petal	mm
MwOP	Minor width of outer petal	mm
ASL	Anther stamens length	mm
SFL	Stamen filament length	mm
SiPL	Stigma length	mm
SyPL	Style length	mm
FL	Flower length	cm
OL	Ovary length	cm
<i>Scape</i>		
BL	Bracted length	mm
BW	Bracted width	mm
SL	Scape length	cm
SW	Scape width	cm
SPL	Scape peduncle length	cm
<i>Bulb and leaf</i>		
BW	Bulb width	cm
BL	Bulb length	cm
LW	Leaf width	mm

from two allopatric sites (BT and ZA for *Z. alba*, and UM and MI for *Z. fosteri*). Subsequently, the bulbs of each species were pooled, and the alkaloid profile was characterized. The methanolic extracts were obtained by sectioning the bulb of the selected specimens, which were crushed and placed in a heating stove at 50–60 °C for 12 h for dehydration. The dried bulbs were extracted with MeOH (volume 10:1 dry weight) for 3 days at room temperature. The extract was concentrated in a rotary evaporator. The extraction of alkaloids was performed using an acid-base reaction. Samples of each MeOH extract (500 mg) were dissolved in 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2.5 mL) and partitioned with Et<sub>2</sub>O (5 × 5 mL). The aqueous phase was recovered and basified to a pH between 9 and 10 with NH<sub>4</sub>OH. Subsequently, it was extracted with EtOAc (5 mL × 3) to obtain the alkaloid fraction. The obtained solution was concentrated, and the presence of alkaloids was verified by thin layer chromatography (TLC) stained with Dragendorff's reagent were used to reveal the presence of alkaloids. Silica gel 60 TLC plates with UV<sub>254</sub> fluorescence indicator 20 × 20 cm in size and 0.20 mm thick were used for revealed. The mobile phase used was AcOEt-MeOH (4:2). To determine the alkaloids qualitatively and the value expressed under the curve in relative percentage, the alkaloid extracts obtained from each sample were used and analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS).

#### 2.4.1. GC-MS analysis

GC-MS analyses were performed in a gas chromatograph (Agilent technologies 7890B GC) coupled to an electronic impact mass spectrometer (Agilent technologies 5977A MSD) operating in ionization energy (EI) mode at 70 eV. A DB-5 MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) was used. The temperature program was 100–180 at 15 °C/min<sup>-1</sup>, 1 min hold at 180 °C, 180–300 at 5 °C/min<sup>-1</sup>, and 1 min hold at 300 °C. The injector temperature was 280 °C. The flow rate of He carrier gas was 0.8 mL min<sup>-1</sup>. The split ratio was 1:20. A hydrocarbon mixture (C9–C36, ultra-scientific, TPRH Standard, No. product SNJ-200 C8–C40) was used for performing the RI and RT calibration. GC-MS results were analyzed using AMDIS 2.64 software, NIST 14 and MassHunter Unknown Analysis. The proportion of each compound in the alkaloid fractions was expressed as a percentage of the total alkaloids. These data do not express a real quantification, although they can be used to compare the relative quantities of each component. The alkaloids were identified by comparing their GC-MS spectra and Kovats retention indices (RI) with the library database developed by Dr.

Bastida's research group (Bastida et al., 2011), which contains Amariyllidaceae alkaloids that have been isolated and identified using different spectroscopic techniques such as NMR, UV, CD and MS, as well as literature data. HRESIMS data was obtained on an LC/MSD-TOF.

### 3. Results

#### 3.1. Genetic analysis

The Bayesian analysis with the STRUCTURE software showed two well-delimited genetic groups, in agreement with the two pure phenotypic species previously recognized as *Z. alba* and *Z. fosteri*.

These results were confirmed by the ΔK values, which indicate that K = 2 is the number of genetic groups (Fig. 4). Likewise, analyses using the STRUCTURE software revealed a high proportion of ancestry (Q > 0.9) for all individuals from the same genetic group (*Z. alba* Q = 1–0.99, *Z. fosteri* < 0.91; Fig. 5).

#### 3.2. Morphological analysis

*Zephyranthes alba* differed significantly from *Z. fosteri* in all the examined characters, except for the minor width of internal petal (MwIP). Locality had highly significant effects on all but one character (MwIP) over all populations and species. All the examined characters in *Z. alba* showed higher values compared to *Z. fosteri* (Table 2).

When evaluating the effect of locality on morphological characters within the species, we detected a significant effect of locality on 75% of the characters in *Z. fosteri* and 55% for *Z. alba*. In particular, the characters that did not show significant differences among localities for *Z. alba* were those related to the pistil length, as well as the width of some vegetative (leaf, bulb) and reproductive structures (petals, scape) (Table 3).

On the other hand, the characters that did not show a significant effect of locality on *Z. fosteri* were scape length (SL), bulb width (BW), minor width of internal petal (MwIP), minor width of outer petal (MwOP), and stamen filament length (SFL) (Table 3).

The discriminant function analysis using locality as a grouping variable, revealed that the morphological characters of the flower, the bulb/leaf and the scape separate the individuals from the allopatric zones into two well defined morphologically groups: one group corresponding to *Z. alba* and the other group corresponding to *Z. fosteri*

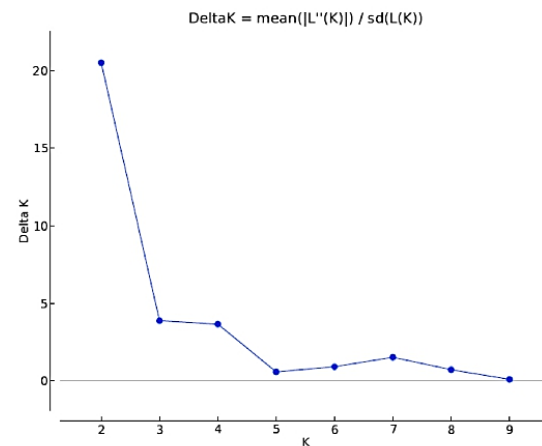


Fig. 4. Estimated genetic groups (K) by cluster analysis in the STRUCTURE program. Graph of the statistic ΔK with respect to genetic grouping K (from 1 to 9). The peak indicates the most likely number of genetic groups (K = 2).





Fig. 5. Genetic assignment of six allopatric populations representing the pure species of *Zephyranthes alba* and *Z. fosteri*, based on analysis of four nuclear microsatellite loci (nSSRs) with the Bayesian method implemented in the STRUCTURE program. Each vertical colored line represents the individual probability of belonging to the group of that color and each population is separated by a black vertical line.

Table 2  
Mean  $\pm$  standard error and ANOVA results ( $F$  statistics) for all characters of *Zephyranthes alba* and *Z. fosteri* in Mexico.

Character	<i>Z. alba</i>	<i>Z. fosteri</i>	$F_{1,90}$	
			Species	Locality
<b>Flower</b>				
IPL	53.48 $\pm$ 6.57	24.87 $\pm$ 3.78	687.87***	177.93***
GwIP	15.34 $\pm$ 2.62	8.22 $\pm$ 2.08	228.75***	61.25***
MwIP	2.69 $\pm$ 0.94	2.35 $\pm$ 1.13	1.48 n.s.	1.03 n.s.
OPL	57.21 $\pm$ 6.78	27.05 $\pm$ 3.45	741.61***	169.37***
GwOP	20.54 $\pm$ 5.33	9.67 $\pm$ 1.87	181.09***	38.71***
MwOP	6.29 $\pm$ 1.23	4.11 $\pm$ 0.76	108.99***	24.15***
ASL	24.58 $\pm$ 4.73	10.10 $\pm$ 1.87	408.02***	133.29***
SFL	8.91 $\pm$ 1.84	6.81 $\pm$ 2.02	31.93***	22.16***
SIPL	7.37 $\pm$ 1.14	2.15 $\pm$ 0.45	832.34***	178.39***
SyPL	26.62 $\pm$ 3.85	11.14 $\pm$ 3.85	391.25***	128.01***
FL	6.22 $\pm$ 0.82	4.63 $\pm$ 0.94	83.24***	44.29***
OL	1.45 $\pm$ 0.27	0.53 $\pm$ 0.15	412.48***	92.83***
<b>Scape</b>				
BL	49.639 $\pm$ 6.27	25.731 $\pm$ 8.04	284.77***	110.20***
BW	9.1048 $\pm$ 2.94	6.70 $\pm$ 1.34	30.37***	37.66***
SL	29.14 $\pm$ 9.91	11.54 $\pm$ 5.15	128.62***	35.51***
SW	0.87 $\pm$ 0.18	0.29 $\pm$ 0.05	437.94***	97.42***
SPL	5.13 $\pm$ 1.69	0.246 $\pm$ 0.23	400.26***	80.47***
<b>Bulb and leaf</b>				
BW	4.27 $\pm$ 0.72	2.13 $\pm$ 0.53	287.78***	62.36***
BL	4.40 $\pm$ 0.64	2.22 $\pm$ 0.52	352.90***	95.26***
LW	10.54 $\pm$ 1.75	1.72 $\pm$ 0.39	1195.28***	246.69***

Abbreviations of characters are described in Table 1.  $F$  significant at  $P < 0.001$  (\*\*\*) ;  $P < 0.01$  (\*\*);  $P < 0.05$  (\*); and n.s. = no significant differences.

(Fig. 6).

The discriminant axes 1 (DF1) and 2 (DF2) together explained 92.12% of the variance in the original dataset. Characters such as internal petal length (IPL) and outer petal length (OPL) showed the highest absolute values in the discriminant function coefficients for DF2 (Table 4). For its part, the characters stigma pistil length (SIPL) and outer petal length (OPL) recorded the highest values of this coefficient for DF1. Meanwhile, OPL and IPL were the most important characters for the DFA using only the flower characters (Table 4). On the other hand, the DFA of the vegetative characters showed that leaf width (LW) and bulb length (BL) were the most important characters in both discriminant axes (Table 4).

Finally, the DFA with the scape characters revealed that bracted length (BL) and scape width (SW) had the highest importance value in the ordering of the data in DF1, while that bracted width (BW) and scape length (SL) did it for DF2 (Table 4).

### 3.3. Chemical analysis

TLC revealed under Dragendorff staining the presence of alkaloids in the *Z. alba* and *Z. fosteri* bulbs. In total, the presence of 10 major alkaloid compounds were detected through the coupled GC-MS analysis showing their relative alkaloid abundance (Table 5).

The alkaloid profile showed contrasting qualitative differences

between both species, and only lycorine was present in the four samples (Table 5). For *Z. fosteri*, the most abundant alkaloid for the two allopatric zones was lycorine, followed by haemanthamine for UM locality and unguinorine for MI (Fig. 7A). In the case of *Z. alba*, the major alkaloids for both allopatric localities were galanthamine, followed by lycorine. Galanthamine, and lycorine have been previously reported from *Z. alba*, formerly *Z. concolor* (Reyes-Chilpa et al., 2011), while lycorine and 2-O-Methylpancracine were reported from *Z. fosteri* (Centeno-Betanzos et al., 2021).

## 4. Discussion

Taxa delimitation of *Z. alba* and *Z. fosteri* has been difficult. The fact that some individuals collected at sympatric sites exhibit diagnostic features of both species, such as flower color and scape length, has led to significant taxonomic confusion, especially in central Mexico, where the distribution of both *Z. alba* and *Z. fosteri* meet. In this study, we used a multi-marker approach (genetic, morphological and chemical markers) to identify the phenotypic and genetic characteristics that allow the differentiation of these species in allopatric stands. In general, we found that both species were different based on their floral morphology (petal and stigma length), nSSR loci, and alkaloid content (galanthamine and lycorine). Besides establishing the characters that enable the differentiation of both *Z. alba* and *Z. fosteri*, the results of this study provide a framework to further studies aiming to determine if hybridization and introgression occur between these species.

## 5. Genetic variation of *Zephyranthes alba* and *Z. fosteri*

The field determination from the flower-morphological characters of *Z. alba* and *Z. fosteri* is supported by microsatellite analyses (nSSR), which identify two well defined genetic groups in allopatric conditions. This result suggests that these populations are useful as reference populations because they maintain their own genetic identities (Templeton, 1989). Several authors have documented that the appropriate number of nSSR for the adequate detection of the number of genetic groups depends on their exclusion power, efficiency, and accuracy (e.g., Burgarella et al., 2009; Castillo-Mendoza et al., 2018; Soto et al., 2018).

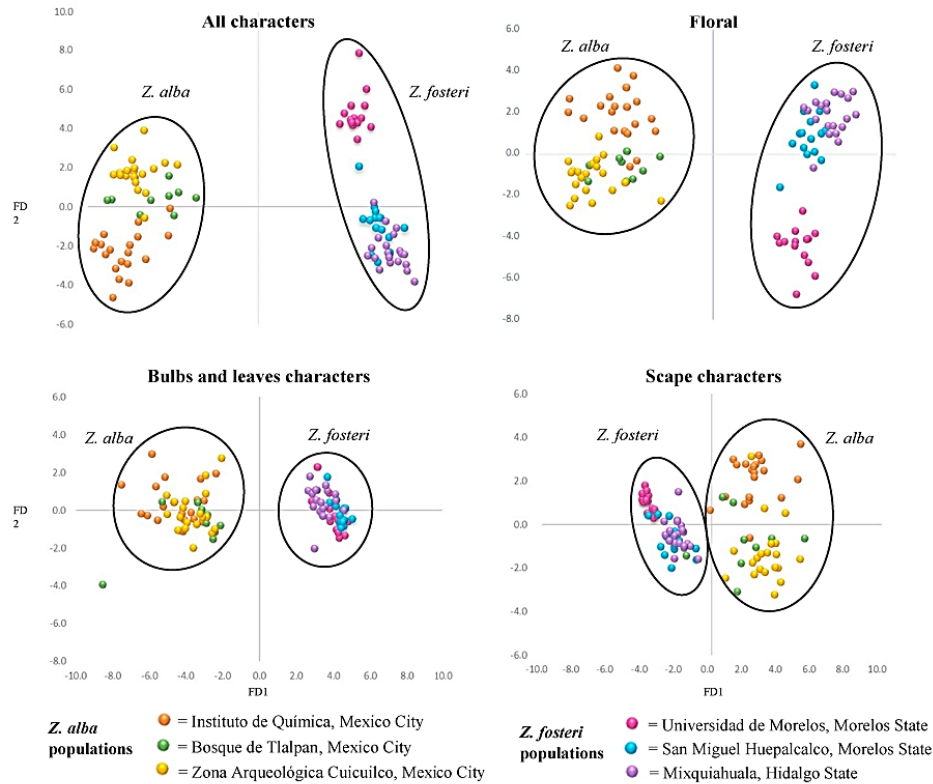
We found evidence of a non-significative proportion ( $Q < 0.1$ ; Vähä and Primmer, 2006) of foreign genome in some individuals inside allopatric populations of *Z. alba*. One explanation is that *Z. alba* is being pollinated by bees (*Dialictus* sp., *Apis mellifera*), ants, butterfly, and flies (Damián-Domínguez et al., 2009) which can facilitate the gene flow between populations. Beekman and Ratnieks (2000) documented that the mean distance foraged of *A. mellifera* was 5.5 km (10% of the bees foraged within 0.5 km of the hive whereas 50% went more than 6 km, 25% more than 7.5 km and 10% more than 9.5 km from the hive). Therefore, genetic flow can occur over kilometers among *Zephyranthes* populations. This scenario shows that individuals of *Z. alba* and individuals of other species of *Zephyranthes* may promote hybridization process, as suggested by Damián-Domínguez et al. (2010) and Centeno-Betanzos (2014), and even intergeneric hybridization events can occur (Tapia-Campos et al., 2012). Consequently, sporadic long-distance

**Table 3**

Mean ± standard error and ANOVA results to determine the effect of the locality on all the morphological characters measured by *Zephyranthes* species (*Z. alba* and *Z. fosteri*).

Character	Localities of <i>Z. alba</i>				Localities of <i>Z. fosteri</i>			
	IQ	BT	MB	F <sub>2,47</sub>	UM	SM	MI	F <sub>2,47</sub>
<b>Flower</b>								
IPL	5.54 <sup>a</sup>	48.42 <sup>b</sup>	53.95 <sup>ab</sup>	4.581*	20.57 <sup>a</sup>	26.21 <sup>b</sup>	26.96 <sup>b</sup>	21.620***
GwIP	16.53 <sup>a</sup>	13.90 <sup>b</sup>	14.90 <sup>ab</sup>	4.380*	6.50 <sup>a</sup>	9.07 <sup>b</sup>	8.73 <sup>b</sup>	11.641***
MwIP	2.94	2.22	2.66	n.s.	2.10	2.51	2.35	n.s.
OPL	57.02 <sup>ab</sup>	52.93 <sup>a</sup>	59.53 <sup>b</sup>	3.487*	24.17 <sup>a</sup>	27.50 <sup>b</sup>	29.01 <sup>b</sup>	7.849**
GwOP	21.77	18.77	20.2	n.s.	8.13 <sup>a</sup>	10.61 <sup>b</sup>	9.85 <sup>b</sup>	13.224***
MwOP	5.93	6.3	6.65	n.s.	3.79	4.25	4.23	n.s.
ASL	9.99 <sup>a</sup>	6.68 <sup>b</sup>	8.94 <sup>a</sup>	18.432***	5.65 <sup>a</sup>	8.31 <sup>b</sup>	5.95 <sup>a</sup>	15.439***
SFL	27.74 <sup>a</sup>	19.79 <sup>b</sup>	23.83 <sup>c</sup>	15.765***	9.44	10.66	9.98	n.s.
SIPL	7.06	7.53	7.59	n.s.	1.92 <sup>a</sup>	1.98 <sup>a</sup>	2.58 <sup>b</sup>	10.364***
SyPL	28.00 <sup>a</sup>	22.51 <sup>b</sup>	27.23 <sup>a</sup>	10.051***	14.83 <sup>a</sup>	10.78 <sup>b</sup>	8.37 <sup>b</sup>	17.396***
FL	5.75 <sup>a</sup>	6.78 <sup>b</sup>	6.45 <sup>b</sup>	7.978**	3.50 <sup>a</sup>	4.90 <sup>b</sup>	5.28 <sup>b</sup>	36.175***
OL	1.44	1.30	1.53	n.s.	0.45 <sup>a</sup>	0.51a <sup>b</sup>	0.63 <sup>b</sup>	5.811**
<b>Scape</b>								
BL	48.44 <sup>a</sup>	46.38 <sup>a</sup>	52.46 <sup>b</sup>	4.240*	16.29 <sup>a</sup>	30.37 <sup>b</sup>	28.18 <sup>b</sup>	38.912***
BW	6.40 <sup>a</sup>	10.09 <sup>b</sup>	11.31 <sup>b</sup>	34.369***	5.37 <sup>a</sup>	7.20 <sup>b</sup>	7.23 <sup>b</sup>	16.628***
SL	35.00 <sup>a</sup>	26.55 <sup>ab</sup>	25.14 <sup>b</sup>	6.622**	12.95	12.34	9.31	n.s.
SW	0.89	0.75	0.90	n.s.	0.26 <sup>a</sup>	0.33 <sup>b</sup>	0.71 <sup>a</sup>	8.472***
SPL	5.50	4.63	4.99	n.s.	0.20 <sup>a</sup>	0.39 <sup>b</sup>	0.10 <sup>a</sup>	12.307***
<b>Bulb and leaf</b>								
BW	4.45	3.86	4.29	n.s.	2.02	2.33	1.98	n.s.
BL	4.77 <sup>a</sup>	4.00 <sup>b</sup>	4.23 <sup>b</sup>	7.173**	2.06 <sup>a</sup>	2.52 <sup>b</sup>	2.00 <sup>a</sup>	7.631**
LW	10.94	10.55	10.15	n.s.	1.77 <sup>a</sup>	2.07 <sup>b</sup>	1.25 <sup>c</sup>	25.601***

Abbreviations of characters are described in Table 1. F significant at P < 0.001 (\*\*\*); P < 0.01 (\*\*); P < 0.05 (\*); and n.s. = no significant differences. Different letters denote significant differences between localities by *Zephyranthes* species (Tukey P < 0.05).



**Fig. 6.** Discriminant function analysis of the morphological characters of *Z. alba* and *Z. fosteri* in six allopatric sites.

**Table 4**  
Standardized canonical discriminant coefficients of 20 morphological variables measured in *Zephyranthes alba* and *Z. fosteri* in central Mexico.

Character	All characters		Flower		Bulb/Leaf		Scape	
	DF1	DF2	DF1	DF2	DF1	DF2	DF1	DF2
BL	0.189	-0.422	-	-	-	-	<b>0.566</b>	-0.228
BW	0.412	0.125	-	-	-	-	0.033	<b>0.412</b>
LW	-0.562	-0.133	-	-	<b>-0.852</b>	<b>-0.603</b>	-	-
SL	0.033	-0.297	-	-	-	-	-0.174	0.355
SW	0.185	0.438	-	-	-	-	<b>0.412</b>	0.185
SPL	-0.015	-0.319	-	-	-	-	0.319	0.229
BW	0.253	0.137	-	-	0.037	0.205	-	-
BL	-0.397	-0.001	-	-	<b>-0.466</b>	<b>0.814</b>	-	-
FL	0.165	-0.523	0.135	0.516	-	-	-	-
OL	-0.517	0.278	-0.476	-0.153	-	-	-	-
IPL	0.677	-4.060	0.885	3.398	-	-	-	-
GwIP	0.311	-0.323	0.292	0.212	-	-	-	-
MwIP	-0.160	0.087	-0.032	-0.188	-	-	-	-
OPL	<b>-1.010</b>	<b>3.867</b>	<b>-0.933</b>	<b>-3.092</b>	-	-	-	-
GwOP	0.139	-0.226	-0.102	0.430	-	-	-	-
MwOP	-0.621	0.177	-0.693	-0.050	-	-	-	-
SFL	-0.556	0.154	-0.556	0.124	-	-	-	-
ASL	0.376	-0.789	0.491	0.783	-	-	-	-
SiPL	<b>-0.739</b>	0.111	-0.687	-0.153	-	-	-	-
SyPL	-0.291	0.947	-0.428	-1.007	-	-	-	-
Cum.Prop	<b>82.200</b>	<b>92.120</b>	<b>81.249</b>	<b>93.450</b>	<b>98.817</b>	<b>99.798</b>	<b>77.722</b>	<b>94.280</b>

Abbreviations of characters are described in Table 1. Letter in bold shows the highest absolute values in the discriminant function coefficients. The variables with the highest absolute values in each discriminant function are shown in bold.

**Table 5**  
Alkaloid profiles of genetically pure *Zephyranthes alba* and *Z. fosteri* from allopatric sites.

Compound	RI <sup>a</sup>	RT <sup>b</sup>	<i>Z. alba</i>		<i>Z. fosteri</i>	
			ZA	BT	UM	MI
			Relative alkaloid abundance (%) <sup>c</sup>			
Galanthamine (1)	2406	20.37–20.41	<b>87.71<sup>d</sup></b>	<b>91.41<sup>d</sup></b>		
Sanguinine (2)	2422	20.53–20.66	2.38	3.44		
Epigalanthamine (3)	2454.6	21.00–21.09	0.38	0.22		
Narwedine (4)	2483	21.44–21.47	1.05	0.63		
2-O-Methylpancracine (5)	2610.7	23.45				2.77
Haemanthamine (6)	2641.3	23.70			26.19	
Tazettine (7)	2653	23.91			16.37	
Lycorine (8)	2746	25.26–25.37	8.45	4.28	<b>46.36<sup>d</sup></b>	<b>88.82<sup>d</sup></b>
Ungiminorine (9)	2901.2	27.40				<b>8.39</b>
2-Hydroxyhomolycorine (10)	2970.2	27.67			11.06	

<sup>a</sup> Relative retention index (Kovats retention index) of alkaloids in the capillary column.

<sup>b</sup> Retention time of alkaloids in the capillary column.

<sup>c</sup> Percentage with respect to the total content of alkaloids detected.

<sup>d</sup> Most abundant alkaloids in bold.

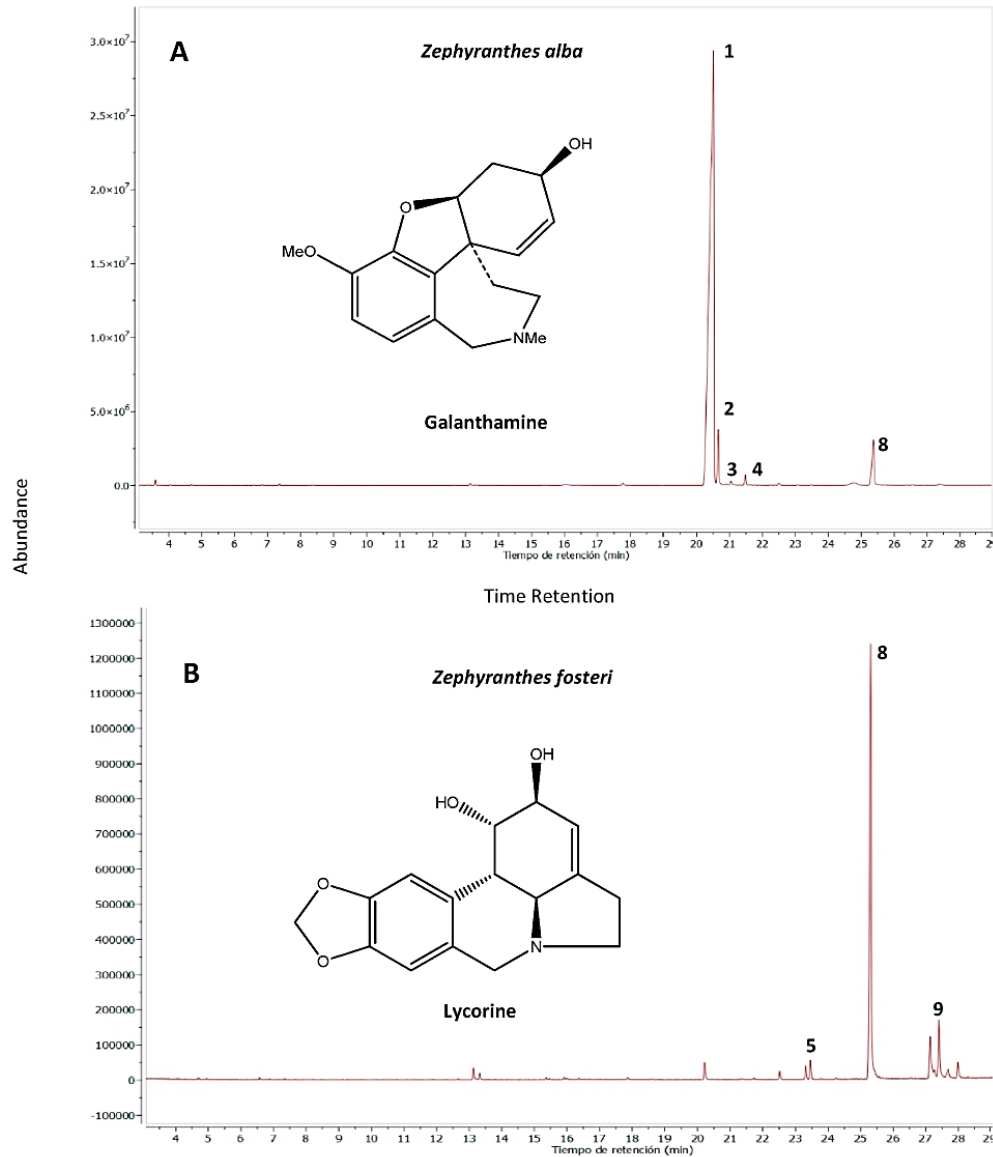
pollination events can still have some impact on the genetic structure and diversity of distant populations.

### 5.1. Morphological expression

Identification of *Zephyranthes* species is frequently difficult due to a continuum of the morphological variation among species. In this sense, intensive morphometric studies arise as an important marker to recognize diagnostic characters that enable the discrimination among species. Our results showed that the differences of floral size-related characters are a powerful character that allow the differentiation among *Z. alba* and *Z. fosteri*. The variables with the highest standardized discriminant coefficients in DFA were internal petal length (IPL), outer petal length (OPL), and stigma pistil length (SiPL). Therefore, these may be considered as diagnostic characters (Table 4). In addition, our results suggest that the morphological characters that did not show significant differences among localities for *Z. alba* (flower: MwIP, GwOP, MwOP, SiPL, OL; scape: SW, SPL; bulb and leaf: BW, LW) and for *Z. fosteri* (flower: MwIP, MwOP, SFL; scape: SL; bulb and leaf: BW) (Table 3), could be used as species-specific characters in future studies to evaluate

hybridization events in sympatric zones between *Z. alba* and *Z. fosteri*.

In this study, to minimize the environmental effects on the morphological variation, six localities with common characteristics were chosen: geological history (all localities situated in the Transmexican Volcanic Belt), climate temperate sub-humid, and soil of volcanic origin. However, locality had a highly significant effect on the overall plant morphology of *Z. fosteri* and in 55% of the characters measured in *Z. alba* (Table 3). The fact that both species show significant phenotypic variation among localities may be the result of an ecological or environmental heterogeneity in a spatial fine-scale. Abiotic variables such as water stress, mineral nutrient deficiency, and geographical position may have an effect in the overall plant morphology. For example, Paniagua-Ibañez et al. (2015) documented that some abiotic variables (i. e., altitude, soil NH<sub>4</sub> and PO<sub>4</sub> content, and soil pH), contribute to the differential phenotypic expression of *Cosmos bipinnatus* (Asteraceae) in the Transmexican Volcanic Belt. Therefore, species with wide geographic distribution show local adaptations or an increased phenotypic variability, promoting different morphological characters in response to abiotic conditions (Kollmann and Bañuelos, 2004), and may exhibit differential phenotypes that eventually lead to taxonomic



**Fig. 7.** Representative chromatograms of the bulb's alkaloid extract. Only the peaks for the alkaloids with the highest relative abundance are labeled. Peaks without assigned numbers are not alkaloids (mainly fatty acids). **A)** *Zephyranthes alba* from "BT" locality: galanthamine (1), sanguinine (2), narwedine (4), lycorine (8). **B)** *Z. fostereri* from "MF" locality: 2-O-Methylpancracine (5), lycorine (8), unguiminorine (9).

confusion (Semir et al., 2014). In extreme cases, morphological plasticity within a species may promote the split of one real taxon into two, or it may cause the merging of two real taxa into one species (Kieltyk and Mirek, 2014). Therefore, we suggest that further morphological studies of the *Z. alba* and *Z. fostereri* complex should analyze each sympatric zone independently to minimize the effects of confounding factors such as spatial variation.

On the other hand, all the examined morphological characters (bulb, flower, leaf, and scape) differed significantly between *Z. alba* and *Z. fostereri* [except minor width of internal petal (MwIP)]. These markers

demonstrated geographic consistency, indicating that each species show some degree of genetic cohesiveness.

### 5.2. Expression of secondary metabolites

Of the 10 alkaloids identified in this study, only lycorine is present in both species in the four localities studied. Five alkaloids are present only in *Z. fostereri*, and four exclusively in *Z. alba* (Table 5). In general, *Z. alba* showed greater homogeneity in the expression of alkaloids, which is consistent with the lower morphological and genetical variation

observed. On the other hand, *Z. fosteri* differed in their alkaloid profile for the two localities, which is consistent with the higher morphological and genetical heterogeneity observed among both allopatric populations. Therefore, the alkaloid profile is supported by morphological, and genetic (nSSR) markers, which denotes that each species maintains its own genetic identity, and morphological and chemical expression that allow a clear separation between the study species in allopatric sites. Galanthamine is highly abundant and may be considered as a diagnostic chemical marker for *Z. alba*. On the contrary, no diagnostic marker could be discerned for *Z. fosteri*, however a characteristic of this species is that lycorine is present in abundance in both allopatric sites (Table 5). In this work, we chose sampling localities with similar geological history and environmental conditions to reduce their effects on the overall plant phenotype. However, the *Zephyranthes* sp. phenotype was significantly affected by the locality. In particular, a number of studies have pointed out the environmental pressures as a key driver of the chemical expression of plants (Xu et al., 2015; Glassmire et al., 2016). This explains the results found in *Zephyranthes*, where significant variation was found in the alkaloid profile among localities, mainly for *Z. fosteri* populations. However, as discussed above, galanthamine and lycorine are characteristic alkaloids for *Z. alba* and *Z. fosteri*, respectively. This suggests that despite the environmental effects, each species preserves its own chemical identity. All, in all, the molecular, morphological and chemical markers were useful in the delimitation of both *Zephyranthes* species. Furthermore, a similar multi-marker approach may be used to assess species boundaries among the nearly 70 species of *Zephyranthes*.

## 6. Conclusions

We found that genetic (nSSR), morphological (flower, bulb, scape, and leaf) traits, and their alkaloids characterize *Z. alba* and *Z. fosteri* from allopatric localities and may aid for future studies of individuals with intermediate morphology between these species in sympatric areas, which may be promoted by hybridization events.

## Author statement

L. Y. Centeno-Betanzos: Experimental work: obtaining and analyzing results of morphometry, chemistry and DNA; writing and editing of the original and final draft. A. López-Caamal: analysis of morphometry and DNA results; editing of the original and final draft. N. Cortés and M. León: Obtaining and analyzing GC/MS results. E. Osorio and J. Bastida: Chemical analysis and acquisition of funds. Z. Cano: Contribution to botany and ecology. E. Tovar-Sánchez and R. Reyes-Chilpa: Conceptualization, writing and editing of the final draft and acquisition of funds.

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgements

This project was financially supported by a grant from CONACyT (261899) for doctoral studies and a grant from PAPIIT-DGAPA-UNAM (IG200321) to Lucia Yoscelina Centeno Betanzos to finish the writing. This work is presented in partial fulfillment towards Lucia Yoscelina Centeno Betanzo's doctoral degree in the program "Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México". Alfredo López-Caamal acknowledges CONACyT for the postdoctoral fellowship granted. We gratefully thank to BIFRENES (416RT0511) for its support for the development of the research stay in Antioquia Faculty, Colombia. We thank M.Sc. Laura Márquez Valdelamar of the Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y la Salud at

Instituto de Biología, UNAM, and M. Sc. Everardo Tapia Mendoza of the LANCIC at Instituto de Química, UNAM per chemical analyses (CG-MS). We thank Dra. Leticia Valencia Cuevas and three anonymous reviewers for helpful comments on an earlier version of this manuscript.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bse.2022.104398>.

## References

- Aldrich, P., Michler, C., Sun, W., Romero-Severson, J., 2002. Microsatellite markers for northern red oak (Fagaceae: *Quercus rubra*). Mol. Ecol. Notes 2, 472–474. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00282.x>.
- Arnold, M., 2006. Evolution through Genetic Exchange. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Arroyo-Leuenberger, S., Leuenberger, B., 2009. Revision of *Zephyranthes andina* (Amaryllidaceae) including five new synonyms. Willdenowia 39 (1), 145–159. <https://doi.org/10.3372/wi.39.39116>.
- Arroyo-Leuenberger, S., Dutilh, J., 2008. Amaryllidaceae. In: Fo Zuloaga, O., Morrone, Belgrano, M.J. (Eds.), Catálogo de las plantas vasculares del Cono Sur (Argentina, sur de Brasil, Chile, Paraguay).
- Avise, J., 2004. Molecular Markers, Natural History, and Evolution. Sinauer Associates, Sunderland.
- Bastida, J., Berkov, S., Torres, L., Pigni, N., de Andrade, J., Martínez, V., Cadina, C., Viladomat, F., 2011. In: Muñoz-Torrero, D. (Ed.), Chemical and Biological Aspects of Amaryllidaceae Alkaloids. Recent Advances in Pharmaceutical Sciences. Transworld Research Network, Trivandrum, India, pp. 65–100.
- Beekman, M., Ratnieks, F., 2000. Long-range foraging by the honey-bee, *Apis mellifera* L. Funct. Ecol. 14 (4), 490–496. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2000.00443.x>.
- Burgarella, C., Lorenzo, Z., Jabbour-Zahab, R., Lumaret, R., Guichoux, E., Petit, R., Soto, A., Gil, L., 2009. Detection of hybrids in nature: application to oaks (*Quercus suber* and *Q. ilex*). Heredity 102, 442–452. <https://doi.org/10.1038/hdy.2009.8>.
- Calderón, G., Rzedowski, J., 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología, A. C. and Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán.
- Castillo-Mendoza, E., Salinas-Sánchez, D., Valencia-Cuevas, L., Zamilpa, A., Tovar-Sánchez, E., 2018. Natural hybridisation among *Quercus glabrescens*, *Q. rugosa* and *Q. obtusata* (Fagaceae): microsatellites and secondary metabolites markers. Plant Biol. 21 (1), 110–121. <https://doi.org/10.1111/plb.12899>.
- Centeno-Betanzos, L., 2014. Estudio anatómico, químico y actividad biológica de *Zephyranthes fosteri*, *Habranthus concolor* y *Habranthus aff. concolor*. Master dissertation. Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City.
- Centeno-Betanzos, L., Reyes-Chilpa, R., Pigni, N., Jankowski, Ch, Torres-Clavería, L., Bastida, J., 2021. Plants of the 'Libellus de medicinalibus indorum herbari' from Mexico, 1552. *Zephyranthes fosteri* (Amaryllidaceae) alkaloids. Chem. Biodivers. 18, 1–11. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000834>.
- Cheng, D., Vrieling, K., Klinkhamer, P., 2011. The effect of hybridization on secondary metabolites and herbivore resistance: implications for the evolution of chemical diversity in plants. Phytochemistry Rev. 10, 107–117. <https://doi.org/10.1007/s11101-010-9194-9>.
- Chowdhury, M., Hubstenberger, J., 2006. Evaluation of cross pollination of *Zephyranthes* and *Habranthus* species and hybrids. JAAS 60 (1), 113–118. <https://scholarworks.uark.edu/jaas/vol60/iss1/18>.
- Cortes, N., Saboga-Guáqueta, A., Cardona-Gómez, G.P., Osorio, E., 2019. Neuroprotection and improvement of the histopathological and behavioral impairments in a murine Alzheimer's model treated with *Zephyranthes carinata* alkaloids. Biomedicine & Pharmacotherapy 110, 482–492. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.013>.
- Damián-Domínguez, M., Cano-Santana, Z., Castellano-Vargas, I., 2009. Fenología reproductiva de *Habranthus concolor* y *H. aff. concolor* (Amaryllidaceae) y su relación con la lluvia. In: Lot, A., Cano-Santana, Z. (Eds.), Biodiversidad del Pedregal de San Ángel. UNAM, Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel y Coordinación de la Investigación Científica, Mexico City, pp. 319–328.
- Damián-Domínguez, M., 2010. Fenología reproductiva de *Habranthus concolor* y *Habranthus aff. concolor* en la reserva ecológica del Pedregal de San Ángel, D. F. Dissertation. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.
- Doyle, J., Doyle, J., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bulletin 19, 11–15.
- Earl, D., vonHoldt, B., 2012. Structure harvester: a website and program for visualizing STRU CTU RE output and implementing the Evanno method. Conserv. Genet. Resour. 4, 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol. Ecol. 14, 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>.
- Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J., 2003. Inference of population structure: extensions to linked loci and correlated allele frequencies. Genetics 164, 1567–1587.
- Flagg, R., Smith, G., García-Mendoza, A., 2019. Two new white-flowered Mexican *Zephyranthes* Species (Amaryllidaceae: Amaryllidoideae) with different breeding

- systems. *Novon A J. Bot. Nomencl.* 27 (4), 222–230. <https://doi.org/10.3417/2019380>.
- Furmanowa, M., Oledzka, H., 1978. Comparison of the effects of extracts of *Zephyranthes robusta* Baker, Haemanthamine and Lycorine on mitosis and DNA synthesis in allium cepa roots. *Caryologia* 31, 449–456. <https://doi.org/10.1080/00087114.1978.10796764>.
- García, N., Meerow, A., Soltis, D., Soltis, P., 2014. Testing deep reticulate evolution in Amaryllidaceae Tribe Hippeastreae (Asparagales) with ITS and chloroplast sequence data. *Syst. Bot.* 39 (1), 75–89. <https://doi.org/10.1600/036364414X678099>.
- Gaskin, J., Schaal, B., 2002. Hybrid Tamarix widespread in US invasion and undetected in native Asian range. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 99 (17), 11256–11259. <https://doi.org/10.1073/pnas.132403299>.
- Georgescu, L., Stefanakis, M., Kolkini, S., Katerinopoulos, H., Printzos, S., 2016. Chemical and genetic characterization of *Phlomis* species and wild hybrids in Crete. *Phytochemistry* 122, 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.11.007>.
- Glassmire, A., Jeffrey, C., Forister, M., Parchman, T., Nice, C., Jahner, J., Wilson, J., Walla, T., Richards, L., Smlanich, A., Leonard, M., Morrison, C., Simbana, W., Salagaje, L., Dodson, C., Miller, J., Tjep, E., Villamarín-Cortez, S., Dyer, L., 2016. Intraspecific Phylogenetic Variation Shapes Community and Population Structure for Specialist Caterpillars, vol. 212. *New Phytologist Foundation*, pp. 208–219. <https://doi.org/10.1111/nph.14038>.
- Harrison, R., Larson, E., 2014. Hybridization, introgression, and the nature of species boundaries. *J. Hered.* 105, 795–809. <https://doi.org/10.1093/jhered/edu033>.
- Herrera, M., Machocho, A., Brun, R., Villadomat, F., Codina, C., Bastida, J., 2001. Crinane and lycorane type alkaloids from *Zephyranthes citrina*. *Planta Med.* 67, 191–193. <https://doi.org/10.1055/s-2001-11495>.
- Hubisz, M., Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J., 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* 9, 1322–1332. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x>.
- Katoch, D., Singh, B., 2015. Phytochemistry and pharmacology of genus *Zephyranthes*. *Med. Aromatic Plants* 4 (212), 2167. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000212.0412>.
- Kieltyk, P., Mirek, Z., 2014. Taxonomy of the *Solidago virgaurea* group (Asteraceae) in Poland, with special reference to variability along an altitudinal gradient. *Folia Geobot.* 49, 259–282. <https://doi.org/10.1007/s12224-013-9180-2>.
- Knox, G., 2009. Rainlily, *Zephyranthes* and *Habranthus* spp.: Low Maintenance Flowering Bulbs for Florida Gardens. Environmental Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, USA.
- Kollmann, J., Bañuelos, J., 2004. Latitudinal trends in growth and phenology of the invasive alien plant *Impatiens glandulifera* (Balsaminaceae). *Divers. Distrib.* 10, 377–385. <https://doi.org/10.1111/j.1366-9516.2004.00126.x>.
- Kornienko, A., Evidente, A., 2008. Chemistry, biology, and medicinal potential of narciclasine and its congeners. *Chem. Rev.* 108, 1982. <https://doi.org/10.1021/cr078198u>. –2014.
- López-Ferrari, A., Espejo-Zerna, A., 2002. Flora de Veracruz. Amaryllidaceae. Fascículo 128. Edit. Instituto de Ecología, A. C. Xalapa, Veracruz.
- Meerow, A., Guy, C., Li, Q., Yang, S., 2000. Phylogeny of the American Amaryllidaceae based on nrDNA ITS sequences. *Syst. Bot.* 25, 708–726. <https://doi.org/10.2307/2666729>.
- Mutsuga, M., Kojima, K., Nose, M., Inoue, M., Ogihara, Y., 2001. Cytotoxic activities of alkaloids from *Zephyranthes carinata*. *Natural Medicines* 55, 201–204. <https://doi.org/10.1021/np50064a020>.
- Oluymisi, O., Oriabure, A., Adekunle, A., Ramsay, K., Shyaula, S., Chodhary, M., 2015. Bioassay-guided isolation of Poliovirus-inhibiting constituents from *Zephyranthes candida*. *Pharmaceut. Biol.* 53, 882–887. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.946061>.
- Paniagua-Ibáñez, M., López-Camal, A., Mussali-Galante, P., Sánchez-Salinas, E., Ortiz-Hernández, M.L., Ramírez-Rodríguez, R., Tovar-Sánchez, E., 2015. Morphological variation of *Cosmos bipinnatus* (Asteraceae) and its relation to abiotic variables in central Mexico. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 88 (1), 14. <https://doi.org/10.1186/s40693-015-0044-4>.
- Pettit, G., Cragg, G., Singh, S., Duke, J., Doubek, D., 1990. Antineoplastic agents, 162. *Zephyranthes candida*. *J. Nat. Prod.* 53, 176–178. <https://doi.org/10.1021/np50067a026>.
- Pritchard, J., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>.
- Quattrocchi, U., 2012. *CRC World Dictionary of Medicinal and Poisonous Plants: Common Names, Scientific Names, Eponyms, Synonyms, and Etymology* (5 Volume Set). Taylor & Francis CRC Press.
- Reyes-Chilpa, R., Berkov, S., Codina, C., Villadomat, F., Bastida, J., Jankowski, C., Arseneau, S., Hernández-Ortega, S., Clotet-Codina, I., Esté, A., 2011. Acetylcholinesterase-inhibiting alkaloids from *Zephyranthes concolor*. *Molecules* 16, 9520–9533. <https://doi.org/10.3390/molecules16119520>.
- Rieseberg, L., Ellstrand, N., 1993. What can morphological and molecular markers tell us about plant hybridization? *Crit. Rev. Plant Sci.* 12, 213–241. <https://doi.org/10.1080/07352689309701902>.
- Rieseberg, L., Wendel, J.F., 1993. Introgression and its consequences in plants. In: Harrison, R.G. (Ed.), *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*. Oxford University Press, New York, USA, pp. 70–109.
- Rzedowski, G., Rzedowski, J., 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. Comisión Nacional para el Estudio de la Biodiversidad and Instituto de Ecología, AC, Mexico.
- Semir, J., Loeuille, B., Monge, M., 2014. The *Lychnophora graminogolensis* (Asteraceae-Vernonieae) species complex: two new species and comments on the identity of *Lychnophora graminogolensis*. *Syst. Bot.* 39, 988–996. <https://doi.org/10.1600/036364414X682193>.
- Soriano, G.A.B., 2019. Propagación y perfil fitoquímico de *Habranthus concolor* Lindl. (Amaryllidaceae). Dissertation. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City.
- Soto, A., Rodríguez-Martínez, D., López De Heredia, U., 2018. SIMHYB: a simulation software for the study of the evolution of hybridizing populations. Application to *Quercus ilex* and *Q. suber* suggests hybridization could be underestimated. *IFOREST* 11, 99–103. <https://doi.org/10.3832/ifor2569-011>.
- Spurrier, M., Smith, G., Flagg, R., Serna, A., 2015. A new species of *Zephyranthes* (Amaryllidaceae) from Mexico. *Novon A J. Bot. Nomencl.* 24, 289–295. <https://doi.org/10.3417/2014029>.
- StatSoft, Inc., 2007. STATISTICA (Data Analysis Software System) version 8. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
- Steinkellner, H., Lexer, C., Turetschek, E., Glössl, J., 1997. Conservation of (GA)n microsatellite loci between *Quercus* species. *Mol. Ecol.* 6, 1189–1194. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1997.00288.x>.
- Tapia-Campos, E., Rodríguez-Domínguez, J., Revuelta-Arreola, M., van Tuyl, J., Barba-González, R., 2012. Mexican geophytes II. The genera *hymenocallis*, *sprekelia* and *Zephyranthes*. *Flor. Orn. Biotechnol.* 6 (1), 129–139.
- Templeton, A., 1989. The meaning of species and speciation: a genetic perspective. In: Otte, D., Endler, J.A. (Eds.), *Speciation and its Consequences*. Sinauer, Sunderland, MA, USA, pp. 159–184.
- Vähä, J., Primmer, C., 2006. Efficiency of modelbased Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. *Mol. Ecol.* 15, 63–72. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02773.x>.
- Wills, D., Hester, M., Liu, A., Burke, J., 2005. Chloroplast SSR polymorphisms in the Compositae and the mode of organellar inheritance in *Helianthus annuus*. *Theor. Appl. Genet.* 110, 941–947. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1914-3>.
- Wu, Z., Chen, Y., Feng, X., Xia, B., Wang, M., Dong, Y., 2009b. Two new ceramides from *Zephyranthes candida*. *Chem. Nat. Compd.* 45, 829–833. <https://doi.org/10.1007/s10600-010-9497-5>.
- Wu, Z., Chen, Y., Xia, B., Wang, M., Dong, Y., Feng, X., 2009a. Two novel ceramides with a phytylphospholipid and a tertiary amide structure from *Zephyranthes candida*. *Lipids* 44, 63–70. <https://doi.org/10.1007/s11745-009-3246-6>.
- Xu, S., Zhou, W., Baldwin, I., 2015. The rapidly evolving associations among herbivore associated elicitor induced phytohormones in *Nicotiana*. *Plant Signal. Behav.* 10 (7), e1035850 <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1035850>.
- Zar, J., 2010. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey.

## CAPÍTULO 3

---

### **Caracterización morfológica, alcaloidea y de microsatélites (nSSR) de *Zephyranthes fosteri* y *Z. alba* (Amaryllidaceae): población simpátrida**

#### **Resumen**

La hibridación entre especies de plantas cercanas filogenéticamente puede presentarse con mayor frecuencia que en especies más lejanas (Vaco, 2011; Harrison, 1993). Este fenómeno se ha observado en plantas de Amaryllidaceae, donde eventos de hibridación entre especies del mismo género o incluso de distinto es común, como es el caso del entrecruzamiento entre *Stenomesson aurantiacum* y *Phaedranassa dubia* (Lara, et al. 2020). Por lo que se ha sugerido incluso que en las Amaryllidaceae existe una predisposición intrínseca de sus especies para la hibridación (Marques et al., 2007; García et al., 2021). En este trabajo se analizó en una zona simpátrida al complejo formado por dos especies herbáceas de Amaryllidaceae que se distribuyen en el país, *Zephyranthes fosteri*, *Zephyranthes alba* y (*Z. fosteri* × *Z. alba*) por medio de la caracterización de 20 caracteres morfológicos (foliares, florales y bulbo); (N=60 individuos), así como el perfil químico (alcaloides) y molecular (microsatélites). Este sitio simpátrico entre ambas especies se encuentra en un camellón de Ciudad Universitaria que pertenece a zonas de amortiguamiento de la REPSA (Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel) ubicada frente a la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de México. En este sitio se encuentran distribuidos individuos de *Z. alba*, *Z. fosteri* e individuos con una morfología atípica [IMA], probablemente resultado de la hibridación de las dos primeras. En el análisis de función discriminante para los 20 caracteres morfológicos medidos reveló la ordenación de tres grupos bien definidos morfológicamente, uno correspondiente a *Z. alba*, otro a *Z. fosteri* y un tercer grupo que aglutina a IMA, sugiriendo la posibilidad de eventos de hibridación en la zona. Esta hipótesis surge debido a que los IMA registraron un 65%

de similitud morfométrica con la especie parental "supuestamente putativa" de *Z. fosteri* y un 35% restante con similitud de tipo intermedio entre ambas especies. Por su parte, los análisis químicos apoyaron que *Z. alba* y *Z. fosteri* son especies diferentes bien definidas en su perfil alcaloideo también en zonas simpátricas como en las alopátricas (Capítulo 2), ya que se determinó que *Z. alba* presenta dos alcaloides especie específico (AEE) (galantamina y clidantina), mientras que para *Z. fosteri* fueron la tazetina y un alcaloide desconocido, denominado *m/z* 272(341) como AEE. Por su parte, los IMA mostraron que la presencia del alcaloide licorina no difiere con sus supuestas especies parentales, pero los alcaloides *m/z* 55(200) y nortazetina son novedosos para este taxón. Por lo tanto, los resultados obtenidos de los caracteres morfológicos y químicos apoyan que los individuos con IMA en esta zona mixta tienen una mayor similitud con la especie parental putativa *Z. fosteri*. Finalmente, los análisis moleculares mostraron que *Z. fosteri* y *Z. alba*, se encuentran bien definidas genéticamente en esta zona simpátrica ya que incluso el nivel de pureza para cada especie se mantuvo como se obtuvo en zonas alopátricas (Capítulo 2). No obstante, en el análisis genético de los IMA, resultó ser coincidente con *Z. alba* lo que se contrapone con los resultados morfológicos y químicos en donde la similitud fue con *Z. fosteri*. Esto pudo ocurrir por distintos motivos, pero el principal pudo deberse a que no hubo suficiente resolución del análisis genético con los tres cebadores universales utilizados por lo cual, se propone no sólo incrementar el número de secuencias cebadoras polimórficas sino además utilizar secuencias específicas para *Zephyranthes* y con ello mejorar el análisis.

### **Introducción:**

A pesar de que el reconocimiento de individuos híbridos por medio del análisis de ADN es fundamental (Howard et al., 1997; Arnold, 1993), el estudio del fenotipo de los



híbridos es de gran importancia, ya que es en esta variación sobre la que actúa la selección natural y no sobre los marcadores genéticos neutros (Bacon and Spellenberg, 1996; Rieseberg and Ellstrand, 1993). En ese sentido los microsatélites han demostrado ser una herramienta muy útil para poder obtener los perfiles genéticos de las especies vegetales (Samuel, 1999; Savadi et al., 2021). Los caracteres químicos por su parte son marcadores que frecuentemente presentan un patrón aditivo en los híbridos, es decir, los híbridos suelen presentar los compuestos químicos de ambas especies parentales (Yarnes et al., 2008; Rieseberg y Ellstrand, 1993; Orians, 2000;). Además su estudio es importante ya que pueden afectar la estructura de la comunidad de herbívoros asociados a éstos (Yarnes et al., 2008), así como algunos procesos ecosistémicos como el ciclaje de nutrientes al modificar la tasa de descomposición de la materia orgánica (Driebe y Whitham, 2000). Por lo anterior, el uso de varios marcadores (P. ej., morfológicos y químicos) es confiable para el reconocimiento de eventos de hibridación y además proveen de más información biológica de las especies (Smith et al., 1996; Ocampo-Bautista et al., 2023).

El género *Zephyranthes* (Amaryllidaceae) agrupa alrededor de 70 especies americanas, herbáceas y perenes de las cuales 36 se encuentran en México. *Z. fosteri* Traub., se distribuye principalmente hacia el centro de la República (Capítulo 1); (Calderón y Rzedowski, 2005). Mientras que *Z. alba* siendo una especie endémica de la Ciudad de México recientemente descrita se ha reportado se distribuye únicamente en el Pedregal de San Ángel, que incluye a la REPSA (Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel); (Capítulo 1). Esta especie comparte muchas similitudes morfológicas con *Z. concolor*, e incluso las poblaciones del Pedregal alguna vez estuvieron denominadas taxonómicamente bajo ese nombre y también como *Habranthus concolor* (Centeno, 2014; Damián-Domínguez et al., 2009; Flagg et al., 2019). Sin embargo debido a diferencias en su citología y el color al interior de la corola, fueron separados estos taxones (Flagg et al. 2019). Individuos de *Zephyranthes fosteri* y *Zephyranthes alba*

coinciden en su distribución en zonas de simpatría. Uno de estos sitios se encuentra en un camellón de Ciudad Universitaria que pertenece a zonas de amortiguamiento de la REPSA (Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel) ubicada frente a la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de México. En este lugar se encuentran distribuidos individuos de *Z. alba*, *Z. fosteri* e individuos con una morfología atípica [IMA], probablemente resultado de la hibridación de las dos primeras. Y debido a que estas especies se distribuyen en ambientes con disturbio antropogénico, las oportunidades para el contacto entre ambas especies van en aumento.

La hibridación no es el resultado general cuando las especies de distintos géneros o incluso distintas especies de un mismo género entran en contacto, porque a menudo existen barreras previas y posteriores a la reproducción que pueden impedir la hibridación (Templeton, 1989). Sin embargo, ciertas familias y géneros parecen estar predispuestos para el origen de eventos de hibridación (Ellstrand et al., 1993). Por ejemplo, en Amaryllidaceae para los géneros *Narciso* L. y *Cooperia* Herb., se ha descrito una alta frecuencia de híbridos naturales (Flagg y Smith, 2009; Larcombe et al., 2016), por lo que se ha propuesto incluso que dicho fenómeno puede explicar gran parte de la variabilidad fenotípica dentro y entre poblaciones de este género así como su alta frecuencia en la familia (Fernández, 1968; Soltis y Soltis, 2009; García et al., 2021).

Por su parte, Flagg y Flory (1976) sugieren que la hibridación en especies de *Zephyranthes* es común, pues reportan que algunas especies de dicho género hibridan con individuos del género *Cooperia* Herb., considerando incluso dicho evento como un proceso de especiación. Asimismo, en zonas naturales al norte del país, frecuentemente se han encontrado individuos con características morfológicas atípicas y/o intermedias entre *Zephyranthes* y *Habranthus* (Aarón Rodríguez, com. pers.).

En este trabajo se pretende contribuir al conocimiento al complejo formado por dos especies herbáceas de Amaryllidaceae que se distribuyen en una zona simpátrida y si es el caso, cómo los individuos híbridos pueden expresar sus caracteres morfológicos, químicos y como varían sus genotipos. Dado que la hibridación e introgresión pueden generar individuos altamente variables fenotípicamente con una mayor adecuación que las especies parentales (López-Caamal, et al., 2014; Tovar-Sánchez, y Oyama, 2004) es importante evaluar si los eventos de hibridación tienen un impacto significativo en la distribución de la variación química la cual además son de importancia farmacológica y morfológica entre estas taxa (Centeno, 2014; Reyes-Chilpa et al., 2011; Centeno et al., 2021; García, 2017; Soriano, 2019).

### **Hipótesis:**

Si en las zonas simpátridas entre *Z. alba* y *Z. fosteri* se presenta el fenómeno de hibridación, se espera que las poblaciones con morfología atípica (probables híbridos) presenten una variación en sus caracteres morfológicos (foliar y floral), químicos (alcaloides) y genéticos (microsatélites) en comparación con sus especies parentales putativas debido a que este proceso produce nuevas combinaciones genéticas que podrían elevar su plasticidad fenotípica.

### **Objetivo general:**

Obtener los tipos genéticos con secuencias cebadoras universales y caracterizarlos con marcadores químicos (alcaloides), morfológicos (florales, foliares y bulbo) y moleculares (microsatélites) del complejo *Zephyranthes* en una zona simpátrida.

### **Objetivos particulares:**

- Caracterización morfológica y determinación del efecto de las especies, localidad e individuo sobre los caracteres morfológicos foliares, florales y de bulbo de *Zephyranthes alba* y *Zephyranthes fosteri* y del complejo *Z. alba* × *Z. fosteri*.
- Determinar el número de caracteres intermedio, de tipo parental, y transgresivo de los IMA (individuos con morfología atípica) entre *Zephyranthes alba* y *Zephyranthes fosteri*.
- Caracterización química (alcaloides) y morfológica (florales, foliares y bulbo) de los individuos del complejo *Z. alba* × *Z. fosteri* en una zona simpátrida.
- Describir cualitativamente el perfil alcaloideo del complejo *Z. alba* × *Z. fosteri* en una zona simpátrida.
- Analizar por medio de microsatélites (nSSR) universales las categorías genéticas del complejo *Z. alba* × *Z. fosteri* en esta zona simpátrida.

### **Materiales y Métodos:**

#### **1) Caracterización morfológica del complejo *Zephyranthes alba* × *Zephyranthes fosteri***

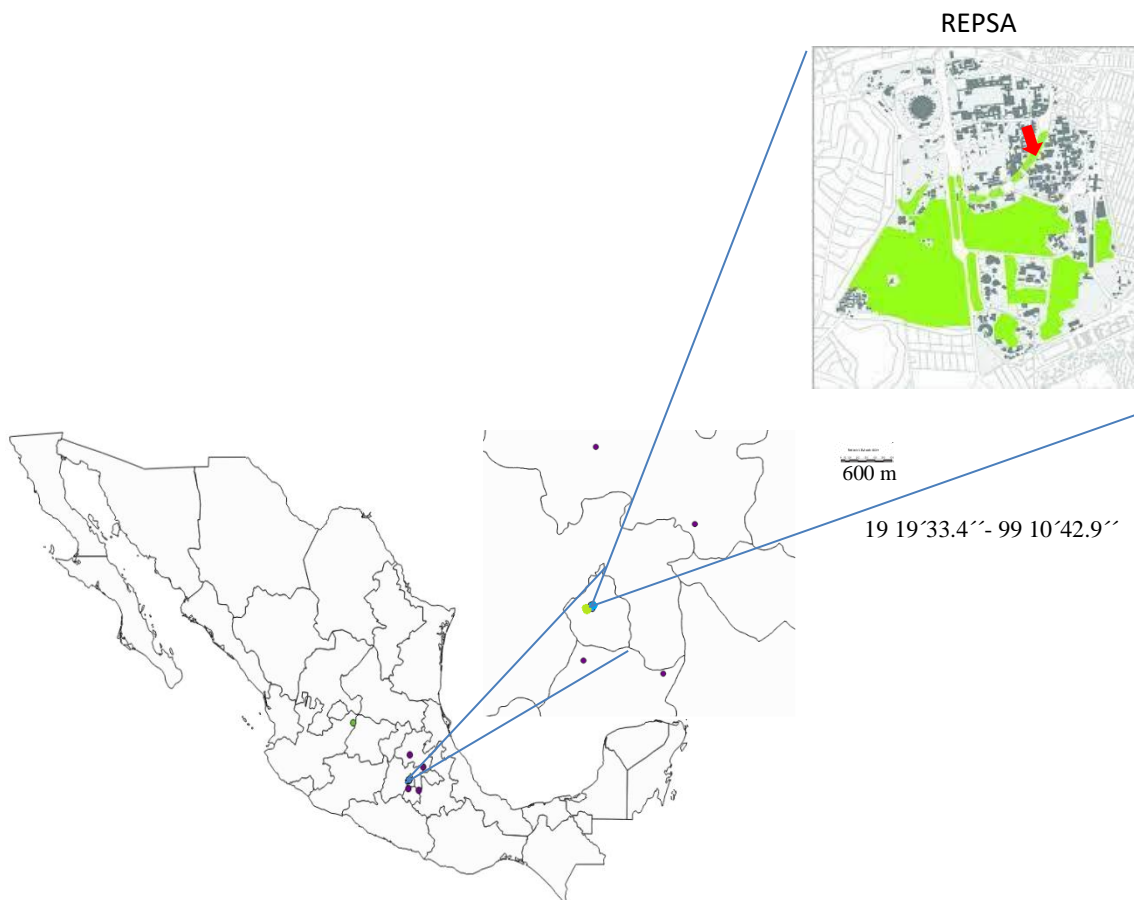
Para el análisis morfológico se colectaron 20 individuos de *Zephyranthes alba*, *Zephyranthes fosteri* e IMA (individuos con morfología atípica) en un sitio simpátrido ubicado en un camellón de la REPSA frente a la Facultad de Veterinaria, en Ciudad Universitaria de la UNAM, debido a que en este lugar se reportó con anterioridad la existencia de un probable híbrido con base en evidencias anatómicas y químicas (Centeno-Betanzos, 2014; Demián, 2010; Damián-Domínguez et al.,

2009);(Fig. 1). Por lo tanto se colectaron 60 individuos en total. A pesar de que podrían existir otros lugares de convergencia (Capítulo 1) este sitio fue el más cercano y de más rápido acceso. Las coordenadas geográficas del sitio fueron; N-O 19 19'46.44''- 99 10'44.53'' y la altitud de 2273 m. Con el objetivo de mantener vivas a las plantas colectadas y contar con material fresco disponible para análisis posteriores, los bulbos de todos cada individuo colectado se cultivaron en macetas, las que se mantienen vivas en el invernadero del Instituto de Química de la UNAM.

Para el análisis morfométrico se utilizaron diferentes partes de la planta, enfocándose principalmente en la flor (Tabla 3.1), debido a que en esta estructura es dónde se puede encontrar mayor diferencia o variación entre las especies de acuerdo con los reportes taxonómicos (García et al., 2021; Capítulo 2). Por lo tanto, de cada individuo se midió en campo; la longitud y grosor del escapo, ancho y largo del bulbo y el ancho de las hojas. A cada individuo le fue disectado cuidadosamente cada verticilo floral (tépalos, estambres, pistilo y bráctea) con una navaja. Cada parte floral fue montada por separado en láminas de papel tipo cartoncillo fijándolas con cinta canela transparente, cuidando de no dejar burbujas de aire o las menos posibles (Anexo, 1). Posteriormente, con un vernier digitalizado marca Truper se tomaron diversas mediciones (ancho y largo) de la estructura reproductiva.

*a) Análisis estadístico:*

Para determinar el número de caracteres intermedios y/o transgresivos en la zona de contacto o simpátrida del complejo *Z. alba* × *Z. fosteri*, ubicada en la Facultad de Veterinaria, UNAM se realizó un análisis estadístico de varianza (ANOVA).



**Figura 3.1** Mapa de la República Mexicana que muestra en la CdMx un sitio de simpatria entre *Z. fosteri* y *Z. alba* (puntos amarillos y verdes) específicamente en la REPSA (flecha roja), ubicado en un camellón frente a la Facultad de Veterinaria, en Ciudad Universitaria de la UNAM. Imagen de la REPSA tomada de: <http://www.repsa.unam.mx>.

Las diferencias de las medias estadísticamente significativas entre taxones se determinaron con un rango múltiple de Tukey. Para realizar dichos cálculos se utilizó el software STATISTICA 8.0 (StatSoft, 2007), con el que se llevó a cabo un análisis de función discriminante (AFD) utilizando todas las variables morfológicas. Cada taxón se estableció como variable predictora.

**Tabla 3.1.** Caracteres morfológicos analizados por cada individuo de la flor, bulbo y hoja.

<b>Carácter</b>	<b>Unidad</b>	<b>Descripción</b>
<b>Flor</b>		
PI_Long	mm	Pétalos internos longitud
PI_A Largo	mm	Pétalos internos ancho largo
PI_A corto	mm	Pétalos internos ancho corto
PE_Long	mm	Pétalos externos longitud
PE_A largo	mm	Pétalos externos ancho largo
PE_A corto	mm	Pétalos externos ancho corto
Est_Fil_Long	mm	Estambres antera longitud
Est_Ant_Long	mm	Estambres filamento longitud
Pi_Estg_Long	mm	Pistilo estigma longitud
Pi_Esti_Long	mm	Pistilo estilo longitud
Fl_Long	cm	Flor longitud
Br_Long	mm	Bráctea largo
Br_Ancho	mm	Bráctea ancho
<b>Escapo</b>		
Es_Long	cm	Escapo longitud
Es_Ancho	cm	Escapo ancho
Es_Ped	cm	Escapo pedúnculo
Ov_Long	cm	Ovario longitud
<b>Bulbo y Hoja</b>		
Bu_Ancho	cm	Bulbo ancho
Bu_Long	cm	Bulbo largo
H_Ancho	mm	Hojas ancho

También se realizó un AFD incluyendo todos los caracteres (flor, bulbo y escapo). El propósito de este análisis fue determinar los caracteres más útiles para discriminar entre *Z. alba* y *Z. fosteri*, y evaluar visualmente la separación de individuos en grupos. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa STATISTICA 8.0 (StatSoft, 2007).

## **2) Análisis de *Zephyranthes alba* y *Z. fosteri* por microsatélites (nSSR)**

### *a) Extracción de ADN*

Se seleccionaron las hojas sin daño de cada individuo colectado. El tejido foliar se conservó a -20 °C hasta la extracción del ADN. El ADN total se extrajo con CTAB (Hexadecyltrimethyl ammonium bromide), siguiendo la metodología propuesta por Doyle y Doyle, (1987), con algunas modificaciones. En resumen, se utilizaron de 200 a 300 mg de hoja. El tejido se trituró con nitrógeno líquido y se agregó 1ml del Buffer de extracción 2x (CTAB, B-mercapoetanol y RNasa). La mezcla se incubó a 65°C, por 15 o 30 min. Se agregaron 600 µL de cloroformo-OH Isoamílico, agitando y centrifugando 5 min a 13,000 rpm. El sobrenadante se precipitó con 540 µL de isopropanol incubando por 24 hrs a -4°C. Después se centrifugó por 5 min a 13,000 rpm desechando el sobrenadante. Al precipitado se le agregaron 500 µL de etanol al 70% centrifugando por 4 min a 13,000 rpm. El alcohol residual se decantó, dejando secar completamente. La muestra se eluyó en agua grado molecular.

Para la realización de este ensayo de análisis molecular se seleccionó únicamente el ADN extraído de 36 muestras representativas de la zona simpátrida de la siguiente forma; 20 individuos con morfología atípica (IMA), 8 individuos de *Z. fosteri* y 8 de *Z. alba*.

### *b) Electroforesis y cuantificación del ADN extraído*

Para conocer la calidad del ADN genómico se usó electroforesis en geles de agarosa al 0.8 %. Se cargaron 9 µL de ADN en cada pozo más 1 µL de buffer de carga. La calidad del ADN fue visualmente evaluado comparando la intensidad de las bandas con



estándares conocidos de ADN lambda a 100pb y el gel se corrió en una cámara de electroforesis a 110V por 25min. El gel de agarosa se tiñó con bromuro de etidio y el ADN se observó bajo un transiluminador de luz UV con el fin de evaluar su integridad. Para la cuantificación del ADN de cada muestra, se realizó mediante análisis espectrofotométrico utilizando un BioFotómetro (Eppendorf, Alemania). Las lecturas se tomaron a 260 de UV y las unidades de cuantificación y pureza del ADN se obtuvieron en un intervalo de 260/280 y 260/230 ng/μL. A partir de estos datos todas las muestras de ADN fueron diluidas a un volumen final de 10 ng/μL.

#### *c) Amplificación y secuenciación del ADN por PCR*

Se realizaron ensayos de amplificación del ADN extraído de las muestras con seis *primers* (nSSR) para loci de microsatélites nucleares universales; OE09, OC11, OA01 y 1C08 (Aldrich et al., 2002) y ZAG110 y ZAG 46 (Steinkellner et al., 1997) disponibles en el laboratorio usando la técnica de PCR para detectar la presencia de productos de amplificación, reproducibilidad y polimorfismo. De éstos únicamente tres mostraron una amplificación aceptable (ZAG 46 y 110 y OA01) y se utilizaron para el análisis de todas las muestras. Luego, los cebadores directos se marcaron con los fluoróforos HEX, NED o 6-FAM y las reacciones de PCR se realizaron de acuerdo con Wills et al., (2005), en un volumen final de 8μL. Las concentraciones de los reactivos de PCR fueron variables y ajustadas para cada *primer* al igual que las temperaturas de amplificación en el termociclador.

#### *d) Genotipificación de los grupos genéticos*

Los productos de PCR de cada primer, se genotipificaron en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM. Para ello los *primers* se marcaron directamente con los fluoróforos HEX, NED o 6-FAM y se establecieron las reacciones de PCR de acuerdo con Wills et al. (2005) en un volumen final de 8 μL. Los productos

de PCR se corrieron en geles de poliacrilamida al 6% (urea 7 M) a 60 W durante 3 h para determinar los cebadores polimórficos. Se midió la longitud de los fragmentos de microsatélites amplificados ejecutando una alícuota de cada producto de PCR en un secuenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems, CA, EE. UU.) a 35 W durante 80 a 90 minutos usando un escaneo genético ROX-2500 (Applied Biosystems, CA, EE. UU.) como tamaño estándar. Los alelos se evaluaron utilizando el Gene Mapper ver. Software 3.7 (Applied Biosystems, CA, EE. UU.).

Posteriormente se utilizó el programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) para obtener la asignación genética de individuos recolectados en el sitio simpátrido y para estimar la contribución de *Z. alba* y *Z. fosteri* a cada genoma del probable híbrido (IMA). Este programa utiliza agrupaciones bayesianas para inferir la estructura de las poblaciones a partir de datos genotípicos, y los individuos se asignan probabilísticamente a poblaciones K en función de sus genotipos multilocus (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003; Hubisz et al., 2009). Para determinar el número de grupos genéticos (K) con la probabilidad posterior más alta, el programa STRUCTURE se ejecutó en valores de K (K = 1 a 4) con seis repeticiones independientes cada uno, las cuales se trataron en el programa CLUMPP (Jakobsson y Rosenberg, 2007).

Para cada individuo, se calculó un coeficiente de mezcla (Q). Este coeficiente representa la proporción del genotipo de un individuo que se origina en una población determinada. Para ello, primero se estableció el valor de K en poblaciones puras y mixtas. En todas las ejecuciones, se utilizó un período de prueba de 10.000 repeticiones, seguido de 300.000 iteraciones de la Cadena de Markov Monte Carlo, que se confirmó que era satisfactoria para que los parámetros alcanzaran la convergencia.

Para el análisis de la asignación genética de los individuos *Z. alba* o *Z. fosteri*, se utilizó el modelo de no mezcla con frecuencias correlacionadas sin ninguna información poblacional previa. Finalmente, cada individuo fue clasificado con base en

el modelo propuesto por Vähä y Primmer (2006), en el que todos los individuos con un coeficiente de asignación  $Q \geq 0.9$  son considerados individuos puros de *Z. alba* o *Z. fosteri*.

### **3) Caracterización de compuestos alcaloides**

Para el análisis de identificación cualitativa y cuantitativa de los alcaloides presentes en individuos de *Z. alba* y *Z. fosteri*, se seleccionaron los bulbos de tres plantas con un coeficiente de asignación  $Q \geq 0,9$  según el software STRUCTURE, es decir aquellos que mostraron mayor pureza en el análisis molecular.

Para el caso de los IMA se escogieron se seleccionaron los bulbos de tres plantas que mostraron los caracteres morfológicos más intermedios en comparación con individuos parentales en el análisis morfométrico (HIB-4, HIB-9 y HIB-13).

#### *a) Extractos metanólicos*

Los extractos metanólicos se obtuvieron seccionando una parte longitudinal del bulbo de los ejemplares seleccionados, los cuales fueron triturados y colocados en una estufa de calentamiento a 50-60 °C durante 12 h para su deshidratación. Los bulbos secos fueron pesados y se extrajeron con MeOH (volumen 10:1 peso seco) durante 3 días a temperatura ambiente en viales de 25ml. El extracto se concentró en un rotavapor y se colocó en una cámara de vacío para eliminar completamente el disolvente.

#### *a) Fracción de alcaloides*

La extracción de alcaloides se realizó por medio de una reacción ácido-base. Se disolvieron muestras de cada extracto de MeOH (500 mg) en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5% (2,5 ml) y se repartieron con Et<sub>2</sub>O (5 x 5 ml). La fase acuosa se recuperó y se basificó a un pH entre 9 y 10 con NH<sub>4</sub>OH. Posteriormente se extrajo con EtOAc (5 mL x 3) para obtener

la fase orgánica o fracción de alcaloides. La solución obtenida se concentró y la presencia de alcaloides se verificó mediante cromatografía en capa fina (TLC) teñida con reactivo de Dragendorff para revelar la presencia de alcaloides. Para la revelación se utilizaron placas de TLC de gel de sílice 60 con indicador de fluorescencia UV254 de 20 × 20 cm de tamaño y 0,20 mm de espesor.

*b) Análisis por cromatografía de capa fina (CCF)*

Tanto los extractos metanólicos como las fracciones alcaloideas se analizaron por CCF empleando cromatofolios de sílica gel 60 con indicador de fluorescencia UV254 de 20 x 20 cm de tamaño y 0.20 mm de espesor. Se aplicaron 1-3µl de la muestra en cada placa con ayuda de un capilar graduado. La fase móvil utilizada fue AcOEt-MeOH (4:2). Para determinar cualitativamente los alcaloides y el valor expresado bajo la curva en porcentaje relativo, se utilizaron los extractos de alcaloides obtenidos de cada muestra y se analizaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

*d) Análisis del perfil alcaloideo por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM).*

Las fracciones alcaloideas de cada muestra se analizaron por la técnica acoplada de CG-EM para determinar cualitativa y cuantitativamente los alcaloides existentes en cada una de las muestras. Los análisis GC-MS se realizaron en un cromatógrafo de gases (Agilent technologies 7890B GC) acoplado a un espectrómetro de masas de impacto electrónico (Agilent technologies 5977A MSD) que funciona en modo de energía de ionización (EI) a 70 eV. Se utilizó una columna capilar DB-5 MS (30 mx 0,25 mm x 0,25 µm). El programa de temperatura fue de 100 a 180 a 15 °C/min: 1,

mantenimiento de 1 minuto a 180 °C, 180 a 300 a 5 °C/min: 1 y mantenimiento de 1 minuto a 300 °C. La temperatura del inyector fue de 280 °C. El caudal de gas portador de He fue de 0,8 ml min<sup>-1</sup>. La relación de división fue de 1:20. Se utilizó una mezcla de hidrocarburos (C9 – C36, ultracientífica, estándar TPRH, n.º de producto SNJ-200 C8 – C40) para realizar la calibración de RI y RT. Los resultados de GC-MS se analizaron utilizando el software AMDIS 2.64, NIST 14 y MassHunter Unknown Analysis. La proporción de cada compuesto en las fracciones de alcaloides se expresó como porcentaje del total de alcaloides.

Estos datos no expresan una cuantificación real, aunque pueden usarse para comparar las cantidades relativas de cada componente. Los alcaloides se identificaron comparando sus espectros GC-MS y sus índices de retención (RI) de Kovats con la base de datos de la biblioteca desarrollada por el grupo de investigación del Dr. Bastida (Bastida et al., 2011), que contiene alcaloides de Amaryllidaceae que han sido aislados e identificados usando diferentes técnicas espectroscópicas como NMR, UV, CD y MS, así como datos de la literatura. Aquellos picos del cromatograma que no fueron identificados se denominaron con base en su relación masa/carga ( $m/z$ ) de los fragmentos principales en su espectro de masas. Para este análisis comparativo sólo se tomaron en consideración los cinco alcaloides mayoritarios para cada muestra.

## **Resultados:**

### **1) Caracterización morfológica del complejo *Zephyranthes alba* × *Z. fosteri***

En el análisis de varianza de una vía detectó que en general, los fenotipos de los IMA (Individuos con morfología atípica) colectados en la zona simpátrida de la Facultad de Veterinaria de la UNAM, no mostraron diferencias significativas con los fenotipos de *Z.*

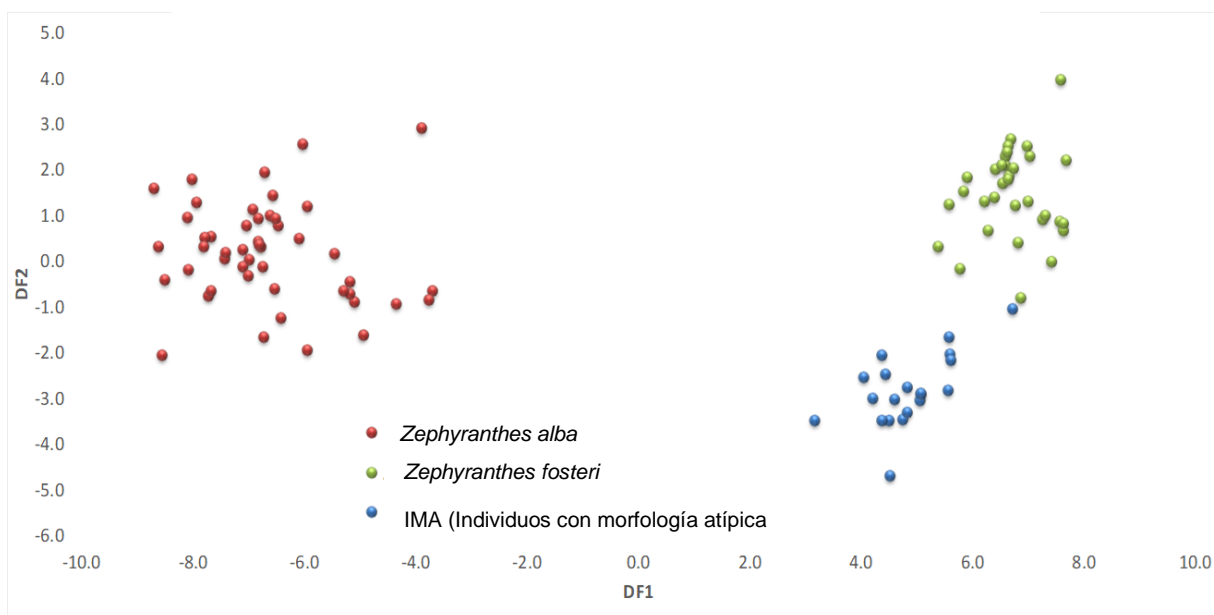
*fosteri* y al contrario tuvieron una similitud en un 65% de los caracteres analizados, entre ellos los caracteres florales y del bulbo. Mientras que el 35% restante de estos caracteres fueron de naturaleza intermedia entre *Z. alba* y *Z. fosteri*, es decir las especies parentales putativas (Tabla 3.2). Estos caracteres fueron principalmente los florales y la hoja.

**Tabla 3.2.** Porcentajes de similitud con los caracteres parentales e intermedios en zona mixta de Veterinaria REPSA, CU, del complejo *Zephyranthes alba* y *Z. fosteri*

Carácter	Parental		Intermedio
	<i>Z. alba</i>	<i>Z. fosteri</i>	
<i>Flor</i>	-	65%	35%
Br_Long		X	
Br_Ancho		X	
Es_Long			X
Es_Ancho		X	
Es_Ped		X	
Fl_Long			X
Ov_Long		X	
Pl_Long			X
Pl_A Largo		X	
Pl_A corto		X	
PE_Long			X
PE_A largo		X	
PE_A corto		X	
Est_Fil_Long		X	
Est_Ant_long		X	
Pi_Estg_Long			X
Pi_Estilo_Long			X
<i>Bulbo</i>			
Bu_Ancho		X	
Bu_Long		X	
<i>Hoja</i>			
H_Ancho			X

Por otro lado, el análisis discriminante también arrojó que los caracteres morfológicos de la flor, el bulbo y la hoja agrupan a los individuos de esta zona simpátrida en tres grupos bien diferenciados morfológicamente (Fig. 3.2).

*Zephyranthes alba* fue distinto significativamente de *Z. fosteri* en todos los caracteres examinados, excepto en el ancho menor del pétalo interno. Los caracteres examinados en *Z. alba* mostraron valores más altos en comparación con *Z. fosteri* como se obtuvo en las zonas alopátridas (Capítulo 2).



**Figura 3.2** Análisis de función discriminante de los caracteres morfológicos (flor, bulbo, hoja) que muestran la ordenación de individuos del complejo *Z. alba* × *Z. fosteri* en una zona simpátrida del sitio de Veterinaria, UNAM, CdMx.

El fenotipo *Z. alba* muestra muy poca afinidad morfológica con el grupo de *Z. fosteri* y los IMA, mientras que estos dos últimos sí muestran una mayor similitud morfológica entre sí. La longitud del estigma, el ancho corto de pétalos externos y el ancho de las hojas, mostraron el mayor peso en la ordenación de los individuos en el

eje DF1, en contraste con la longitud del pétalo externo, la longitud del escapo y la longitud del pistilo del estigma en el eje DF2. Los cuales fueron los más importantes.

### **3) Análisis molecular (nSSR) del complejo *Zephyranthes alba* × *Z. fosteri***

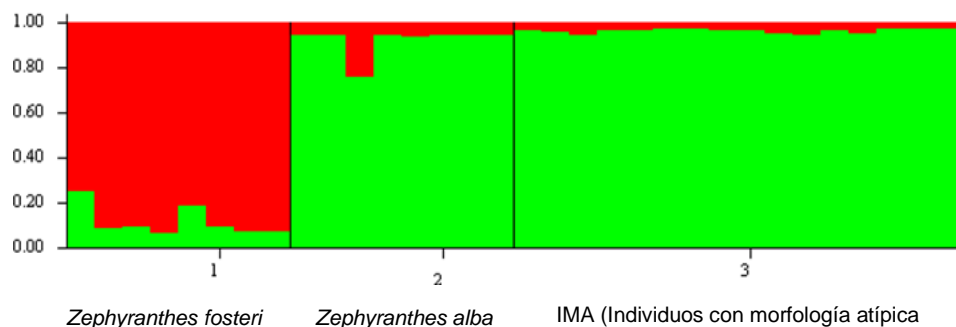
El análisis bayesiano con el software STRUCTURE mostró dos grupos genéticos bien delimitados. Lo cual se contrapone a las tres especies fenotípicas *Z. alba*, *Z. fosteri* e IMA previamente resultantes en el análisis morfométrico. Los individuos identificados previamente por su morfología como *Z. fosteri* y *Z. alba* efectivamente presentaron un perfil genético diferente. Sin embargo, el perfil genético de los IMA coincidió con el de *Z. alba*, aglutinándolos en el mismo grupo, lo que sugiere que supuestamente pertenecen al mismo tipo genético (Fig. 3.3). Estos valores resultan contradictorios con los resultados morfológicos en donde se observó que los IMA presentaban mayor similitud morfológica con *Z. fosteri*, al igual que el perfil químico realizado para los IMA.

Por otro lado, algunos individuos de *Z. alba* del sitio simpátrido presentaron un valor de  $Q = 0.99$  (Fig. 3.3), el cual fue muy parecido al de los individuos en zonas alopátridas y supone un estado de pureza alto y mayor valor en comparación con los individuos de *Z. fosteri* (Capítulo 2). A diferencia de los individuos de *Z. fosteri* que en su mayoría tuvieron un valor que oscila en  $Q = 0.91$  cuyo valor fue muy parecido al que presentaron la mayoría de los individuos en zonas alopátricas (Capítulo 2).

Es importante considerar que a pesar de que hubo amplificación de los productos de PCR con cinco *primers* nucleares universales, las bandas no se mostraron bien definidas en su totalidad desde el comienzo para estas muestras. Sin embargo, en este estudio fueron suficientes para enviarlas a secuenciar y solo tres de ellos resultaron útiles. Posteriormente la base de datos tuvo que reducirse a 32 muestras seleccionadas



después de la limpieza realizada con Geniús debido a que el análisis no fue lo suficiente limpio.



**Figura 3.3.** Asignación genética de individuos de la zona simpátrida representativa de las especies *Z. alba*, *Z. fosteri* e IMA basada en el análisis de cuatro *loci* de microsatélites nucleares (nSSR) con el método bayesiano implementado en el programa STRUCTURE. Cada línea vertical de color representa la probabilidad individual de pertenecer al grupo de ese color y cada población está separada por una línea vertical negra.

Es por ello que la contradicción de los resultados moleculares con los morfológicos se considera que podría estar relacionado con la falta de resolución de los *primers* utilizados en este ensayo molecular.

Por lo tanto, se considera que en futuros estudios debe de aumentarse el número de secuencias cebadoras polimórficas para el análisis, con la finalidad de obtener resultados más robustos.

### **3) Caracterización fitoquímica del complejo *Zephyranthes alba* × *Z. fosteri***

#### *a) Extracción de alcaloides*

Se encontró que en la extracción de alcaloides hubo variación en el porcentaje del rendimiento obtenido de los bulbos entre los tres taxones (Cuadro 3.1). *Zephyranthes*

*alba* fue el taxón con mayor rendimiento con 27.5% en promedio, mientras que *Z. fosteri* mostró un promedio de 27.4% y finalmente los IMA (Individuos con Morfología Atípica) con 18.4%.

**Cuadro 3.1.** Pesos (mg) y rendimientos (%) de los extractos metanólicos y de alcaloides obtenidos de *Z. alba* (ZA), *Zephyranthes fosteri* (ZF) e IMA (Individuos con morfología atípica) en el sitio simpátrido (Facultad de Veterinaria, UNAM).

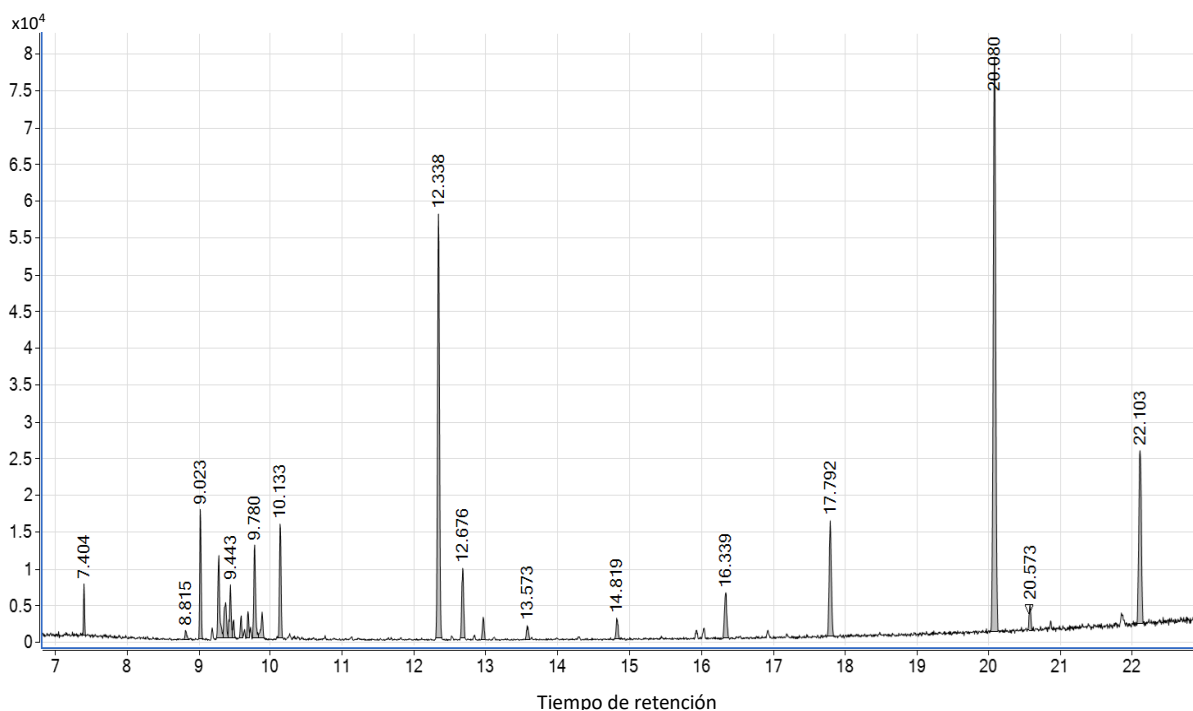
Individuos	Extracto metanólico mg	Fracción de alcaloides mg	Rendimiento %
<b><i>Zephyranthes alba</i></b>			
ZAV2	43.00	12.61	29.3
ZAV3	65.60	20.90	<b>31.8</b>
ZAV4	25.70	5.50	21.4
<b><i>Zephyranthes fosteri</i></b>			
ZFV3	41.29	9.50	23.0
ZFV5	29.82	10.90	<b>36.5</b>
ZFV10	38.89	9.20	23.6
<b>Individuos con morfología atípica (IMA)</b>			
IMA V2	35.33	8.00	22.6
IMA V5	32.20	6.50	20.1
IMA V8	41.68	4.51	10.8
IMA V4	58.30	13.42	<b>23.0</b>
IMA V9	48.50	11.09	22.8
IMA V10	20.80	2.70	12.9

a) *Análisis del perfil alcaloideo por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM)*

En el análisis de CG-EM de la fracción de alcaloides, *Z. alba* y *Z. fosteri* presentaron un perfil de alcaloides muy distinto entre ellos. Esto fue evidente en los cromatogramas

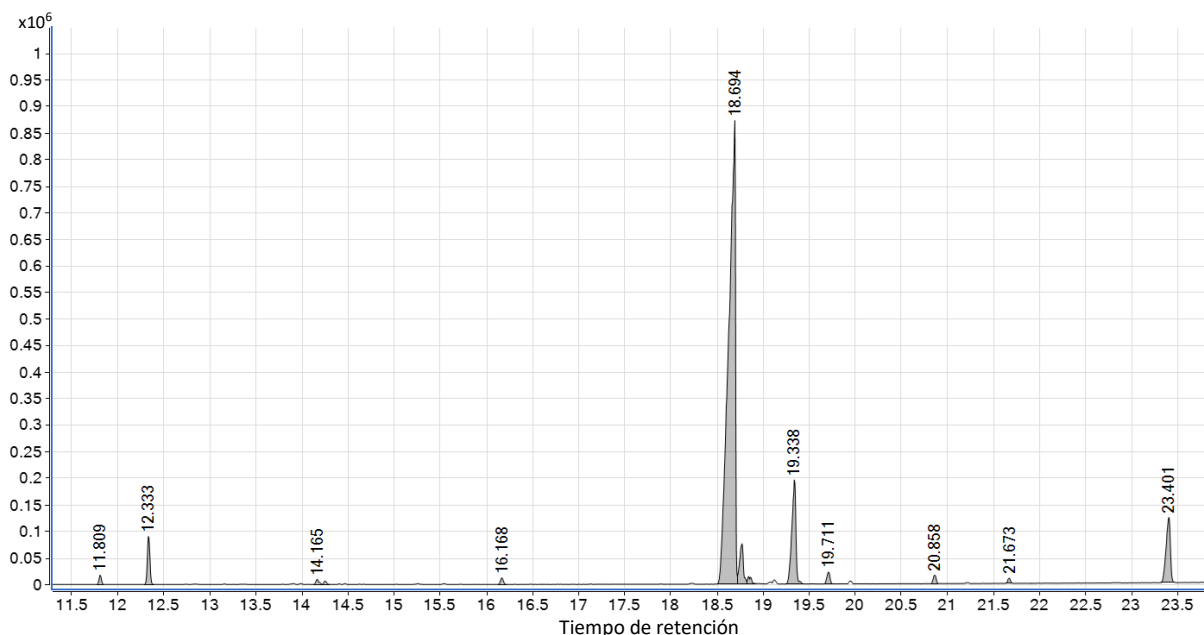
resultantes de cada especie (Figs. 3.4 y 3.5). Por un lado, el perfil de alcaloides que presento *Z. alba* fue muy parecido al obtenido previamente en zonas alopátridas, mientras que el perfil de *Z. fosteri* cambió en la presencia y ausencia de algunos alcaloides. Por su parte los IMA presentaron un perfil de alcaloides más parecido al de *Z. fosteri* que al perfil de *Z. alba* coincidiendo a los resultados morfométricos(Figs. 3.6).

Cabe resaltar que cada individuo analizado mostro un perfil muy parecido en el tipo y cantidad de alcaloides para cada taxon (Cuadro 3.2). Esto puede observarse en la similitud del cromatograma resultante de cada individuo (Figs. 3.4, 3.5 y 3.6) así como en su respectivo espectro de masas (Figs. 3.7, 3.8 y 3.9). Los cromatogramas obtenidos para cada individuo pueden ser consultados en el anexo al final del manuscrito (Anexo 2 a 10).



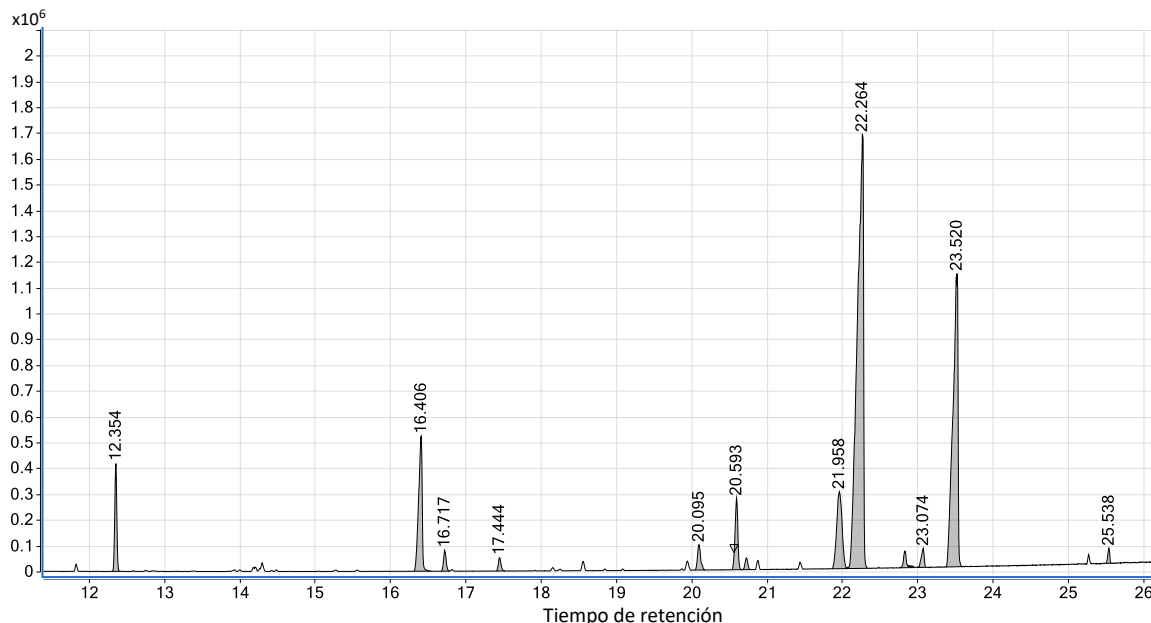
**Figura 3.4.** Cromatograma del extracto de alcaloides del bulbo de la muestra (ZFV10) de *Z. fosteri*. Se muestran los picos que corresponden a cada uno de los compuestos (alcaloides) que contiene la muestra y sus tiempos de retención (RT); (eje X) característicos. El área del pico es proporcional a la cantidad del compuesto en la muestra.

En el cuadro 3.2, se muestran los alcaloides mayoritarios presentes en los tres taxa. En *Z. alba* (ZAV) los alcaloides mayoritarios fueron la galantamina y clidantina, además de dos compuestos no identificados, denominados como  $m/z$  286(287) y  $m/z$  325(341).



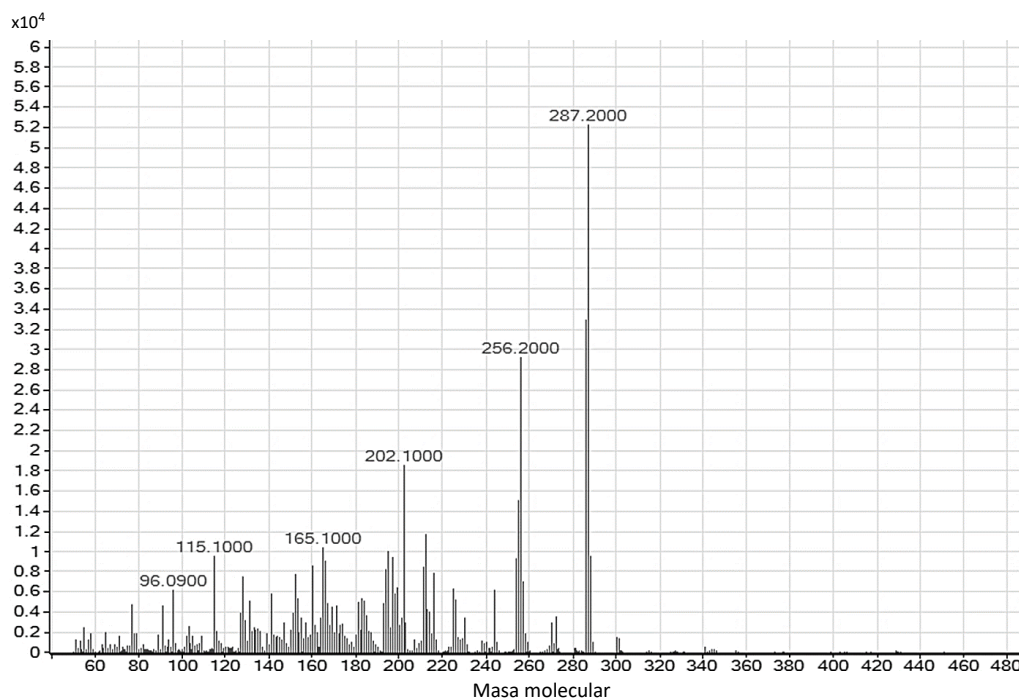
**Figura 3.5.** Cromatograma del extracto de alcaloides del bulbo de la muestra (ZA2) de *Z. alba*. Se muestran los picos que corresponden a cada uno de los alcaloides de la muestra y sus tiempos de retención (RT); (eje X) característicos. El área del pico es proporcional a la cantidad del compuesto en la muestra.

En *Z. fosteri* (ZFV) los alcaloides mayoritarios fueron la licorina y la tazetina, seguido de tres alcaloides no identificados, denominados como  $m/z$  272(341),  $m/z$  175(281) y  $m/z$  88(281) respectivamente. Por último, en cinco de las seis muestras de los IMA analizados, los alcaloides mayoritarios fueron la tazetina y licorina seguido de los dos alcaloides no identificados de  $m/z$  175(281) y  $m/z$  272(341). Finalmente, en una muestra de IMA el compuesto mayoritario fue un alcaloide no identificado, con  $m/z$  88(281), seguido de tazetina y otro alcaloide desconocido de  $m/z$  55(200) (Cuadro 3.2).



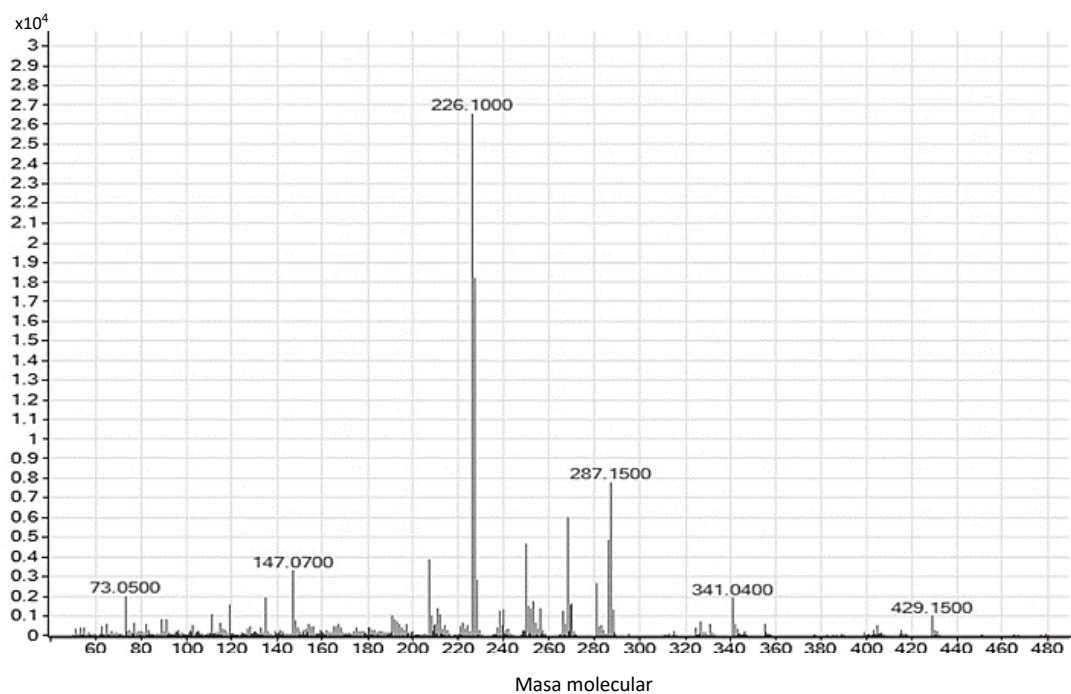
**Figura 3.6.** Cromatograma del extracto de alcaloides del bulbo de la muestra (IMA V8). Se muestran los picos que corresponden a cada uno de los alcaloides de la muestra y sus tiempos de retención (RT); (eje X) característicos. El área del pico es proporcional a la cantidad del compuesto en la muestra.

Debido a que los tres individuos analizados de cada especie parental (*Z. alba* y *Z. fosteri*) presentaron un perfil de alcaloides muy similar, se puede inferir que existe una fuerte relación intraespecífica y por lo tanto sus alcaloides mayoritarios podrían ser considerados como marcadores especie-específicos. Aunque el alcaloide licorina estuvo presente en los individuos de todas las muestras, en *Z. alba* fue minoritaria en comparación con *Z. fosteri* y los IMA. Por otro lado, sobresale que los alcaloides presentes en los individuos de *Z. fosteri* estuvieran presentes casi en su totalidad también en los individuos de IMA analizados, lo cual concuerda con los resultados morfométricos obtenidos en donde ambos taxones comparten mayor similitud que con *Z. alba*.

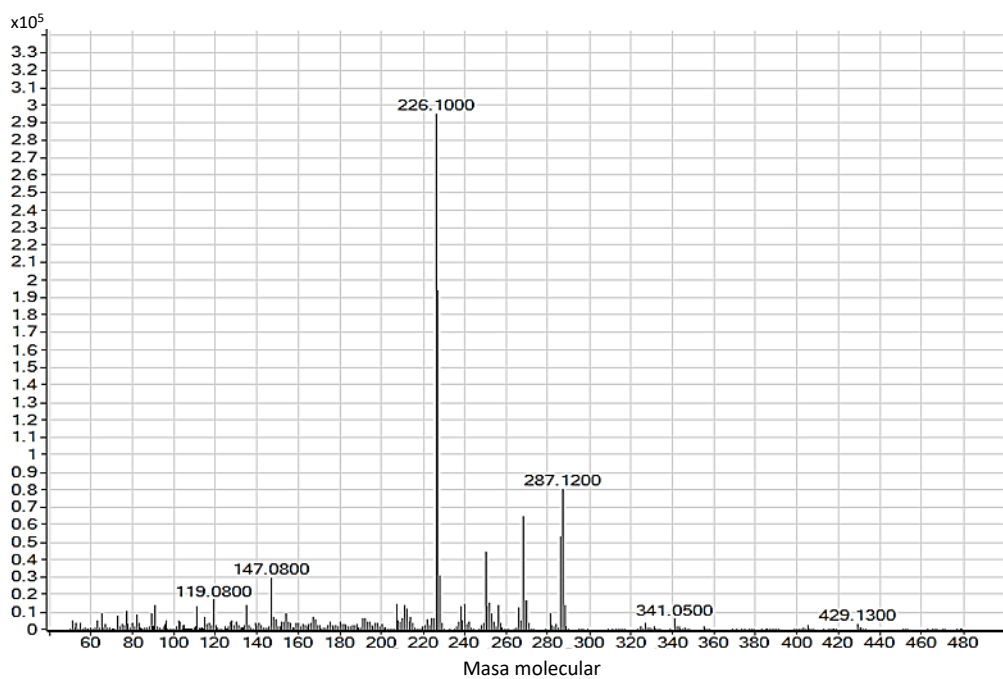


**Figura 3.7.** Espectro de masas del pico mayoritario del cromatograma de la muestra ZA2 de *Z. alba*. Se muestra el patrón de fragmentación del compuesto. El pico base (286) y el peso molecular del compuesto (287), los cuales son característicos del alcaloide galantamina.

La diferencia en el perfil de alcaloides entre estas dos especies, radicó en la presencia/ausencia de algunos alcaloides minoritarios y en el orden de abundancia de los alcaloides mayoritarios. Asimismo, los seis individuos analizados de los IMA, mostraron un patrón de expresión característico, como la tazetina como alcaloide mayoritario seguido de la licorina, con excepción de un individuo que mostró alcaloides mayoritarios no identificados.



**Figura 3.8.** Espectro de masas del pico mayoritario del cromatograma de la muestra de *Z. fosteri*. Se muestra el patrón de fragmentación del alcaloide licorina.



**Figura 3.9.** Espectro de masas del pico mayoritario del cromatograma de la muestra IMA V10. Se muestra el patrón de fragmentación del compuesto licorina.

Un aspecto que los individuos de *Z. fosteri* de esta localidad no hayan presentado el 3-demetoximesembranol, y mucho menos como alcaloide mayoritario, ya que este fue el alcaloide mayoritario en otras muestras colectadas con anterioridad, pero en la zona cultural de la REPSA en un estudio anterior (Centeno-Betanzos, 2014).

**Cuadro 3.2** Porcentaje de abundancia de los alcaloides mayoritarios detectados por (CG-EM) de la fracción alcaloidea de *Z. fosteri* (ZF), *Z. alba* (ZA) e IMA distribuidos en una zona mixta (Veterinaria, UNAM). Números en negrita denotan alcaloides exclusivos de cada taxa.

Compuesto	Muestras											
	<i>Habranthus concolor</i>			<i>Zephyrathes fosteri</i>			Individuos con morfología atípica					
	HCV2	HCV3	HCV4	ZFV5	ZFV3	ZFV10	IMA V2	IMA V5	IMA V8	IMA V4	IMA V9	IMA V10
Galantamina	<b>73.15</b>	<b>77.07</b>	<b>85.92</b>									
Clidantina	<b>9.86</b>		<b>0.96</b>									
Pancracina			<b>0.34</b>									
Licorina	6.52		96.36	26.79	34.70	11.79	11.74	18.43	25.57		19.87	27.91
Tazetina				20.55	25.90	8.74	48.71	29	46.08	10.10	54.33	54.74
Nortazetina											0.51	0.60
<i>m/z</i> 55(200)										<b>9.44</b>		
<i>m/z</i> 88(281)				0.79						10.93		
<i>m/z</i> 272(341)				9.96		2.69		6.52				
<i>m/z</i> 175(281)				4.64	5.28	2.05	4.20	4.31			5.95	5.14
<i>m/z</i> 175(247)									<b>8.32</b>			
<i>m/z</i> 273 (241)		<b>0.65</b>										
<i>m/z</i> 325(341)		<b>4.59</b>										
<i>m/z</i> 272(429)					9.65				7.11			3.10
<i>m/z</i> 183(405)					<b>0.43</b>							
<i>m/z</i> 135(405)						<b>1.76</b>						
<i>m/z</i> 295(403)						<b>0.55</b>						
<i>m/z</i> 381(429)						<b>0.88</b>						
<i>m/z</i> 279(341)						<b>0.78</b>						



## **Discusión:**

La delimitación de *Z. alba* y *Z. fosteri* en sitios de simpatría como el ubicado en el camellón de la REPSA frente a la Facultad de Veterinaria, en Ciudad Universitaria de la UNAM, es complejo (Centeno-Betanzos, 2014; Demián, 2010; Damián-Domínguez et al., 2009). Esto debido a que individuos de *Z. alba* y *Z. fosteri* pueden presentar características morfológicas parecidas como el color blanco de sus flores, longitud del escapo o el tiempo de floración. También a la presencia de individuos con morfología atípica como el color rosa pálido, longitud del escapo intermedio entre *Z. alba* y *Z. fosteri*, así como aspectos de su estructura interna, lo cual ha llevado a una confusión taxonómica aún sin resolver, especialmente en sitios en simpatría (Centeno-Betanzos, 2014; García, 2021). En este estudio, utilizamos un enfoque de marcadores múltiples (morfológicos, químicos y moleculares) por individuo para identificar las características fenotípicas y moleculares que permitieran la diferenciación de estas especies en sitios simpátridos.

En general, encontramos que en sitios simpátridos individuos de *Z. alba* y *Z. fosteri* pueden presentar características marcadas en su morfología floral (longitud de pétalos y estigmas), que permite distinguirlos como se describió en el Capítulo 2. Sin embargo, el análisis morfométrico también separó y anidó a individuos con una morfología distinta a las supuestas especies parentales como un grupo distinto pero con características similares entre ellos. Algunos caracteres morfológicos clave de la flor, usados en la identificación de las especies corresponden a la longitud del perianto, longitud del tubo, de los filamentos, el tipo de estigma y la posición de éste en relación con las anteras, caracteres que presentan cambios durante el desarrollo de la flor. Asimismo, el ancho de la hoja en relación con el ancho del escapo puede un aspecto morfológico útil. Las mediciones florales en especímenes de herbario deben hacerse

cuando la flor se encuentra en antesis, es decir, cuando las anteras están liberando polen. (Flagg et al. 2002, 2019).

En cuanto al contenido mayoritario de alcaloides en *Z. alba* de galantamina y en *Z. fosteri* de licorina se mantuvo a lo reportado en sitios alópatridos (Capítulo 2). Sin embargo, en 4 IMA de los 6 analizados, el alcaloide mayoritario fue la tazetina, mientras que en uno fue un alcaloide desconocido  $m/z$  88(281) y en otro la licorina como también lo presentaron los individuos analizados de *Z. fosteri*.

Por otro lado, el análisis molecular si bien separó a los individuos de *Z. alba* y *Z. fosteri*, el perfil molecular de los IMA fue contradictorio al resultado morfométrico y químico ya que éste análisis los IMA presentaron una afinidad molecular a *Z. alba* y no a *Z. fosteri*, lo que si bien se atribuye a un probable error de amplificación de los *primers* usados, también existe la probabilidad de que sean correctos y efectivamente los IMA sean genéticamente más parecidos a *Z. alba*, pero para descartar o no estas hipótesis se sugiere iniciar repitiendo el análisis con *primers* de mayor afinidad al género *Zephyranthes*. Además de establecer los caracteres morfológicos y fitoquímicos que permiten la diferenciación tanto de *Z. alba* como de *Z. fosteri*, en zonas simpátridas, los resultados de este estudio proporcionan un marco para futuros estudios destinados a determinar si se produce hibridación e introgresión entre estas especies.

Por otro lado, a pesar de que los caracteres moleculares han sido una herramienta útil en la solución de problemas sistemáticos y filogenéticos en grupos complejos, como por ejemplo la propuesta e incorporación de más tribus dentro de la familia Amaryllidaceae realizada por Meerow (1999), se ha documentado que la combinación de los caracteres moleculares con caracteres morfológicos, anatómicos y químicos tiene un alto valor informativo y práctico que sin duda, en conjunto pueden lograr delimitar a los taxones. Por un último, mientras los caracteres morfoanatómicos presentan una accesibilidad y facilidad para ser evaluados en el campo, o bajo la lupa

o un microscopio óptico sencillo, los caracteres químicos y/o moleculares por otro lado, pueden proveer de información muy precisa y en muchos casos contundente dando mejor solución a condiciones de ubicación taxonómicas complejas.

### **Conclusiones:**

- Los análisis de función discriminante utilizando los caracteres morfológicos de la flor, el bulbo y hoja muestran que en una zona simpátrida analizada (Facultad de Veterinaria, UNAM) se ordenan tres grupos correspondientes a cada taxón: *Z. fosteri*, *Z. alba* e IMA.
- Se determinó que los IMA de esta zona simpátrida comparten el 65% de los caracteres morfológicos con *Z. fosteri* y el 35% restante son intermedios entre sus especies parentales putativas.
- Los análisis químicos mostraron que *Z. fosteri* y *Z. alba* presentaron un perfil de alcaloides claramente diferente al igual que las zonas alopátridas (Capítulo 2). *Zephyranthes alba* presentó como compuestos mayoritarios galantamina y clidantina mientras que para *Z. fosteri* fueron licorina y tazetina. Por último, los IMA presentaron tazetina, licorina y nortazetina como compuestos mayoritarios.
- En las zonas simpátridas los individuos identificados morfológicamente como *Z. fosteri* y *Z. alba* presentaron un perfil genético diferente. Sin embargo, el perfil genético de los IMA coincidió con el de *Z. alba*, lo que se contrapone con los resultados morfológicos en donde los IMA presentan mayor similitud morfológica con *Z. fosteri*.

### Literatura citada:

- Arnold, M. L. 1993. *Iris nelsonii* (Iridaceae): origin and genetic composition of a homoploid hybrid species. *American Journal of Botany* 80: 577–591.
- Bacon, J. R., y R. Spellenberg. 1996. Hybridization in two distantly related Mexican black oaks *Quercus konzattii* and *Quercus eduardii* (Fagaceae: *Quercus*: section *Lobatae*). *SIDA* 17: 17–41.
- Bastida, J., Berkov, S., Torras, L., Pigni, N., de Andrade, J., Martínez, V., Cadina, C., Viladomat, F., 2011. In: Muñoz-Torrero, D. (Ed.), *Chemical and Biological Aspects of Amaryllidaceae Alkaloids. Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*. Transworld Research Network, Trivandrum, India, pp. 65–100.
- Calderón, G. y Rzedowski, J. 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. Co-edición entre el Instituto de Ecología, A. C. y la Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán.
- Centeno-Betanzos, L.Y. 2014. Estudio anatómico, químico y actividad biológica de *Zephyranthes fosteri*, *Habranthus concolor* y *Habranthus aff. concolor*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México, CdMx.
- Centeno-Betanzos, L. Y., Reyes-Chilpa, R., Pigni, N. B., Jankowski, C. K., Torras-Claveria, L., & Bastida, J. 2021. Plants of the '*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*' from Mexico, 1552. *Zephyranthes fosteri* (Amaryllidaceae) Alkaloids. *Chemistry and Biodiversity*, 18(3).
- Damián-Domínguez, M., Cano-Santana, Z. y Castellanos-Vargas, I. 2009. Fenología reproductiva de *Habranthus concolor* y *H. aff. concolor* (Amaryllidaceae) y su relación con la lluvia. En: Lot, A. y Cano-Santana, Z. Eds. *Biodiversidad del Ecosistema del Pedregal de San Ángel*. Coordinación de la Investigación Científica y Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel. Ciudad de México. 319-328.

- Damián, M. de J. 2010. Fenología Reproductiva de *Habranthus concolor* y *Habranthus aff. concolor* en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Angel, D.F. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Driebe, E. M y Whitham, T. G. 2000. Cottonwood hybridization affects tannin and nitrogen content of leaf litter and alters decomposition. *Oecologia* 123:99-107.
- Ellstrand, N. C., & Elam, D. R. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual review of Ecology and Systematics*, 24(1), 217-242.
- Falush, D., Stephens, M., and Pritchard, J. K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164(4), 1567-1587.
- Flagg, R.O. and W.S. Flory. 1976. Origins of three Texas species of *Zephyranthes*. *Pl. Life* 32:67–80.
- Flagg, R. y Smith, G. 2009. A new mexican *Habranthus* (Amaryllidaceae) and a key to the *Habranthus* of México and Southwestern USA. *Herbertia* 63: 174-1.
- Flagg, R. O., Smith, G. L., y García-Mendoza, A. J. 2019. Two New White-flowered Mexican *Zephyranthes* Species (Amaryllidaceae: Amaryllidoideae) with Different Breeding Systems. *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature*, 27(4), 222-230.
- García Cruz, K. P. 2017. Análisis químico y efecto citotóxico de extractos metanólicos y fracciones alcaloides de *Zephyranthes fosteri* (Amaryllidaceae) sobre las líneas tumorales humanas HeLa y SKLU-1 /. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- García Mendoza, Abisáí J. 2021. Amaryllidaceae. En: Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fonseca Juárez, Rosa María; Arias Montes, Salvador;

Grether González. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Harrison, R. G. 1993. Hybrids and hybrid zones: historical perspective. *In* R. G. Harrison [ed.], *Hybrid zones and the evolutionary process*, 3–12. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Howard, D. J., R. W. Preszler, J. Williams, S. Fenchel, y W. J. Boecklen. 1997. How discrete are oaks species? Insights from a hybrid zone between *Quercus grisea* and *Quercus gambelii*. *Evolution* 51: 747–755.
- Hubisz, M., Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* 9, 1322–1332.
- Hubisz, M. J., Falush, D., Stephens, M., and Pritchard, J. K. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular ecology resources*, 9 (5), 1322-1332.
- Jakobsson, M., & Rosenberg, N. A. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23(14), 1801-1806.
- Lara, S., y Dayanna, E. 2020. Evidencia genética de hibridación natural entre *Stenomesson aurantiacum* y *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae) (Bachelor's thesis, Quito: Universidad Tecnológica Indoamérica).
- Larcombe, M. J., Barbour, R. C., Jones, R. C., Vaillancourt, R. E., y Potts, B. M. 2016. Postmating barriers to hybridization between an island's native eucalypts and an introduced congener. *Tree genetics y genomes* 12: 26.
- López-Caamal, A. y Tovar-Sánchez, E. 2014. Genetic, morphological, and patterns of plant hybridization. *Revista Chilena de Historia Natural* 87:16.

- Marques, I., A. Rossello-Graell, D. Draper, y J. M. Iriondo. 2007. Pollination patterns limit hybridization between two sympatric species of *Narcissus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany* 94: 1352–1359.
- Ocampo-Bautista, F., Mussali-Galante, P., Alvarez, L., Marquina-Bahena, S., Valencia-Cuevas, L., Valencia-A, S., & Tovar-Sánchez, E. 2023. Natural Hybridization between *Bursera bicolor* × *B. glabrifolia* (Burseraceae) Complex: Molecular and Chemical Evidence. *Forests*, 14(7), 1382.
- Orians, C. M. 2000. The effects of hybridization in plants on secondary chemistry: Implications for the ecology and evolution of plant-herbivore interactions. *American Journal of Botany* 87:1749-1756.
- Pritchard, J., Stephens, M., Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959.
- Reyes-Chilpa, R., Berkov, S., Hernández-Ortega, S., Jankowski, C. K., Arseneau, S., Clotet-Codina, Bastida, J. 2011. Acetylcholinesterase-inhibiting Alkaloids from *Zephyranthes concolor*. *Molecules*, 16(11).
- Rieseberg, L. y Ellstrand, N. 1993. What can morphological and molecular markers tell us about plant hybridization?. *Critical Reviews in Plant Science* 12: 213-241.
- Samuel, R. 1999. Identification of hybrids between *Quercus petrea* and *Q. robur* (Fagaceae): results obtained with RAPD markers confirm allozyme studies based on the Got-2 locus. *Plant Systematics and Evolution* 217: 137–146.
- Savadi, S., Sowmya, K., Megha, V. S., Muralidhara, B. M., & Mohana, G. S. 2021. Genetic diversity and identification of interspecific hybrids of *Anacardium* species using microsatellites. *Brazilian Journal of Botany*, 44, 139-148.

- Savadi S, Muralidhara BM, Preethi P. 2020. Advances in genomics of cashew tree: molecular tools and strategies for accelerated breeding. *Tree Genet Genomes* 16:61.
- Smith, J. F., C. C. Burke, y W. L. Wagner. 1996. Interspecific hybridization in natural populations of *Cyrtandra* (Gesneriaceae) on the Hawaiian Islands: evidence from RAPD markers. *Plant Systematics and Evolution* 200: 61–77.
- Soltis, P. S., y Soltis, D. E. 2009. The role of hybridization in plant speciation. *Annual review of plant biology*, 60, 561-588.
- Soriano García, A. B. 2019. Propagación y perfil fitoquímico de *Habranthus concolor* Lindl. (Amaryllidaceae). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México, CdMx.
- StatSoft, Inc, 2007. STATISTICA (Data Analysis Software System) version 8. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
- Steinkellner, H., Lexer, C., Turetschek, E., Glössl, J., 1997. Conservation of (GA)<sub>n</sub> microsatellite loci between *Quercus* species. *Mol. Ecol.* 6, 1189–1194.
- Templeton, A. R. 1989. The meaning of species and speciation: a genetic perspective.
- Tovar-Sánchez, E. y Oyama, K. 2004. Natural hybridization and hybrid zones between *Quercus crassifolia* and *Quercus crassipes* (Fagaceae) in México: morphological and molecular evidence. *American Journal of Botany* 91: 1352-1363.
- Vaco Machado, A. 2011. Diferenciación genética e hibridación en especies del género *Baccharis* L.
- Vähä, J., Primmer, C. 2006. Efficiency of modelbased Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. *Mol. Ecol.* 15, 63–72.



- Wills, D., Hester, M., Liu, A., Burke, J., 2005. Chloroplast SSR polymorphisms in the Compositae and the mode of organellar inheritance in *Helianthus annuus*. *Theor. Appl. Genet.* 110, 941–947.
- Yarnes, C., Boecklen, W., Salminen, J. 2008. No simple sum: seasonal variation in tannin phenotypes and leaf-miners in hybrid oaks. *Chemoecology* 18: 39-51.

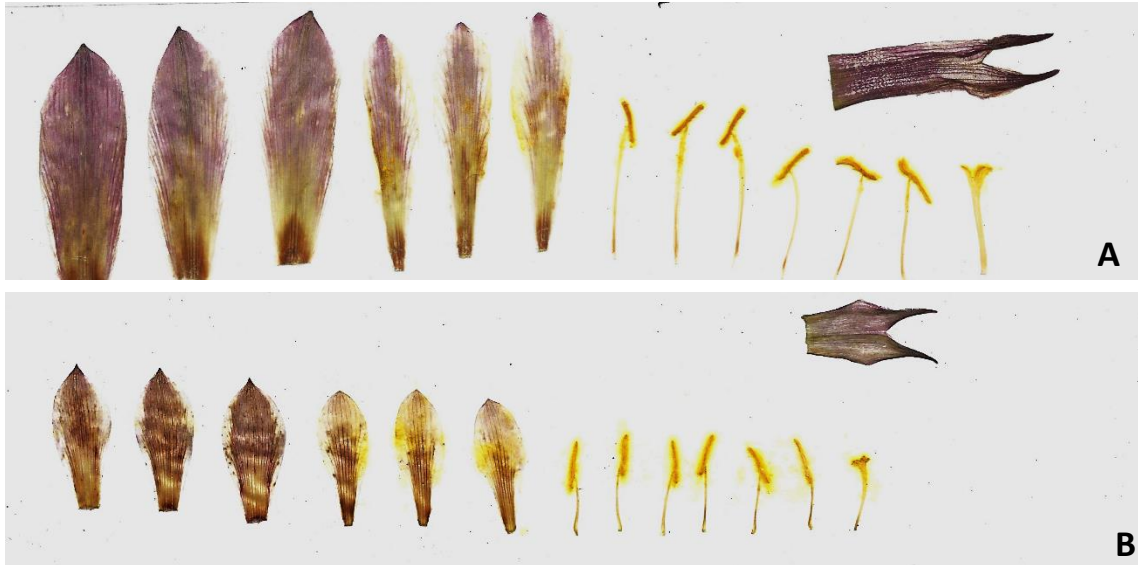
## CONCLUSIONES GENERALES:

---

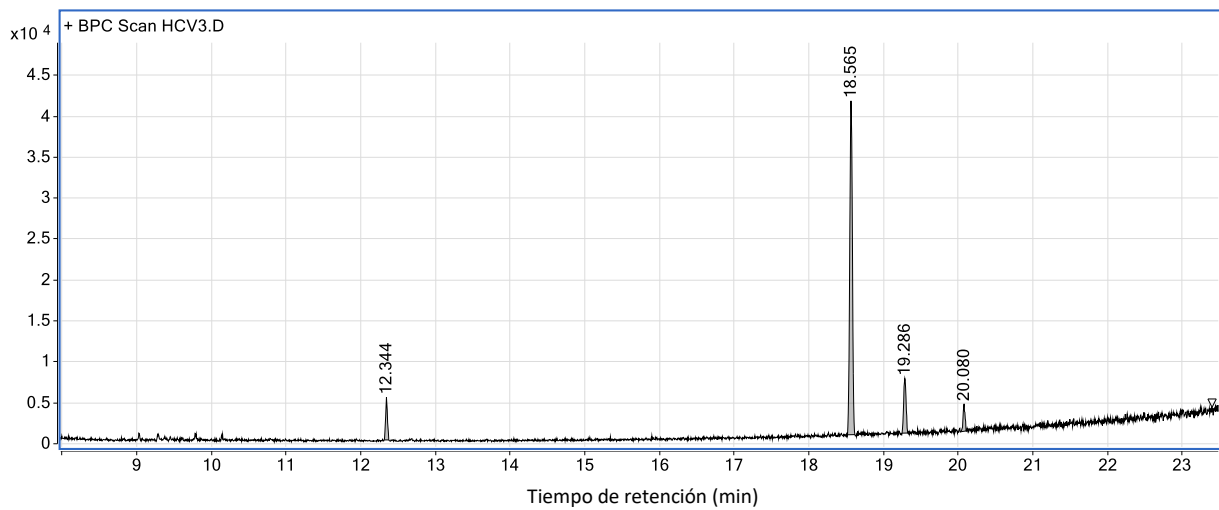
- Las especies *Z. fosteri*, *Z. concolor* y *Z. alba* se encuentran concentradas principalmente en el centro del país. De ellas *Z. fosteri* ocupa una extensión geográfica mayor y se encuentra mayormente representada en los ejemplares de herbario consultados.
- Los análisis de función discriminante de los caracteres morfológicos de la flor, el bulbo y hoja en una zona simpátrida (Facultad de Veterinaria, UNAM) se ordenaron tres grupos correspondientes a *Z. fosteri*, *Z. alba* e IMA (Individuos con Morfometría Atípica).
- Se determinó que los IMA de la zona simpátrida analizada comparte el 65% de los caracteres morfológicos con *Z. fosteri* y el 35% intermedio entre sus especies parentales putativas.
- Los análisis químicos mostraron que *Z. fosteri* y *Z. alba* presentaron un perfil de alcaloides claramente diferente en zonas alopátricas y simpátricas.
- *Zephyranthes alba* presentó como compuestos mayoritarios galantamina y clidantina mientras que en *Z. fosteri* fueron la licorina y tazetina y en los IMA fue la tazetina, licorina y nortazetina.
- En las zonas simpátricas *Z. fosteri* y *Z. alba* presentaron un perfil genético distinto. Sin embargo, el perfil genético de los IMA coincidió con el de *Z. alba*, lo que se contrapuso con los resultados morfológicos en donde los IMA presentan mayor similitud morfológica con *Z. fosteri*.
- La genética (nSSR), morfología (flor, bulbo, escapo, y hoja), y alcaloides caracterizaron a *Z. alba* y *Z. fosteri* en localidades alopátricas y la zona simpátrica analizada.

**ANEXOS:**

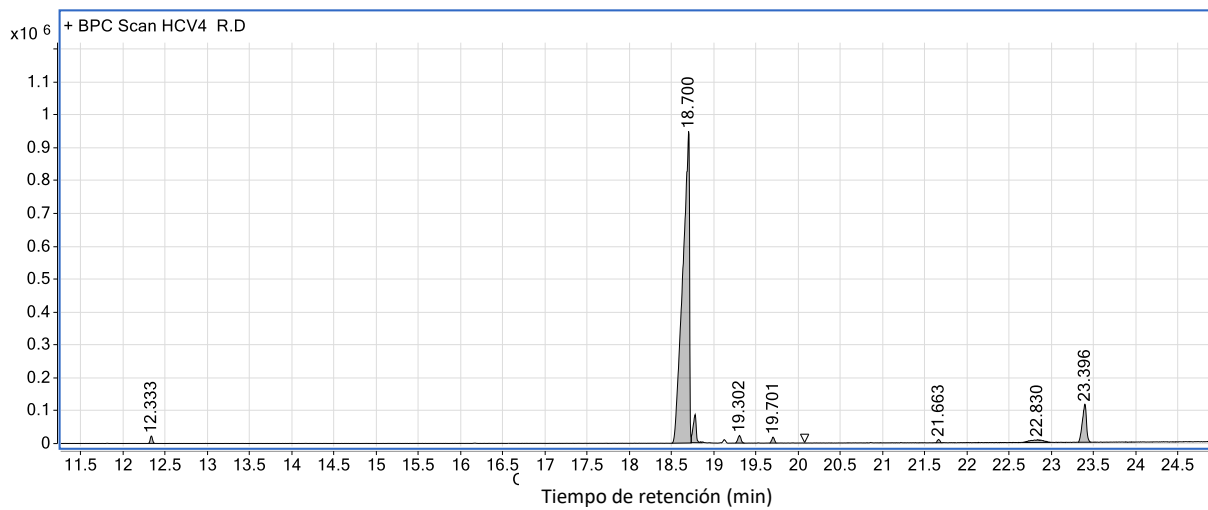
**Anexo 1.** Imágenes de la disección de las partes florales. La parte de arriba muestra los verticilos secos de *Z. alba* (A) y la de abajo los verticilos secos de *Z. fosteri* (B): Fotos: Lucía Y. Centeno.



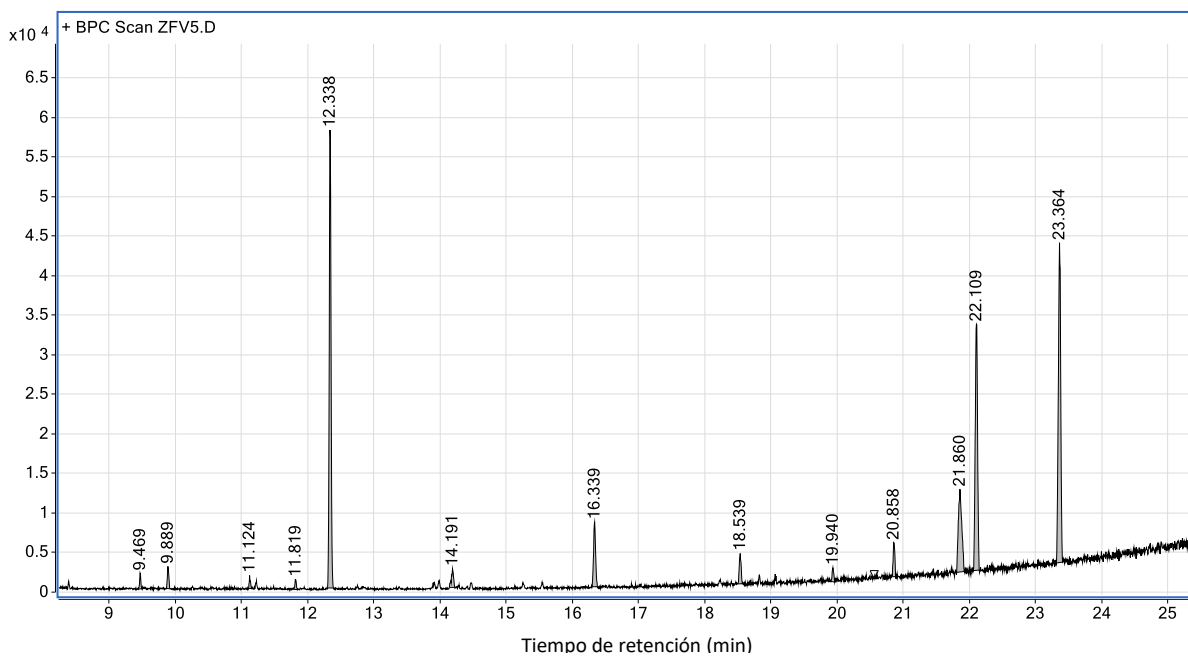
**Anexo 2.** Cromatograma del extracto de alcaloides del bulbo de un individuo (HCV3) de *Z. alba* en zona simpátrida. Se muestran los picos correspondientes a cada uno de los compuestos con sus tiempos de retención (RT).



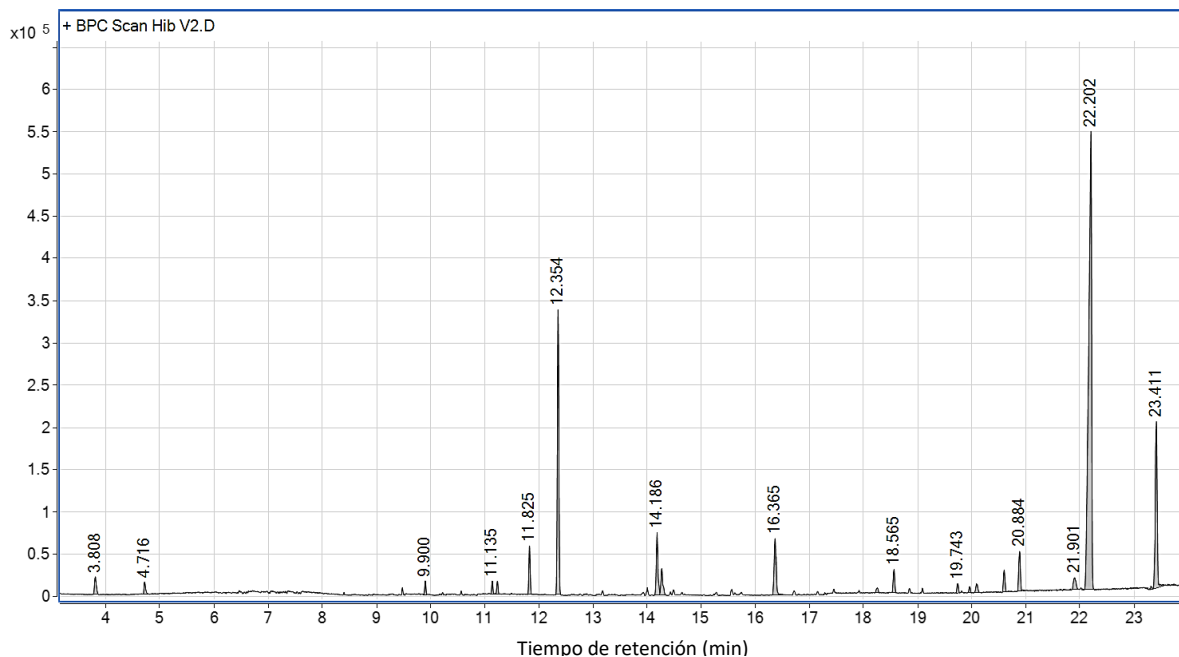
**Anexo 3.** Cromatograma del extracto de alcaloides del bulbo de un individuo (HCV4) de *Z. alba* en zona simpátrida. Se muestran los picos correspondientes a cada uno de los compuestos con sus tiempos de retención (RT).



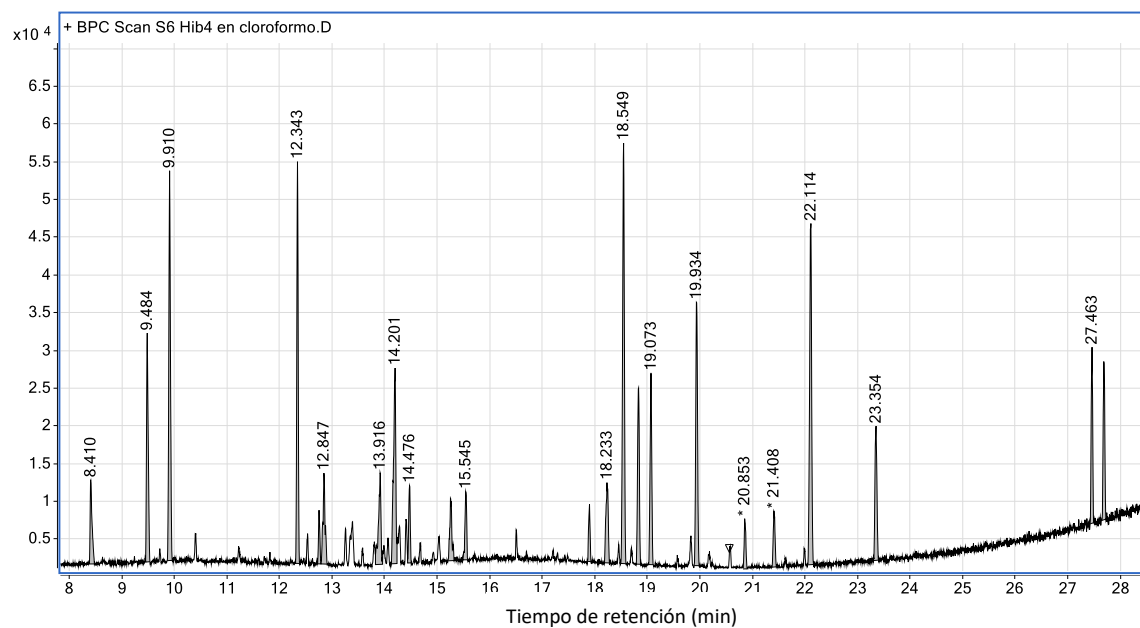
**Anexo 4.** Cromatograma del extracto de alcaloides del bulbo de un individuo (ZFV5) de *Z. fosteri* en zona simpátrida. Se muestran los picos correspondientes a cada uno de los compuestos con sus tiempos de retención (RT).



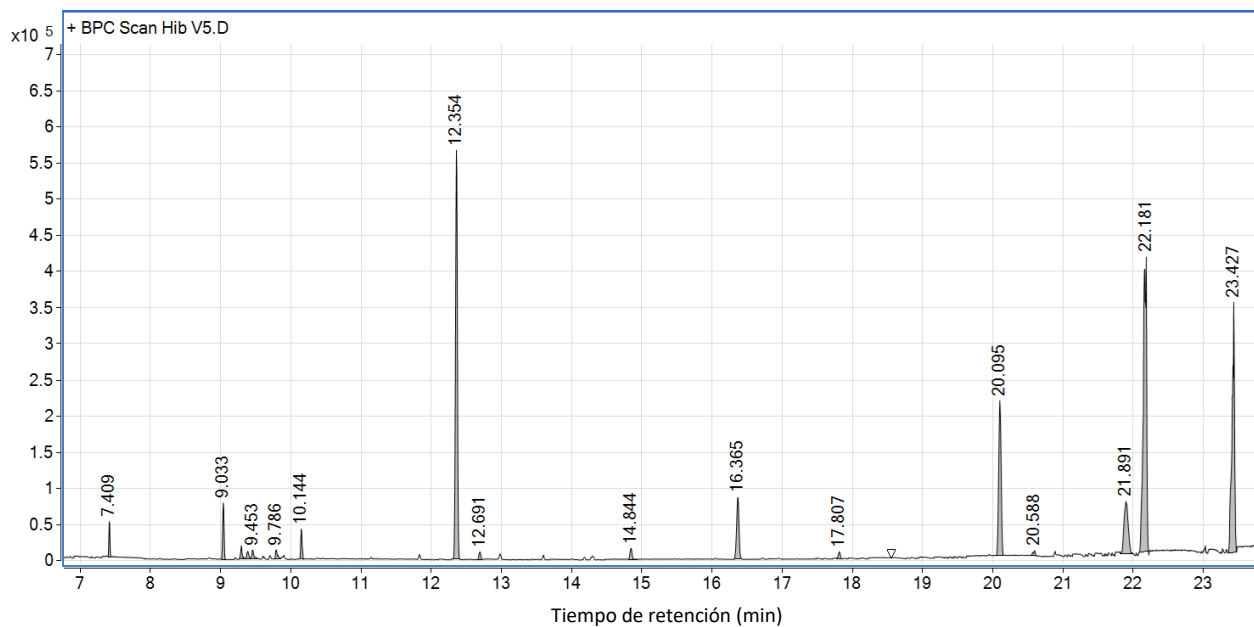
**Anexo 5.** Cromatograma del extracto de alcaloides del bulbo de un individuo de (Hib 2) IMA en una zona simpátrida. Se muestran los picos correspondientes a cada uno de los compuestos con sus tiempos de retención (RT).



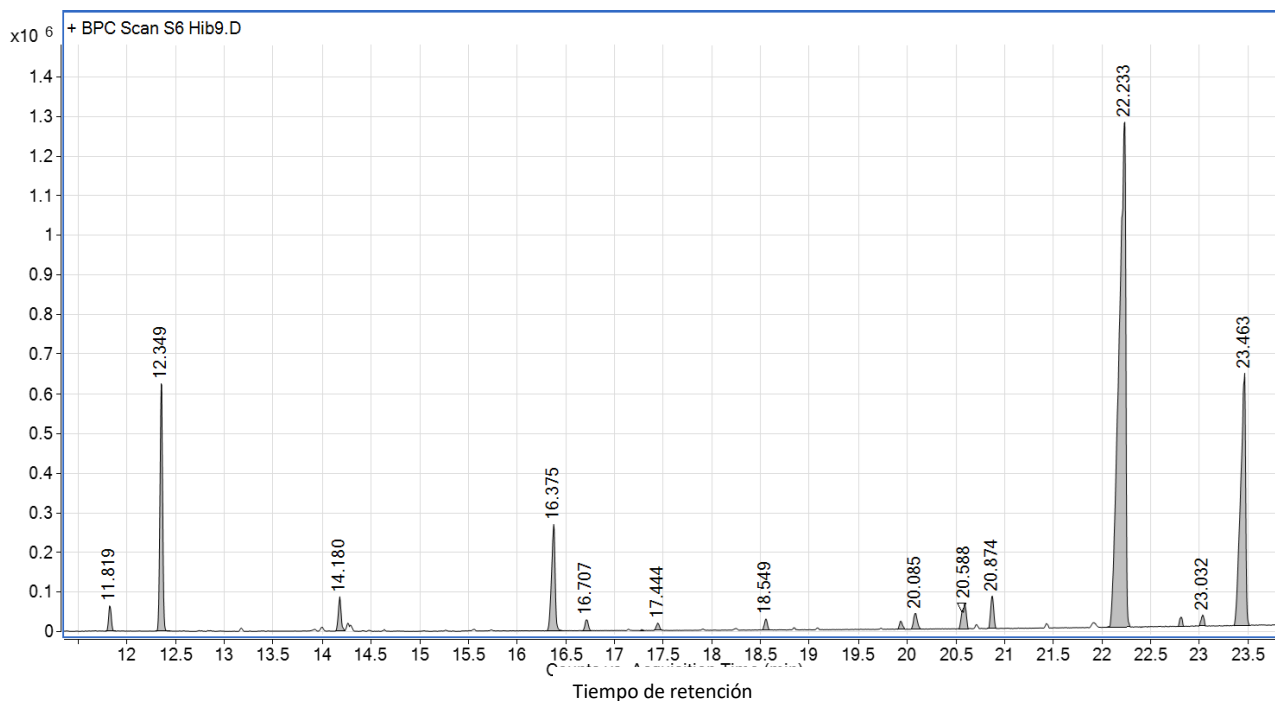
**Anexo 6.** Cromatograma del extracto de alcaloides del bulbo de un individuo de (Hib 4) IMA en una zona simpátrida. Se muestran los picos correspondientes a cada uno de los compuestos con sus tiempos de retención (RT).



**Anexo 7.** Cromatograma del extracto de alcaloides del bulbo de un individuo de (Hib 5) IMA en una zona simpátrida. Se muestran los picos correspondientes a cada uno de los compuestos con sus tiempos de retención (RT).



**Anexo 8.** Cromatograma del extracto de alcaloides del bulbo de un individuo de (Hib 9) IMA en una zona simpátrida. Se muestran los picos correspondientes a cada uno de los compuestos con sus tiempos de retención (RT).



**Anexo 9.** Cromatograma del extracto de alcaloides del bulbo de un individuo de (Hib 10) IMA en una zona simpátrida. Se muestran los picos correspondientes a cada uno de los compuestos con sus tiempos de retención (RT).

